Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Organizacion CSA Ltda

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 00024874

54. **TÍTULO** PEPTIDOS MACROCICLICOS ACTIVOS FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C.

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A61K 38/00 (PRO)

71. **SOLICITANTE** BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD.

DOMICILIO Laval, Québec, Canadá.

74. **APODERADO** EMILIO FERRERO
Código No 1092

22. **BOGOTÁ, D. C.,** 00-04-05

202037.
7 02090

(FORMA P-10)

21. **EXPEDIENTE No.** 00-24874

54. **TITULO** PEPTIDOS MACROCICLICOS ACTIVOS FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C.

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** A61K 38/00 (Prov)

71. **SOLICITANTE** BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD.

DOMICILIO Laval, Québec, Canadá.

74. **APODERADO** EMILIO FERRERO

Código No. 1092

22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.** 00-04-05

12

202037

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00024874 00000000 Folios: 174
Fecha (AMD): 2000-04-05 17:34:12
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TI 00 24874 FO: 01 ACTUACION: 01

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social: **BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD.**

No. de Identificación:

Representante Legal (Persona Jurídica):

País de Domicilio: **Canadá**

Departamento o Estado:

Dirección: **Laval, Québec, H7S 2G5**

Ciudad: **2100 Cunard,**

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre: **EMILIO FERRERO**

Dirección y Domicilio: **Carrera 4 No. 72-35 Piso 4o**

Ciudad: **Bogotá, Colombia**

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es):
1- Youla S. TSANTRIZOS
2- Dale R. CAMERON
3- Anne-Marie FAUCHER
4- Elise GHIRO
5- Nathalie GOUDREAU
6- Teddy HALMOS
7- Montse LLINAS-BRUNET.

Identificación / Dirección / Ciudad:
1- 1590 Champigny, Saint-Laurent (Québec), H4L 4P7, Canadá.
2- 493 Rue de L'Erabliére, Rosemére (Québec), J7A 4MA, Canadá.
3- 11 Lefebvre Nord, Oka (Québec), J0N 1E0, Canadá.
4- 768 Pierre Laval (Québec) H7X 3L8 Canadá, Canada.
5- 416 Graham, Mont-Royal (Québec), H3P 2C9, Canadá.
6- 1935 Jean Picard, # 8, Laval(Québec) H7T 2K4, Canadá.
7- 14 Rushbrooke, Dollard-des-Ormeaux (Québec), H9B 3K6, Canadá.

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención: **PEPTIDOS MACROCICLICOS ACTIVOS FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C.**

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐ TIPO DE PRIORIDAD ANDINA ☐ UNIONISTA ☒

(33) País	Fecha	No. Solicitud
US. Convención de París.	6 de abril de 1999	60/128.011

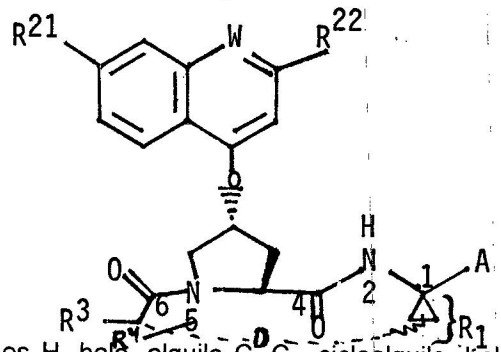
Para Publicar a los ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

Colo: 11041-801-005-1
RCB/MRM-iD- 27

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL : C07C 101/000

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención cubre compuestos macrocíclicos de fórmula I activos in vitro y en ensayos celulares contra la NS3 proteasa de virus de la hepatitis C.



(I)

en la que W es CH o N; R^{21} es H, halo, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo, haloalquilo, alcoxi C_1-C_6, cicloalcoxi, hidroxi o $N(R^{23})_2$, en dond cada R^{23} es independientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalcoxi; y R^{22} es H, halo, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, haloalquilo C_1-C_6, tioalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, cicloalcoxi C_3-C_6, alcoxi C_2-C_7-alquilo, cicloalquilo C_3-C_6, arilo C_6 o C_{10} o Het, en donde Het es un heterociclo de cinco, seis o siete miembros, saturado o insaturado, que contiene de uno a cuatro heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; estando dichos cicloalquilo, arilo o Het sustituido con R^{24}, en donde R^{24} es H, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, alcoxi C_1-C_6, cicloalcoxi C_3-C_6, $N0_2$, $N(R^{25})_2$; NH-C(O)-R^{25}, o NH-C(O)-NH-R^{25}, en donde cada R^{25} es independientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6; o R^{24} es NH-C(O)-OR^{26}, en

Continua.....

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	X
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC	X
Recibo de la tasa respectiva por v/r de $608.000,=	X
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia de la primera solicitud	
Traducción oficial	
Si se reivindica prioridad Unionista:	
Copia certificada de la primera solicitud:	
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción simple	
Capítulo descriptivo	X
Dibujos, planos necesarios	
Capítulo reivindicatorio	X
Tarjeta archivo propietarios según formato	X
Tarjeta archivo temático según formato	X
Extracto para publicación según formato	X
Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms	
Otros Documentos	

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE EMILIO FERRERO CC 438.010 de Usaquén

Resumen:

es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6; R^3 es hidroxi, NH_2, o un grupo de fórmula -NH-R^{31}, en donde arilo C_6 o C_{10}, heteroarilo, -C(O)-R^{32}, -C(O)-OR^{32} o -C(O)-NHR^{32}, en donde R^{32} es alquilo C_1-C^6 o iquilo C_3-C_6; D es una cadena de alquileno de 5 a 10 átomos, saturada o insaturada, que comtiene onalmente uno a tres heteroátomos independientemente elegidos entre O, S o N-R^{41}, en donde R^{41} es alquilo $_{C1-C6,}$ cicloalquilo, o C(O)-R^{42} en donde R^{42} es alquilo C_1-C_6, cicloalquilo o arilo C_6 o C_{10}; R^4 es H o uno a tres sustituyentes en cualquier átomo de carbono de dicha cadena D, siendo dicho sustituyente egido independientemente entre el grupo formado por alquilo C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, droxi, halo, amino, oxo, tio o tioalquilo C_1-C_6, y A es una amida de fórmula -C(O)-NH-R^5 en donde R^5 se ige entre el grupo formado por alquilo C_1-C_8, cicloalquilo C_3-C_6, arilo C_6 o C_{10} o aralquilo C_7-C_{16}; o A es un áido carboxílico o una sal o éster del mismo aceptable farmacológicamente.

PEPTIDOS MACROCICLICOS ACTIVOS FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C.

CAMPO DE LA INVENCION.

La presente invención se refiere a compuestos y 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 170 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-ex-

posición, 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 pocos años, 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 fue aprobado originalmente para pacientes que no responden al IFN solo. Ahora ha sido aprobado para pacientes simples y actualmente constituye el "patrón oro" en la terapia del HCV. 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 estructurales (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.

Algunos 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 (documento WO 98/22496; patente de EE. UU. n° 5.866.684 y patente de EE.UU. n° 6.018.020) 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).

El documento WO 97/43310 de Schering Corporation describe secuencias peptídicas de 20 y 21 aminoácidos activas contra la NS3 proteasa del HCV.

El documento WO 98/46597 de la Emory University describe péptidos y simulaciones de péptidos activos *in vitro* contra proteasas de serina.

El documento WO 98/46630 de Peptide Therapeutics Limited describe sustrato depsipeptídico que inhibe la NS3 proteasa del HCV.

Finalmente, la patente de EE.UU. nº 5.869.253 describe moléculas de RNA enzimáticas que inhiben la NS3 proteasa del HCV.

Ninguna de las anteriores solicitudes de patente descritas antes describe o sugiere péptidos cíclicos activos y selectivos contra la NS3 proteasa del virus de la hepatitis C.

Los documentos WO 99/07733, WO 99/07734, WO 00/09543 y WO 00/09558 describen de hexa a tetra-péptidos y análogos de tripéptidos que inhiben la NS3 proteasa. Sin embargo estas descripciones no sugieren ni llevan al diseño de análogos macrocíclicos de la presente invención.

El documento WO 99/38888 publicado el 5 de agosto de 1999 por el Institute de Richerche di Biologia Moleculare (IRBM) describe inhibidores de péptidos pequeños de la NS3 proteasa del HCV. No hay nada en esta descripción que sugiera o indique la naturaleza cíclica de los péptidos de la presente invención. Además, esta solicitud PCT fue publicada después de la fecha de prioridad de la presente solicitud.

El documento WO 99/64442 del IRBM, también publicado después de la fecha de prioridad de esta solicitud, describe oligopéptidos con cetoácidos en P1.

El documento WO 99/50230 de Vertex Pharmaceuticals (publicado el 7 de octubre de 1999) fue también publicado después de la fecha de prioridad de la presente solicitud. Incluso así, la publicación no sugiere ni remotamente ninguno de los péptidos cíclicos de la presente invención.

Una ventaja de la presente invención es que proporciona péptidos macrocíclicos que son inhibidores para la NS3 proteasa del virus de la hepatitis C.

Otra ventaja 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

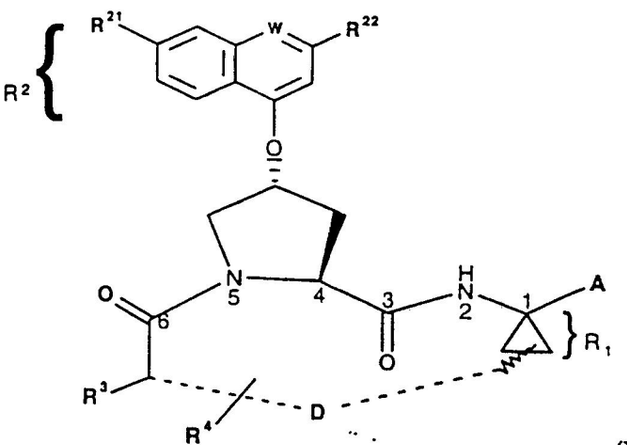
contra otras proteasas de serina tales como la eslastasa leucocitaria humana (HLE), elastasa pancreática porcina (PPE), o quimiotripsina pancreática bovina, o proteasas de cisteína tales como la catepsina B hepática humana (Cat B).

Otra ventaja de la presente invención es que proporciona péptidos pequeños de bajo peso molecular que son capaces de atravesar las membranas de las células e inhiben la actividad de la NS3 proteasa en cultivos de células.

Otra ventaja más de los compuestos de la presente invención reside en el hecho de que son activos en ambos genotipos principales encontrados en aislados clínicos (1a y 1b), sugiriendo fuertemente que este compuesto será activo contra todos los genotipos del HCV conocidos actualmente.

SUMARIO DE LA INVENCION.

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



(I)

en la que W es CH o N,

R^{21} es H, halo, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, haloalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, cicloalcoxi C_3-C_6, hidroxi o $N(R^{23})_2$, en donde R^{23} es idependientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6; y

R^{22} es H, halo, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, haloalquilo C_1-C_6, tioalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, cicloalcoxi C_3-C_6, alcoxi C_2-C_7-alquilo, cicloalquilo C_3-C_6, arilo C_5 o C_{10} o Het, en

donde Het es un heterociclo de cinco, seis o siete miembros, saturado o insaturado, que contiene de uno a cuatro heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; estando dichos cicloalquilo, arilo o Het sustituidos con R^{24},

en donde R^{24} es H, halo, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, alcoxi C_1-C_6, cicloalcoxi C_3-C_6, NO_2, $N(R^{25})_2$; NH-C(O)-R^{25}, o NH-C(O)-NH-R^{25},

en donde cada R^{25} es independientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;

o R^{24} es NH-C(O)-OR^{26} en donde R^{26} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;

R^3 es hidroxi, NH_2, o un grupo de fórmula -NH-R^{31}, en donde R^{31} es arilo C_6 o C_{10}, heteroarilo, -C(O)-R^{32}, -C(O)-OR^{32}, o -C(O)-NHR^{32},

en donde R^{32} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;

D es una cadena de alquileno de 5 a 10 átomos saturada o insaturada, que opcionalmente contiene uno a tres heteroátomos independientemente elegidos entre O, S o N-R^{41}, en donde R^{41} es H, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, o -C(O)-R^{42} en donde R^{42} es alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6 o arilo C_6 o C_{10};

R^4 es H o de uno a tres sustituyentes en cualquier átomo de carbono de dicha cadena D, dicho sustituyente elegido independientemente entre el grupo formado por alquilo C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, hidroxi, halo, amino, oxo, tio o tioalquilo C_1-C_6,

y

A es una amida de fórmula -C(O)-NH-R^5 en donde R^5 se elige entre el grupo formado por alquilo C_1-C_8, cicloalquilo C_3-C_6, arilo C_6 o C_{10} o aralquilo C_7-C_{16};

o A es un ácido carboxílico o una sal o éster del mismo farmacológicamente 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 administrándole 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.

Otro aspecto más 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. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores adicionales incluyen, pero no se limitan a ellos, α-, β- y δ-interferones.

De acuerdo con una realización alternativa, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden comprender adicionalmente un agente antiviral. Los ejemplos de agentes antivirales incluyen ribavirina y amantadina.

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

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

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

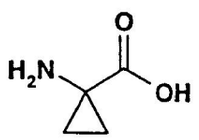
Definiciones.

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

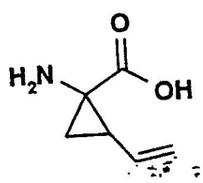
Con referencia a los casos en los que se usan *(R)* o *(S)* para designar la configuración absoluta de un sustituyente, p. ej. R^4, del compuesto de fórmula I, la designación se hace en el contexto del compuesto completo y no en el contexto de solamente el sustituyente.

La designación "P1, P2, P3, etc." como se usa en el presente texto se refiere a la posición de los restos de aminoácidos partiendo del extremo del término C de los análogos de péptido y prolongándose hacia el término N (es decir, P1 se refiere a la posición 1 a partir del término C, P2: segunda posición a partir del término C, etc.) (véase Berger A. y Schechter I., Transactions of the Royal Society London series B257, 249-264 (1970)).

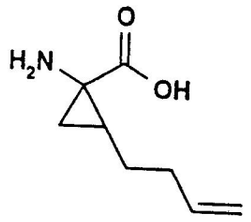
Como se usa en el presente texto, la expresión "ácido 1-aminociclopropil-carboxílico" (ACCA) se refiere a un compuesto de fórmula:



Como se usa en el presente texto, la expresión "vinil-ACA" se refiere a un compuesto de fórmula:



Como se usa en el presente texto, la expresión "homo-alil-ACA" se refiere a un compuesto de fórmula:



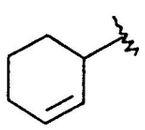
El término "halo" como se usa en el presente texto significa un sustituyente de halógeno elegido entre bromo, cloro, flúor o yodo.

La expresión "haloalquilo C_1-C_6" 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 uno a seis átomos de carbono que tienen uno o más hidrógenos sustituidos con un halógeno elegido entre bromo, cloro, flúor o yodo.

La expresión "tioalquilo C_1-C_6" 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 un grupo tiol, tal como un tiopropilo.

La expresión "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 uno a seis átomos de carbono, e incluye, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo, 1-metiletilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo.

La expresión "cicloalquilo C_3-C_6" 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 seis átomos de carbono, e incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. La expresión "cicloalquilo insaturado" incluye, por ejemplo, el sustituyente ciclohexenilo:



La expresión "alquileno saturado o insaturado" como se usa en el presente texto, significa un sustituyente de alquilo divalente derivado de la eliminación 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 $-CH_2C\equiv CCH_2CH_2-$.
Esta cadena de alquilo puede contener opcionalmente un heteroátomo tal como oxígeno (por ejemplo: $CH_3-CH_2-O-CH_2-$).

La expresión "alcoxi C_1-C_6" como se usa en el presente texto, bien sea solo o en combinación con otro sustituyente, significa el sustituyente -O-alquilo C_1-C_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.

La expresión "cicloalquilo C_3-C_6" como se usa en el presente texto, bien sea solo o en combinación con otro sustituyente, significa el sustituyente -O-cicloalquilo C_3-C_6 que contiene de tres a seis átomos de carbono.

La expresión "alcoxi C_1-C_6 alquilo" como se usa en el presente texto, significa el sustituyente (alquilo C_1-C_6)-O-(alquilo C_1-C_6), en la que alquilo es como se definió anteriormente, que contiene hasta seis átomos de carbono. Por ejemplo, metoximetilo significa $-CH_2-O-CH_3$.

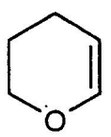
La expresión "acilo C_2-C_7" como se usa en el presente texto, bien sea solo o en combinación con otro sustituyente, significa un grupo alquilo C_1-C_6 unido a través de un grupo carbonilo tal como -C(O)-(alquilo C_1-C_6).

La expresión "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 bien un sistema bicíclico aromático que contiene 10 átomos de carbono. Por ejemplo, arilo incluye un sistema de anillo de fenilo o de naftilo.

La expresión "aralquilo C_7-C_{16}" como se usa en el presen-

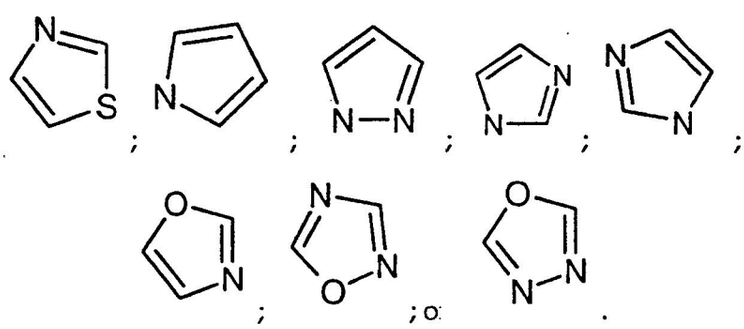
te texto, bien sea solo o en combinación con otro sustituyente, significa un arilo como se definió anteriormente unido a través de un grupo alquilo C_1-C_6, en donde el alquilo es como se definió anteriormente que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. El aralquilo incluye por ejemplo bencilo y butilfenilo.

El término "Het" como se usa en el presente texto, bien sea solo o en combinación con otro sustituyente, significa un sustituyente monovalente derivado por eliminación de un hidrógeno de un heterociclo de cinco, seis o siete miembros, saturado o insaturado (incluyendo aromático), que contiene de uno a cuatro heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Los ejemplos de heterociclos adecuados incluyen: tetrahidrofurano, tiofeno, diazepina, isoxazol, piperidina, dioxano, morfolina, pirimidina o

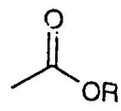


El término "Het" incluye también un heterociclo como se definió anteriormente fusionado con uno o más de otros ciclos, sea un heterociclo o cualquier otro ciclo. Un ejemplo de estos incluye tiazolo[4,5-b]-piridina.

Aunque generalmente se encuentra bajo el término "Het", el término "heteroarilo" como se usa en el presente texto define con precisión un heterociclo insaturado para el cual los dobles enlaces forman un sistema aromático. Los ejemplos adecuados de sistema heteroaromático incluyen: quinoleína, indol, piridina,



La expresión "éster aceptable farmacéuticamente" como se usa en el presente texto, bien sea solo 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 término carboxi, está reemplazada por una función alcoxicarbonilo:



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-C_4 o alcoxi C_1-C_4. Otros ésteres profármacos adecuados se encuentran 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-C_{16}, un éster de bencilo no sustituido o un éster de bencilo sustituido con al menos un halógeno, alquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, nitro o trifluorometilo.

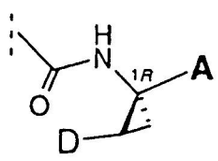
La expresión "sal aceptable farmacéuticamente" como se usa en el presente texto incluye las sales derivadas de bases aceptables farmacéuticamente. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen colina, etanolamina y etilendiamina. Las sales de Na^+, K^+ y Ca^{++} se consideran también dentro del alcance de la

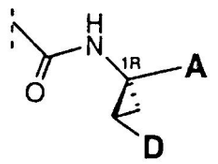
invención (véase también Pharmaceutical Salts, Birge, S.M. et al., J. Pharm. Sci. (1977), 66, 1-19, incorporada al presente texto como referencia).

Realizaciones preferidas.

R^1:

Las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen compuestos de fórmula I como se describió anteriormente, en la que el resto R^1 se elige entre los dos distintos diaesteroisómeros donde el centro del carbono 1 tiene la configuración *R* representada por las estructuras (i) y (ii):



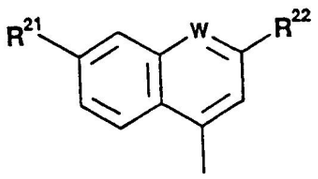


D syn respecto a la amida (i) o D syn respecto a A (ii)

Más preferentemente, el enlazador D está unido a R^1 en la configuración *syn* respecto a A como se representa por la estructura (ii).

R^2:

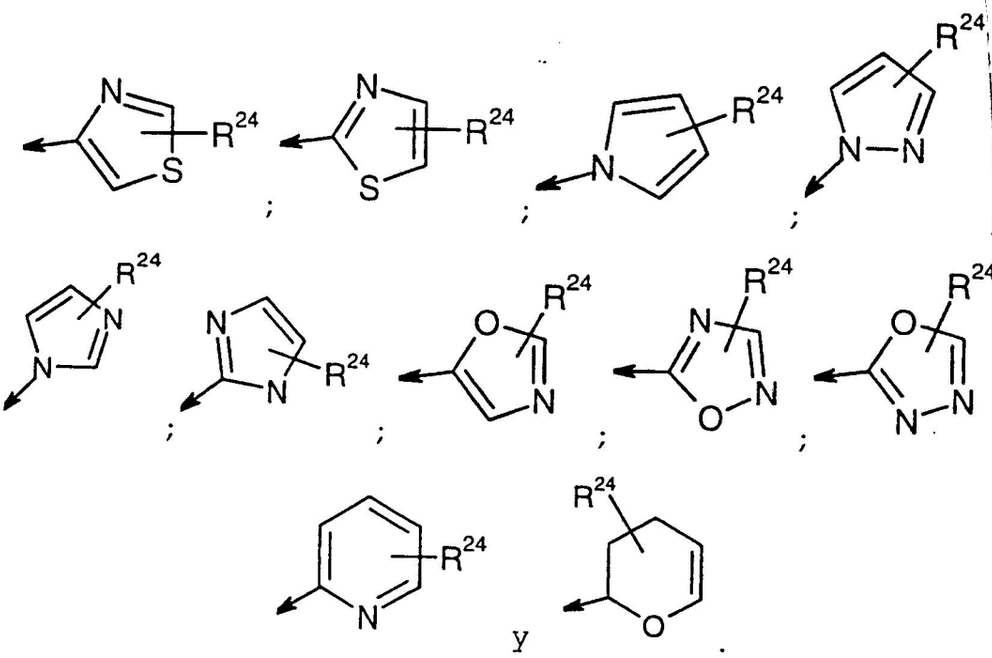
Las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen compuestos de fórmula I como se describió anteriormente, en la que el resto R^2 es:



en donde W es preferentemente N.

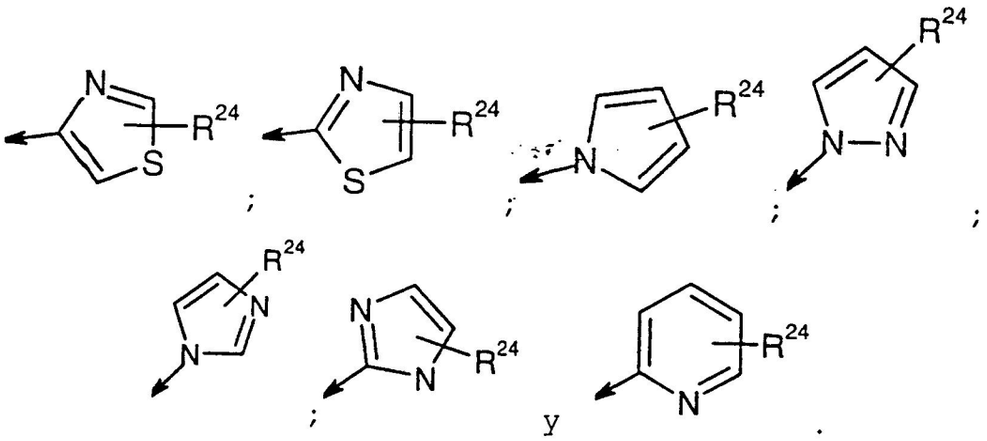
Preferentemente, R^{21} es H, alquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, hidroxi, cloro o $N(R^{23})_2$ en donde R^{23} es preferentemente H o alquilo C_1-C_6. Más preferentemente, R^{21} es H o alcoxi C_1-C_6. Lo más preferentemente R^{21} es metoxi.

Preferentemente R^{22} es H, tioalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, fenilo o Het elegido entre el grupo formado por:



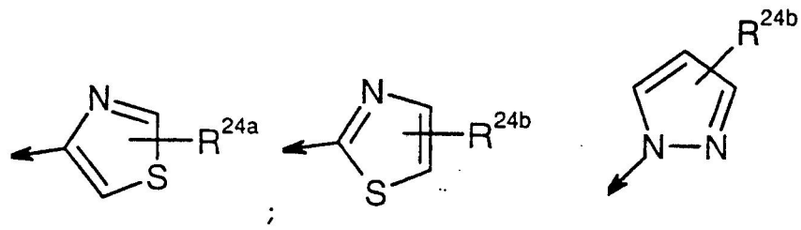
Preferentemente, R^{24} es H, alquilo C_1-C_6, NH-R^{25}, NH-C(O)-R^{25}; o NH-C(O)-NH-R^{25} o NH-C(O)OR^{26}.

Más preferentemente R^{22} es alcoxi C_1-C_4, fenilo o het elegido entre el grupo formado por:



Más preferentemente, R^{24} es H, alquilo C_1-C_6, NH-R^{25}, NH-C(O)-R^{25}; o NH-C(O)-OR^{26}.

Lo más preferentemente R^{22} es etoxi, o Het elegido entre el grupo formado por:



;

Lo más preferentemente, R^{24a} es NH-R^{25}, NH-C(O)-R^{25} o NH-C(O)-OR^{26}. Lo más preferentemente R^{24b} es H o alquilo C_1-C_6.

Preferentemente, cada R^{25} es independientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6. Más preferentemente R^{25} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6. Más preferentemente R^{25} es alquilo C_1-C_6.

Preferentemente R^{26} es alquilo C_1-C_6.

R^3:

Las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen compuestos de fórmula I como se describió anteriormente, en la que el resto R^3 es preferentemente una amida de fórmula NH-C(O)-R^{32}, una urea de fórmula NH-C(O)-NH-R^{32}, o un carbamato de fórmula NH-C(O)-OR^{32}. Más preferentemente, R^3 es un carbamato o una urea. Lo más preferentemente R^3 es un carbamato.

Preferentemente R^{32} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6. Más preferentemente R^{32} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_4-C_6. Lo más preferentemente R^{32} es terc-butilo, ciclobutilo o ciclopentilo.

D:

Las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen compuestos de fórmula I, en la que el enlazador D es una cadena de alquileno de 6 a 8 átomos de carbono, saturada o insaturada. Más preferentemente, el enlazador D es una cadena de 7 átomos.

Preferentemente la cadena D contiene uno o dos heteroátomos elegidos entre O, S, NH, N-(alquilo C_1-C_6) o N-(acilo C_2-C_7). Más preferentemente, la cadena D contiene opcionalmente un heteroátomo elegido entre NH o N-(acilo C_2-C_7), lo más preferentemente N(Ac), y está situado en el átomo 10 de

la cadena. Lo más preferentemente, la cadena que contiene un átomo de nitrógeno está saturada.

Alternativamente, D contiene un heteroátomo elegido entre O ó S. Preferentemente, cuando D tiene una longitud de siete átomos, el átomo O ó S está en la posición 9 de la cadena. Preferentemente esta cadena está sustituida con R^4, en donde R^4 es H o alquilo C_1-C_6. Más preferentemente R^4 es H o metilo. Lo más preferentemente R^4 es H o 8-(*S*)-Me. Aún más preferentemente, D está saturado. Alternativamente D contiene un doble enlace en posición 11,12. Preferentemente este doble enlace es *trans*.

Alternativamente D es una cadena todo carbono de alquileno saturada o insaturada. En este caso D es preferentemente saturado y es de una longitud de 7 átomos. Más preferentemente D está sustituido con R^4, en donde R^4 es oxo, tio, hidroxi, tioalquilo, alcoxi o alquilo. Más preferentemente, R^4 es H o alquilo C_1-C_6. Lo más preferentemente, R^4 es H o metilo. Lo más preferentemente R^4 es H o 10-(*S*)-Me.

Alternativamente D es una cadena todo carbono de alquileno que contiene preferentemente un doble enlace y es de una longitud de 7 átomos. Más preferentemente, este doble enlace está en posición 13,14 de la cadena. Lo más preferentemente, este doble enlace es *cis*. Preferentemente, esta cadena D está sustituida con R^4, en donde R^4 es H, oxo, hidroxi, alcoxi o alquilo. Más preferentemente, R^4 es H o alquilo C_1-C_6. Incluso más preferentemente, R^4 es H o metilo. Lo más preferentemente, R^4 es H o 10-(*S*)-Me.

A:

Las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen compuestos de fórmula I como se describió anteriormente, en la que A es un ácido carboxílico.

Realizaciones específicas:

Las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen compuestos de fórmula I como se describió anteriormente, en la que R^2 es un sustituyente de quinoleína (es

decir, W es N);

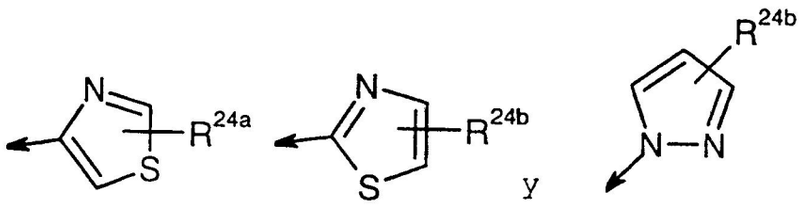
R^3 es un grupo de fórmula -NH-C(O)-NHR^{32} o -NH-C(O)-OR^{32}, en donde R^{32} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_4-C_6;

D es una cadena del alquileno de 6 a 8 átomos saturada o insaturada unida a R^3 en configuración *syn* respecto a A, que opcionalmente contiene uno o dos heteroátomos independientemente elegidos entre O, S ó N-R^{41}, en donde R^{41} es acilo C_2-C_7;

R^4 es H, o de uno a tres sustituyentes elegidos independientemente entre hidroxi o alquilo C_1-C_6; y

A es un ácido carboxílico, o una sal o éster del mismo aceptable farmacéuticamente.

Más preferentemente son compuestos de fórmula I en la que R^1 es como se definió anteriormente; R^{21} es H o metoxi; R^{22} es alcoxi C_1-C_6, o Het elegido entre el grupo formado por:



en donde R^{24a} es H, alquilo C_1-C_6, NH-R^{25}, -NH-C(O)-R^{25} o -NH-C(O)-NH-R^{25}, en donde R^{25} es H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;

o R^{24b} es -NH-C(O)-R^{26} , en donde R^{26} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;

y R^{24b} es H o alquilo C_1-C_6;

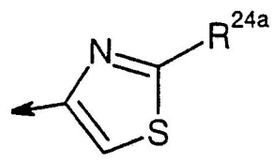
R^3 es una urea de fórmula -NH-C(O)-NHR^{32} o un carbamato de fórmula -NH-C(O)-OR^{32}, en la que R^{32} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;

D es una cadena de alquileno de 7 átomos de carbono saturada o insaturada, que opcionalmente contiene un doble enlace en posición 11,12 ó 13,14;

conteniendo opcionalmente dicha cadena D un heteroátomo elegido independientemente entre: O, S, NH, N(Me) o N(Ac); y

R^4 es H o alquilo C_1-C_6.

Lo más preferentemente, son compuestos de fórmula I en la que R^{21} es metoxi, y R^{22} es etoxi o:



en donde R^{24a} es NH-(alquilo C_1-C_4), NH-C(O)-(alquilo C_1-C_4) o NH-C(O)-O-(alquilo C_1-C_4); y

D está saturado o contiene un doble enlace *cis* en posición 13,14.

Finalmente, están incluidos en el alcance de esta invención todos los compuestos de fórmula I que se presentan en las Tablas 1 a 9.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administradas oralmente, parenteralmente o mediante un reservorio implantado. Se prefieren la administración oral o la administración mediante inyección. Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener cualquier vehículo o coadyuvante convencional, no tóxico y farmacéuticamente aceptable. 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 infusión o inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intrasternal, intratecal e intralesional.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de preparado inyectable estéril, por ejemplo, como suspensión acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión puede ser formulada de acuerdo con métodos conocidos 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 vehículos 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 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 portadores adecuados para las formulaciones y composiciones anteriormente indicadas pueden encontrarse en textos farmacéuticos normales, 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 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 infusión continua. Tal administración puede usarse como terapia crónica o aguda. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los materiales portadores para producir un forma de dosificación individual variará dependiendo del hospedador tratado y el 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 dependen de diversos factores,

incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estad 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 de 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 proporcione 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 deben estar presentes en un nivel de dosificación entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100%, y más preferentemente entre aproximadamente 10 y 80% de la dosificación normalmente administrada en un régimen de monoterapia.

Cuando estos compuestos o sus sales aceptables farmacéuticamente se formulan junto con un vehículo aceptable farmacéuticamente, la composición resultante puede ser administrada *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 del HCV. Tal tratamiento puede también conseguirse usando los compuestos de esta invención en combinación con agentes que incluyen, pero sin limitarse a ellos: 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 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 la presente 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 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 solamente 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. El solicitante proporciona por primera vez compuestos con un bajo peso mole-

cular, que soy muy activos y específicos frente a la NS3 proteasa del HCV. Algunos de los presentes compuesto pueden ser instrumentales para proporcionar herramientas de investigación para diseñar ensayos de replicación viral, validación de sistemas de ensayo con animales y estudios estructurales de biología para incrementar los conocimientos del mecanismo de las enfermedades por el HCV.

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 médico o de laboratorio, 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.

En los documentos WO 00/09543 y WO 00/09558 se describen varias formas de llevar a cabo la síntesis de intermedios acíclicos de compuestos de fórmula I.

Los compuestos de la presente invención se sintetizan de acuerdo con el procedimiento general ilustrado en los Esquemas I, II y III (en los que PG es un grupo protector apropiado). En todos los esquemas presentados a continuación, D' tiene la misma definición que D pero es de 2 a 5 átomos más corto.

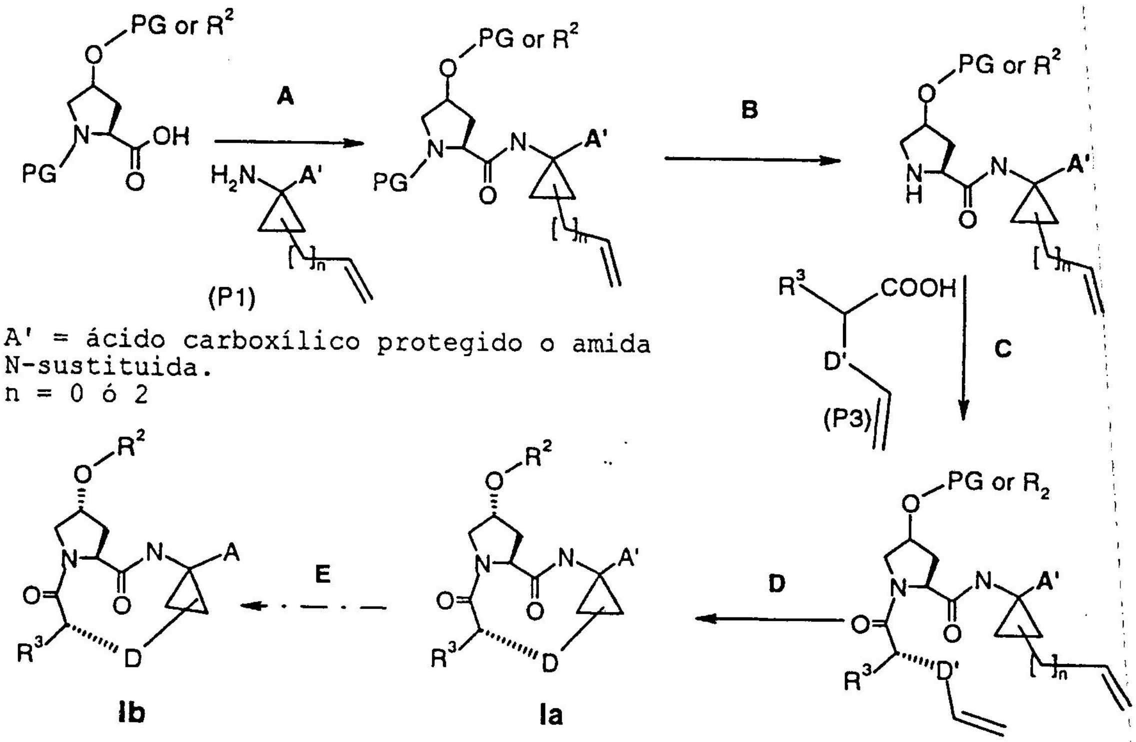
Cuando la invención cubre compuestos de fórmula I en la que A es una amida N-sustituida, vinil-ACCA o homo-alil-ACCA (R^1) es acoplado a una amina apropiada antes del acoplamiento con P2. Tal acoplamiento será fácilmente reconocido por los expertos en la técnica. Como reconocerán los expertos en la técnica, tal amida (A) no está protegida sino que lleva cualquier sustituyente relevante R^5 como se definió antes.

La reacción de cierre de anillo (macrociclización) se lleva a cabo por metátesis de olefina (Esquema I) o bien, cuando el enlazador contiene un átomo de nitrógeno, por ami-

nación reductora (Esquema II) o por formación de enlace peptídico (Esquema III). Los detalles de estos procedimientos se presentan a continuación.

A. Macrociclización mediante metátesis de olefina.

Esquema I



D = saturado D = insaturado

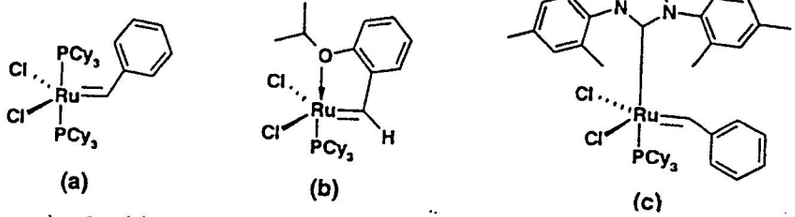
Esquema I:

Hay varias formas por las que puede llevarse a cabo la secuencia de acoplamiento, que pueden ser fácilmente reconocidas por los expertos en la técnica. Partiendo de 4-(S)-hidroxiprolina, el sustituyente en el 4-hidroxi puede ser incorporado mediante una reacción de Mitsunobu (como se describe en Mitsunobu, *Synthesis* 1981, enero, 1-28; Rano et al. *Tet. Lett.* 1994, 36, 3779-3792; Krchnak et al. *Tet. Lett.* 1995, 36, 6193-6196) antes o después de la macrociclización. Alternativamente el conjunto puede hacerse con la prolina 4-(R)-hidroxi-sustituida requerida, como se describe en los procedimientos generales de los documentos WO 00/09543 y WO

00/09558 (véase más adelante para ejemplos específicos de estos fragmentos).

Etapas A, B, C: Brevemente, los restos P1, P2 y P3 pueden ser unidos por técnicas de acoplamiento de péptidos bien conocidas y descritas de un modo general en los documentos WO 00/09543 y WO 00/09558.

Etapa D: La formación del macrociclo puede llevarse a cabo mediante una metátesis de olefina usando un catalizador basado en Ru tal como el publicado por Miller, S.J.; Blackwell, H.E.; Grubbs, R.H. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 9606-9614 (a); Kingsbury, J.S.; Harrity, J.P.A.; Bonitatebus, P.J.; Hoveyda, A.H.; *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 791-799 (b) y Huang, J.; Stevens, E.D.; Nolan, S.P.; Petersen, J.L.; *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 2674-2678 (c). Se reconocerá también que también pueden usarse para esta reacción catalizadores que contienen otros metales de transición tales como Mo.



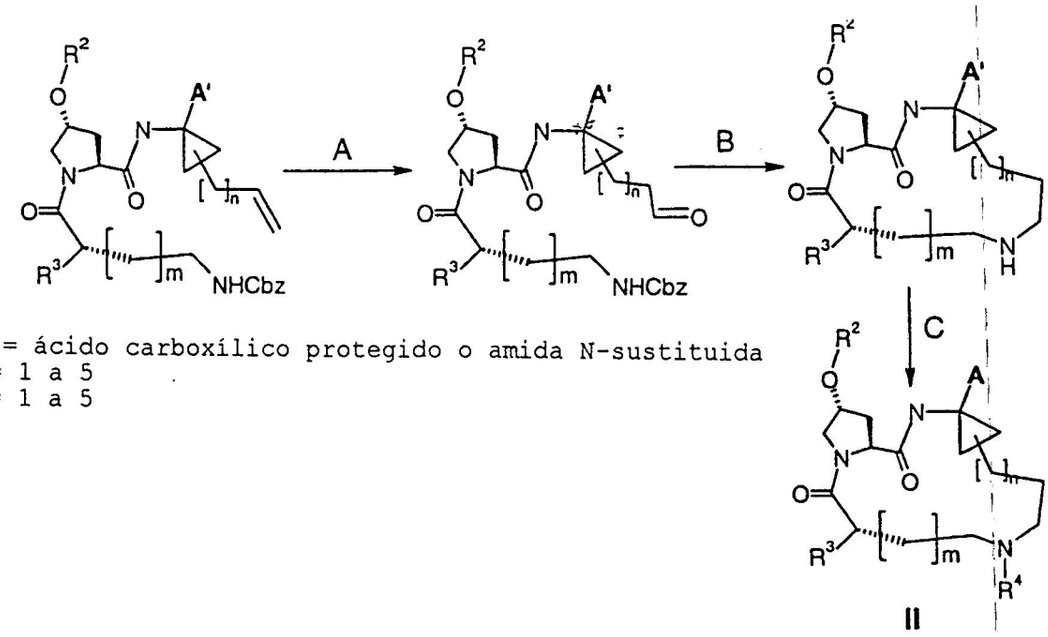
Catalizador de Grubb Catalizador de Horeday Catalizador de Nolan

Etapa E: Opcionalmente, el doble enlace se reduce por métodos de hidrogenación estándar bien conocidos en la técnica. Cuando A' es un ácido carboxílico protegido, también se le desprotege apropiadamente.

B. Macrociclización mediante aminación reductora (para enlazadores que contienen N).

Cuando el enlazador contiene un átomo de nitrógeno, la macrociclización se logra por aminación reductora como se muestra en el Esquema II para obtener inhibidores de estructura general II.

Esquema II



A' = ácido carboxílico protegido o amida N-sustituida
n = 1 a 5
m = 1 a 5

Etapa A: La hidroboración del doble enlace según el procedimiento de Brown (H.C. Brown y B.C. Subba Rao, *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, 6434-6437) seguida por la oxidación del alcohol resultante (por ejemplo mediante el peryodinato de Dess-Martin, *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 7277-7287) proporciona el correspondiente aldehído.

Etapa B: La hidrogenación en presencia de ácido conduce a la eliminación del grupo protector de amino seguida por macrociclización mediante aminación reductora.

La unidad P3 usada en esta síntesis se obtiene fácilmente a partir de una variedad de aminoácidos tales como lisina, ornitina, glutamina (después de una reacción de Hofmann: *Ber.* 1881, 14, 2725) y otros; estas modificaciones de síntesis son métodos bien conocidos en la técnica.

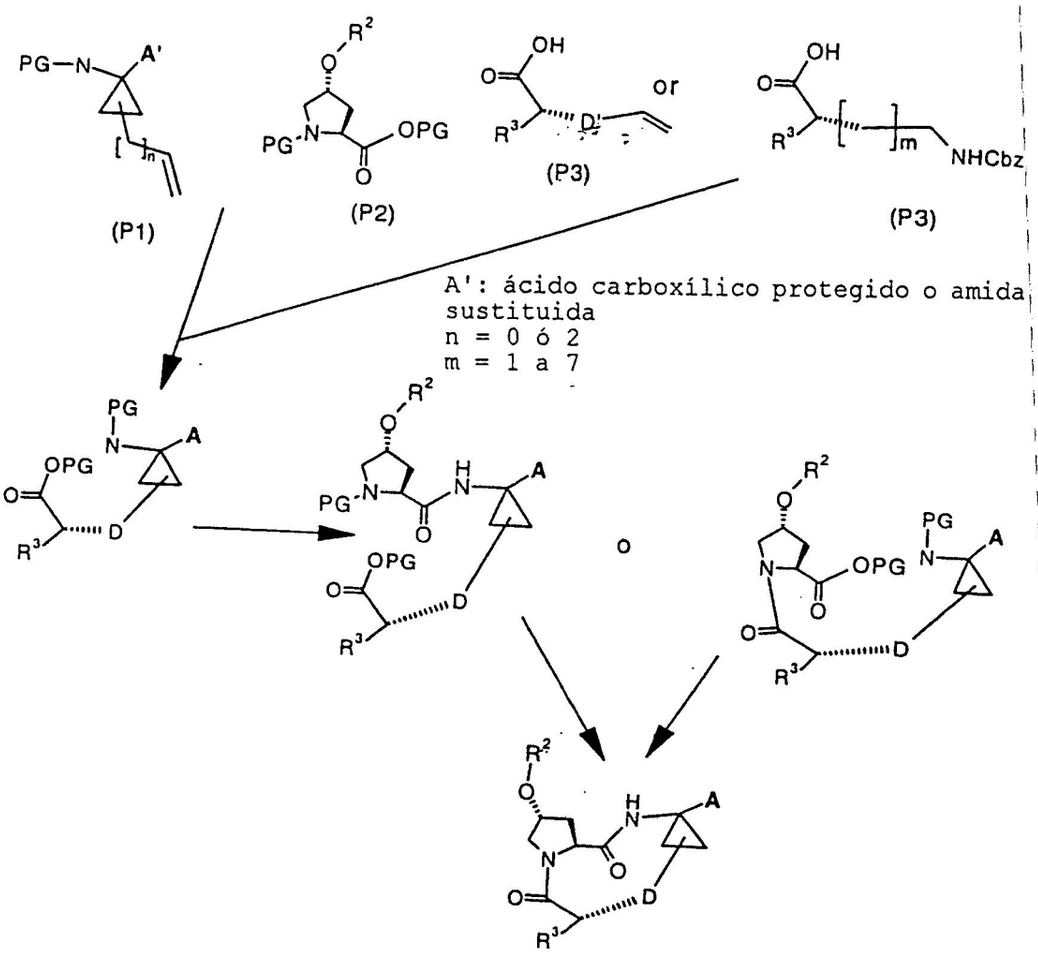
Etapa C: Opcionalmente, la amina secundaria en el enlazador D (formada después de la etapa D) es alquilada con haluros de alquilo o acetilada con cloruros de ácido de arilo o alquilo usando metodologías bien conocidas en la técnica para obtener inhibidores de estructura general II. Cuando A' es un ácido carboxílico protegido, también se le desprotege apropiadamen-

te.

C. Macrociclización mediante formación de lactama.

Alternativamente, se entiende que estos compuestos macrocíclicos con estructura general I y II pueden ser sintetizados por otros caminos. Por ejemplo, P1 y P3 pueden ser primero conectados al enlazador D, después acoplados a P2, y la reacción de macrociclización puede ser una formación de lactama de dos formas posibles, como será reconocido por los expertos en la técnica, y como se muestra en el Esquema III.

Esquema III



Síntesis de P1

La síntesis de inhibidores con estructura general I y II requiere los mismos fragmentos P1:

a) vinil ACCA, cuya síntesis y resolución se describen en los

documentos WO 00/09543 y WO 00/09558, o

b) homoalil ACCA (Ejemplo 1, compuesto 1f).

Síntesis de P2

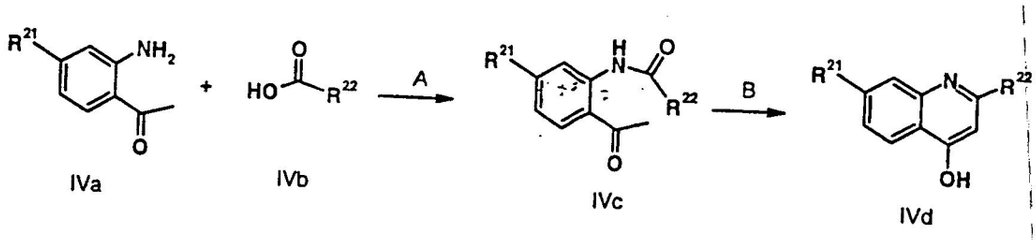
Algunos de los fragmentos de P2 usados para la síntesis de compuestos de fórmula I se describen en los documentos WO 00/09543 y WO 00/09558.

Otros fragmentos de P2 se sintetizan como sigue:

a. Síntesis del derivado 2-"Het"-4-hidroxi-7-metoxiquinoleína.

(i) Planteamiento a partir del correspondiente ácido "Het" carboxílico IVb.

Esquema IV



La síntesis se lleva a cabo de acuerdo con un procedimiento modificado descrito en Li et al. *J. Med. Chem.* 1994, 34 (3400-3407. El producto intermedio IVa en el que R^{21} = OMe (Ejemplo 7, compuesto 7b) se prepara como se describe en Brown et al. *J. Med. Chem.* 1989, 32, 807-826.

Etapa A: El producto intermedio IVa es acoplado con ácidos carboxílicos heterocíclicos IVb bajo condiciones básicas con $POCl_3$ para activar el grupo carboxilato. Se usan diversos ácidos carboxílicos con la estructura general IVb para la preparación de inhibidores; estos son disponibles comercialmente o bien se sintetizan como se indica en los esquemas V, VI y VII, o se sintetizan individualmente usando métodos descritos en los ejemplos específicos.

Etapa B: El cierre del anillo, seguido por deshidratación, se consigue bajo condiciones básicas para obtener quinoleínas de estructura general IVd.

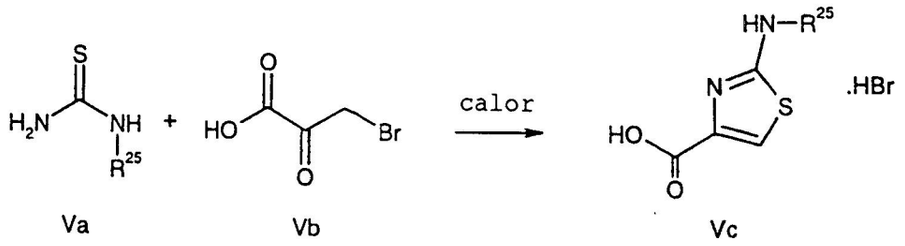
(i.a). Síntesis de ácidos "Het" carboxílicos de

fórmula general IVb

Síntesis de derivados 2-(sustituido)-amino-4-carboxi-aminotiazol (Vc)

Se usa el procedimiento modificado descrito por Berdikhina et al. *Chem. Heterocycl. Compd.* (Traduc. inglesa) 1991, 4, 427-433.

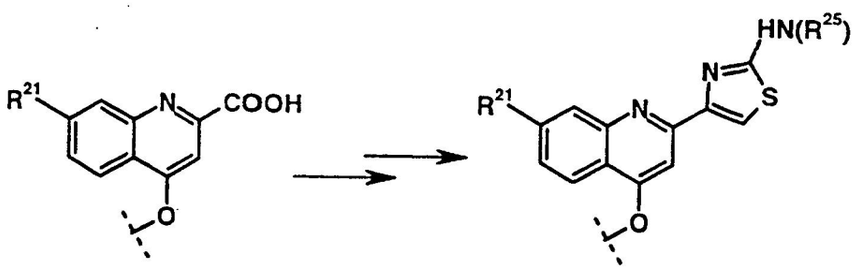
Esquema V



Va Vb Vc

Se preparan diversos ácidos 2-alquilaminotiazolil-4-carboxílicos, compuestos de estructura general Vc, usando la metodología general de síntesis señalada en el Esquema V usando tioureas (Va) con diferentes sustituyentes de alquilo (R^{25}: grupo alquilo) y ácido 3-bromopirúvico. Este tipo de reacción de condensación en bien conocido en la técnica. Alternativamente, el fragmento P2 que contiene los derivados de 2-amino-sustituido-tiazol son sintetizados a partir del correspondiente derivado 2-carboxilo como se muestra en el esquema VI de acuerdo con el procedimiento de Unangst, P.C.; Connor, D.T. *J. Heterocyc. Chem.* 29, 5, 1992, 1097-1100.

Esquema VI



(VIa) (VIb)

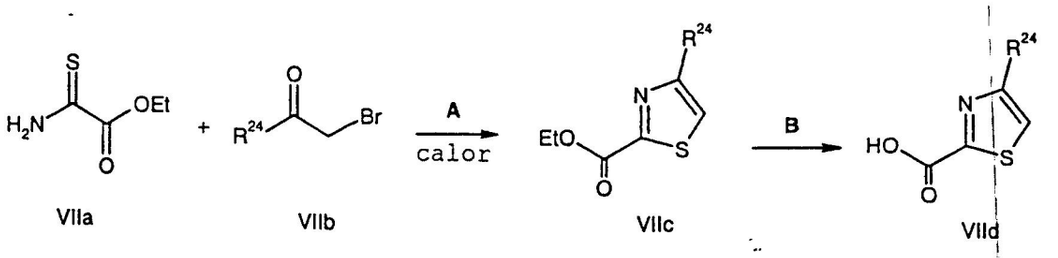
Ejemplos de este procedimiento se describen en los documentos WO 00/09543 y WO 00/09558.

Síntesis de derivados 2-carboxi-4-aminotiazol

sustituido VIId.

Se preparan diversos ácidos 4-aquiltiazol-2-carboxílicos, compuestos estructura general VIId, usando la metodología de síntesis general que se señal a en el Esquema VII.

Esquema VII



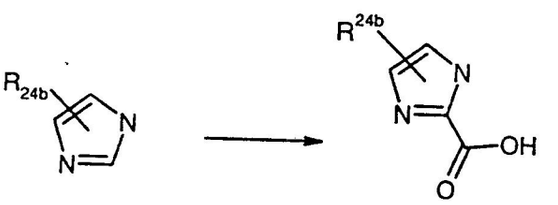
VIIa VIIb VIIc VIId

El procedimiento descrito por Janusz et al. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 3515-3529 se usa con modificaciones como se describen a continuación: se hace reaccionar tiooxamato de etilo (VIIa) con diferentes β-bromocetonas de estructura general VIIb (R^{24} = grupo alquilo) para formar ácidos tiazolil carboxílicos de estructura general VIId. Este tipo de reacción de condensación es bien conocido en la técnica.

Síntesis de derivado 2-carboxi-(sustituido)-imidazol (VIIIb)

Se preparan diversos ácidos alquilimidazolil-2-carboxílicos, compuestos de estructura general VIIIb, usando la metodología general de síntesis señalada en el Esquema VIII.

Esquema VIII



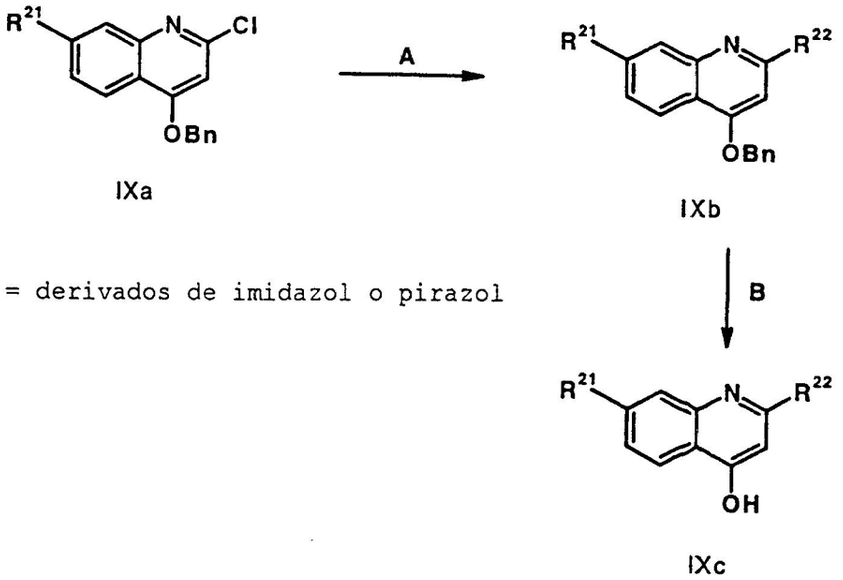
VIIIa VIIIb

Se usó el procedimiento descrito por Baird et al. *J. Amer. Chem. Soc.* 1996, 118, 6141-6146: se desprotoniza un alquil imidazol con una base fuerte (p. ej. n-BuLi) y después se hace reaccionar con CO_2 para formar el ácido carboxílico VIIIb. Este tipo de reacción de condensación es bien conocido en la técnica.

b. Síntesis de 4-hidroxi-7-metoxi-2-(imidazolil o pirazolil)quinoleínas.

Las 4-hidroxi-7-R^{21} quinoleínas que tienen un resto imidazolilo o pirazolilo en C2 se preparan generalmente usando la metodología señalada en el Esquema IX.

Esquema IX



IXa

IXb

R^{22} = derivados de imidazol o pirazol

IXc

La síntesis del producto intermedio clave (en el que R^{21} = OMe) 4-benciloxi-2-cloro-7-metoxiquinoleína IXa, se describe con detalle en el Ejemplo 6 (compuesto 6e).

Etapa A: A temperaturas elevadas, pueden usarse diversos imidazoles, imidazoles sustituidos con alquilo, pirazoles o pirazoles sustituidos con alquilo para desplazar el resto 2-cloro del compuesto IXa dando compuestos de estructura general IXb.

Etapa B: Al eliminar el grupo protector de bencilo del resto 4-hidroxi de la quinoleína por métodos de hidrogenación estándar, se obtienen derivados de quinoleína de estructura general IXc.

Síntesis de P3.

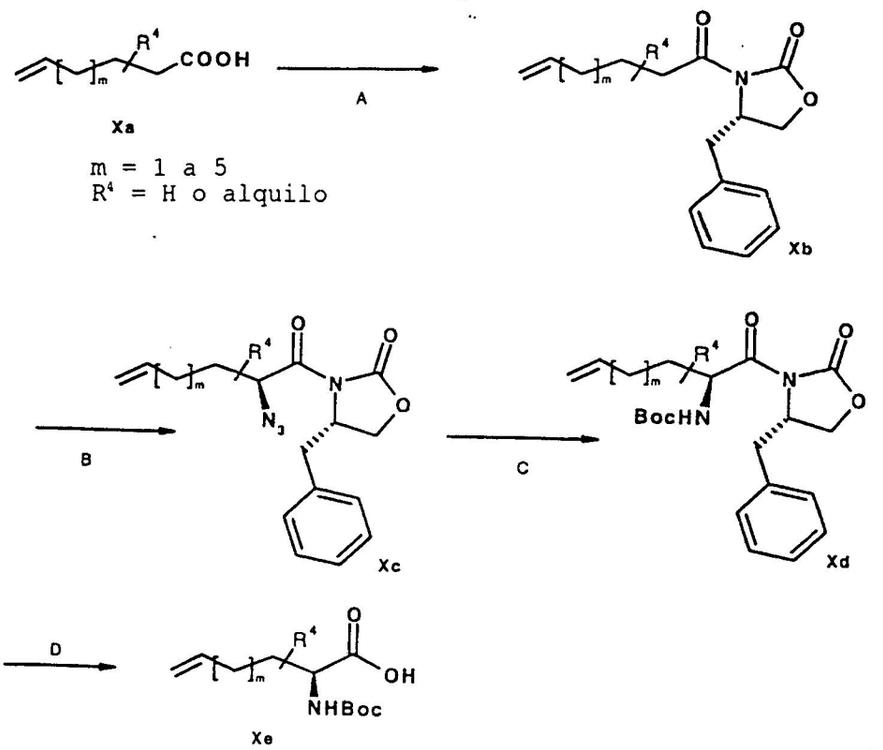
Se sintetizan diversos fragmentos P3 que contienen la prolongación del enlazador D apropiada para macrociclización por metátesis de olefina. En general las unidades P3 que contienen una olefina terminal para metátesis se sintetizan si-

guiendo los esquemas generales que se muestran a continuación (Esquemas X, XI y XII).

Síntesis de enlazadores en la Clase A.

Esta síntesis general se usa para preparar enlazadores que están basados en todo carbono (sin heteroátomos) (Esquema X).

Esquema X



La síntesis se realiza de acuerdo con el procedimiento de Evans et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 4011-4030.

Los ácidos carboxílicos de partida (Xa) son disponibles comercialmente o se preparan por procedimientos conocidos de la bibliografía, familiares para los expertos en la técnica.

Etapa A: El ácido carboxílico Xa se activa con cloruro de pivaloílo y después se hace reaccionar con el anión del auxiliar quiral de Evans 4(S)-4-(fenilmetil)-2-oxazolidinona siguiendo una química bien conocida (revisión: D.J. Ager et al., *Aldrichimica Acta* 1997, 30, 3-11, y referencias contenidas en la misma) para obtener compuestos de estructura general Xb.

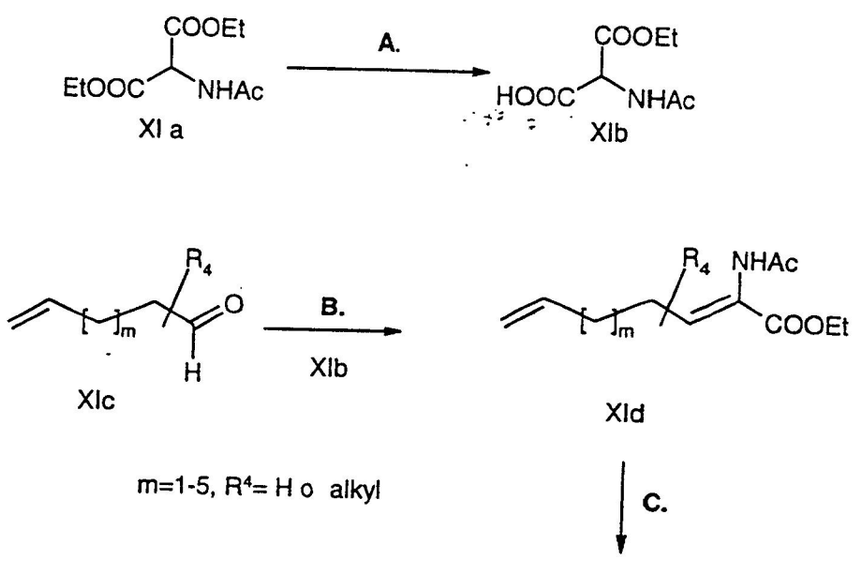
Etapa B: La α-azidación estereoselectiva con triazilazida de un enolato de imida quiral tal como el que se formaría a partir de compuestos con estructura general Xb en presencia de una base como KHMDS, es también bien conocida en la técnica (Revisión: D.J. Ager et al., *Aldrichimica Acta* 1997, 30, 3-11, y referencias contenidas en la misma).

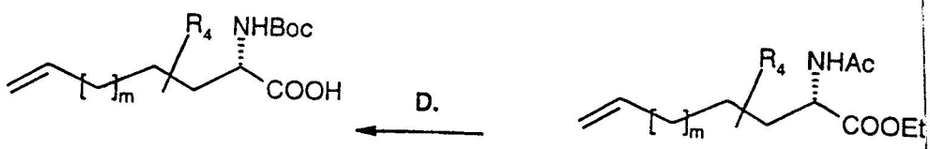
Etapa C: La reducción de la α-azida, catalizada por $SnCl_2$, seguida por la protección de la amina formada como su carbamato de t-butilo da productos intermedios de estructura general Xc. Estas reacciones son también bien conocidas en la técnica.

Etapa D: Finalmente, el auxiliar quiral es hidrolizado bajo condiciones básicas, tales como las de una mezcla de H_2O_2 con LiOH, para producir los enlazadores de tipo amionoácido de estructura general Xe.

Alternativamente, se sintetizan restos P3 que tienen la misma estructura general siguiendo el procedimiento descrito por M.J. Burk et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 657-663 ilustrado en el esquema XI. Estos compuestos variaban en el número de unidades de metileno ($-CH_2-$) a lo largo del enlazador (m = 1 a 5) y la sustitución de grupos alquilo en R_4, pero no contenían ningún heteroátomo.

Esquema XI





Xe XIe

Etapa A: El compuesto monoácido XIb se prepara a partir de 2-acetamidomalonato de dietilo disponible comercialmente por hidrólisis de ésteres estándar bajo condiciones básicas.

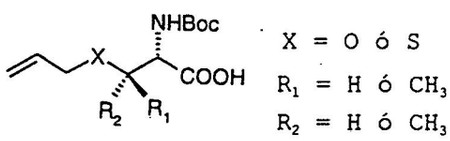
Etapa B: La condensación del tipo de Knoevenagel entre un aldehído de estructura general XIc y compuesto XIb en presencia de una base, tal como piridina, y anhídrido acético, conduce a la formación del producto intermedio de enamida XId que tiene la estereoquímica Z alrededor del doble enlace recién formado, como se muestra.

Etapa C: La hidrogenación catalítica regioselectiva y enantioselectiva del producto intermedio de enamida XId para dar el producto intermedio de aminoácido XIe se realiza usando el método de Burk.

Etapa D: El nitrógeno del derivado acetamido XIe es después di-protegido con la adición de un sustituyente de carbamato de t-butilo antes de que el grupo acetato así como el éster etílico, sean hidrolizados bajo condiciones básicas estándar para obtener restos P3 de la estructura general XIf.

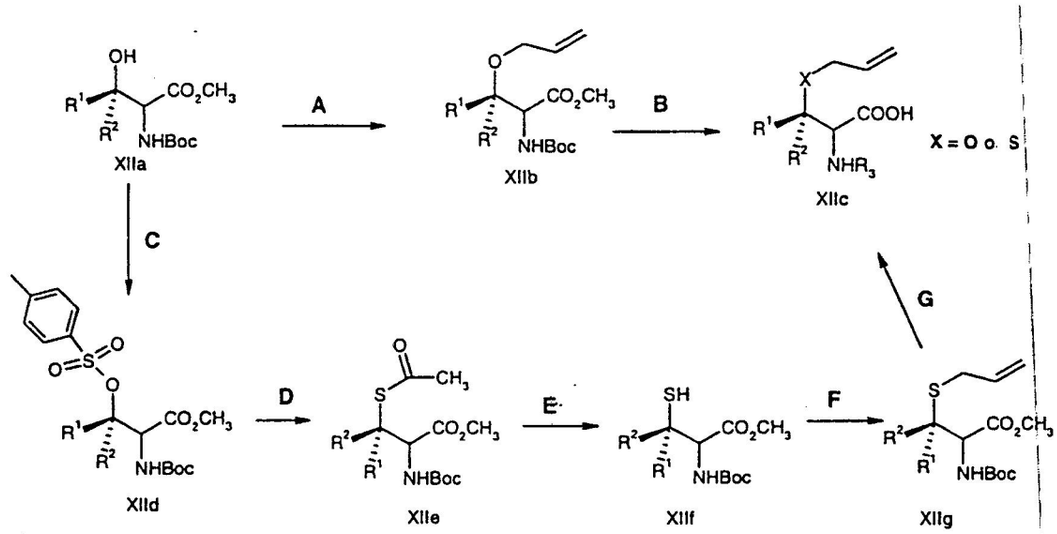
Síntesis de enlazadores en la Clase B.

Estructura general de los enlazadores en la Clase B



Esta síntesis general se usa para preparar enlazadores que contienen oxígeno o azufre.

Esquema XII



R^1 = H ó CH_3

R^2 = H o CH_3 pero no ambos R^1 = R^2 = CH_3

Etapa A: Aminoácidos adecuadamente protegidos, tales como éster metílico de Boc-(L)-serina, éster metílico de Boc-(L)-treonina o éster metílico de Boc-(L)-alotreonina, son alquilados con yoduro de alilo en presencia de Ag_2O para dar el éster metílico XIIb.

Etapa B: La hidrólisis del éter metílico bajo condiciones básicas estándar da los enlazadores de tipo éter de estructura general XIIc (X=O).

Etapa C: El análogo de azufre se prepara a partir del mismo aminoácido de partida XIIa (apropiadamente protegido como antes) y su grupo hidroxilo es convertido en un buen grupo lábil (tal como el intermedio de tosilato XIId) usando una metodología estándar bien conocida en la técnica.

Etapa D: El resto tosilo fue subsiguientemente desplazado con el anión de tioacetato, lo que lleva a la formación del producto intermedio de tioéster XIIe por inversión del centro quiral en el carbono β.

Etapa E: La hidrólisis del resto tioéster bajo condiciones básicas suaves da el tiol libre XIIf.

Etapa F: La alquilación del resto tiol se consigue fácilmente bajo condiciones básicas con yoduro de alilo.

Etapa G: Finalmente, el análogo de sulfuro XIIc (X=S) se ob-

tiene después de la hidrólisis del éster metílico usando procedimientos estándar.

Síntesis del fragmento R3:

Los ejemplos de síntesis de fragmentos en los que R^3 es $NH-R^{3i}$ se describen en el documento WO 00/09543.

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 los documentos WO 00/094543 y WO 00/09558.

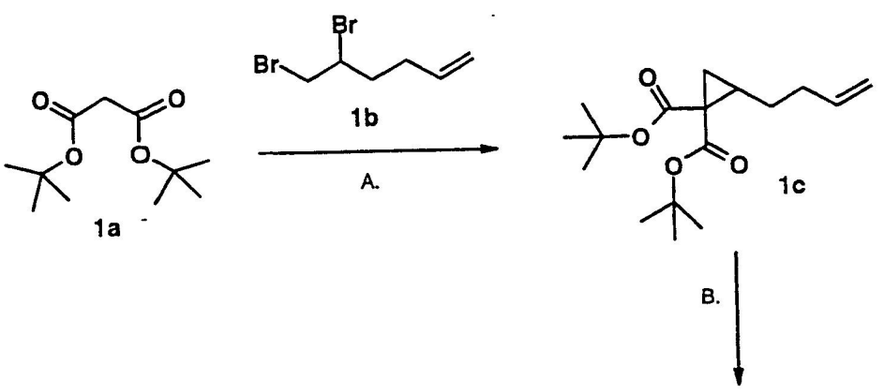
Las temperaturas se indican en grados Celsius. Los porcentajes de las soluciones expresan una relación de peso a volumen, y las relaciones de las soluciones expresan una relación de volumen a volumen, a menos que se indique otra cosa. Los espectros de resonancia nuclear magnética (NMR) fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker de 400 MHz; los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón y se refieren al disolvente deuterado interno, a menos que se indique otra cosa. Los espectros de NMR de todos los compuestos finales (inhibidores) se obtuvieron en DMSO-d_6 de su sal de TFA a menos que se indique otra cosa. La cromatografía en columna rápida se llevó a cabo sobre gel de sílice (SiO_2) de acuerdo con la técnica de cromatografía rápida de Still (W.C. Still et al., J. Org. Chem., 1978), 43, 2913). Las abreviaturas usadas en los ejemplos incluyen Bn: bencilo; Boc: terc-butiloxicarbonilo [$Me_3COC(O)$]; BSA: albúmina de suero bovino; Cbz: Benciloxicarbonilo; CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato; DBU: 1,8-diazabiciclo[5.4.0]-undec-7-eno; CH_2CH_2=DCM cloruro de metileno; DEAD: dietilazodicarboxilato; DIAD: diisopropilazodicarboxilato; DIPEA: diisopropiletilamina; DMAP: dimetilaminopiridina; DCC: 1,3-diciclohexilcarbodiimida; DME: 1,2-dimetoxietano; DMF: dimetilformamida; DMSO: dimetilsulfóxido; DTT: titiotreitol o treo-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol; DPPA: difenilfosforil-

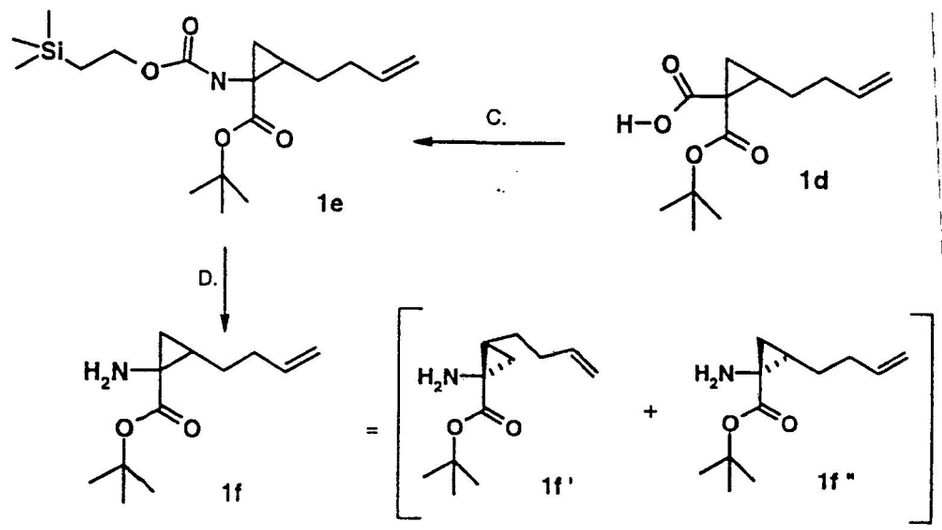
azida; EDTA: ácido etilendiaminatetraacético; Et: etilo; EtOH: etanol; EtOAc: acetato de etilo; Et_2O: dietil-éter; ESMS: espectrometría de masas por electropulverización; HATU: hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; HPLC: cromatografía de líquidos de alto rendimiento; MS: espectrometría de masas; MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Disorption Ionization-Time of Flight; FAB: bombardeo con átomos rápidos; LAH: hidruro de aluminio y litio; Me: metilo; MeOH: metanol; MES: ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico; NaHDMS: bis(trimetilsilil)amida sódica; NMM: N-metilmorfolina; NMMO: óxido de N-metilmorfolina; NMP: N-metilpirrolidina; Pr: propilo; Succ: 3-carboxipropanoílo; PNA: 4-nitrofenilamino o p-nitroanilida; TBAF: fluoruro de tetra-n-butilamonio; TBME: terc-butil-metil-éter; tBuOK: terc-butóxido potásico; TBTU: tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; TCEP: hidrocloruro de tris(2-carboxietil)fosfina; TFA: ácido trifluoroacético; THF: tetrahidrofurano; TIS: triisopropilsilano; TLC: cromatografía en capa fina; TMSE: trimetilsililetilo; Tris/HCl: hidrocloruro de tris(hidroximetil)aminometano.

RESTOS P1

EJEMPLO 1.

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





A. A una suspensión de cloruro de benciltrietilamonio (5,08 g, 22,3 mmoles) en solución acuosa de NaOH al 50% (50 mL), se añadieron sucesivamente 1,2-dibromo-5-hexeno (1b, 8,10 g, 33,46 mmoles) y malonato de di-t-butilo (1a, 4,82 g, 22,30 mmoles). La mezcla se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 16 horas, después se diluyó con H_2O y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). La capa orgánica se siguió lavando con H_2O (2 x 50 mL) y salmuera/H_2O (2/1,2 x 50 mL), se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía rápida en columna sobre gel de sílice, usando 3 a 5% de EtOAc en hexano como eluyente, para obtener el compuesto 1c con un 38% de rendimiento (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),; 4,93-5,50 (m, 2H); 4,96 (dm, J = 10,2 Hz, 1H), 5,18 (dm, J = 17,2 Hz, 1H). ES(+)MS *m/z* 297 $(M+H)^+$.

B. A una suspensión de t-butóxido potásico (5,75 g, 51,25 mmoles) en dietil-éter anhidro (150 mL) a 0°C, se añadió H_2O (203 µL, 11,27 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 10 minutos. Se añadió una solución etérea de compuesto 1c (2,48 g en 10 mL de dietil-éter, 10,25 mmoles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La

mezcla se diluyó con H_2O enfriada con hielo y se extrajo con dietil-éter (3 x 200 mL). La capa acuosa se acidificó a 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 de EtOAc se lavó con H_2O (2 x 100 mL) y con salmuera (100 mL), se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó para dar el compuesto 1d con un rendimiento del 85% basado en la cantidad de material de partida recuperado.

^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 $(M+H)^+$.

C. A una solución del ácido 1d en benceno anhidro (1,14 g en 25 mL de benceno, 4,74 mmoles) se añadió Et_3N (800 µmL, 5,68 mmoles), seguido por la adición de difenilfosforil-azida (1,13 mL, 5,21 mmoles) y la mezcla se calentó a reflujo durante 3,5 horas. Subsiguientemente se añadió trimetilsililetanol (1,36 mL, 9,48 mmoles) y se siguió agitando a reflujo durante 4 horas más. Después se enfrió la mezcla a temperatura ambiente, se evaporó hasta la mitad de su volumen original, se diluyó con dietil-éter (30 mL) y se lavó con solución acuosa de $NaHCO_3$ al 5% (2 x 30 mL) y salmuera (50 mL), se secó sobre MgSO4 y se evaporó. El aceite residual se cromatografió sobre gel de sílice usando EtOAc al 10% en hexano como eluyente para obtener el compuesto 1e puro con un rendimiento del 88% (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).

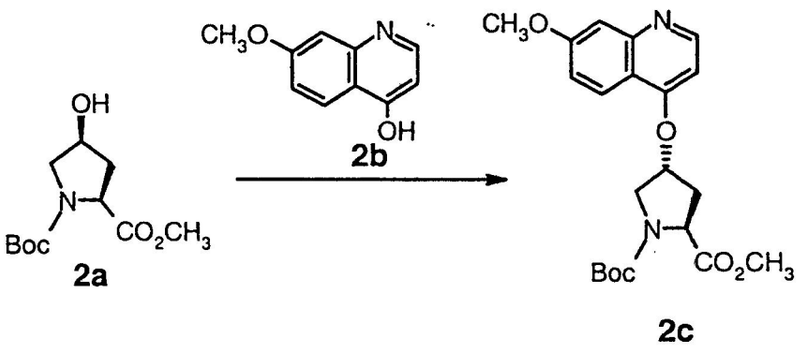
D. A una solución del derivado de ciclopropilo 1e (1,19 g, 3,35 mmoles, en 30 mL de THF), se añadió t-Bu_4NF (6,7 mL de 1M en THF, 6,7 mmoles) y la mezcla se agitó primero a temperatura ambiente durante 16 h y a continuación se calentó a

reflujo durante 15 min. El disolvente fue evaporado cuidadosamente a baja presión (debido a la alta volatilidad de la amina libre 1f, se ha de tener cuidado durante la evaporación del disolvente). El residuo crudo se redisolvió en EtOAc (100 mL) y se lavó con H_2O (2 x 50 mL) y con salmuera (50 mL), se secó sobre $MgSO_4$ y el disolvente se evaporó de nuevo con cuidado. El producto crudo 1f (como mezcla de dos enantiómeros 1f' y 1f") se usó para acoplamiento con los derivados de prolina P2 sin más purificación. El aislamiento del fragmento P1P2 que tiene la estereoquímica deseada en P1 se logró fácilmente en esta etapa usando cromatografía rápida (ejemplo 21, fragmento 21b).

RESTOS P2

EJEMPLO 2.

Síntesis de Boc-4(R)-[(7-metoxi-4-quinoleinil)oxi]prolina (2c).



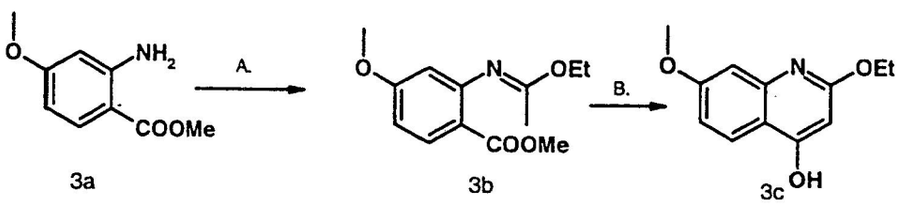
Se preparó 4-hidroxi-7-metoxiquinoleína (2b) de acuerdo con el método descrito por Chun, M.W.; Olmstead, K.K.; Choi, Y.S.; Lee, C.O.; Lee, C.-K.; Kim, J.H.; Lee, *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7, 789. Una solución de compuesto 2b (1,88 g, 10,73 mmoles) y DEAD (3,4 mL, 21,46 mmoles) en THF anhidro se añadió a una solución agitada de cis-hidroxiprolina protegida 2a (2,63 g, 10,73 mmoles) y trifenilfosfina (5,63 g, 21,46 mmoles) en THF anhidro (160 mL) a 0°C bajo N_2. Se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se

agitó durante 14 h. Después el THF se evaporó y se aisló el producto puro 2c después de cromatografía en columna 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 3.

Síntesis de 2-etoxi-4-hidroxi-7-metoxi-quinoleína (3c).



La síntesis de metil-p-metoxiantranilato 3a se hizo como se describe en Katz et al. *J. Org. Chem.* 1953, 18, 1380-1400.

La síntesis general para el derivado de quinoleína es una modificación del procedimiento de Baccar et al., *Indian Journal of Chemistry*, 1995, Sat. B, 330-332.

A. Se disolvió metil-p-metoxiantranilato 3a (3,069 g, 16,96 mmoles) en trietilortoacetato (4,7 mL, 25,4 mmoles), y después se añadió una solución de HCl anhidro (4N/dioxano, 50 µL, 0,6 mmoles). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 19 horas. Después se evaporaron las sustancias volátiles bajo vacío para dar el producto 3b (4,92 g, aceite ámbar, rendimiento cuantitativo) que se usó tal cual para el siguiente paso.

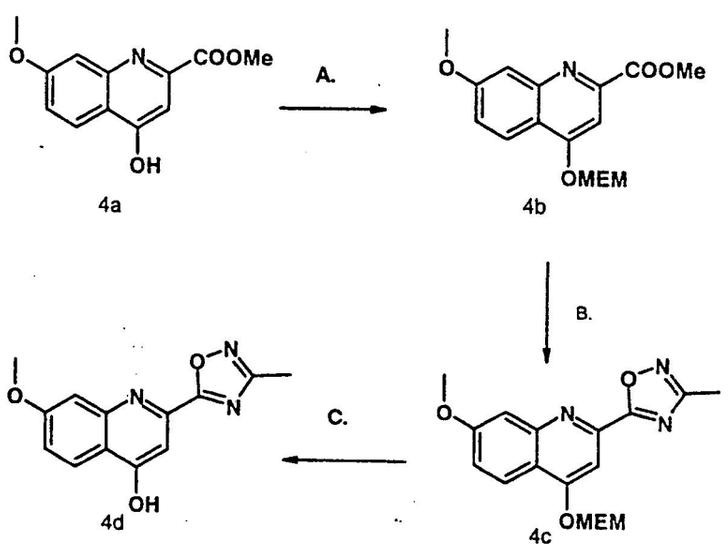
B. A una solución del sustrato 3b (supuestos 16,96 mmoles) en THF (34 mL) a -78°C bajo nitrógeno, se añadió LiHMDS (1M/THF, 22 mL, 1,3 eq.). Al poco de la adición, se retiró el ba-

ño a baja temperatura y la mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante 1 hora, al cabo de la cual se añadió otra porción de LiHMDS (16 mL). La mezcla resultante se agitó hasta la desaparición completa del material de partida (1 hora) por TLC (EtOAc al 100%, R_f imidato = 0,7; R_f producto = 0,2). Después se añadió HCl (4N/dioxano, 10 mL) y la mezcla se concentró bajo vacío. La pasta resultante se trituró en una mezcla de EtOAc (10 mL) y solución acuosa de NaH_2PO_4 (1M, 10 mL) y después se sometió a ultrasonidos. Se formó un precipitado abundante, se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó para dar el producto deseado 3c en forma de un sólido color beige (3,177 g, 84% de rendimiento para las 2 etapas, más del 99% de pureza por HPLC).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d): δ (ppm) 7,88 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 6,98 (br s, 1H), 6,89 (br d, J = 8,6 Hz, 1H); 5,94 (br s, 1H); 4,30 (br s, 2H), 3,84 (s, 3H); 1,34 (t, J = 7,0 Hz, 3H).

EJEMPLO 4.

Síntesis de 4-hidroxi-7-metoxi-2-(3-metil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-quinoleína (4d).



A. A una solución de 2-carbometoxi-4-hidroxi-7-metoxiquinoleína 4a (cuya preparación se describe en los documentos WO

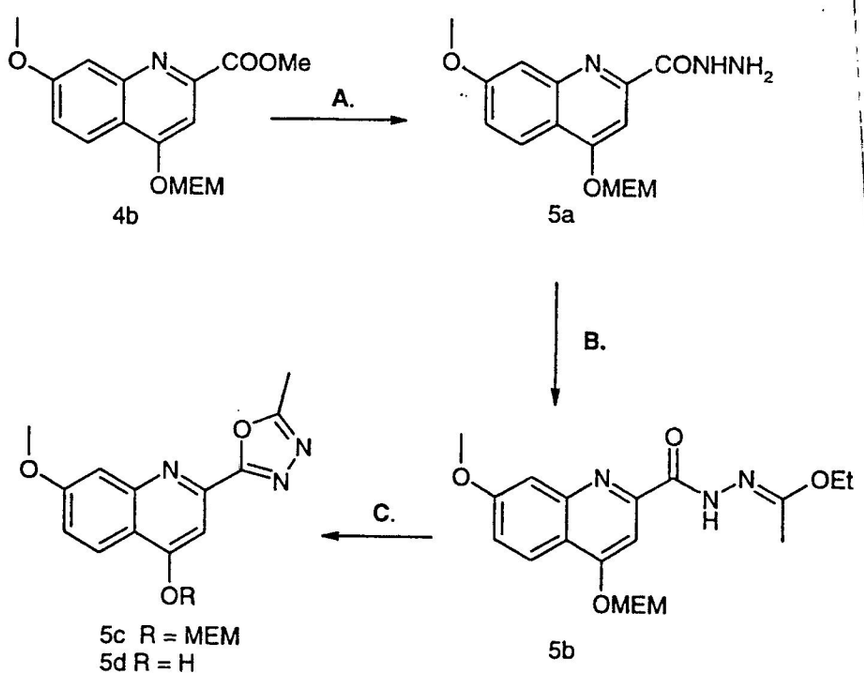
00/09543 y WO 00/09558 (1 g, 4,29 mmoles) en DMF (10 mL) bajo nitrógeno, se añadió NaH (60% en aceite mineral, 190 mg, 4,98 mmoles). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, después se añadió gota a gota cloruro de MEM (0,455 mL, 4,98 mmoles) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 19,5 horas más. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (100 mL), se lavó con H_2O (50 mL) y con salmuera (50 mL), se secó con $MgSO_4$ y se concentró bajo vacío para dar el material de reacción aislado crudo (1,37 g). Este fue purificado mediante cromatografía en columna rápida para dar el producto 4b (1,04 g, rendimiento 75%) en forma de un aceite incoloro.

B. A una mezcla de tamiz molecular de 4 Å recién activado (500 mg) y acetamidoxima (248 mg, 3,35 mmoles) se añadió THF (3 mL). La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos bajo nitrógeno a temperatura ambiente, y después se añadió NaH (al 60% en aceite mineral, 124 mg, 3,24 mmoles) en porciones. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y después se añadió éster 4b (500 mg, 1,56 mmoles) en solución en THF (5 mL). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 1 hora, después se filtró sobre celite, aclarando EtOAc (3 porciones de 20 ml) y se concentró bajo vacío. La mezcla cruda resultante se purificó mediante cromatografía en columna rápida (100% EtOAc) para dar el producto 4c (352 mg, 65% de rendimiento) en forma de un sólido blanco.

C. Al éter MEM 4c (170 g, 0,493 mmoles) en THF (4 mL) se añadió HCl acuoso (1N, 1 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y después se diluyó con solución acuosa de NaH_2PO_4 (1M, 50 mL). El sólido formado se filtró, se trituró con EtOAc, se filtró y se secó para dar el producto deseado (4d) (90 mg, 71% de rendimiento) en forma de sólido blanco. MS (ES+) 258 (M+1), (ES-) 256 (M-1). ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d): δ (ppm) 8,03 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,38 (d, J = 2,2 Hz, 1H); 7,06 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 6,85 (br s, 1H); 3,88 (s, 3H); 2,64 (s, 3H).

EJEMPLO 5

Síntesis de 4-hidroxi-7-metoxi-2-(5-metil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-quinoleína (5e).



A. Al sustrato 4b (465 mg, 1,45 mmoles) en etanol (5 mL) se añadió hidrazina anhidra (57 µL, 1,8 mmoles). La solución resultante se calentó a reflujo durante 4 h, después se concentró bajo vacío para dar el producto 5a (704 mg, rendimiento en crudo cuantitativo) en forma de un sólido amarillo, que se usó en la etapa siguiente tal cual.

B. El compuesto 5a (supuestos 1,45 mmoles) en trietil-ortoacetato (5 mL) se calentó a 100-110°C bajo nitrógeno: La mezcla resultante se diluyó después con EtOAc (100 mL), se lavó con solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (50 mL) y con salmuera (50 mL), se secó con $MgSO_4$, se concentró bajo vacío y se purificó mediante cromatografía en columna rápida (EtOAc al 100%). El compuesto 5b (359 mg, 61% de rendimiento para los dos pasos) se obtuvo en forma de un aceite amarillo. MS (ES+) 392 (m+1), (ES-) 390 (m-1).

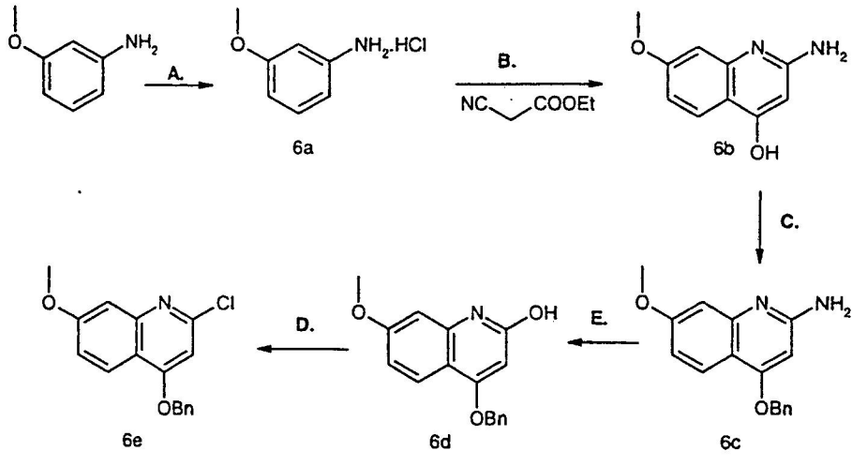
C. El compuesto 5b (333 mg, 0,852 mmoles) se calentó a

140°C en alto vacío durante 8,5 h, y se purificó mediante cromatografía en columna rápida (100% de EtOAc) para dar una mezcla de 5b (116 mg, 35%, R_f 0,5) y compuesto 5c (138 mg, 72% de rendimiento corregido, R_f 0,3). A una solución en THF (4 mL) de compuesto 5c (138 mg, 0,4 mmoles) se añadió solución acuosa de HCl (1N, 1 mL) y la mezcla resultante se agitó hasta final (30 minutos). El THF fue evaporado bajo vacío y se añadió NaH_2PO_4 (1M, 2 mL). La suspensión resultante se sometió a ultrasonidos y se filtró, y el sólido se secó en alto vacío para dar el producto deseado 5d (75 mg, 73% de rendimiento) en forma de sólido beige. MS (ES+) 258 (m+1), (ES-) 256 (m-1).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d): δ 8,03 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,39 (d, J = 2,2 Hz, 1H); 7,06 (br d, J = 8,6 Hz, 1H); 6,85 (br s, 1H); 3,88 (s, 3H); 2,64 (s, 3H).

EJEMPLO 6.

Síntesis de 4-benciloxi-2-(cloro)-7-metoxiquinoleína (6e).



A. Meta-anisidina disponible comercialmente (25 g, 0,20 moles) en dioxano (80 mL) se enfrió a 0°C y se añadió HCl anhidro (4N/dioxano, 75 mL, 0,30 moles). Después se añadió Et_2O (500 mL) y se mantuvo la agitación durante 1 hora. Después se filtró el sólido beige y se secó bajo vacío para dar la sal 6a (31,88 g, 98% de rendimiento).

B. A esta sal se añadió etil-cianoacetato (21,3 mL, 0,20 moles) y la mezcla, en un matraz equipado con cabeza de destilación y un matraz colector, se calentó a 280-300°C. El etanol producido se recogió para controlar la evolución de la reacción. A los 9 mL de etanol recogido (cantidad teórica 11,7 mL), se dejó de calentar, se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se diluyó con agua (200 mL)-EtOAc (200 mL) y después se agitó y se añadió solución acuosa de NaH_2PO_4 (300 mL). Después de una agitación adicional durante 1 h, filtración y secado, se obtuvo 6b (19,06 g, 84,5% de pureza, aprox. 50% de rendimiento) en forma de un sólido amarillo, y se usó tal cual en la siguiente reacción.

C. El compuesto 6b (11,0 g, 57,8 mmoles) en DMF (100 mL) a 0°C se añadió a NaH (60% en aceite mineral, 2,78 g, 115,6 mmoles). Después se retiró el baño de hielo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, después se añadió bromuro de bencilo (7,6 mL, 63,6 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas. Después se diluyó la solución con EtOAc (220 mL)-hexano (220 mL) y el sólido formado se filtró, se trituró con solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (110 mL), se lavó con agua, hexano-EtOAc (relación 1:1, 100 mL) y se secó bajo vacío elevado. El producto 6c (5,6 g, 91% de pureza, 35% de rendimiento) se obtuvo entonces en forma de un sólido amarillo. Al compuesto 6c (2,67 g, 9,52 mmoles) en ácido acético (21 mL) se añadió nitrito de iso-amilo (3,8 mL, 28,6 mmoles) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente y se controló mediante HPLC. Se añadió más nitrito de iso-amilo (1,3 mL, 9,52 mmoles) al cabo de 2 horas, y la mezcla se dejó agitando durante 90 horas (HPLC 81% de producto, 3% de sustrato). Se añadió agua (100 mL) a la suspensión resultante, que después se filtró. El sólido marrón recogido se secó bajo vacío elevado dando el producto 6d (2,35 g, 92% de pureza, 72% de rendimiento).

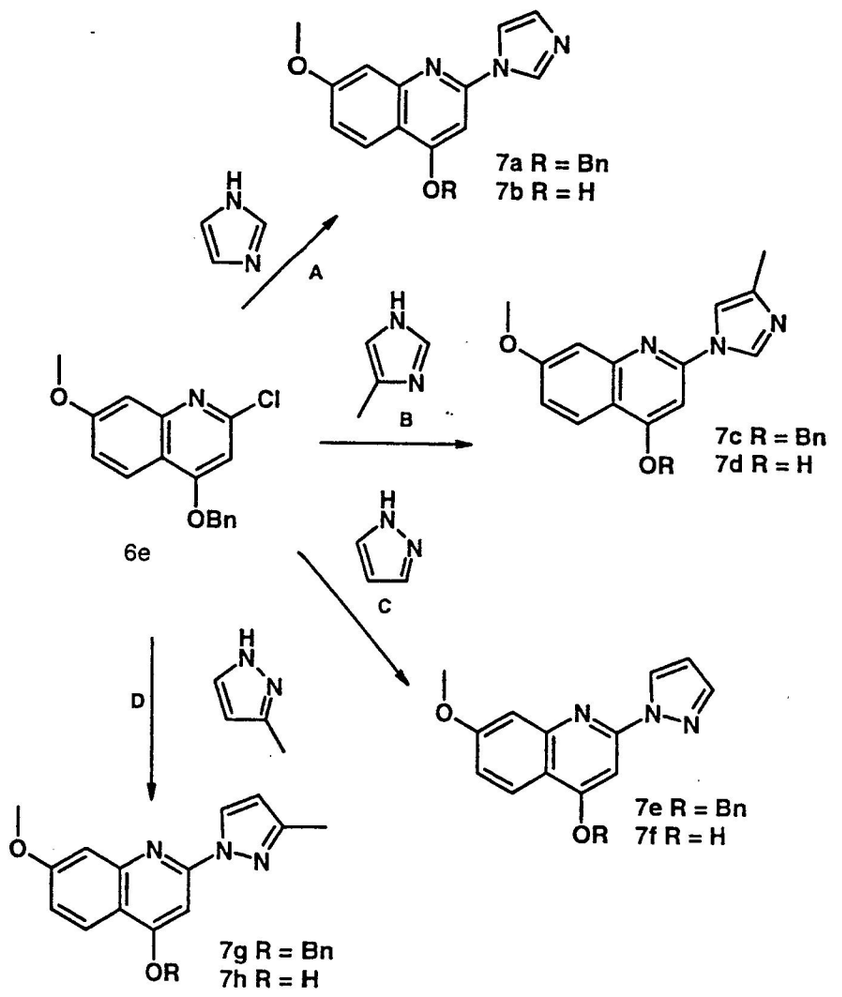
D. Al compuesto 6d (1,5 g, 4,39 mmoles) se añadió oxicloruro de fósforo (13 mL, 141 mmoles) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 1 hora y después se diluyó con

EtOAc (150 mL) y se apagó a 0°C lentamente con solución acuosa de NaOH (1N, 150 mL) a pH 9. Las dos capas se separaron y la capa orgánica se secó con $MgSO_4$ y se concentró bajo vacío para dar un sólido de color marrón que se purificó mediante cromatografía en columna rápida (15% EtOAc/Hexano). El producto 6e (819 mg, pureza > del 99%, 62% de rendimiento) fue obtenido en forma de un sólido amarillo.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,07 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,50-7,40 (m, 5H); 7,29 (d, J = 2,5 Hz, 1H); 7,12 (dd, J = 9,2, 2,5 Hz, 1H); 6,73 (s, 1H); 5,26 (s, 2H), 3,92 (s, 3H).

EJEMPLO 7.

Síntesis de 4-hidroxi-2-(1-imidazolil)-7-metoxiquinoleína (7b); 4-hidroxi-2-(4-metil-1-imidazolil)-7-metoxiquinoleína (7d); 4-hidroxi-7-metoxi-2-(1-pirazolil)quinoleína (7f); y 4-hidroxi-2-(3-metil-1-pirazolil)-7-metoxiquinoleína (7h).



A. El compuesto 6e (423 mg, 1,41 mmoles) e imidazol (400 mg, 5,88 mmoles) se calentaron a 110°C durante 20 h. Después se diluyó la mezcla con EtOAc y se lavó con agua y salmuera, se secó con $MgSO_4$, se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto 7a (422 mg, 96% de pureza, 90% de rendimiento) en forma de un sólido amarillo. El compuesto 7a (319 mg, 0,963 mmoles) con Pd (5%/C, 64 mg) en una mezcla de etanol (5 mL) y THF (5 mL) fue purgado y puesto bajo una atmósfera de hidrógeno. Después de 7,5 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró, se aclaró con una mezcla de cloroformo-metanol y se concentró para dar 7b (130 mg, 97,7% de pureza, 56% de rendimiento) en forma de sólido amarillo. MS (ES+) 242 (m+1), (ES-) 240 (m-1).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d): δ 8,51 (s, 1H); 8,03 (d, J = 8,9

Hz, 1H); 7,93 (s, 1H), 7,23 (d, J = 1,9 Hz, 1H); 7,15 (s, 1H); 7,12 (dd, J = 9,2, 2,2 Hz, 1H); 6,92 (br s, 1H); 3,91 (s, 3H).

B. El compuesto 6e (251 mg, 0,837 mmoles) y 4-metilimidazol (344 mg, 4,19 mmoles) se calentaron a 110°C durante 20 h. Después se diluyó la mezcla con EtOAc, se lavó con agua y salmuera, se secó con $MgSO_4$ y se concentró bajo presión reducida para dar un producto en crudo que contenía una mezcla 10:1 de isómero 4-metil y 5-metil-imidazolilo respectivamente. El principal isómero deseado 11c, un sólido blanco (166 mg, 99% de pureza, 57% de rendimiento) fue separado de una segunda fracción más polar (76 mg, 23% de rendimiento) que contiene una mezcla de isómero 4-metil y 5-metil-imidazolilo mediante cromatografía en columna rápida (100% de EtOAc). El compuesto 7c (163 mg, 0,472 mmoles) con Pd (5%/C, 33 mg) en una mezcla de etanol (2,4 mL) y THF (5 mL) fue purgado y puesto bajo una atmósfera de hidrógeno. Después de 18 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró, se aclaró con una mezcla de cloroformo-metanol y se concentró para dar 7d (118 mg, 99% de pureza, 98% de rendimiento) en forma de un sólido blanco.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d): δ 8,42 (br s, 1H); 8,01 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,64 (br s, 1H), 7,21 (br s, 1H); 7,10 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 6,89 (br s, 1H); 3,90 (s, 3H); 2,20 (s, 3H).

C. El compuesto 6e (184 mg, 0,614 mmoles) y pirazol (209 mg, 3,07 mmoles) se calentaron a 110°C durante 17 h. Después se diluyó la mezcla con EtOAc, se lavó con solución acuosa de NaOH (1N) y salmuera, se secó con $MgSO_4$ y se concentró bajo presión reducida para dar un producto en crudo que fue purificado mediante cromatografía en columna rápida (2:1 hexano-EtOAc) para dar 7e (103 mg, 50% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido. El compuesto 7e (103 mg, 0,311 mmoles) con Pd (5%/C, 20 mg) en una mezcla de etanol (2 mL) y THF (2 mL) fue purgado y puesto bajo una atmósfera de hidrógeno. Después de 5,5 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró, se aclaró con una

mezcla de cloroformo-metanol y se concentró para dar 7f (77 mg, 99% de pureza, 99% de rendimiento) en forma de un sólido amarillo. MS (ES+) 242 (m+1), (ES-) 240 (m-1).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d): δ 8,72 (d, J = 2,5 Hz, 1H); 8,31 (s, 1H); 8,00 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 7,83 (br s, 1H); 7,43 (br s, 1H); 7,24 (br s, 1H); 7,10 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 6,59 (br s, 1H); 3,90 (s, 3H).

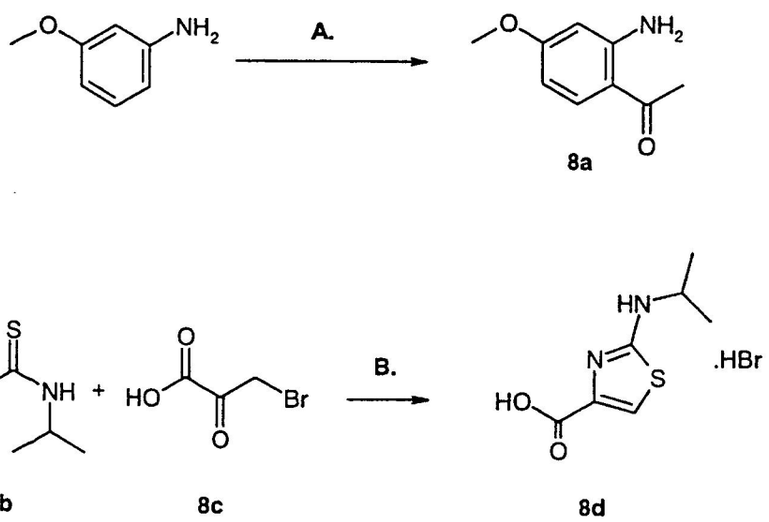
D. Se calentaron compuesto 6e (217 mg, 0,724 mmoles) y 4-metilpirazol (594 mg, 7,24 mmoles) a 110°C durante 23 h. La mezcla, mostrando una mezcla 1:1 de compuesto desbencilado 7h y compuesto bencilado 7g, fue después diluida con EtOAc (2-3 mL) y filtrada para dar el producto desbencilado 7h puro (111 mg, 95% de pureza, 54% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

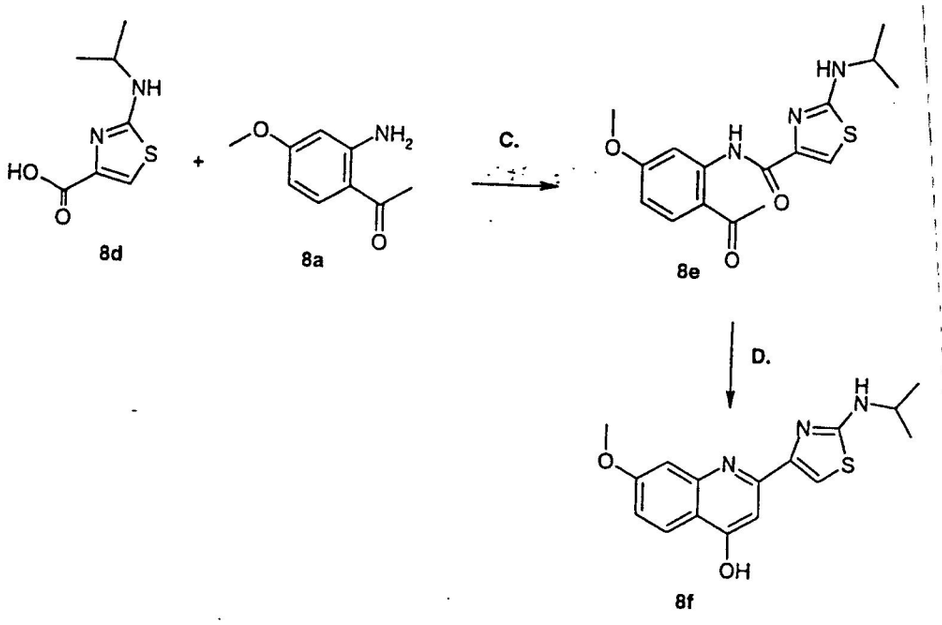
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d): δ 8,58 (d, J = 2,6 Hz, 1H); 7,98 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,25 (br s, 1H); 7,20 (s, 1H); 7,04 (br d, J = 9,2, 1H); 6,38 (s, 1H); 3,89 (s, 3H); 2,30 (s, 3H).

EJEMPLO 8.

Síntesis de 4-hidroxi-7-metoxi-2-[4-(2-isopropilaminotiazolil)]-quinoleína (8f).

Nota: [Se prepararon diversos sustituyentes de 2-alquilaminotiazolilo usando el mismo esquema de síntesis en los que el compuesto 8b fue reemplazado por otras alquil tioureas].





A. El protocolo usado para la conversión de m-anisidina en 8a fue idéntico al descrito en la bibliografía: F.J. Brown et al. *J. Med. Chem.* 1989, 32, 807-826. Sin embargo, el procedimiento de purificación fue modificado para evitar la purificación por cromatografía. La fase de EtOAc que contiene el producto deseado fue tratada con una mezcla de $MgSO_4$, carbón y 5% p/p (basado en la masa esperada) de gel de sílice. Después de filtrar por celite, el producto fue triturado con éter. El compuesto 8a se obtuvo como un sólido marrón pálido con pureza superior al 99% (confirmada por HPLC).

B. Una suspensión de isopropil tiourea (8b, 3,55 g, 30 mmoles) y ácido 3-bromopirúvico (8c, 5 g, 1 eq.) en dioxano (300 mL, 0,1 M) se calentó a 80°C. Al alcanzar los 80°C, la solución se volvió transparente y poco después el producto precipitó como un sólido blanco. Después de 2 horas de calentamiento, la solución se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado blanco se filtró para obtener el compuesto 8d con alta pureza (mayor que el 98%, confirmada por NMR) y 94% de rendimiento (7,51 g).

C. Una mezcla del ácido carboxílico 8d (4,85 g, 18,2 mmoles) y el derivado de anilina 8a (3 g, 1 eq.) En piridina (150 mL, 0,12 M) fue enfriada a -30°C (al enfriar, la solu-

ción transparente se volvió parcialmente una suspensión). Después se añadió lentamente oxicloruro de fósforo (3,56 ml, 2,1 eq.) durante un periodo de 5 min. La mezcla de reacción se agitó a -30°C durante 1 h, se retiró el baño y se dejó calentar la mezcla de reacción a la temperatura ambiente. Después de 1,5 h, la mezcla de reacción se vertió en hielo, se ajustó el pH en 11 con solución acuosa de NaOH 3N, se extrajo con CH_2Cl_2, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró bajo vacío. El sólido de color beige se purificó después mediante cromatografía rápida (45% de EtOAc en hexano) para dar el compuesto 8e en forma de un sólido amarillo pálido con un 73% de rendimiento (6,07 g).

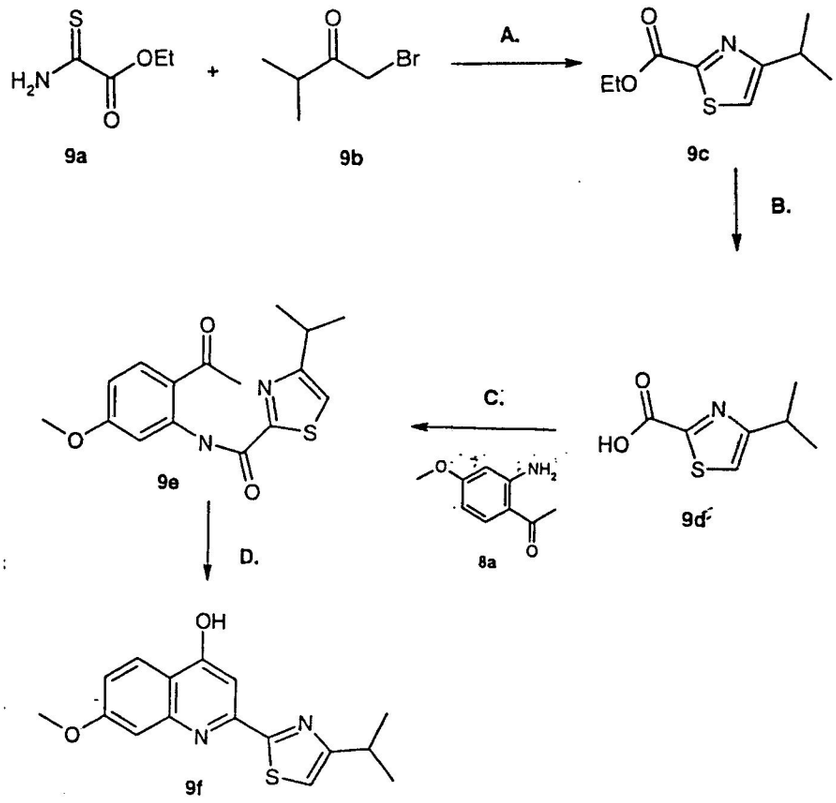
D. Se calentó a reflujo una solución de t-BuOK (2,42 g, 21,6 mmoles) en t-BuOH anhidro (40 mL, 0,14 M, destilado en Mg metálico). Se añadió el compuesto 8e (1,8 g, 5,4 mmoles) en porciones durante 5 minutos y la solución de color rojo oscuro formada se agitó a reflujo durante 20 minutos más (la terminación de la reacción se controló mediante HPLC). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadió HCl (4 N en dioxano, 1,5 eq.). Después se concentró la mezcla bajo vacío con el fin de asegurar que todo el HCl y el dioxano eran eliminados, el producto se redisolvió dos veces en CH_2Cl_2 y se secó bajo vacío para obtener finalmente la sal de HCl del compuesto 8f en forma de un sólido de color beige (1,62 g, 93% de pureza por HPLC). Después se vertió el producto en un tampón de fosfato (NaH_2PO_4 1N, pH aprox. 4,5), y se trató con ultrasonidos. El sólido beige formado se filtró y se secó bajo vacío para dar el compuesto 8f (1,38 g, 81% de rendimiento) en forma de sólido beige (91% de pureza por HPLC).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 8,27 (s, 1H), 8,12 (d, 1H, J = 9,2 Hz); 7,97 (br s, 1H); 7,94 (s, 1H); 7,43 (s, 1H); 7,24 (dd, 1H, J = 9,2, 2,2 Hz); 3,97 (m, 1H); 3,94 (s, 3H); 1,24 (d, 2H, J = 6,4 Hz).

EJEMPLO 9.

Síntesis de 4-hidroxi-7-metoxi-2-[2-(4-isopropiltiazolil)]-quinoleína (9f).

Nota: Se prepararon diversos sustituyentes de 2-(4-alquil)-tiazolilo usando el mismo esquema de síntesis en el que el compuesto 9b era reemplazado por otras α-bromocetonas.



A. A una solución de 3-metil-butan-2-ona (8 g, 93 mmoles) en MeOH (100 mL) a -30°C se añadió gota a gota Br_2 (4,79 mL, 93 mmoles, 1 eq.) durante un periodo de 45 minutos. La mezcla resultante se agitó después a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se añadió pentano y la solución se lavó con solución acuosa de $NaHCO_3$ al 5%, se filtró y se concentró bajo vacío. El aceite amarillo crudo resultante, compuesto 9b, se usó sin más purificación. Una solución de tiooxamato de etilo (9a, 1,8 g, 13,5 mmoles) y derivado de bromocetona 9b (13,5 mmoles) se agitó a 70°C durante 15 h. La mezcla se concentró después bajo vacío y a continuación se purificó mediante cro-

matografía en columna rápida, usando EtOAc al 15% en hexano como eluyente, para obtener el compuesto 9c (740 mg, 28% de rendimiento).

B. Una solución de compuesto 9c (700 mg, 3,5 mmoles) en THF/MeOH/H_2O (relación 3:1:1, 13 mL) fue tratada con $LiOH.H_2O$ (148 mg, 3,5 mmoles, 1 eq.) a temperatura ambiente durante 5 h. Después se ajustó el pH a 6 con HCl 0,1N y la mezcla se concentró a sequedad bajo vacío para obtener el ácido 13d, que se usó directamente en la siguiente etapa sin más purificación.

C. Una solución de 4-metoxi-2-amino-acetofenona (intermedio 8a, 570 mg, 3,45 mmoles) y derivado de ácido carboxílico 9d (590 mg, 3,45 mmoles, 1 eq.) en piridina (30 mL), se enfrió a -20°C. Después se añadió $POCl_3$ (0,35 mL, 3,379 mmoles, 1,1 eq.) gota a gota durante un periodo de 5 minutos. La solución resultante se agitó a -10°C durante 2 h. La reacción se apagó con la adición de H_2O y la mezcla se concentró bajo vacío. El residuo se vertió en una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtró y se concentró bajo vacío. El producto crudo fue purificado mediante cromatografía en columna rápida usando EtOAc al 25% en hexano como eluyente, para dar el compuesto 9e en forma de sólido blanco (740 mg, 67% de rendimiento).

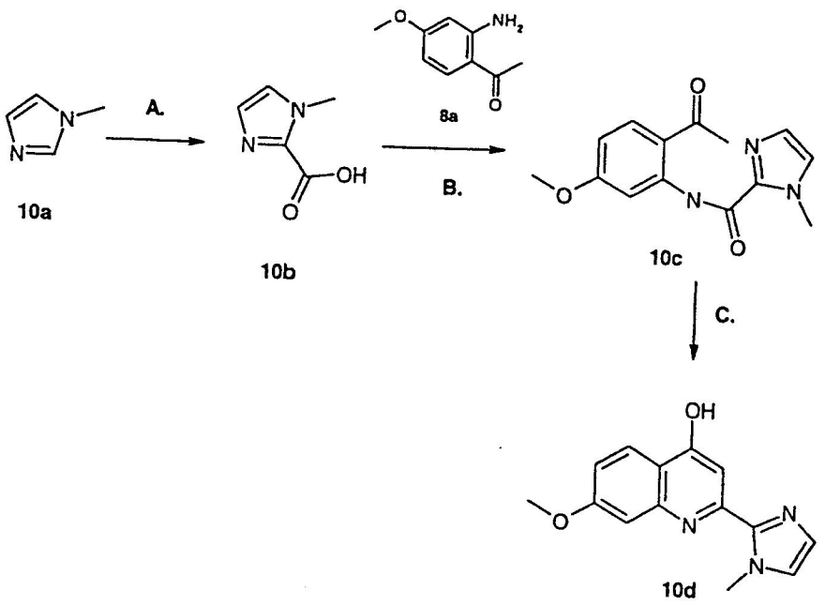
D. Se añadió t-BuOK (518 mg, 2,1 eq.) a una suspensión de compuesto 9e (700 mg, 2,2 moles) en t-BuOH anhidro (11 mL). La mezcla resultante se calentó a 75°C durante 7,5 h, después se enfrió la solución a temperatura ambiente y se acidificó mediante la adición de HCl (HCl 4N en dioxano, 2,5 mL). La mezcla se concentró bajo vacío y el residuo obtenido se vertió en una solución de NaH_2PO_4 1N y se filtró. Después se trituró el material sólido con una pequeña cantidad de EtOAc, se filtró y se secó bajo vacío para obtener compuesto 9f como un sólido de color beige pálido (270 mg, 41% de rendimiento).

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,0 (br s, 1H), 7,60 (br s, 1H); 7,51 (br s, 1H); 7,43 (br s, 1H); 7,29 (br s, 1H); 7,14 (br

s, 1H); 6,95 (br a, 1H); 3,90 (s, 3H); 3,15 (m, 1H); 1,33 (d, J = 5,4 Hz, 6H).

EJEMPLO 10.

Síntesis de 4-hidroxi-2-(1-metil-2-imidazolil)-7-metoxiquinoleína (10d).



A. Una solución de N-metilimidazol 10a (5 g, 61 mmoles) en 100 mL de THF se enfrió a -78°C. Se añadió solución de n-BuLi (24,4 ml de una solución 2,5M/Et_2O, 1 eq.) gota a gota durante 15 minutos. La mezcla resultante se agitó durante 90 minutos a -78°C, después se vertió en porciones sobre CO_2 sólido en exceso. La mezcla heterogénea se agitó 2 h y se dejó que alcanzase la temperatura ambiente. Se añadió HCl 1N hasta pH 5 y la capa acuosa se separó y se liofilizó. El residuo así obtenido se extrajo con EtOAc (para eliminar las sales), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró bajo presión reducida. Se obtuvieron 6,2 g (80% de rendimiento) de un sólido blanco 10b.

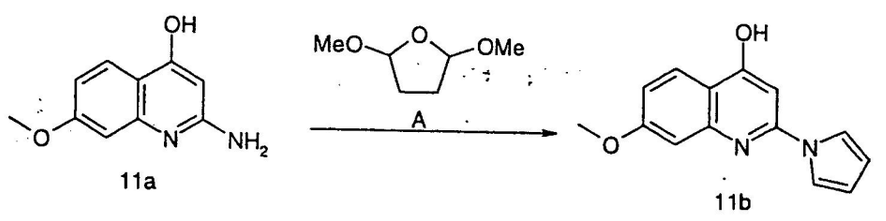
B. Una solución de 4-metoxi-2-amino-acetofenona 8a (394 mg, 2,39 mmoles) y el derivado de ácido carboxílico 10b (301 mg, 1 eq.) en piridina (10 ml) se enfrió a -20°C. Después se

añadió gota a gota $POCl_3$ (244 µl, 1,1 eq.) durante 5 minutos. La solución resultante se agitó a -10°C durante 2,5 h. Después se añadió agua y la mezcla se concentró bajo presión reducida. El residuo se vertió en una solución saturada de $NaHCO_3$ y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró bajo presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía usando gel de sílice (25% de EtOAc/Hex) dando 530 mg (81% de rendimiento) de un sólido de color amarillo pálido 10c.

C. Se añadió t-BuOK (431 g, 2,1 eq.) a una suspensión del sustrato 10c (500 mg, 1,8 mmoles) en 8 ml de t-BuOH. Después se calentó la mezcla resultante a 75°C durante 7 h. Se dejó que la solución llegase a la temperatura ambiente durante la noche y se añadieron 2,5 ml de HCl (4N/dioxano). La mezcla se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se diluyó con EtOAc. Se añadió NaOH 1N hasta que se obtuvo un pH de 7. La fase orgánica se separó y se secó ($MgSO_4$), se filtró, y se concentró bajo presión reducida para dar 145 mg de 10 d (31% de rendimiento) en forma de un sólido de color beige pálido. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7,99 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 7,49 (s, 1H); 7,37 (s, 1H); 7,18 (s, 1H); 6,92 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 6,31 (s, 1H), 3,87 (s, 3H); 3,84 (s, 3H).

EJEMPLO 11.

Síntesis de 4-hidroxi-2-(1-pirrolil)-7-metoxiquinoleína (11b).



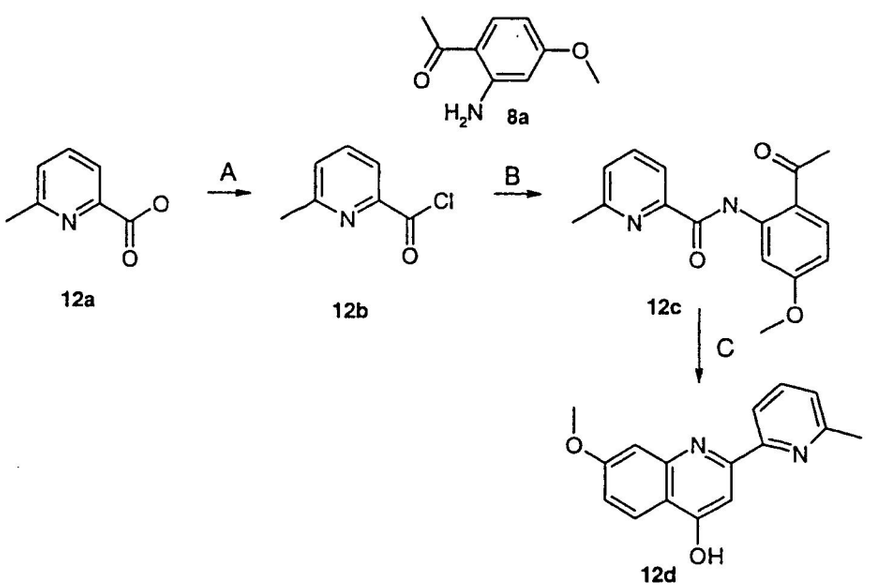
A. Una solución del sustrato 11a (obtenido a partir del compuesto 6c después de hidrogenolisis del grupo bencilo con Pd/C al 5% en etanol-THF) (1 g, 5,25 mmoles) y 2,5-dimetoxi-tetrahidrofurano (0,68 ml, 1 eq.) en ácido acético glacial se

calentó a reflujo durante 4,5 h y se dejó que alcanzase la temperatura ambiente. Después se concentró la mezcla bajo presión reducida. El residuo se diluyó con metanol y se añadió solución acuosa de NaOH 1N hasta alcanzar el pH 7. El producto se purificó mediante cromatografía usando gel de sílice (3% de $MeOH/CH_2Cl_2$, el residuo estaba pre-adsorbido sobre gel de sílice). Se obtuvieron 140 mg (13% de rendimiento) de 11b en forma de sólido blanco.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7,98 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,64 (s, 2H); 7,18 (d, J = 2,5 Hz, 1H); 7,50 (br d, J = 7,9 Hz, 1H); 6,88 (br s, 1H); 6,32 (s, 2H); 3,90 (s, 3H).

EJEMPLO 12.

Síntesis de 4-hidroxi-7-metoxi-2-(6-metil-2-piridil)quinoleína (12d).



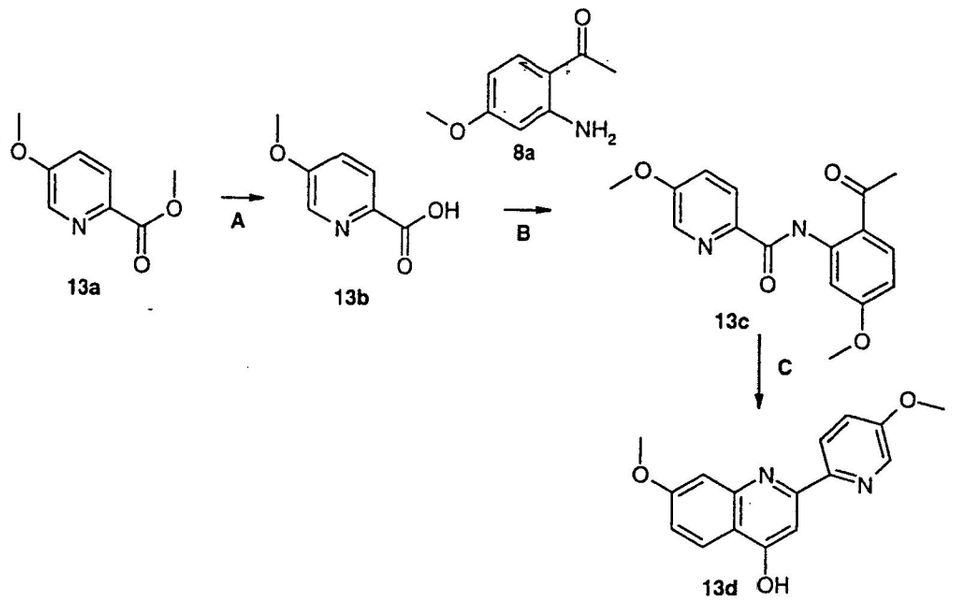
A. Se calentaron a reflujo ácido 6-metilpicolínico 12a (411 mg, 3,0 mmoles) y $SOCl_2$ (0,520 mL, 7,2 mmoles, 2,4 eq.) en benceno (5 mL) durante 2 h. El disolvente y el SO_2 en exceso se eliminaron de la mezcla de reacción bajo vacío, y el residuo se trituró con pentano. El material sólido formado se separó por filtración y el filtrado se concentró para dar el cloruro de ácido 12b (500 mg, 2,6 mmoles).

B. A una solución del cloruro de ácido 12b crudo en CH_2Cl_2 (5 mL) a 0°C se añadieron una solución de la anilina 8a (344 mg, 2,08 mmoles), DIPEA (1,45 mL, 8,35 mmoles) y DMAP (61 mg, 0,5 mmoles) en CH_2Cl_2 (10 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Los componentes volátiles se eliminaron bajo vacío, el residuo se disolvió en EtOAc y la solución se lavó con solución de $NaHCO_3$ al 5% (2x), H_2O y salmuera. La capa orgánica se secó después sobre $MgSO_4$ y se concentró bajo vacío. La mezcla se purificó mediante cromatografía en columna rápida, usando EtOAc/hexano (1:2) como eluyente para obtener la amida 12c (490 mg, 82%).

C. A una suspensión de amida 12c (490 mg, 1,71 mmoles) en t-BuOH (10 mL), se añadió t-BuOK (410 mg, 3,34 mmoles) y la mezcla se agitó a 75°C durante 6 h y después a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se vertió entonces sobre tampón de fosfato (175 mL, pH = 7) y se agitó durante 30 minutos. El sólido se trituró dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró bajo vacío. El sólido obtenido fue triturado con EtOAc para dar el derivado de quinoleína 12d (263 mg, 58%). ^1H NMR ($CDCl_3$,400 MHz): δ 2,68 (s, 3H); 3,94 (s, 3H); 6,85-6.88 (2d, J = 8,68 y 9,5 Hz, 2H); 6,94 (dd, J = 8,9 y 2,2 Hz, 1H); 7,27 (dd, J = 6,7 y 1,9 Hz, 1H); 7,73-7,79 (m, 2H); 8,28 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 10,3 (br s, 1H).

EJEMPLO 13.

Síntesis de 4-hidroxi-7-metoxi-2-(5-metoxi-2-piridil)quinoleína (13d).



A. A una solución de compuesto 13a (623 mg, 3,73 mmoles) en MeOH, se añadió NaOH (2M, 4,70 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después se acidificó la solución con HCl (6N, 2,2 mL) y se concentró para obtener el compuesto 13b, que se usó en la siguiente etapa sin purificar.

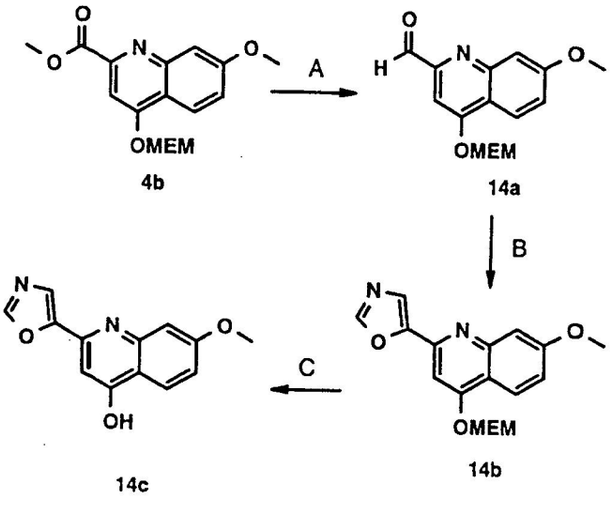
B. A una solución del compuesto crudo 13b (aprox. 3,73 mmoles) en piridina (25 mL) se añadió la anilina 8a (500 mg, 3,03 mmoles) y la solución se enfrió a -25°C antes de añadir $POCl_3$ (0,35 mL, 3,73 moles). La mezcla de reacción se agitó a -10°C durante 1 h y después a 0°C durante 2 h. Después se vertió la mezcla sobre H_2O y se extrajo con EtOAc (2-3x). Las capas orgánicas reunidas se lavaron con $NaHCO_3$ al 5% y salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$ y se concentraron bajo vacío. El material crudo fue purificado mediante cromatografía en columna rápida usando EtOAc/hexano (1:2) como eluyente, para dar la amida 13c (617 mg, 55%).

C. A una suspensión de la amida 13c (617 mg, 2,05 mmoles) en t-BuOH anhidro (10 mL), se añadió t-BuOK (490 mg, 4,11 mmoles) y la mezcla se agitó a 75°C durante 6 h y después a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se vertió en tampón de fosfato (175 mL, pH = 7) y se agitó

durante 30 minutos. El material sólido formado se filtró y se trituró con EtOAc para dar el derivado de quinoleína 13d (250 mg, 43%). ^{1}H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 3,86 (s, 3H); 3,94 (s, 3H); 6,72 (b s, 1H); 6,91 (dd, J = 8,9 y 1,9 Hz, 1H); 7,54 (d, J = 1,9, 1H); 7,60 (dd, J = 8,9 y 2,9 Hz, 1H); 7,97 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 8,21 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 8,48 (d, J = 1,9 Hz, 1H).

EJEMPLO 14.

Síntesis de 4-hidroxi-7-metoxi-2-(oxazol-5-il)quinoleína (14c).



A. El derivado de quinoleína protegido 4b del Ejemplo 4 (3,8 mg, 11,8 mmoles) se disolvió en CH_2Cl_2 (60 mL) y se enfrió a -78°C antes de añadir hidruro de diisobutil-aluminio (7,9 mL, 1 eq., 1,5M en tolueno) muy lentamente a lo largo de 15 minutos. Después de agitar durante 80 min., se añadió una cantidad adicional de DIBAL (5,5 mL, 0,7 eq., 1,5 M en tolueno). Después de agitar a -78°C durante 2 h más, la reacción fue apagada cuidadosamente con metanol (4 mL) a -78°C y después se vertió en una solución acuosa de sal de Rochelle (tartrato de Na-K 1N). La pasta espesa se agitó con CH_2Cl_2 (300 mL) durante 2 h hasta quedar clara. Se separaron las fases y la fase orgánica se secó ($MgSO_4$), se filtró y se

concentró para dar un sólido blanco. La purificación mediante cromatografía rápida (SiO_2, malla 230-400) con EtOAc al 50%/ hexano dio el aldehído 14a en forma de un sólido blanco (2,5 g, 73%).

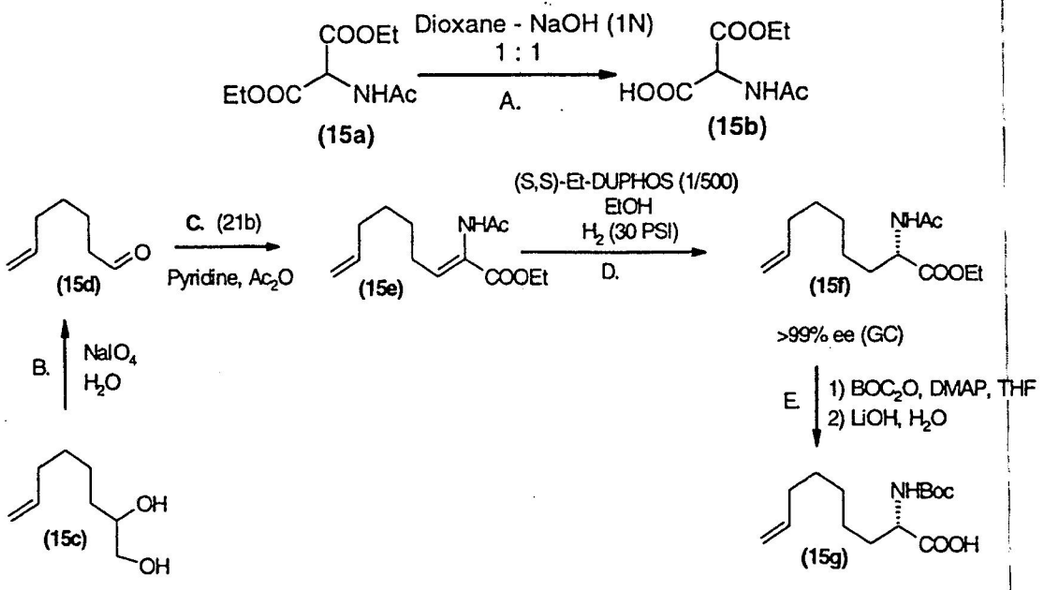
B. A una suspensión agitada de K_2CO_3 (48 mg, 0,34 mmoles) en MeOH (7 mL) se añadió toluenosulfonilmetil-isocianuro (66 mg, 0,34 mmoles). La mezcla de reacción se calentó a 45°C y se añadió aldehído 14a (0,10 g, 0,34 mmoles). La mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 16 h y después se concentró a sequedad bajo vacío. La purificación se realizó mediante cromatografía rápida (SiO_2, malla 230-400) para dar el oxazol deseado 14b (0,089 g, 80%). MS: 331,0 $(M+H)^+$.

C. La hidroxiquinoleína protegida MEM 14b se disolvió en THF (3 mL) y se trató con HCl acuoso (1N, 1 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de ser concentrada a sequedad bajo vacío. El residuo se trató con tampón de fosfato (3 mL, solución 1N, pH 4,5) y se agitó antes de filtrar el producto, se lavó con agua destilada y se secó durante la noche bajo vacío elevado (60°C, 16 h). La hidroxiquinoleína deseada 14c se obtuvo en forma de un sólido de color canela (0,065 g, 100%). MS: 242,9 $(M+H)^+$. ^1H NMR (DMSO-d_6): δ 8,65 (s, 1H); 8,02 (bs, 1H); 7,97 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 7,19 (s, 1H); 6,39 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 6,42 (b s, 1H); 3,87 (s, 3H); ES (+) MS: m/z 242,9 $(M+H)^+$.

RESTOS ENLAZADORES DE PEPTIDOS (P3)

EJEMPLO 15.

Síntesis de ácido (2S)-N-Boc-amino-non-8-enoico (15g).



A. A una solución de 2-acetamidomalonato de dietilo 15a disponible comercialmente (100 g, 0,46 moles) en dioxano (500 mL) se añadió solución acuosa de hidróxido sódico (1 M, 1 eq. 460 mL) gota a gota durante 30 a 45 minutos. La mezcla resultante se dejó agitando durante 16,5 h y luego se evaporó el dioxano bajo vacío, la solución acuosa se extrajo con tres porciones de 300 mL de acetato de etilo y se acidificó a pH 1 con HCl concentrado. Esta solución se dejó cristalizar en un baño de hielo fundente. Después de aparecer algunos cristales, la mezcla se sometió a ultrasonidos y apareció un abundante precipitado. La filtración y el secado bajo vacío dieron el compuesto 15b (62,52 g, 72% de rendimiento) en forma de un sólido blanco.

B. A una emulsión agitada magnéticamente de 7-octeno-1,2-diol 15c (25 g, 0,173 moles) comercialmente disponible y H_2O (100 mL), en un matraz de fondo redondo de 1 L, se añadió una solución acuosa de peryodato sódico (40,7 g, 0,190 moles, 1,1 eq., en 475 mL de H_2O) durante un periodo de 20 minutos (ligeramente exotérmica). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h más (la terminación de la reacción se confirma mediante TLC). Después se decantó la mezcla en un embudo de separación y la capa acuosa se separó de la

capa orgánica. La solución acuosa se saturó con NaCl, se decantó y se separó de la fracción orgánica una vez más. Las dos fracciones orgánicas se reunieron, se secaron sobre sulfato sódico y se filtraron sobre un tapón de algodón (en una pipeta pasteur) para dar el compuesto 15d (15,135 g, aceite incoloro, 78% de rendimiento). La solución acuosa se extrajo con CH_2Cl_2, se secó con $MgSO_4$ anhidro y se concentró bajo vacío (sin calentamiento, heptanal p. eb. 153°C) para obtener una cantidad adicional de compuesto 15 d (1,967 g, aceite incoloro, 10% de rendimiento). Rendimiento total 88%.

C. A 2-acetamidomalonato de etilo sólido 15b (7,57 g, 40 mmoles) se añadió 6-heptenal 15d (4,48 g, 40 mmoles) en solución en piridina (32 mL, 10 eq.) durante 1 minuto. La solución resultante se enfrió en un baño a 10°C y se añadió anhídrido acético (12 mL, 3,2 eq.) durante 4 minutos. La solución de color naranja resultante se agitó durante 3 h a temperatura ambiente, y se añadió otra porción de 2-acetamidomalonato de etilo 15b (2,27 g). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 11 h más. Después se añadió hielo (60 mL) y la solución se agitó durante 1,5 h, después la mezcla se diluyó con 250 mL de agua y se extrajo con dos porciones de éter. La solución etérea se lavó con HCl 1N y solución saturada de $NaHCO_3$, se secó con Na_2SO_4, se concentró y se purificó mediante cromatografía rápida (EtOAc 40%/hexano) para dar el compuesto 15e (4,8 g, 50% de rendimiento) en forma de un aceite amarillo pálido.

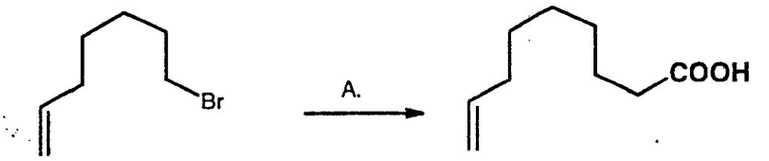
D. A una solución desgasificada (burbujeo de argón durante 30 minutos) de 2-acetamido-2,8-nonadienoato de Z-etilo 15e (8,38 g, 35 mmoles) en etanol seco (70 mL) se añadió (S,S)-Et-DUPHOS Rh(COD)OTf (51 mg, S/C=496). La mezcla se puso bajo 2,1 atmósferas de hidrógeno (después de 4 ciclos de vacío-H_2) y se agitó en un agitador Parr durante 2 h. La mezcla resultante se evaporó a sequedad para obtener el compuesto crudo 15f, que se usó en la subsiguiente etapa sin purificar.

E. A una solución de 2-acetamido-8-nonenoato de (S)-etilo crudo 15f (7,3 g, 30,3 mmoles) en THF (100 mL), se añadieron

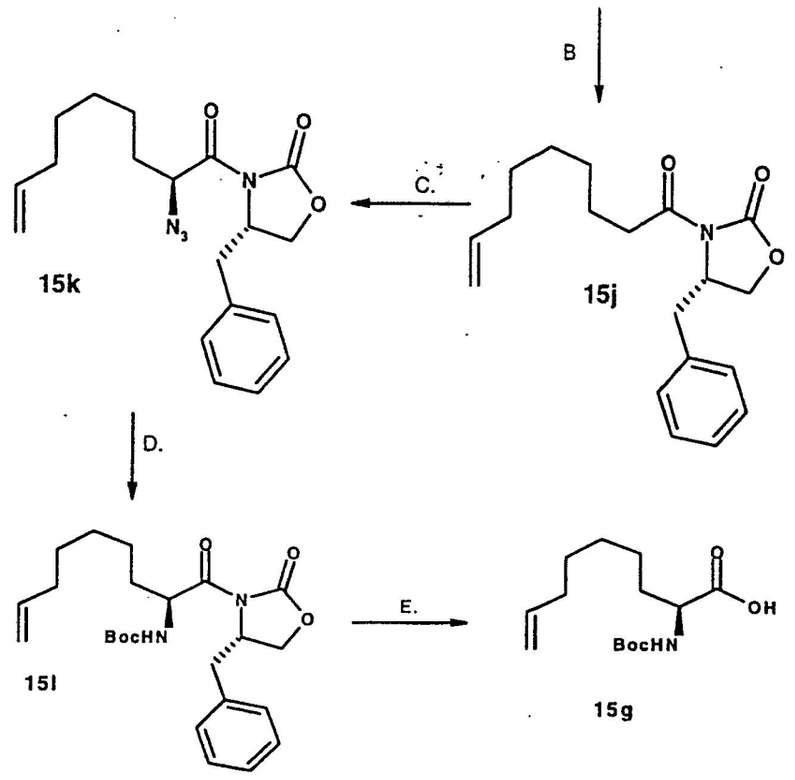
Boc_2O (13,2 g, 2 eq.) y DMAP (740 mg, 0,2 eq.), y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2,5 h. Subsiguientemente, la mayoría del disolvente THF fue evaporado, se diluyó la mezcla cruda con CH_2Cl_2 y se lavó con HCl 1N con el fin de eliminar el DMAP. La capa orgánica se extrajo más intensamente con solución acuosa saturada de $NaHCO_3$, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró bajo vacío. El producto se diluyó después con THF (50 mL) y agua (30 mL), se añadió $LiOH \cdot H_2O$ (2,54 g, 2 eq.) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 25 h (la terminación de la hidrólisis se confirmó mediante TLC). La mezcla de reacción se concentró bajo vacío para eliminar la mayor parte del disolvente THF y se diluyó con CH_2Cl_2. La solución resultante se lavó con HCl 1N, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró bajo vacío. Para eliminar impurezas menores y el Boc_2O en exceso, el producto crudo fue purificado mediante cromatografía rápida (usando un gradiente de disolvente de 100% de hexano - 100% de EtOAc como eluyente). El compuesto del título 15 g se obtuvo con una elevada pureza en forma de aceite amarillo pálido (5,82 g, 71% de rendimiento). ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 7,01 (d, J = 8 Hz, 1H); 5,79 (tdd, Jt = 6,7 Hz, Jd = 17,0, 10,2 Hz, 1H), 5,00 (md, Jd = 17,0 Hz, 1H); 4,93 (md, Jd = 10,2 Hz, 1H); 3,83 (m, 1H); 2,00 (q, J = 6,9 Hz, 2H); 1,65-1,5 (m, 2H); 1,38 (s, 9H); 1,35-1,21 (m, 6H).

EJEMPLO 15A.

Síntesis alternativa de ácido (2S)-N-Boc-amino-non-8-enoico.



15h **15i**



A. A una suspensión agitada de tiras de Mg cortadas finamente (0,55 g, 22,5 mmoles) en THF seco (30 mL) que contiene dibromoetano (0,1 mL), se añadió gota a gota 8-bromo-1-octeno (15 h, 2,52 mL, 15 mmoles) a lo largo de un periodo de 15 min (la reacción es ligeramente exotérmica). Después de 30 min., la mezcla se calentó a 38°C durante 1 h y después se enfrió a -78°C 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 crudo que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando EtOAc al 15% en hexanos como eluyente para dar el compuesto 15i con un 62% de rendimiento (1,44 g).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ1,31-1,42 (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).

B. A una solución vigorosamente agitada del ácido carboxílico 15i (1,36 g, 8,7 mmoles) en THF anhidro (70 mL) a -78°C,

se añadieron Et_3N recién destilado (1,6 mL; 11,3 mmoles) y cloruro de pivaloílo (1,18 mL, 9,58 mmoles) mediante una jeringa bajo condiciones anhidras. La mezcla se agitó a -78°C durante 15 minutos y después a 0°C durante 45 minutos. La mezcla se enfrió de nuevo a -78°C 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°C; 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 mmoles) a una solución en THF (20 mL) de la oxazolidinona (2,78 g, 15,7 mmoles) en THF a -78°C.

La mezcla de reacción se agitó a -78°C durante 15 minutos y después a temperatura ambiente durante 1,5 h. Finalmente, fue apagada con una solución acuosa de bisulfato sódico (100 mL de 1M) 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 solución de $NaHCO_3$ al 5% (3 x 50 mL) y salmuera (2 x 50 mL), se secaron sobre $MgSO_4$ y se evaporaron. El aceite crudo resultante se cromatografió en gel de sílice usando EtOAc al 15% en hexanos para obtener el compuesto 15j 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, 1H); 5,00 (dd, J = 17,2 y 1,6 Hz, 1H); 5,75-5,84 (m, 1H); 7,18-7,38 (m, 5H).

C. A una solución agitada de KHMDS (0,8 M THF, 22 mL, 17,5 mmoles) en THF seco (50 mL) a -78°C se añadió por medio de una cánula una solución del derivado de ácido j (3,25 g, 10,30 mmoles) en THF seco (40 mL) a -78°C. La mezcla se agitó a -78°C durante 45 minutos. A esta mezcla se añadió una solución de trizilazida (3,67 g, 11,85 moles) en THF seco (40 mL) a -78°C. La mezcla se agitó a -78°C durante 3 minutos y después se apagó con ácido acético (5 mL). Subsiguientemente, se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y 45 minutos y finalmente a 40°C durante 15 minutos. 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 con $MgSO_4$ 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 15k (2,47 g, rendimiento 67%).

^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,32-1,45 (m, 6H); 1,45-1,6 (m, 6H); 1,75-1,88 (2, 2H, rotámeros); 2,01-2,11 (m, 2H); 2,82-2,87 (m, 1H); 3,33 (dd, J = 13,5 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).

D. A una solución agitada de $SnCl_2$ anhidro (2,61 g, 13,8 mmoles) en MeOH anhidro (80 mL), se añadió mediante cánula una solución de la azida 15k (2,45 g, 6,9 mmoles) a 0°C en MeOH anhidro (20 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente 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 mmoles) y $NaHCO_3$ (2,89 g, 34,5 mmoles) (el pH se ajusta en 8 con más $NaHCO_3$ si es necesario) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Parte del dioxano se evaporó (aprox. 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 20-25% de EtOAc en hexano como eluyente para dar el compuesto 15l (1,75 g, rendimiento 60%).

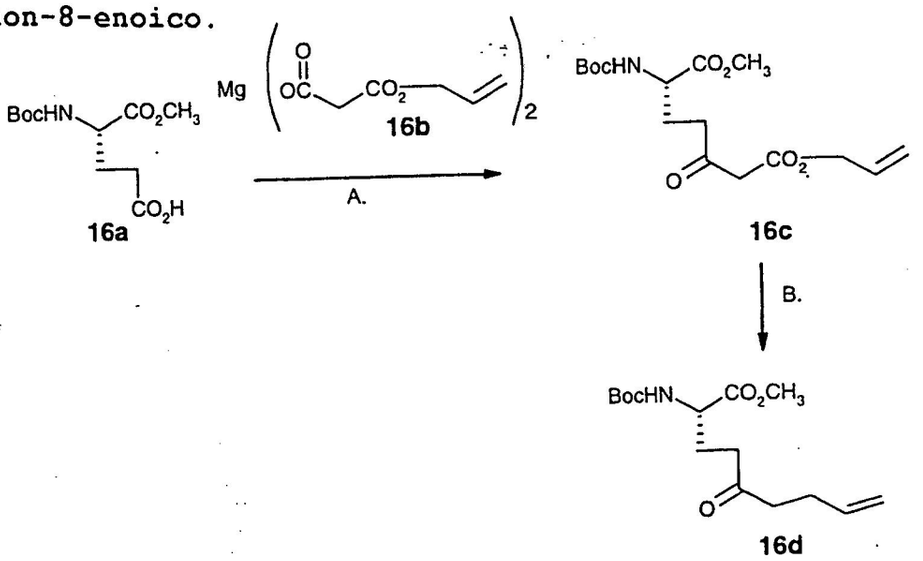
^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,27-1,53 (m, 6H); 1,46 (s, 9H); 1,80 (m, 1H); 2,00-2,08 (m, 1H); 2,80 (t, J = 12,1 Hz, 1H); 3,34 (d, 14,3 Hz, 1H); 4,17-4,23 (m, 2H); 4,60-4,66 (m, 1H); 4,93 (d, J = 10,2 Hz, 1H); 5,05 (dd, J = 17,2 y 1,9 Hz, 1H); 5,13 (bs, 1H); 5,38-5,43 (m, 1H); 5,74-5,84 (m, 1H); 7,22-7,36 (m, 5H).

E. A una solución agitada a 90°C del derivado N-Boc 15l (1,74 g, 4,04 mmoles) en THF/H_2O (75 mL/15 mL), se añadieron H_2O_2 (30% v/p, 2,05 mL, 16,2 mmoles) y $LiOH.H_2O$ (0,34 g, 8,1 mmoles) y la solución se agitó a 0°C durante 1 hora. La reac-

ción fue apagada con Na_2SO_3 (2,24 g en H_2O, 15 mL, 17,8 mmoles). El pH se ajustó en 4-5 con solución acuosa de ácido cítrico 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 20% de hexano en EtOAc como eluyente, para dar el ácido carboxílico libre 15g (0,76 g, rendimiento 70%). Este compuesto era idéntico en todos sus aspectos al obtenido en el Ejemplo 15.

EJEMPLO 16

Síntesis del éster metílico del ácido (2S)-N-Boc-amino-5-oxo-non-8-enoico.



Esta síntesis se basa en la metodología de T. Tsuda et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 6381-6384.

A. A una solución bien agitada del éster monoalílico del ácido malónico (1,50 g, 10,4 mmoles) en THF seco bajo N_2 (20 mL) a -78°C, se añadió gota a gota n-Bu_2Mg (0,9M/hexano, 5,8 mL, 5,2 mmoles) durante un periodo de 5 minutos. La suspensión pesada se agitó después a temperatura ambiente durante 1 hora y se evaporó a sequedad (vacío liberado bajo N_2). La sal sólida de Mg 16b fue secada bajo vacío durante 1 hora.

El derivado de ácido glutámico 16a se mezcló primero con 1,1'-carbonil-diimidazol (1,65 g, 10,21 mmoles) en THF anhidro, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para activar el resto ácido libre. Subsiguientemente, el resto de ácido glutámico activado fue canulado en una solución de la sal de Mg 16b y la mezcla de reacción obtenida se agitó temperatura ambiente durante 16 horas. 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 35-40% de EtOAc en hexano como eluyente para dar el compuesto 16c (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); 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).

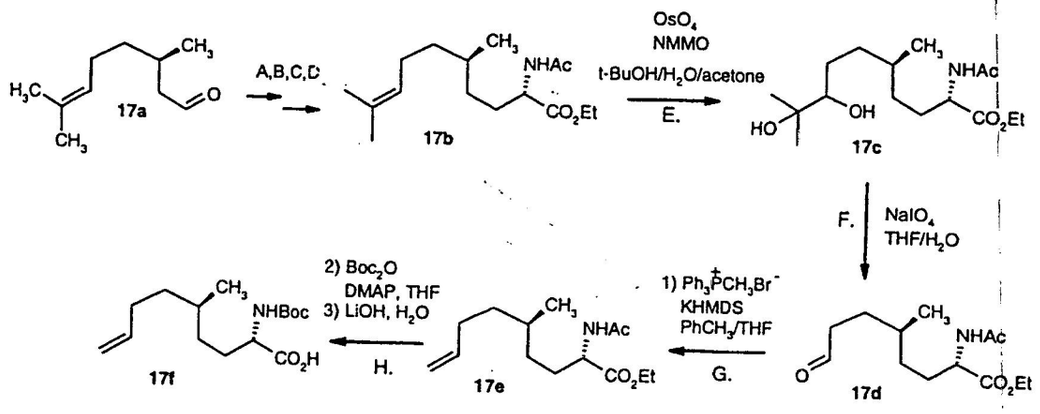
B. A una solución bien agitada de tetraquis(trifenilfosfina) Pd(0) (0,116 g, 5% en moles, 0,1 mmoles) en DMF seco (7 mL) se añade (mediante jeringuilla y bajo atmósfera de N_2) el diéster 16c (0,687 g, 2 mmoles) en DMF seco (3 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas. La DMF fue evaporada bajo presión reducida y el residuo se diluyó con EtOAc (20 mL). La solución en EtOAc se lavó con HCl 0,5N enfriado con hielo (5 mL), y con salmuera (10 mL), se secó y se evaporó. El residuo fue cromatografiado sobre gel de sílice usando 15-20% de EtOAc en hexano como eluyente para dar el compuesto 16d (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); 4,92 (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).

EJEMPLO 17.

Síntesis de ácido (2S,5R)-N-Boc-2-amino-5-metil-non-8-enoico

(17f).



A,B,C,D. (R)-(+)-Citronelal 17a disponible comercialmente fue convertido primero en el derivado de aminoácido 17b siguiendo las mismas etapas de síntesis que las descritas anteriormente en el Ejemplo 15 para la conversión de aldehído 15d en el producto intermedio de aminoácido 15f.

E. El compuesto 17b (0,675 g, 5,6 mmoles) se disolvió en una mezcla de t-BuOH/acetona/H_2O (1:1:1, 18 mL) y se puso en un baño de hielo (0°C). Se añadieron consecutivamente NMMO (0,789 g, 6,74 mmoles, 1,2 eq.) y OsO_4 (2,5% p/p en t-BuOH, 0,7 mL, 0,067 mmoles, 0,012 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mayor parte de la acetona se eliminó por evaporación bajo vacío y después se extrajo la mezcla con EtOAc. La capa orgánica se lavó más con H_2O y salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ anhidro y se evaporó a sequedad. El diol 17c se obtuvo con alta pureza después de cromatografía en columna rápida usando 1% de EtOH en EtOAc como eluyente, con un 77% de rendimiento (0,575 g).

F. A una solución de diol (0,575 g, 1,73 mmoles) en THF/H_2O (1:1, 20 mL) a 0°C, se añadió $NaIO_4$ (0,48 g, 2,25 mmoles, 1,3 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas. La mayor parte del disolvente de THF fue subsiguientemente eliminado por evaporación bajo vacío y la mezcla restante se extrajo con EtOAc (2x100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron más con solución acuosa de ácido cítrico al 5% (2x20 mL), solución acuosa de $NaHCO_3$ al

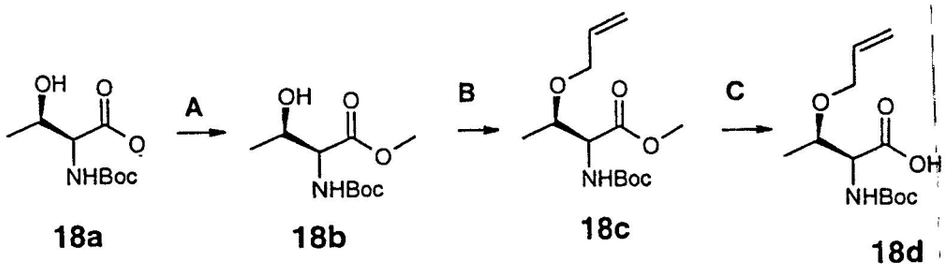
5% (20 mL) y con salmuera (2x50 mL), y después la solución en EtOAc se secó bajo $MgSO_4$ anhidro y se evaporó a sequedad bajo vacío. El producto intermedio de aldehído 17d (0,47 g de producto crudo) fue usado en la etapa siguiente sin más purificación.

G. A una solución de Ph_3PCH_3Br (925 mg, 2,6 mmoles) en tolueno anhidro (15 mL), se añadió KHMDS (0,5 M en tolueno, 5,2 mL, 2,6 mmoles) y la suspensión amarilla formada se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos bajo N_2. Después de ese periodo, la suspensión fue primero enfriada a 0°C, se añadió una solución del aldehído 17d (0,47 g, 1,73 mmoles, disuelto en 15 mL de THF anhidro) mediante una jeringa, y se dejó calentar la mezcla a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, la mayor parte del THF se eliminó por evaporación bajo vacío, se añadió a la mezcla EtOAc (100 mL), y la capa orgánica se lavó con H_2O (30 mL), solución acuosa de $NaHCO_3$ al 5% (30 mL) y salmuera (30 mL). La solución en EtOAc se secó después sobre $MgSO_4$ anhidro y se evaporó a sequedad bajo vacío. El compuesto puro 17e fue aislado después de purificación por cromatografía en columna rápida sobre gel de sílice usando hexano:EtOAc (3:2) como eluyente, con un rendimiento del 63% (0,29 g) para las dos últimas etapas.

La hidrólisis del éster etílico y el intercambio simultáneo del grupo protector de N-acetilo por un Boc en el intermedio 17e para obtener el compuesto 17f se llevó a cabo usando el mismo procedimiento que se indicó para la conversión de compuesto 15f en 15g (17f, 310 mg, cuantitativo). ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 0,88 (d, J = 6,4 Hz, 3H); 1,18-1,28 (m, 2H); 1,35-1,48 (m, 3H); 1,45 (s, 9H); 1,64-1,74 (m, 1H); 1,81-1,89 (m, 1H); 1,94-2,12 (m, 2H); 4,28 (bd, J = ~3,2 Hz, 1H); 4,93 (dm, J = 11,1 Hz, 1H); 5,00 (dm, J = 16,8 Hz, 1H); 5,74-5,84 (m, 1H).

EJEMPLO 18.

Síntesis de N-Boc-O-alil-(L)-treonina (18d).



18a **18b** **18c** **18d**

A. Se disolvió parcialmente Boc-(L)-treonina 18a (500 mg, 2,28 mmoles) en CH_2Cl_2/MeOH (8 mL/0,5 mL respectivamente) a 0°C. Se añadió lentamente una solución de diazometano en dietil-éter hasta que persistió el color amarillo, indicando la presencia de diazometano en exceso. Al evaporar los disolventes, se obtuvo éster metílico 18b crudo en forma de aceite blanco turbio (0,534 g).

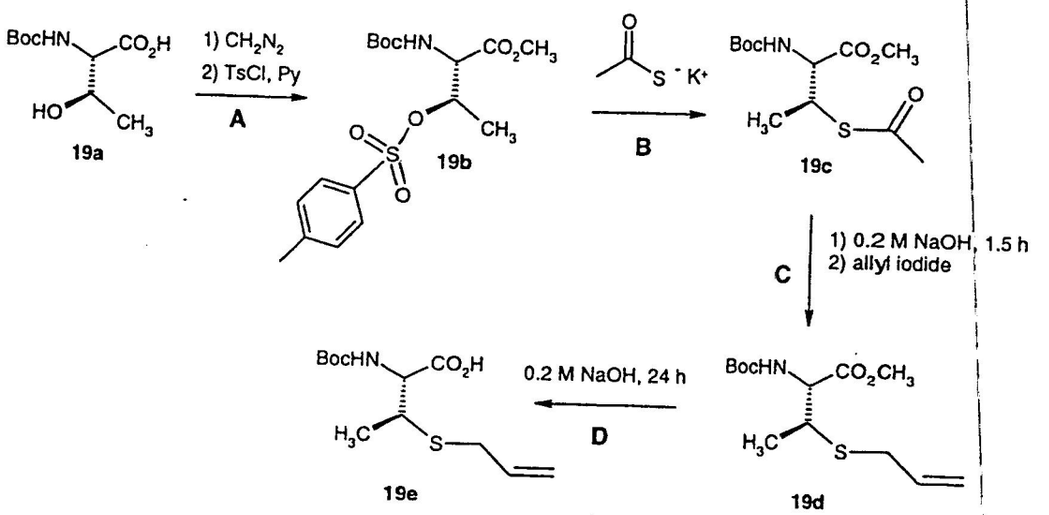
B. El producto intermedio 18b (311 mg, 1,33 mmoles) se disolvió después en dietil-éter anhidro (8 mL), se añadió Ag_2O (341 mg, 1,47 mmoles) y tamices moleculares de 4Å recién activados (1 g). Finalmente se añadió yoduro de alilo (134 µL, 1,47 mmoles) al matraz de reacción, y la mezcla se agitó a reflujo. Se añadieron dos porciones más de yoduro de alilo (45 µL, 0,50 mmoles, cada vez) después de un periodo de 20 h y 30 h, y se siguió agitando durante un total de 36 horas. después la mezcla se filtró a través de celite y se purificó mediante cromatografía en columna rápida sobre gel de sílice, usando EtOAc/hexano (1:4) como eluyente, para dar 73 mg (27% de rendimiento) de compuesto 18c como un aceite transparente. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1,21 (d, J = 6,0 Hz, 3H); 1,45 (s, 9H); 3,75 (s, 3H); 3,82-3,87 (m, 1H); 3,99-4,07 (m, 2H); 4,29 (dd, J = 9,5 y 2,5 Hz, 1H); 5,14 (dm, J = 10,5 Hz, 1H); 5,21 (dm, J = 17,2 Hz, 1H); 5,75-5,84 (m, 1H).

C. El compuesto éster 18c (99 mg, 0,362 mmoles) se disolvió en una mezcla de THF/MeOH/H_2O (2:1:1,4 mL) y se añadió $LiOH.H_2O$ (61 mg, 1,45 mmoles). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y después se acidificó con HCl 1N a pH aprox. 3 antes de eliminar los disolventes bajo vacío.

El aceite resultante, compuesto 18d, se usó tal cual para la síntesis de inhibidores macrocíclicos.

EJEMPLO 19.

Síntesis de ácido (2S,3S)-N-Boc-2-amino-3(mercaptoalil)butanoico (19e).



A. El compuesto 19a (9,1 mmoles) se disolvió en piridina (5 mL) y la solución se enfrió a 0°C en un baño de hielo, se añadió cloruro de tosilo (2,3 g, 11,8 mmoles, 1,3 eq.) en pequeñas porciones, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Después de ese periodo, la mezcla de reacción se repartió entre dietil-éter (300 mL) y H_2O (100 mL). La capa etérea se siguió lavando con HCl 0,2 N (6x100 mL) y salmuera (100 mL), se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad bajo vacío. La purificación del material crudo mediante cromatografía en columna rápida usando hexano/EtOAc (gradiente de relación 8:2 a 7:3) como eluyente, condujo al aislamiento de derivado de tosilo 19b con un 85% de rendimiento (3,05 g).

B. A una solución de producto intermedio 19b (775 mg, 2 mmoles) en DMF anhidro (2,5 mL) se añadió tioacetato potásico (365 mg, 3,2 mmoles, 1,6 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mayor parte de la DMF fue después evaporada bajo vacío y la mezcla que que-

daba se repartió entre EtOAc y H_2O. La capa acuosa se reextrajo con EtOAc, las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro y se evaporaron a sequedad. La purificación del material crudo mediante cromatografía en columna rápida usando hexano/EtOAc (relación 4:1) como eluyente, condujo al aislamiento del compuesto 19c con un rendimiento del 80% (465 mg).

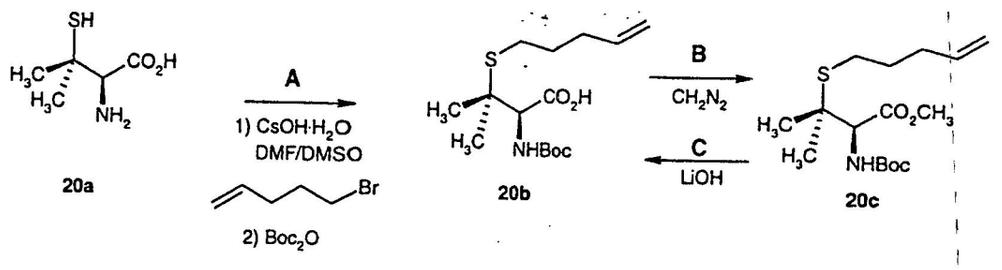
C. A una solución de tioéster 19c (465 mg) en H_2O/EtOH (relación 3:5, 8 mL), se añadió una solución acuosa de NaOH 0,2 M (2,4 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Después se añadió yoduro de alilo (0,292 mL, 3,2 mmoles, 2 eq.) y se siguió agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos más. La mezcla de reacción se concentró a la mitad de su volumen original y después se extrajo con EtOAc. La capa acuosa se acidificó a pH aprox. 3 con HCl acuoso 0,5N frío y se re-extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro y se evaporaron a sequedad bajo vacío. La mezcla de reacción en crudo contenía al menos cuatro productos; todos los productos fueron aislados después de cromatografía en columna rápida sobre gel de sílice, usando hexano/EtOAc (gradiente de relación 9:1 a 3:1). La estructura del compuesto menos polar (TLC R_f=0,68 en hex/EtOAc 4:1) correspondía a la del producto deseado 19d (83 mg, 18% de rendimiento). ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,24 (d, J = 7,0 Hz, 3H); 1,46 (s, 9H); 3,13-3,19 (m, 2H); 3,24-3,29 (m, 1H); 3,77 (s, 3H); 4,50 (dd, J = 8,6 y 3,8 Hz, 1H); 5,12 (d, J = 12,4 Hz, 1H); 5.15 (dd, J = 18,4 y 1,3 Hz); 5,22 (bd, J = 7,6 Hz, 1H); 5,75-5,85 (m, 1H).

D. Una solución del éster metílico 19d (83 mg, 0,287 mmoles) en MeOH/H_2O (3:1,4 mL) se mezcló con solución acuosa de NaOH (0,2N, 1,3 mL, 0,26 mmoles) durante 24 h a temperatura ambiente y durante 1 h a 40°C. La mezcla de reacción fue acidificada con HCl acuoso frío (HCl 0,5 N, a 0°C, pH=4-5), el MeOH se eliminó bajo vacío y la mezcla acuosa restante se extrajo con EtOAc. La solución orgánica se secó sobre $MgSO_4$ y

se evaporó a sequedad para obtener el compuesto 19e. El compuesto 19e se usó para la síntesis final de inhibidores sin más purificación posterior.

EJEMPLO 20.

Síntesis de ácido (S)-N-Boc-2-amino-3-metil-3-(1-mercapto-4-butenil)butanoico (20c).



A. Se disolvió N-penicilamina 20a (448 mg, 3 mmoles) en DMF/DMSO (relación 5:1, 6 mL), se añadieron 4-bromopenteno (0,46 mL, 4,5 mmoles, 1,5 eq.) y $CsOH \cdot H_2O$ (1,0 g, 6 mL, 2 eq.), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 24 h, se añadió Boc_2O (820 mg, 3,75 mmoles, 1,25 eq.) a la mezcla y se siguió agitando durante 12 h más. La DMF se eliminó posteriormente bajo vacío, la mezcla restante se diluyó con HCl acuoso 0,5N frío ajustando el pH en aprox. 4-5, y después se extrajo con EtOAc (2x50 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera (2x), se secó sobre $MgSO_4$ anhidro y se evaporó a sequedad para dar el ácido carboxílico crudo 20b.

B. La purificación de 20b resultó ser difícil, por lo que el producto crudo se trató primero con diazometano para formar el correspondiente éster metílico 20c, y después se purificó mediante cromatografía en columna rápida, usando hexano/EtOAc (9:1) como eluyente, para obtener 190 mg (20% de rendimiento) del éster metílico 20c puro.

^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,35 (s, 3H); 1,37 (s, 3H); 1,44 (s, 9H); 1,59-1,67 (m, 2H); 2,11-2,17 (m, 2H); 2,51-2,60 (m, 2H); 3,74 (s, 3H); 4,29 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 4,98 (dm, J = 10,5 Hz, 1H); 5,03 (dm, J = 19 Hz,1 1H); 5,35 (bd, J = 7 Hz,

1H); 5,72-5,83 (m, 1H).

C. El éster se disolvió posteriormente en THF/MeOH/H_2O (2:2:1,5 mL), se añadió $LiOH \cdot H_2O$ (50 mg, 2,0 mmoles, 2 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a 40°C durante 4 h para hidrolizar el éster 20c, para dar de nuevo el ácido 20b. La mezcla de reacción se acidificó con HCl 0,5N a pH=4-5, el THF y el MeOH se evaporaron a sequedad y la solución acuosa restante se extrajo con EtOAc. La capa de EtOAc se secó sobre $MgSO_4$ anhidro y se evaporó a sequedad para dar el compuesto 20b, que se usó en la subsiguiente síntesis de inhibidores macrocíclicos sin más purificación.

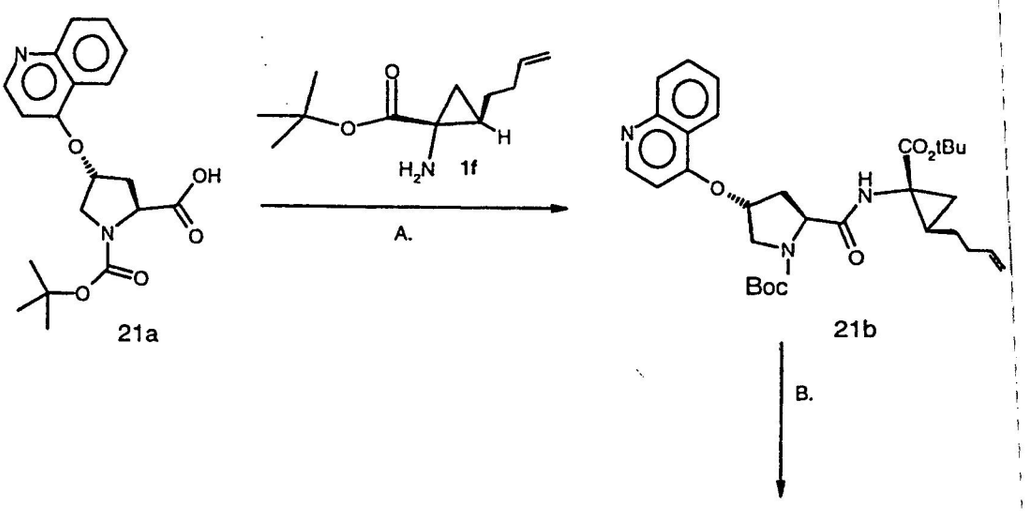
PRODUCTOS INTERMEDIOS DE DIPEPTIDO Y TRIPEPTIDO ACICLICO

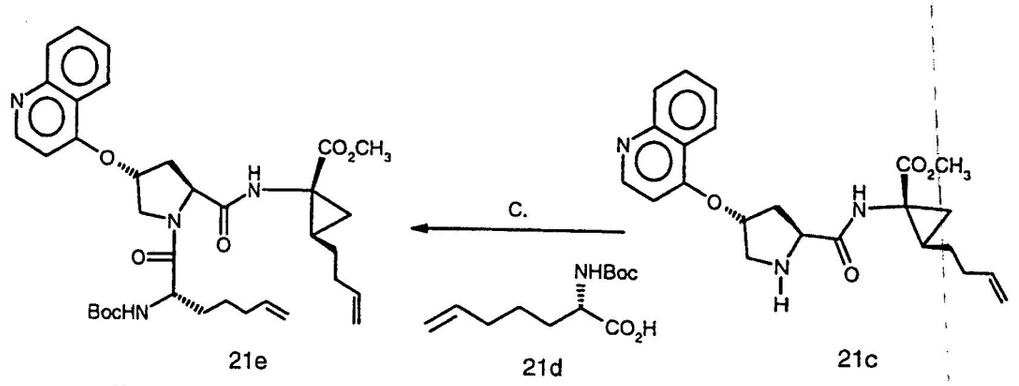
El procedimiento general para reacciones de acoplamiento hechas en solución, y ejemplos específicos de las mismas, se describen en los documentos WO 00/09543 y WO 00/09558.

Estos procedimientos han sido usado para la síntesis de los dipéptidos intermedios 26c, 30a y los tripéptidos 23a, 24a, 31a, 32,a y 33a.

EJEMPLO 21.

Síntesis del tripétido acíclico 21e.





21e 21d 21c

A. A una solución del derivado de prolina 21a (preparado a partir de Boc-4(R)-hidroxiprolina disponible comercialmente y 4-cloro-quinoleína como se describe en los documentos WO 00/05543 y WO 00/09558) (1,38 g, 3,68 mmoles) y el homoalil ACCA 1f crudo (aprox. 3,35 mmoles) en CH_2Cl_2 (10 mL), se añadieron sucesivamente NMM (1,21 mL, 10,05 mmoles) y HATU (1,53 g, 4,02 mmoles) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Después de ese tiempo, el disolvente fue evaporado y la mezcla de reacción cruda se redisolvió en EtOAc (30 mL). La solución se lavó con solución acuosa de $NaHCO_3$ al 5% (2 x 10 mL) y salmuera (10 mL), y se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó. El producto crudo fue purificado mediante cromatografía sobre gel de sílice usando dietil-éter al 8% en EtOAc como eluyente para obtener el diastereómero del compuesto 21b con un 20% de rendimiento (no se ha determinado la estereoquímica absoluta).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 0,93 y 1,01 (t, J = 8,3 Hz, 1H, rotámeros en relación 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 (b s, 0,7H); 2,63 (b s, 0,75 H); 2,93 (b s, 0,75H); 3,16 (m, 0,25H); 3,77 (b s, 1,5H); 3,88 (b s, 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 (b s, 1H); 5,75-5,88 (m, 1H); 6,57 y 6,78 (2 b s, 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, 1H).

B. A una solución del dipéptido 21b (137 mg, 0,248 mmoles) en CH_2Cl_2 seco, se añadió una solución de HCl en dioxano (4M,

4 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Después se evaporó el disolvente y el residuo se secó bajo vacío elevado para dar el aminoácido libre. La mezcla se disolvió en dietil-éter/MeOH (3 µL/2 µL) y se trató con un ligero exceso de diazometano disuelto en dietil-éter. Después de 30 minutos, el diazometano en exceso se destruyó con la adición de HCl (4M en dioxano) y la mezcla se evaporó a sequedad para obtener la sal HCl del compuesto 21c, que se usó en la siguiente etapa sin purificar.

C. A una suspensión agitada del dipéptido crudo 21c (0,23 g, 0,48 mmoles) en CH_2Cl_2 (25 mL) se añadió sucesivamente el ácido (2S)-N-Boc-amino-hept-6-enoico 21d (0,151 g, 0,62 mmoles), NMM (210 µL, 1,91 mmoles) y HATU (0,236 g, 0,62 mmoles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h (el pH se ajustó aprox. en 8 con NNM después de 1 h en caso necesario). El CH_2Cl_2 se evaporó, el residuo se recogió en EtOAc (50 mL) y la solución orgánica se lavó con solución de $NaHCO_3$ al 5% (2 x 20 mL) y salmuera (2 x 20 mL), se secó y se evaporó. El compuesto crudo obtenido fue cromatografiado en gel de sílice (50 mL, EtOH al 2%/EtOAc) para dar el compuesto 21e (0,319 g, rendimiento 46%).

^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, rotámeros en relación 1:6) desplaza mientos 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 (b d, 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).

PEPTIDOS MACROCICLICOS

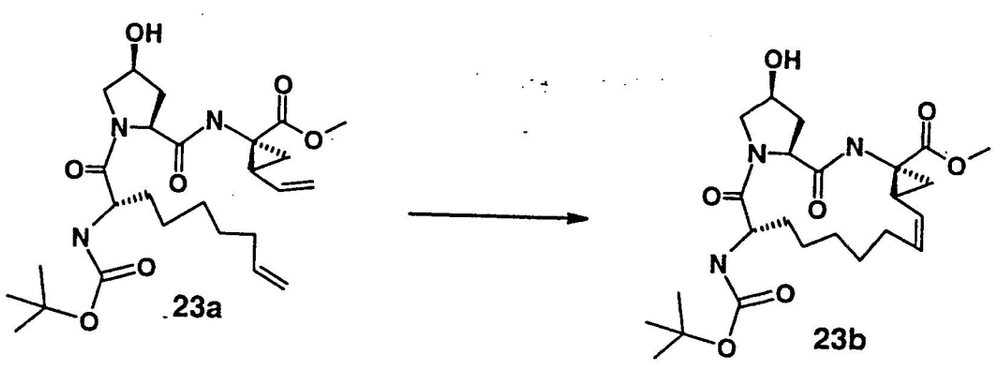
EJEMPLO 22.

Procedimiento general para la macrociclización mediante metátesis de olefina.

En todos los casos, el tri-péptido dieno se disolvió en CH_2Cl_2 a una concentración de 0,01 M, y la solución fue desoxigenada borboteando argón (aprox. 1 h para un volumen de 500 mL). Se añade una solución de catalizador (5-30% en moles disuelto en una pequeña cantidad de CH_2Cl_2 desgasificado) y la mezcla de reacción se somete a reflujo hasta que todo el material de partida se convirtió en el producto o los productos, según se observa por TLC y HPLC. Las mezclas de reacción crudas fueron concentradas a continuación casi a sequedad y se filtraron a través de una corta almohadilla de gel de sílice, eluyendo primero con CH_2Cl_2 para eliminar la mayor parte del catalizador, y después con EtOAc para eluir todos los productos macrocíclicos (la mayor parte del tiempo como un único diastereómero). El producto o los productos crudos de cada reacción se analizan mediante HPLC quiral en una columna CHIRALCEL OJ-R (adquirida de Chiral Technologies Inc., 0,46 ϕ x 15 cm) usando una mezcla de disolventes isocrática de 70% de H_2O + 0,06% de TFA - 30% de CG_3CN + 0,06% de TFA a 205 nm. El producto macrocíclico principal fue caracterizado totalmente por los datos de ^1H, COSY, TOCSY y ROESY NMR con el fin de confirmar su estructura y estereoquímica.

EJEMPLO 23.

Síntesis del intermedio macrocíclico (23b).

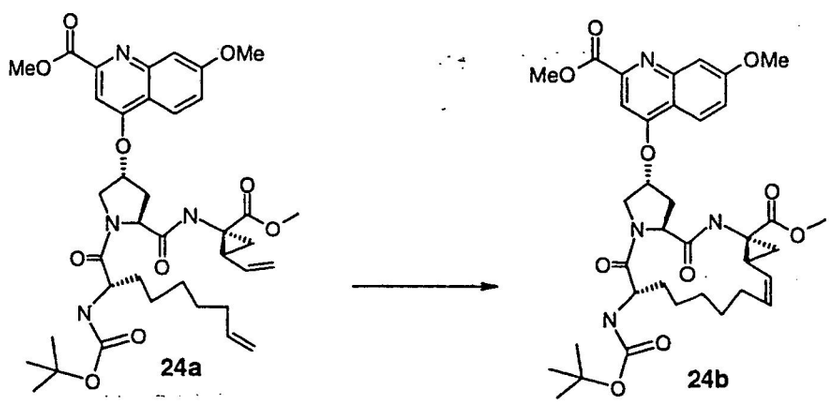


Una solución de dieno 23a (4,0 g, 7,88 mmoles) en CH_2Cl_2 seco (800 mL, Aldrich, anhidro) fue desoxigenada burbujeando Ar durante 2 h. Después se añadió catalizador de Hoveyda (262 mg, 0,434 mmoles, 5,5% en moles) en forma sólida, y la mezcla de reacción se calentó a reflujo bajo un balón de Ar. Después de 28 h, la solución de color rojo-naranja se evaporó para dar un sólido amorfo y después se purificó mediante cromatografía en columna rápida sobre gel de sílice. El sistema inicial de disolventes fue 10% de EtOAc en CH_2Cl_2. Una vez eluido el catalizador de la columna, el disolvente se cambió por EtOAc puro. La elución del catalizador de la columna se evidenció por su color. El producto macrocíclico 23b fue aislado en forma de espuma incolora que se redisolvió en CH_2Cl_2/hexano (aprox. 1:2). La evaporación del disolvente proporcionó un polvo blanco (3,362 g, 89% de rendimiento).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,20-1,50 (m, 6H); 1,43 (s, 9H); 1,53 (dd, J = 9,5 y 5,4 Hz, 1H); 1,61-1,70 (m, 1H); 1,76-1,90(m, 2H); 2,05-2,26 (m, 4H); 2,45 (d, J = 14,3, 1H); 3,67 (s, 3H); 3,71 (d, J = 11,1, 1H); 3,90 (dd, J = 11,1 y 4,3 Hz, 1H); 4,43-4,53 (m, 2H); 4,76 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 4,86 (b d, J = 9,8 Hz, 1H); 5,20-5,23 (m, 2H); 5,57 (dt, J = 7,0 y 9,8 Hz, 1H); 7,32 (b s, 1H).

EJEMPLO 24.

Síntesis del intermedio macrocíclico (24b).



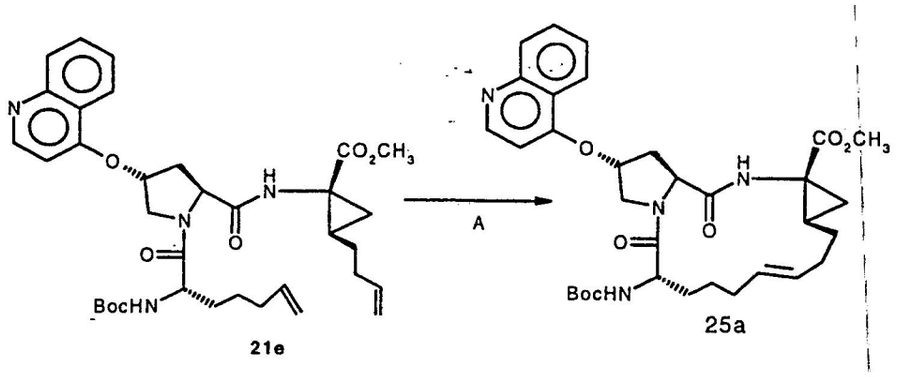
Una solución de dieno 24a (2,76 g, 3,82 mmoles) en CH_2Cl_2

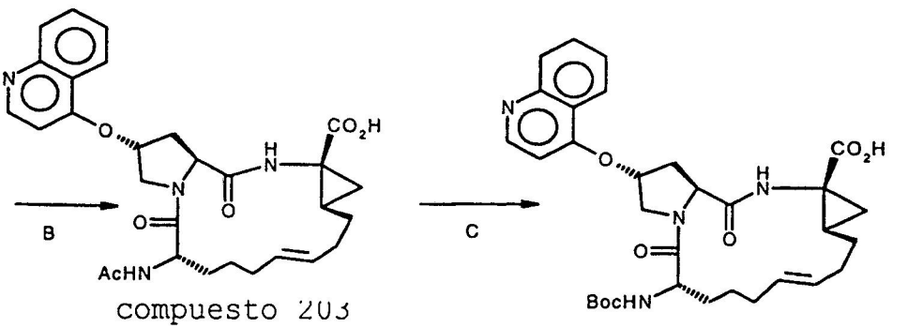
anhidro (600 mL, anhidro) fue desoxigenada burbujeando Ar durante 1,5 h. Se añadió mediante una cánula una solución de catalizador de Hoveyda (117 mg, 0,19 mmoles, 0,05 eq.) en CH_2Cl_2 anhidro y desgasificado (8 mL), y la mezcla de reacción se agitó a reflujo bajo un balón de Ar. Después de 20 h, la mezcla de reacción estaba completa aproximadamente al 50%, momento en el cual se añadió una segunda porción de catalizador (117 mg), y se siguió agitando durante 16 h más. Después se concentró la solución a aproximadamente 100 mL, se aplicó a la parte superior de una almohadilla de gel de sílice (6 x 10 cm) y el catalizador se recuperó primero eluyendo con CH_2Cl_2. El compuesto 24b se retiró por lavado de la almohadilla de sílice con MeOH al 3% en EtOAc y se volvió a purificar mediante cromatografía en columna rápida usando EtOAc/hexano (2:1) para obtener un 70% de rendimiento de un sólido blanco con un ligero tono oliva (1,85 g, 94% de pureza por HPLC).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8,69 (s, 1H); 8,13 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,50-7,44 (m, 2H); 7,17 (dd, J = 9,2, 2,2 Hz, 1H); 7,04 (d, J = 6,4 Hz, 1H); 5,60-5,56 (m, 1H); 5,52 (dd, J = 9,2 Hz, 1H); 5,25 (dd, J = 9,2 Hz, 1H); 4,59 (d, J = 11 Hz, 1H); 4,44 (dd, J = 9,2 Hz, 1H); 4,05-3,98 (m, 1H); 3,94 (s, 3H); 3,92 (s, 3H); 3,89-3,82 (m, 1H); 3,55 (s, 3H); 2,64-2,53 (m, 1H); 2,46 (d, J = 7,3 Hz, 1H); 2,40-2,31 (m, 1H); 2,21 (dd, J = 8,9 Hz, 1H); 1,78-1,65 (m, 2H); 1,55 (dd, J = 4,8 Hz, 1H); 1,485 (dd, J = 4,8 Hz, 1H); 1,41-1,30 (m, 7H); 1,16 (s, 9H). MS; es$^+$: 795,4 $(M+H)^+$.

EJEMPLO 25.

Síntesis de los compuestos 202 y 203 (Tabla 2).





compuesto 203

compuesto 202

A. El compuesto de dieno 21e (0,130 g, 0,205 mmoles) fue ciclizado usando cantidades catalíticas de dicloruro de bis-(triciclohexilfosfina)bencilideno rutenio IV (catalizador de Grubb, *supra*) (52 mg, 0,064 mmoles) en CH_2Cl_2 (60 mL) bajo reflujo durante 2 h, para dar, después de cromatografía en gel de sílice (50 mL, 3% de EtOH/EtOAc), el compuesto 25a (60,1 mg, rendimiento 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 relación 1:2); 3,69 (s, 3H); 3,96-4,04 (m, 1H); 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 relación 1:3); 7,36 (s, 1H); 7,46-7,50 (m, 1H); 8,03 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 8,13 y 8,17 (2d, J =8,0 Hz, 1H, rotámeros en relación 1:3); 8,77 (d, J = 5,1 Hz, 1H).

B. El resto éster del compuesto macrocíclico 25a (0,0156 g, 0,026 mmoles) se hidrolizó con $LiOH \cdot H_2O$ (8,7 mg, 0,206 mmoles) en THF/MeOH/H_2O (4 mL/2 mL/2 mL). El producto crudo fue purificado mediante HPLC en fase inversa C18 en una columna

Whatman (Partisil 10,0DS3) 50/2,4 cm usando un gradiente de disolvente de 5% de CH_3CN acuoso a 100% de CH_3CN, para obtener el compuesto puro 202 en forma de sólido blanco amorfo (11,8 mg).

^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); 2,41-2,59 (m, 2H); 3,97-4,00 (b d, 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 (dd, J = 7,3 Hz, 1H); 7,98 (dd, 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).

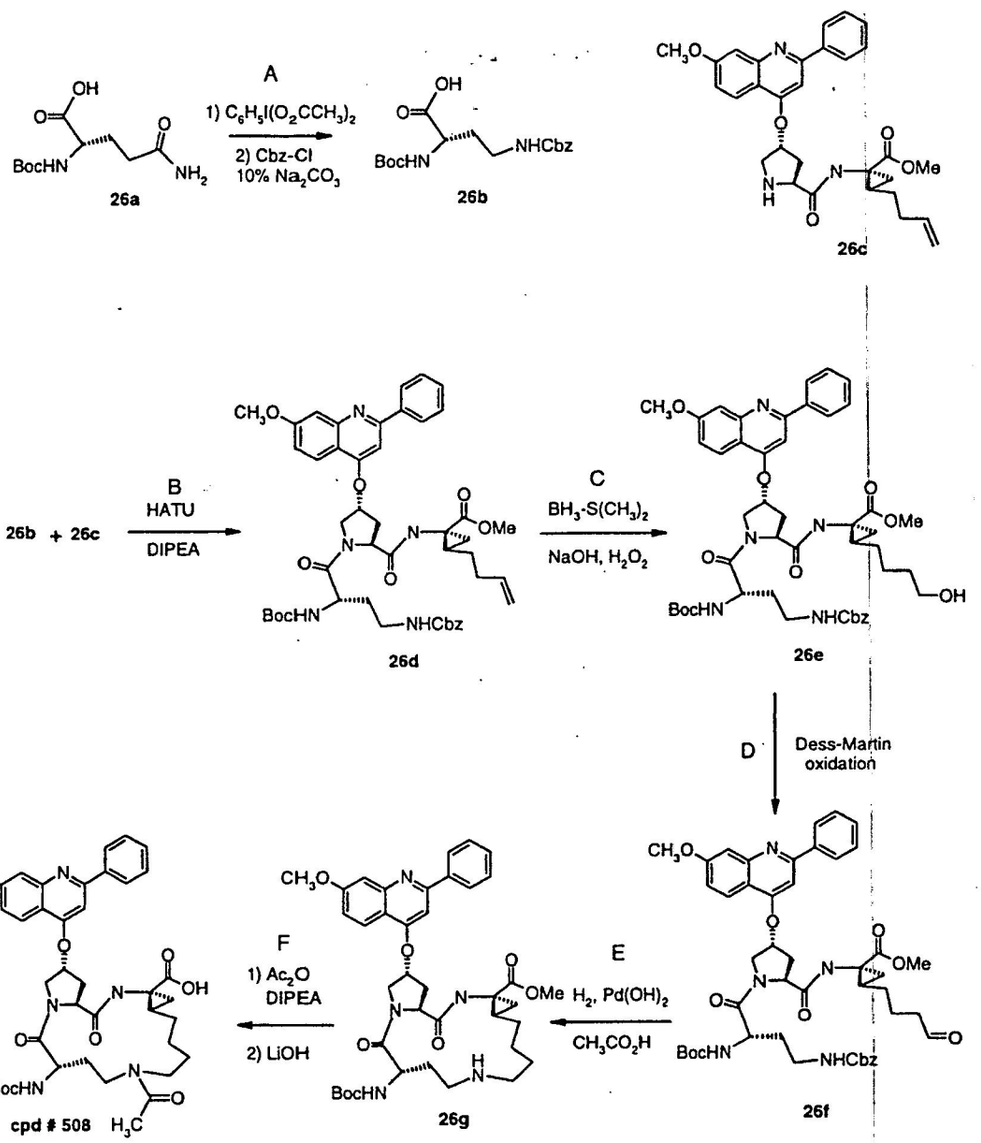
C. El compuesto macrocíclico 25a (20 mg, 0,033 mmoles) en CH_2Cl_2 seco (1 mL) se agitó en presencia de HCl 4M/dioxano (5 mL) durante 1 h. La mezcla se evaporó y se secó cuidadosamente. El residuo se redisolvió en CH_2Cl_2/DMF (3 mL/1 mL) y se trató con NMM (14,5 µL, 0,132 mmoles) y anhídrido acético (7,0 µL, 0,073 mmoles) y se agitó a temperatura ambiente durante 14 h. La mezcla se evaporó y se secó en alto vacío. El residuo se disolvió después en una mezcla de THF/MeOH/H_2O (4 mL/ 2 mL/2 mL) y se agitó durante la noche con $LiOH \cdot 2H_2O$ (11 mg, 0,264 mmoles). El residuo aislado después de acidificar a pH = 3 con HCl 1N enfriado en hielo fue purificado mediante HPLC en fase uinversa C18 usando un gradiente de disolvente de 0-40% de CH_3CN acuoso (0,06% de TFA) con el fin de aislar el compuesto puro 203 como un sólido blanco amorfo (12 mg).

^1H NMR (tampón de 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 (b d, 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 (b s, 1H, Pro-γ); 7,41

(d, J = 6,3 Hz, 1H); 7,64 (b s, 1H, Acc-NH); 7,80 (dd, J = 7,9 Hz, 1H); 8,03 (dd, J = 8,0, 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 26.

Síntesis del compuesto 508 (Tabla 5).



A. Una solución de L-glutamina protegida con Boc 26a (4,93 g, 20 mmoles) y diacetato de yodobenceno (7,73 g, 24 mmoles,

1,2 eq.) en EtOAc/CH_3CN/H_2O (2:2:1; 60 mL) se agitó a 16°C durante 1 h y a 20°C durante 3 h. La mezcla de reacción se diluyó después con H_2O (20 mL), los disolventes EtOAc y CH_3CN se eliminaron bajo vacío, y la mezcla acuosa restante se extrajo con dietil-éter (3 x 50 mL) y EtOAc (50 mL) con el fin de eliminar la mayor parte de las impurezas. La capa acuosa (que contenía el producto intermedio de amina) se concentró después a sequedad, el material restante se redisolvió en Na_2CO_3 al 10% (30 mL), se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadió lentamente una solución de cloroformiato de bencilo (3,3 mL, 20,4 mmoles, 1,02 eq.), dioxano (40 mL) (aprox. 10 minutos). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 h y a temperatura ambiente durante 2 h. Después se diluyó la mezcla con H_2O (50 mL), se extrajo con dietil-éter frío (aprox. 5°C) (3 x 50 mL), se acidificó con HCl 4M a pH = 3-4 y se extrajo con EtOAc (3 x 50 mL). Las capas orgánicas reunidas se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro y se evaporaron a sequedad bajo vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía en columna rápida, usando EtOAc/hexano/AcOH (7:2,9:0,1) para obtener el compuesto 26b con un 43% de rendimiento global (3,04 g).

B. El producto intermedio de dipéptido 26c (250 mg, 0,41 mmoles), compuesto 26b (171 mg, 0,49 mmoles, 1,2 eq.) y HATU (185 mg, 0,49 mmoles, 1,2 eq.) se disolvieron en CH_2Cl_2 (6 mL) y se añadió DIPEA (0,29 mL, 1,62 mmoles, 4 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 h, después se evaporó bajo vacío el CH_2Cl_2 y el material crudo se redisolvió en EtOAc. La solución en EtOAc se lavó con solución acuosa de $NaHCO_3$ al 5% y con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ anhidro y se evaporó a sequedad. El compuesto 26d fue obtenido después de purificar el material crudo mediante cromatografía en columna rápida, usando EtOAc/hexano (4:1) como eluyente, con un 98% de rendimiento (338 mg).

C. Una solución de compuesto 26d (335 mg, 0,394 mmoles) en THF (5 mL) se enfrió a 0°C y se añadió una solución de BH_3 en sulfuro de dimetilo (0,12 mL de solución 10M, 1,2 mmoles, 3

eq.). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. Después se enfrió de nuevo a 0°C antes de añadir lentamente una solución acuosa de NaOH (0,8 mL de solución 2,5 M, 1,97 mmoles, 5 eq.) a lo largo de un periodo de 15 minutos, seguido por la adición lenta (aprox. 15 minutos) de una solución acuosa de H_2O_2 (0,8 mL de una solución 8,8 M, 6,9 mmoles, 17,5 eq.). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. Después de ese tiempo, la mezcla de reacción se acidificó a pH aprox. 4 con el fin de apagar el BH_3 en exceso, después se añadió solución acuosa de $NaHCO_3$ para ajustar el pH en aprox. 9-10, se eliminó el THF bajo vacío, y el material crudo se repartió entre H_2O y EtOAc. La capa acuopsa se volvió a extraer con EtOAc, las capas orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro y se evaporaron a sequedad bajo vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía en columna rápida usando EtOAc/hexano/NH_4OH (8:2:0,5) como eluyente, para obtener compuesto puro 26e con un rendimiento del 57% (192 mg).

D. A una solución de compuesto 26e en CH_2Cl_2 (8 mL) se añadió peryodinato de Dess-Martin (195 mg, 97%, 0,33 mmoles, 1,5 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h, La reacción se apagó añadiendo solución acuosa de $Na_2S_2O_3$ (3 mL de solución al 5%), después se añadió solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (5 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente, la mezcla de reacción cruda se extrajo con EtOAc, la capa orgánica se lavó con solución acuosa de $NaHCO_3$ al 5% y salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ anhidro y se evaporó bajo vacío para dar 188 mg de aldehído 28f que se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

E. Una solución de compuesto 26f (188 mg, 0,22 mmoles), CH_3CO_2H (38 µL) y $Pd(OH)_2$ (25 mg) en etanol (5 mL) se agitó a temperatura ambiente bajo H_2 a presión atmosférica durante 16 h. Después de ese periodo se añadieron al matraz más H_2 gas, $Pd(OH)_2$ (180 mg) y CH_3CO_2H (154 µL) y se siguió agitando du-

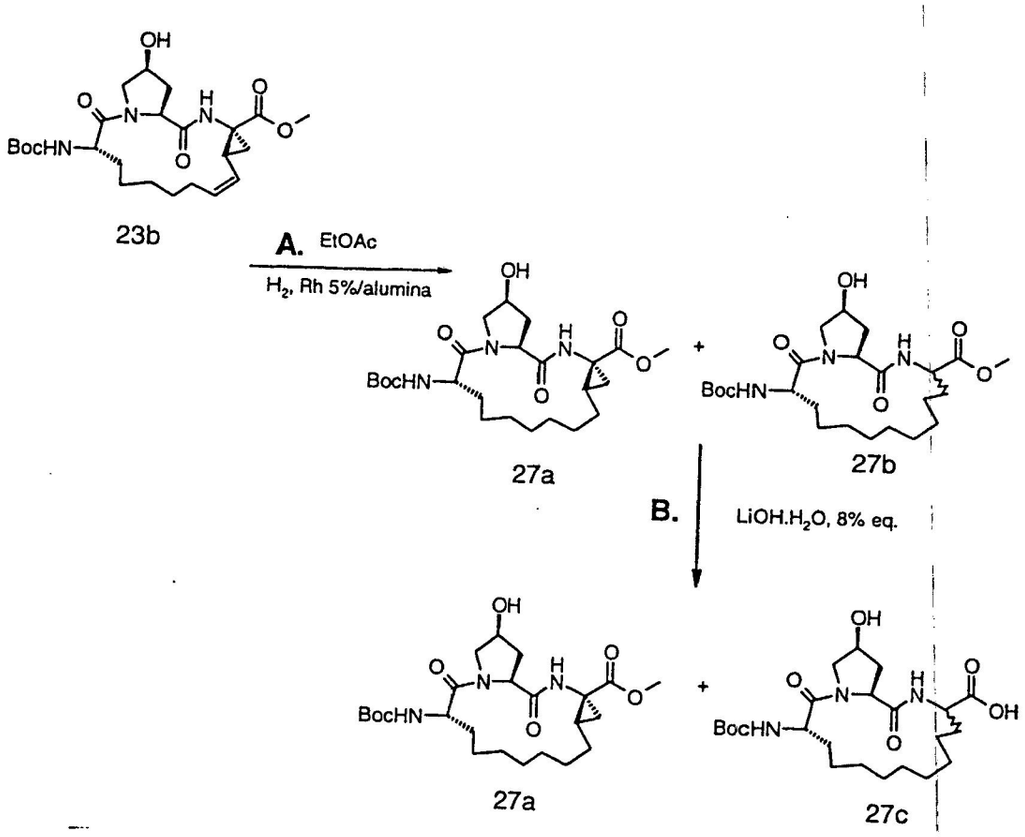
rante 24 h más. Después se filtró la mezcla y el disolvente se evaporó a sequedad, y el producto macrocíclico crudo se purificó mediante cromatografía en columna rápida usando $CHCl_3$/MeOH/AcOH (10:2:1) para obtener el compuesto 26g con un rendimiento de aprox. 30% (48 mg).

F. Una mezcla de compuesto 26g (22 mg, 0,031 mmoles), DIPEA (27 µL, 0,155 mmoles, 5 eq.) y anhídrido acético (8,7 µL, 0,093 mmoles, 3 eq.) en CH_2Cl_2 (5 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El CH_2Cl_2 se eliminó después bajo vacío, se añadió una mezcla de THF/MeOH/H_2O (2:2:1,5 mL) y $LiOH \cdot 2H_2O$ (13 mg, 0,31 mmoles, 10 eq.), y se dejó que tuviese lugar la reacción de hidrólisis durante 68 h a temperatura ambiente y 2 h a 50°C. Después se acidificó la mezcla de reacción (pH aprox. 4) y se purificó mediante HPLC en fase inversa para obtener el compuesto final 508 (aprox. 6 mg, aprox. 26% de rendimiento para las 2 últimas etapas).

^1H NMR (DMSO, 400 MHz) de 508 (mezcla de rotámeros confirmada por datos de COSY, TOCSY y ROESY NMR): δ 1,18 (s, 9H); 1,09-1,85 (m solap., 11H); 1,95 (s, 3H); 2,30 (m, 1H); 2,63 (m, 1H); 3,18-4,14 (m solap., 6H); 3,96 (s, 3H); 4,44 (m, 1H); 4,62 y 4,69 (2d, J = 11,8 Hz, 1H, rotámeros); 5,82 (b s, 1H); 7,20 (m, 2H); 7,53 (b s, 1H); 7,67 (b s, 4H); 8,19 (b s, 3H); 8,61 (s, 1H).

EJEMPLO 27.

Síntesis del producto intermedio macrocíclico saturado (27a).

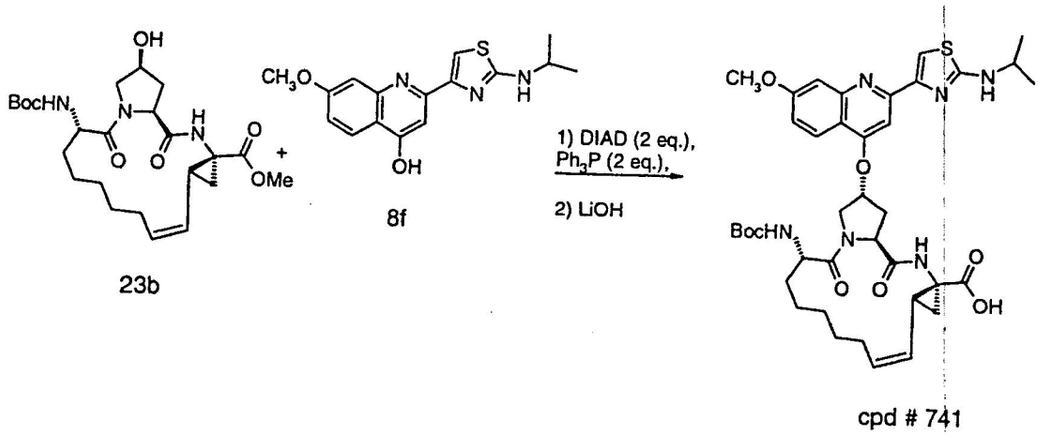


A. El producto intermedio macrocíclico insaturado 23b (3,50 g, 7,30 mmoles) se disolvió en EtOAc (30 mL) y se añadieron 700 mg (20% p/p) de Rh al 5% sobre alúmina. La mezcla se agitó bajo gas H_2 a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 1,5 h. Después de ese tiempo, el análisis por HPLC confirmó la completa conversión del material de partida en dos productos, el producto deseado 27a y un producto minoritario (8% de la masa total) que fue identificado más tarde como el compuesto 27b formado a partir de la apertura del anillo de ciclopropano. La mezcla de reacción se filtró y se concentró para dar unsólido de color verde claro (3,47 g). El sólido se evaporó conjuntamente dos veces con EtOH para eliminar todo el EtOAc (la presencia de EtOAc interfiere en la etapa siguiente). La separación de compuesto 27a del 27b por cromatografía mostró ser muy difícil, por lo que se ideó un método alternativo basado en las velocidades relativas de hidrólisis de sus correspondientes restos éster metílico.

B. La mezcla cruda de compuestos 27a y 27b (3,47 g) se disolvió en THF:MeOH (1:1,20 mL), se añadió una solución acuosa de LiOH·OH (24 mg en 5 mL de H_2O, 8% eq.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h (la hidrólisis completa del producto secundario 27b para dar su ácido correspondiente 27c fue confirmada por HPLC). La mezcla de reacción se concentró bajo vacío para eliminar la mayor parte del THF y el MeOH y se repartió entre H_2O (100 mL) y EtOAc (300 mL). La capa orgánica se lavó con NaOH 0,5 N (3 x 100 mL), salmuera (100 mL), solución acuosa de ácido cítrico al 10% (2 x 100 mL), y salmuera (100 mL), se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El producto deseado 27a se obtuvo con una pureza elevada (mayor del 90% por HPLC) en forma de una espuma de color verde claro y con un 93% de rendimiento global (3,28 g) para las dos etapas. ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,1-1,38 (m, 13H); 1,42 (s, 9H); 1,51-1,57 (m, 1H); 1,63-1,67 (dd, J = 8,0 y 5,1 Hz, 1H); 1,81-1,87 (m, 1H); 1,92-1,99 (m, 1H); 2,02-2,08 (m, 1H); 2,62 (d, J = 14 Hz, 1H); 3,4 (d, J = 8,3, 1H); 3,65 (s, 3H); 4,01 (dd, J = 10,8 y 4,1 Hz, 1H); 4,42-4,48 (m, 1H); 4,51-4,55 (m, 1H); 4,87 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 5,14 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,97 (br s, 1H).

EJEMPLO 28.

Síntesis del compuesto n° 741 (Tabla 7).



El derivado de quinoleína 8f fue unido al compuesto macrocíclico preformado 23b mediante una reacción de Mitsunobu. El derivado de quinoleína 8f (30 mg, 0,095 mmoles) se disolvió en THF y después se añadieron el macrociclo 23b (45,6 mg, 1 eq.) y PPh_3 (49,8 mg, 2 eq.). La mezcla resultante se enfrió a 0°C. Después se añadió gota a gota DIAD (37,4 µL, 2 eq.). La solución se agitó durante 1 hora a 0°C y después se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Después se diluyó la mezcla con EtOAc (15 mL), se lavó con una solución saturada de $NaHCO_3$ (15 mL) y después con salmuera. La solución se secó con $MgSO_4$, se filtró y se concentró bajo vacío. Se obtuvieron 202 mg de un aceite amarillo. El producto se purificó mediante cromatografía rápida sobre gel de sílice (100% de EtOAc). El producto contenía aún subproductos de DIAD después de la purificación. El producto resultante que se obtuvo contenía 55% p/p del producto deseado, por lo que el rendimiento se declaró el 62%.

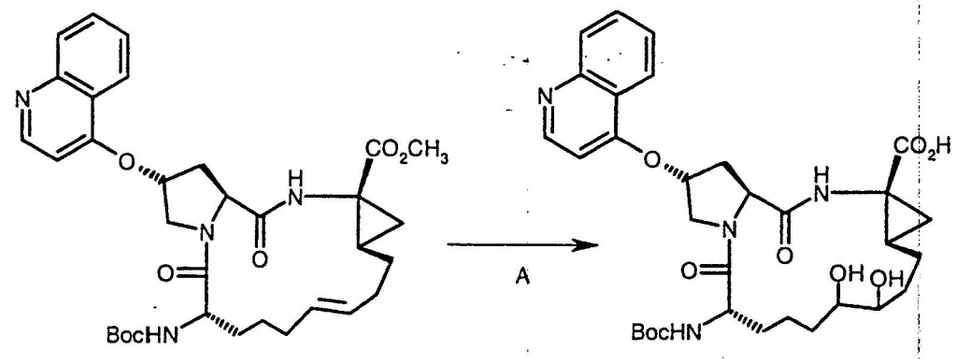
El producto intermedio de éster (46 mg, 0,06 mmoles) se disolvió en una mezcla de THF/MeOH/H_2O (relación 2:1:1, 2 mL), se añadió $LiOH \cdot H_2O$ (20 mg, 0,48 mmoles) y la solución se agitó a temperatura ambiente. Después de un periodo de 16 h, el análisis de la mezcla de reacción por HPLC indicó que la hidrólisis era completa. Los disolventes orgánicos se eliminaron bajo vacío y el material crudo resultante disuelto en DMSO se purificó mediante HPLC en fase inversa C18 para dar el inhibidor puro 741.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,67 (s, 1H); 8,29-8,14 (m, 2H); 8,08-7,97 (m, 1H); 7,91-7,78 (m, 1H); 7,74 (s, 1H); 7,31-7,20 (m, 1H); 7,10 (d, J = 5,7 Hz, 1H); 5,82-5,71 (m, 1H); 5,58-5,47 (m, 1H); 5,32-5,23 (m, 1H); 4,74-4,64 (m, 1H); 4,55-4,47 (m, 2H); 4,23-4,06 (m, 1H); 4,04-3,94 (m, 1H); 3,97 (s, 3H); 3,92-3,85 (m, 1H); 2,70-2,55 (m, 2H); 2,53-2,36 (m, 2H); 2,20-2,09 (m, 1H); 1,80-1,62 (m, 2H); 1,56-1,43 (m, 2H); 1,42-1,29 (m, 6H); 1,27 (d, J = 3,2 Hz, 3H); 1,25 (d, J = 2,9 Hz, 3H); 1,12 (s, 9H).

MS: 763,1 (M+1), 761,1 (M-1).

EJEMPLO 29.

Síntesis de compuesto 205 (Tabla 2).



(25a) comp 205

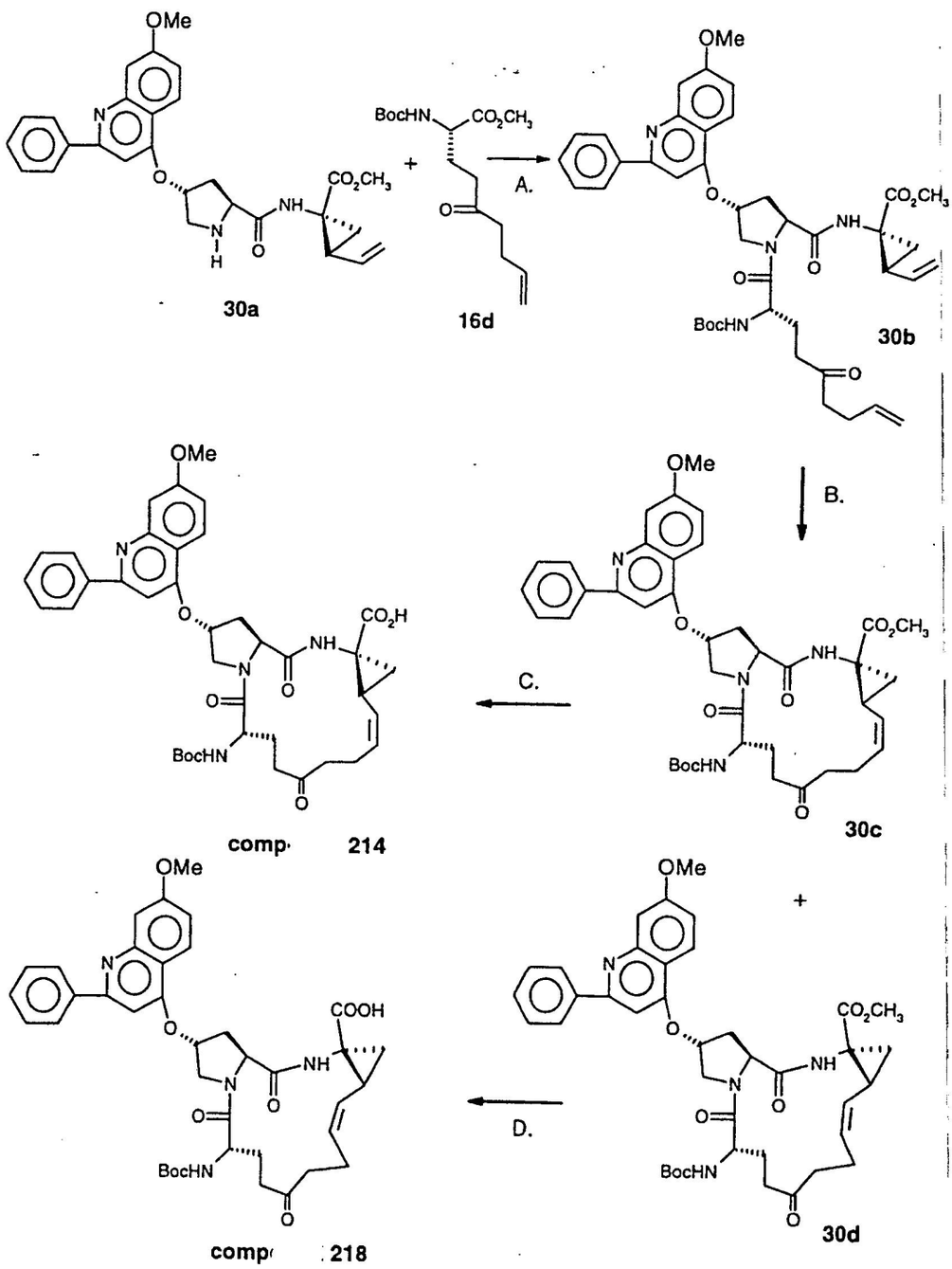
A una solución del compuesto macrocíclico 25a (21 mg, 0,035 mmoles) en t-butanol/H_2O) (1,5 mL/1,5 mL) a 0°C, se añadió una solución de OsO_4 en t-butanol (0,36 mL de 35% p/v, 0,035 mmoles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (20 mL) y la solución orgánica se lavó con $NaHCO_3$ al 5% (2 x 10 mL) y salmuera (2 x 10 mL), se secó y se evaporó a sequedad. El compuesto crudo se recogió en THF/MeOH/H_2O (3 mL/1,5 mL/1,5 mL) y se agitó en presencia de $LiOH \cdot H_2O$ (13 mg, 0,28 mmoles) durante 16 h. La mezcla se acidificó a pH 4 con HCl 0,5N enfriado con hielo, se evaporó y se purificó mediante HPLC en fase inversa C18 usando un gradiente de disolvente de H_2O (0,06% de TFA) a 40% de CH_3CN acuoso (0,06% de TFA). El diol syn 205 fue aislado con alta pureza en forma de un sólido blanco amorfo.

Compuesto n° 205: ^1H 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 (b s, 1H, Pro-γ); 7,03 (d, J = 6,0 Hz, 1H); 7,40 (b s, 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 (b s, 1H).
EMS (modo de ionización negativa): m/z 625 $(M-H)^-$.

EJEMPLO 30.

Síntesis de los compuestos 214 y 218 (Tabla 2).



A. Una solución del éster ceto-nonenoato 16d (0,180 g, 0,6 mmoles) en MeOH/H_2O (5 mL/2 mL) se agitó a temperatura ambiente en presencia de $LiOH \cdot H_2O$ (50 mg, 1,2 mmoles) durante 1 h. La solución se acidificó a pH 6 con HCl 0,5N enfriado con hielo y se evaporó la mayor parte del MeOH. Después se disolvió el residuo en EtOAc (30 mL) y la solución se lavó con HCl 0,5N enfriado con hielo (10 mL), se trató con salmuera (10 mL), se secó y se evaporó. Después se redisolvió el residuo crudo en CH_2Cl_2 (10 mL) y se hizo reaccionar con el fragmento P1-P2 30a (0,337 g, 0,6 mmoles) en presencia de HATU (233 mg, 0,612 mmoles) y DIPEA (420 µL, 2,4 mmoles) durante un periodo de 16 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se cromatografió sobre gel de sílice usando EtOAc/hexano (1/1) como eluyente para aislar el compuesto puro 30b (0,370 g, 83% de rendimiento, pureza superior al 95% por HPLC).

^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1,41 (s, 9H); 1,58-1,62 (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 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).

B. El dieno 30b (0,370 g, 0,49 mmoles) fue ciclizado en presencia del catalizador bis(triciclohexilfosfina) bencilideno rutenio IV dicloruro (0,125 mg, 0,15 mmoles) en CH_2Cl_2 (destilado en CaH_2 y desgasificado con argón durante 30 minutos) durante un periodo de 2 h a reflujo. El compuesto se obtuvo en forma de una mezcla de estereoisómeros (30c y 30d en relación 1:1) después de cromatografía en columna rápida en gel de sílice usando EtOAc/hexano (3/1) con un rendimiento del 35% (0,124 g).

^1H NMR de la mezcla de 30c y 30d ($CDCl_3$, 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 (3, 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, 05H); 5,30 (m, 0,5H), 5,44 (m, 2H); 5,64 (m, 1H); 7,1-7,0 (m, 3H); 7,47 (m, 4H); 8,08-798 (m, 3H).

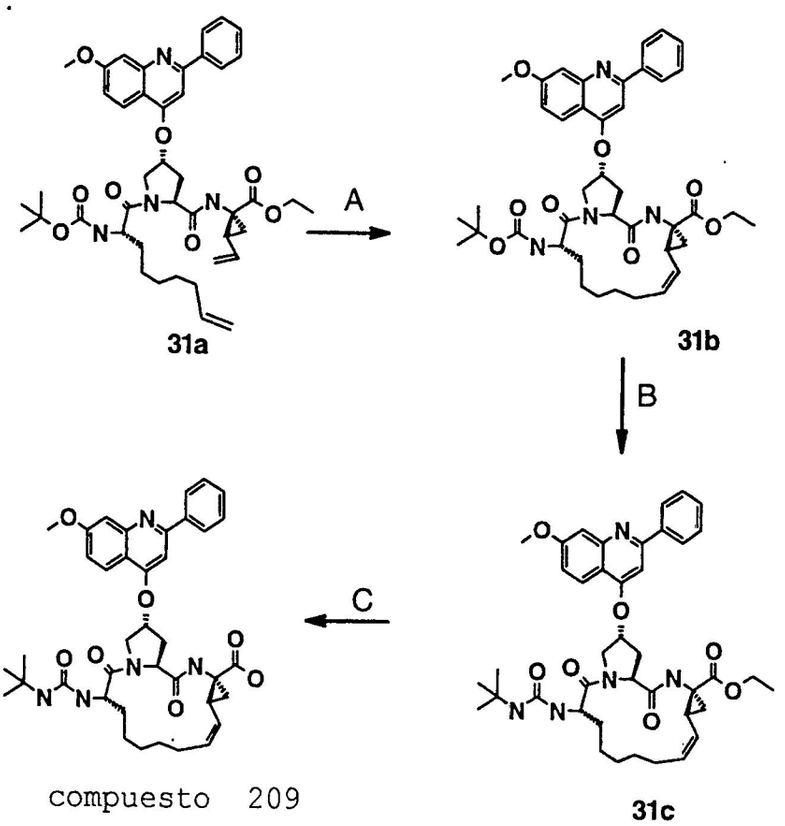
C,D. Se llevó a cabo la hidrólisis de los ésteres metílicos 30c y 30d (24 mg, 0,033 mmoles) en THF/MeOH/H_2O (1 mL/0,5 mL/0,5 mL) con $LiOH \cdot H_2O$ (11 mg, 0,246 mmoles) durante un periodo de 16 h a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo, la mezcla de reacción se acidificó a pH 4-5 y se cromatografió en una columna de HPLC de fase inversa C18 usando un gradiente de disolvente de H_2O (0,06% de TFA) a solución acuosa al 50% de CH_3CN (0,06% de TFA). Los compuestos deseados 214 y 218 fueron aislados de la mezcla de los dos compuestos con alta pureza (94% de pureza por HPLC) con un 15% de rendimiento (3 mg).

Compuesto 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 (b t, 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, 1H, Pro-**δ**); 5,45 (t, J = 9,9 Hz, 1H); 5,51-5,58 (m, 1H); 5,82 (b s, 1H, Pro-**γ**); 7,09 (d, J = 6,0 Hz, 1H, BocNH); 7,26 (b s, 1H); 7,53 (s, 1H); 7,67 (b s, 3H); 8,16 (d, J = 2 Hz, 1H); 8,18 (s, 1H); 8,83 (s, 1H, ACCA-NH).

Compuesto 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 (solap., 9H); 3,90 (b d, 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 (b s, 1H); 7,50 (b s, 1H); 7,66 (b s, 3H); 8,20 (b s, 2H); 8,53 (s, 1H).

EJEMPLO 31.

Síntesis del compuesto 209 (Tabla 2).



A. El dieno 31a (249 mg, 0,330 mmoles) se disolvió en 30 mL de CH_2Cl_2 anhidro y la solución fue desgasificada con argón durante 15 minutos. El catalizador dicloruro de bis(triciclohexilfosfina) bencilideno rutenio IV (82 mg, 0,100 mmoles) 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 calentó a reflujo durante 2 h bajo N_2. La solución se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna rápida para obtener el compuesto 31b en forma de im sólido de color pardo con un rendimiento del 71% (171 mg).

^1H 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 $(M+H)^+$.

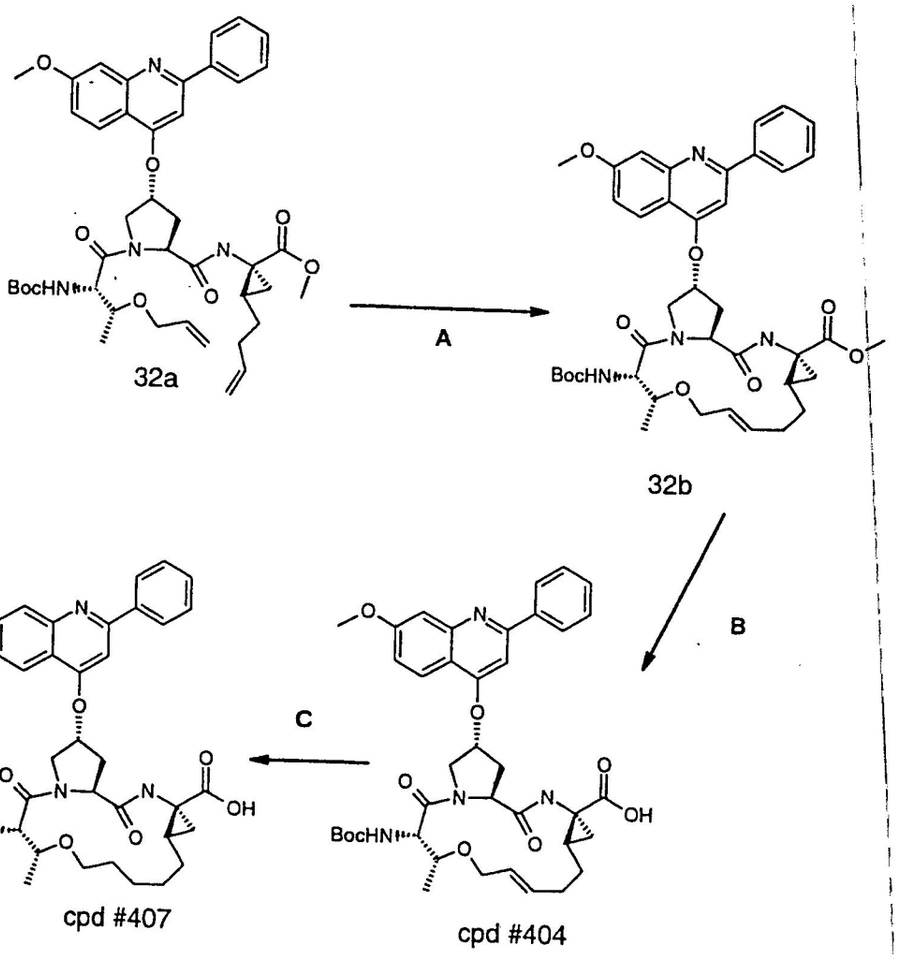
B. El compuesto 31b (0,117 mmoles) se agitó en una solución de HCl (1 mL de solución 4N en dioxano) durante 30 minutos y se concentró a sequedad. El sólido se recogió en CH_2Cl_2 (2 mL) y se añadieron sucesivamente Et_3N (82 µL, 0,585 mmoles) y t-butil-isocianato (35 mg, 0,351 mmoles). Después de agitar a temperatuta ambiente durante 20 h, la mezcla se concentró a sequedad y el compuesto crudo 31c se usó en la etapa de hidrólisis final sin más purificación.

D. El compuesto 31c (85 mg, 0,117 mmoles) se disolvió en THF/MeOH/H_2O (2 mL/1 mL(1 mL), se añadió $LiOH \cdot H_2O$ (39 mg, 0,936 mmoles), y la solución se agitó durante 20 h a temperatura ambiente. Después de ese tiempo, se añadió ácido acético (1 mL) y la solución se concentró para eliminar el MeOH y el THF. El compuesto puro 209 fue aislado después de purificar elproducto crudo mediante HPLC en fase inversa C18 (35 mg, aprox. 31% de rendimiento).

^1H 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, 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 (b d, J = 7,9 Hz, 1H, Pro-δ); 5,30 (dd, J = 9,5 Hz, 1H); 5,52 (b dd, J = 19 y 8,3, 1H); 5,68 (s, 1H); 5,78 (b s, 1H, Pro-γ); 5,94 (b s, 1H); 7,21 (b s, 1H); 7,51 (b s, 1H), 7,66 (b s, 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 32.

Síntesis de los compuestos n° 404 y n° 407 (Tabla 4).



A. El dieno 32a (84 mg, 0,11 mmoles) se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro (11 mL) y la solución se desgasificó durante un periodo de 15 minutos con una circulación de argón. El catalizador de dicloruro de bis(triciclohexilfosfina) bencilideno rutenio IV (19 mg, 0,023 mmoles) se disolvió primero en 1 mL de CH_2Cl_2 y después se pasó al matraz de reacción mediante una cánula. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a reflujo. Después se eliminó el disolvente bajo vacío y la mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna rápida en gel de sílice, usando EtOAc/hexano (1:1) como eluyente, para dar el compuesto macrocíclico 32b en forma de un aceite amarillo (33 mg, 41% de rendimiento).

B. El producto intermedio éster 32b (33 mg, 0,045 mmoles) se disolvió en una mezcla de THF/MeOH/H_2O (relación 2:1:1, 2 mL), se añadió $LiOH \cdot H_2O$ (8 mg, 0,18 mmoles) y la solución se

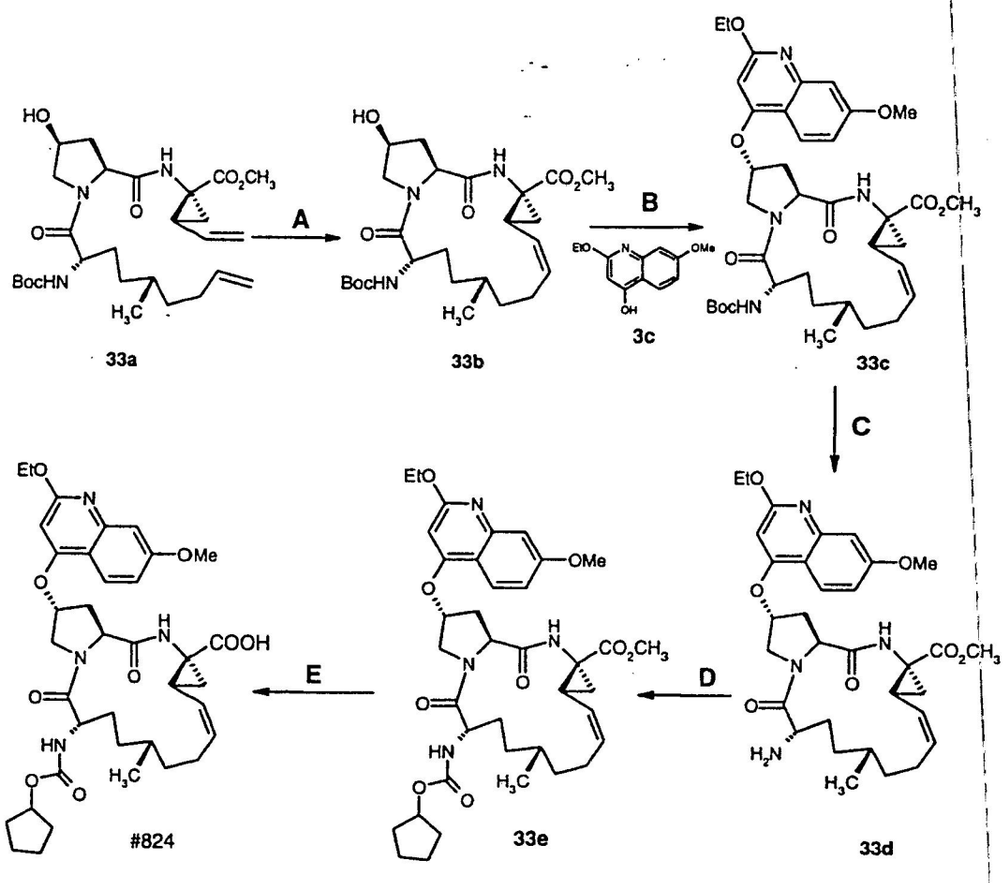
agitó a temperatura ambiente. Después de un periodo de 16 h, el análisis de la mezcla de reacción mediante HPLC indicó que la hidrólisis era incompleta. Entonces se añadió una cantidad adicional de $LiOH \cdot H_2O$ (4 mg, 0,09 mmoles) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante un tiempo total de 36 h. Finalmente, la solución se acidificó con una pequeña alícuota de ácido acético, los disolventes orgánicos se eliminaron bajo vacío y el material crudo que quedaba se purificó mediante HPLC en fase inversa C18 para dar inhibidor 404 puro. ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 1,21 (d, J = 6 Hz, 3H, Me); 1,36 (s, 9H, Boc); 1,1-1,4 (3m, 3H); 1,66 (m, 1H); 1,80 (m, 1H); 2,10 (m, 2H); 2,57 (m, 2H); 3,90 (m, 4H); 4,47 (b d, J = 12,7 Hz, 1H); 4,58 (b d, J = 7,3 Hz, 1H); 4,66 (dd, J = 8,0 Hz, 1H); 5,57 (m, 1H); 5,66 (m, 1H); 5,83 (b s, 1H); 6,18 (bd, J = 6,9 Hz, 1H); 7,25 (b d, J = 7,3 Hz, 1H); 7,56 (b s, 1H); 7,70 (m, 4H); 8,22 (b d, J = 2,9 Hz, 2H); 8,29 (b s, J = 9,2 Hz, 1H).

C. Se disolvió inhibidor 404 (15 mg, 0,021 mmoles) en etanol (2 mL) y se añadió Pd al 10%/C (2 mg). La mezcla se agitó bajo hidrógeno a temperatura ambiente durante 16 h. Después de filtrar, la mezcla se purificó mediante HPLC en fase inversa C18 para dar el inhibidor 407 en forma de un sólido blanco (10 mg, 66% de rendimiento).

^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 1,04 (m, 1H); 1,17 (d, J = 6,0 Hz, 3H); 1,35 (s, 9H); 1,25-1,75 (m, 12H); 2,32-2,45 (m, 1H); 3,40-3,50 (m, 2H); 3,74-3,83 (m, 1H); 3,85-3,93 (m, 1H); 3,97 (s, 3H); 4,27-4,36 (dd, J = 21,1 y 8,6 Hz, 1H); 4,54 (dd, J = 7,95 y 7,95 Hz, 1H); 5,64 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 5,82 (br s, 1H); 7,27-7,33 (m, 1H); 7,53-7,57 (b s, 1H); 7,60-7,74 (m, 4H); 8,13-8,27 (m, 3H); 8,30-8,35 (br s, 1H).

EJEMPLO 33.

Síntesis del compuesto n° 824 (Tabla 8).



A. El compuesto 33a (aprox. 0,55 mmoles) se disolvió en CH_2Cl_2 (100 mL) y la solución fue desgasificada cuidadosamente antes de añadir una muestra de catalizador de Hoveyda (17 mg, 0,028 mmoles, 0,05 eq.). Después se agitó la solución bajo reflujo durante 5 h. La mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna rápida, usando un gradiente de disolvente de CH_2Cl_2/EtOAc (relación de 3:2 a 2:3), para dar el compuesto 33b con un 72% de rendimiento (194 mg).

B. A una solución de compuesto 33b (70 mg, 0,142 mmoles), se añadieron lentamente a lo largo de un periodo de 20 minutos 2-etoxi-4-hidroxi-7-metoxiquinoleína 3c (63 mg, 0,284 mmoles, 2 eq.) y Ph_3P (186 mg, 0,71 mmoles, 5 eq.) en THF anhidro (15 mL) a 0°C, y DIAD (140 µL, 0,71 mmoles, 5 eq.). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y

se agitó a esa temperatura durante 2,5 h. Subsiguientemente, el THF fue evaporado bajo vacío y el producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna rápida, usando un gradiente de disolvente de hexano/EtOAc (relación de 7:3 a 1:1). El compuesto puro fue aislado con un rendimiento del 73% (72 mg).

C. El compuesto 33c (72 mg, 0,104 mmoles) se mezcló con CH_2Cl_2 (5 mL) y HCl 4M en dioxano (5 mL), y la mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante 1,5 h para segmentar el grupo protector Boc y obtener la sal de HCl del compuesto intermedio 33d. La mezcla de reacción cruda se evaporó a sequedad bajo vacío, se secó bajo vacío para asegurar la eliminación de todo el HCl y se usó en la etapa siguiente sin purificar.

D. A una solución de ciclopentanol (29 µL, 0,32 mmoles) en THF (10 mL), se añadió gota a gota una solución de fosgeno en tolueno (1,93 M, 274 µL, 0,528 mmoles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h para formar el reactivo cloroformiato de ciclopentilo. Después de ese periodo, se eliminó aproximadamente la mitad del disolvente por evaporación bajo vacío, la solución de color amarillo claro restante se diluyó mediante la adición de CH_2Cl_2 (5 mL) y se volvió a concentrar a la mitad de su volumen original, con el fin de asegurar la eliminación de todo el fosgeno en exceso. La anterior solución del reactivo de cloroformiato de ciclopentilo se diluyó más con THF (10 mL), se enfrió a 0°C y se añadió al compuesto sólido 33d (0,104 mmoles) a 0°C. Se añadió Et_3N (75 µL, 0,534 mmoles, 5,2 eq.) a la mezcla de reacción y se siguió agitando a 0°C durante 1,5 h. Los disolventes se eliminaron bajo vacío y el material crudo se purificó mediante cromatografía en columna rápida usando EtOAc/Hexano (1:1) como eluyente, para obtener el compuesto 33e con rendimiento casi cuantitativo (75 mg).

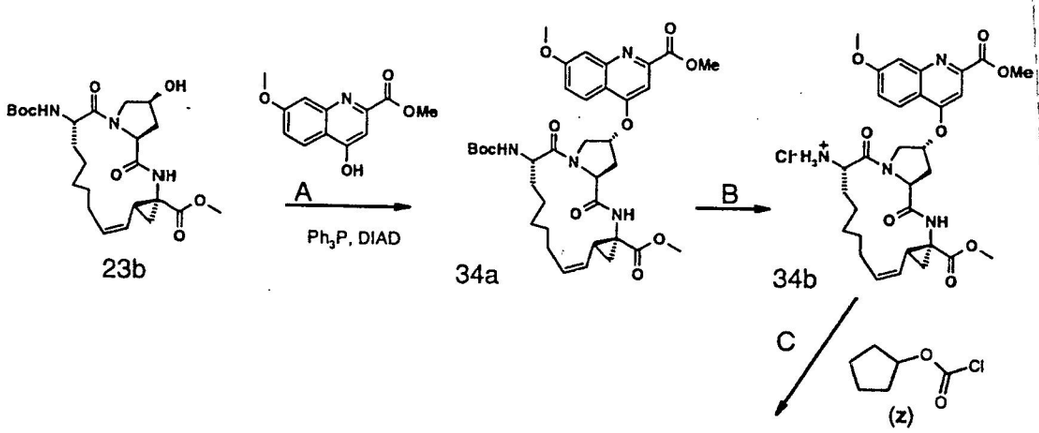
E. La hidrólisis del éster metílico se logró haciendo reaccionar el compuesto 33e (75 mg, 0,11 mmoles) con $LiOH \cdot H_2O$ (35 mg, 0,84 mmoles, 8 eq.) en una mezcla de disolventes de

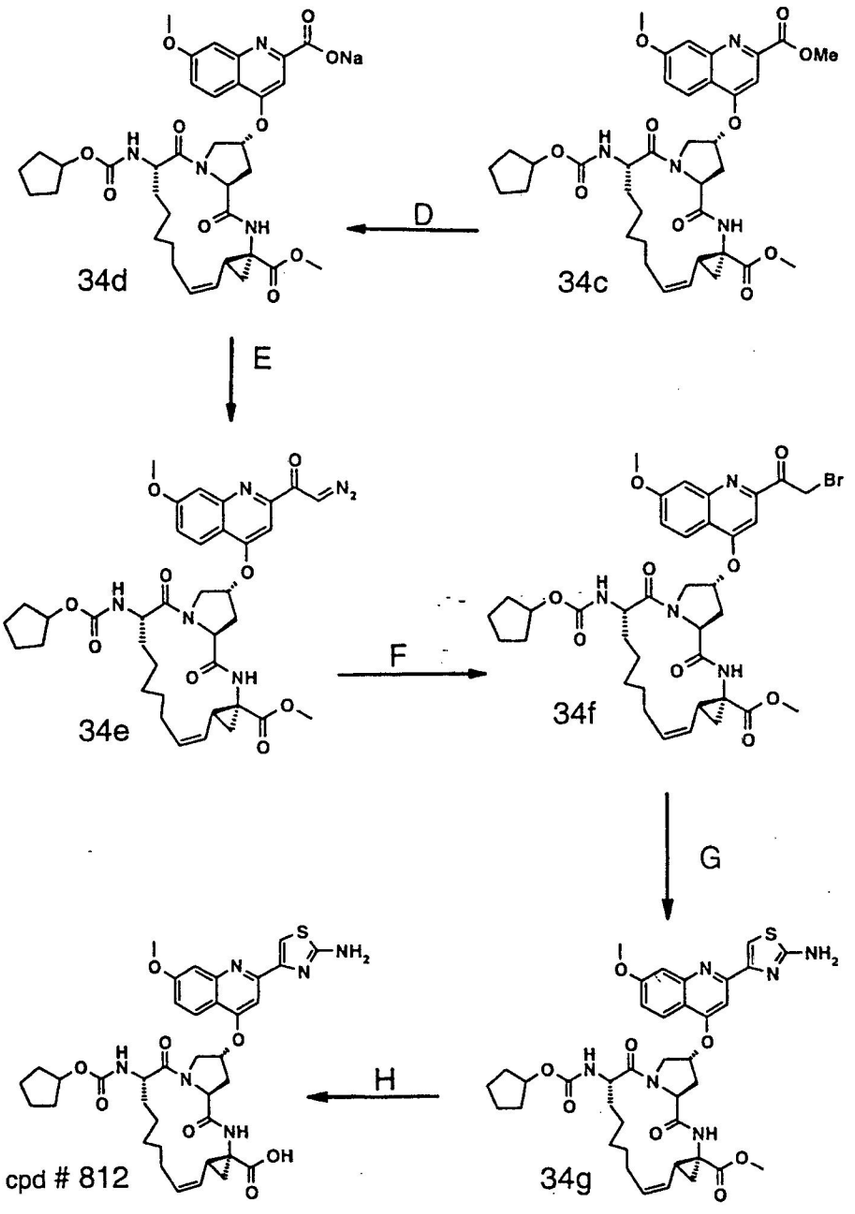
THF/MeOH/H_2O (relación 2:2:1, 7,5 mL) a 50°C durante 2,5 h. Al terminar la hidrólisis, la mezcla se acidificó a pH = 4,5 y los disolventes se evaporaron a sequedad bajo vacío. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa en fase inversa C18, usando un gradiente de disolvente de H_2O a solución acuosa de CH_3CN al 58% (con 0,06% de TFA), para obtener el inhibidor n° 824 en forma de un sólido amorfo de color blanco (45 mg, 65% de rendimiento).

^1H NMR de la sal Na^+ del n° 824 (DMSO, 400 MHz): δ 0,88(d, J = 6,7 Hz, 3H); 0,95-1,70 (resonancias solapadas, 17H); 1,37 (t, J = 7 Hz, 3H); 2,00-2,10 (m, 1H); 2,10-2,33 (m, 3H); 2,38-2,44 (m, 1H); 3,80-3,85 (m, 1H); 3,85 (s, 3H); 4,02-4,08 (m, 1H); 4,42 (q, J = 7 Hz, 2H), 4,35-4,44 (m, 1H); 4,50 (d, J = 10,8 Hz, 1H); 4,63 (b d, 1H); 5,28 (dd, J = 9,5 Hz, 1H); 5,38 (b s, 1H); 5,42-5,49 (m, 1H); 6,37 (s, 1H); 6,87 (dd, J = 8,9 y 2,2 Hz, 1H); 7,07 (d, J = 2,2 Hz, 1H); 7,28 (d, J = 7,0 Hz, 1H); 7,90 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 8,57 (s, 1H).

EJEMPLO 34.

Síntesis del compuesto n° 812 (Tabla 8).





A. A una solución del compuesto intermedio macrocíclico 23b (13,05 g, 27,2 mmoles, 1,0 eq.), Ph_3P (14,28 g, 54,4 mmoles, 2,0 eq.) y 2-carboximetoxi-4-hidroxi-7-metoxiquinoleína (documentos WO 00/09543 y WO 00/09558) (6,67 g, 28,6 mmoles, 1,05 eq.) en THF (450 mL) a 0°C, se añadió DIAD (10,75 mL, 54,6 mmoles, 2,0 eq.) gota a gota durante un periodo de 15

minutos. Después se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatuta ambiente durante 3 h. Después de la conversión completa del material de partida en los productos, el disolvente se evaporó bajo vacío, la mezcla restante se diluyó con EtOAc, se lavó con solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (2x) y salmuera (1x), y la capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. Se obtuvo el compuesto puro 34a después de cromatografía rápida; la columna se eluyó primero con hexano/EtOAc (50:50), seguido por $CHCl_3$/EtOAc (95:5) para eliminar los subproductos Ph_3PO y DIAD, y la elución de la impurezas se controló mediante TLC. Finalmente, el producto 34a deseado se eluyó de la columna con $CHCl_3$/EtOAc (70:30). Normalmente, la etapa de cromatografía hubo de repetirse 2-3 veces antes de poder ser aislado el compuesto 34a con pureza elevada en forma de un sólido blanco con un rendimiento global del 68% (12,8 g, 99,5% de pureza por HPLC).

B. A una solución del producto intermedio 34a protegido con Boc (1,567 g) en CH_2Cl_2 (15 mL), se añadió HCl 4N en dioxano (12 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h (en caso de formarse un gel espeso en medio del periodo de reacción, se añaden 10 mL más de CH_2Cl_2). Al terminar la desprotección, los disolventes se evaporaron a sequedad para obtener un sólido amarillo y un material similar a una pasta. La mezcla se redisolvió en MeOH aproximadamente al 5% en CH_2Cl_2 y se volvió a evaporar a sequedad bajo vacío para obtener el compuesto 34b en forma de un sólido amarillo, que se usó en la etapa siguiente sin más purificación.

C. A una solución de ciclopentanol (614 µL, 6,76 mmoles) en THF (15 mL), se añadió gota a gota una solución de fosgeno en tolueno (1,93 M, 5,96 mL, 11,502 mmoles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h para formar el reactivo cloroformiato de ciclopentilo (z). Al cabo de ese tiempo, se eliminó aproximadamente la mitad del disolvente mediante evaporación bajo vacío, la solución de color amarillo claro

restante se diluyó mediante la adición de CH_2Cl_2 (5 mL) y se concentró a la mitad de su volumen original para asegurar la eliminación de todo el fosgeno en exceso. La anterior solución de reactivo de cloroformiato de ciclopentilo se diluyó más con THF (15 mL) y se añadió a la sal amina-2HCl 34b. La mezcla se enfrió a 0°C en un baño de hielo, el pH se ajustó a aproximadamente 8,5-9 mediante la adición de Et_3N (añadido gota a gota) y la mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 h. Después de ese periodo, la mezcla se diluyó con EtOAc, se lavó con agua (1x), solución saturada de $NaHCO_3$ (2x), H_2O (2x) y salmuera (1x). La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtró y se evaporó bajo vacío para obtener una espuma de color amarillo-ámbar. El compuesto 34c se obtuvo en forma de una espuma blanca después de purificar mediante cromatografía en columna rápida (usando un gradiente de disolvente de 30% de hexano a 20% hexano en EtOAc como eluyente) con 80% de rendimiento (1,27 g) y una pureza superior al 93%.

D. El éster dimetílico 34c (1,17 g) se disolvió en una mezcla de THF/MeOH/H_2O (20 mL; relación 2:1:1) y se añadió una solución acuosa de NaOH (1,8 mL, 1N, 1 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h antes de ser evaporada a sequedad, para obtener la sal sódica 34d en forma de sólido blanco (aprox. 1,66 mmoles). El compuesto 34d fue usado en la etapa siguiente sin purificar.

E. La sal sódica cruda 34d (1,66 mmoles) se disolvió en THF (17 mL), se añadió Et_3N, y la mezcla se enfrió a 0°C en un baño de hielo. Se añadió gota a gota cloroformiato de isobutilo (322 µL, 2,5 mmoles) y la mezcla se agitó a 0°C durante 75 minutos. Después de ese periodo se añadió diazometano (15 mL) y se siguió agitando a 0°C durante 30 minutos y después a temperatura ambiente durante 1 h más. La mayor parte del disolvente se evaporó a sequedad bajo vacío, la mezcla restante se diluyó con EtOAc, se lavó con solución saturada de $NaHCO_3$ (2x), H_2O (2x) y salmuera (1x), se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad para obtener el compuesto 34e en forma de una espuma de color amarillo claro

(1,2 g, aprox. 1,66 mmoles). El producto intermedio diazocetona 34e se usó en la etapa siguiente sin purificar.

F. La diazocetona 34e (1,2 g, 1,66 mmoles) disuelta en THF (17 mL) se enfrió a 0°C en un baño de hielo. Se añadió gota a gota una solución acuosa de HBr (48%, 1,24 mL) y la mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1h. Después se diluyó la mezcla con EtOAc, se lavó con solución saturada de $NaHCO_3$ (2x), H_2O (2x) y salmuera (1x), la capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad para obtener el producto intermedio de β-bromocetona 34f en forma de una espuma de color amarillo claro (aprox. 1,657 mmoles).

G. A una solución de la bromocetona 34f (600 mg, 0,779 mmoles) en isopropanol (5 mL), se añadió tiourea (118 mg, 1,55 mmoles) y la mezcla de reacción se puso en un baño de aceite precalentado a 75°C en el que se dejó agitando durante 1 h. Después se eliminó bajo vacío el isopropanol, y el producto se disolvió en EtOAc (100 mL). La solución se lavó con solución saturada de $NaHCO_3$ y salmuera, la capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó para dar el producto crudo 34g (522 mg) en forma de un sólido de color pardo-rojizo. Este material se usó en la etapa final sin más purificación.

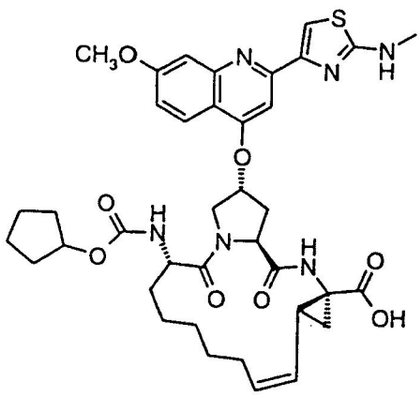
H. El éster metílico crudo 34g (122 mg, 0,163 mmoles) se disolvió en una solución de THF/MeOH/H_2O (relación 2:1:1, 4 mL) y se saponificó usando $LiOH \cdot H_2O$ (89 mg, 214 mmoles). La reacción de hidrólisis se llevó a cabo durante un periodo de 12-15 h a temperatura ambiente. Después se eliminaron los disolventes bajo vacío y el producto crudo se purificó mediante HPLC C18 de fase inversa usando un gradiente de disolvente de 10% de CH_3CN en H_2O a 100% de CH_3CN, para dar el inhibidor de proteasa del HCV n° 812 en forma de un sólido de color amarillo (24 mg, 20% de rendimiento global para la conversión del producto intermedio 34f en el inhibidor n° 812).

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ8,63 (s, 1H); 8,26-8,15 (m, 2H); 7,79 (b s, 1H); 7,72 (b s, 1H); 7,50 (b s, 2H); 7,33-7,25 (m,

2H); 5,77 (b s, 1H); 5,52 (dd, J = 8,3 Hz, 1H); 5,27 (dd, J = 9,2 Hz, 1H); 4,64 (d, J = 10,8 Hz, 1H); 4,50 (dd, J = 8,3 Hz, 1H); 4,39-4,31 (m, 1H); 4,08-3,99 (m, 2H); 3,94 (s, 3H); 3,87 (d, J = 9,5 Hz, 2H); 2,65-2,53 (m, 2H); 2,46-2,36 (m, 2H), 2,20-2,12 (dd, J = 8,6 Hz, 1H); 1,80-1,64 (m, 2H); 1,63-1,06 (m, 14H). MS;es$^+$: 733,2 $(M+H)^+$, es$^-$: 731,2 $(M-H)^-$.

EJEMPLO 34A.

Usando el mismo procedimiento que se describe en el ejemplo 34, pero haciendo reaccionar la bromocetona 34f con N-metiltiourea disponible comercialmente se obtuvo el n° 811 (Tabla 8).

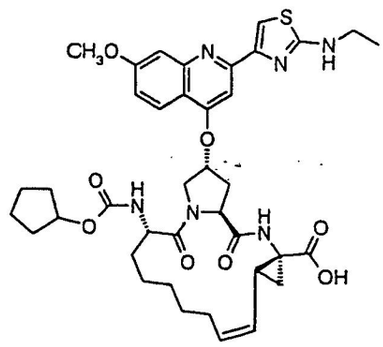


^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,63 (s, 1H); 8,20 (s, 1H); 8,18 (s, 1H); 8,12-7,93 (m, 1H); 7,88-7,69 (m, 2H); 7,32-7,24 (m, 2H); 5,82-5,75 (m, 1H); 5,52 (ddd, J = 8,1 Hz, 1H); 5,28 (dd, J = 9,9 Hz, 1H); 4,67-4,61 (m, 1H); 4,51 (dd, J = 8,8 Hz, 1H); 4,44-4,37 (m, 1H); 4,08-4,00 (m, 1H); 3,96 (s, 3H); 3,89 (m, 1H); 3,04 (d, J = 4,1 Hz, 3H); 2,65-2,37 (m, 3H); 2,16 (m, 1H); 1,77-1,65 (m, 2H); 1,63-1,11 (m, 17H). MS; es$^+$: 747,2 $(M+H)^+$, es$^-$: 745,3 $(M-H)^-$.

EJEMPLO 34B.

Usando el mismo procedimiento que se describe en el ejemplo 34, pero haciendo reaccionar la bromocetona 34f con

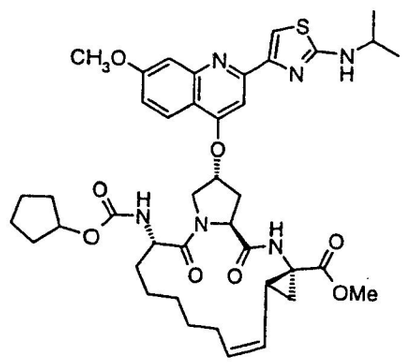
N-etiltiourea disponible comercialmente se obtuvo el n° 810 (Tabla 8).



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,63 (b s, 1H); 8,27 (b s, 1H); 8,20 (d, J = 9,0 Hz, 1H); 8,13-8,07 (m, 1H); 7,86 (b s, 1H); 7,78 (s, 1H); 7,33-7,25 (m, 2H); 5,81 (b s, 1H); 5,54 (dd, J = 8,8 Hz, 1H); 5,28 (dd, J = 9,7 Hz, 1H); 4,65 (d, J = 12,4 Hz, 1H); 4,51 (dd, J = 8,8 Hz, 1H); 4,38 (b s, 1H); 4,03 (m, 1H); 3,97 (s, 3H); 3,92-3,87 (m, 1H); 3,54-3,46 (m, 2H); 2,68-2,65 (m, 2H); 2,47-2,38 (m, 1H); 2,15 (dd, J = 8,6 Hz, 1H); 1,78-1,65 (m, 2H); 1,60-1,12 (m, 17H); 1,25 (t, J = 7,3 Hz, 3H). MS; es$^+$: 783,2 $(M+Na)^+$, es$^-$: 761,3 $(M+H)^+$.

EJEMPLO 34C.

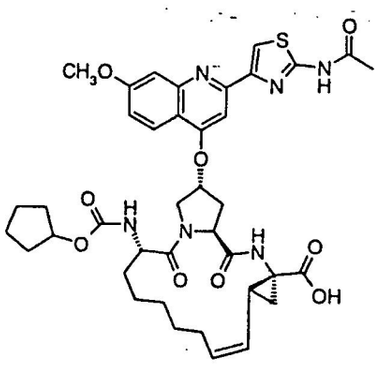
Usando el mismo procedimiento que se describe en el ejemplo 34, pero haciendo reaccionar la bromocetona 34f con N-isopropiltiourea disponible comercialmente se obtuvo el n° 822.



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,63 (s, 1H); 8,33-8,23 (b s, 1H); 8,21 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 8,04 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 7,86 (bs, 1H); 7,77 (s, 1H); 7,35-7,23 (m, 2H); 5,81 (b s, 1H); 5,52 (dd, J = 8,5 Hz, 1H); 5,27 (dd, J = 9,2 Hz, 1H); 4,51 (dd, J = 7,6 Hz, 1H); 4,37 (b s, 1H); 4,15 (b s, 1H); 4,07-3,98 (m, 2H); 3,97 (s, 3H); 3,88 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 2,60-2,53 (m, 2H); 2,47-2,37 (m, 2H); 2,19-2,10 (dd, J = 9,2 Hz, 1H); 1,80-1,64 (m, 2H); 1,63-1,29 (m, 13H); 1,27 y 1,25 (2 x d, J = 6,5 Hz, 6H); 1,23-1,09 (m, 2H). MS; es$^+$: 775,0 $(M+H)^+$, es$^-$: 772,9 $(M-H)^-$.

EJEMPLO 34D.

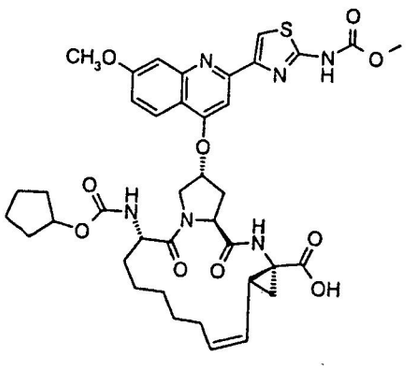
Usando el mismo procedimiento que se describe en el ejemplo 34, pero haciendo reaccionar la bromocetona 34f con N-acetiltiourea disponible comercialmente se obtuvo el nº 809.



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,62 (s, 1H); 8,30 (b s, 1H); 8,17 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 7,62 (b s, 1H); 7,52 (b s, 1H); 7,28 (d, J = 6,4 Hz, 1H); 7,21 (bs, 1H); 5,63 (b s, 1H); 5,54 (dd, J = 8,1 Hz, 1H); 5,28 (dd, J = 9,5 Hz, 1H); 4,62 (d, J = 12,2 Hz, 1H); 4,56-4,46 (m, 2H); 4,11-4,04 (m, 1H); 3,95 (s, 3H); 3,93-3,88 (m, 1H); 2,62-2,54 (m, 1H); 2,45-2,36 (m, 1H); 2,22 (s, 3H); 2,21-2,13 (m, 1H); 1,79-1,69 (m, 2H); 1,65-1,30 (m, 16H); 1,26-1,12 (m, 12H). MS; es$^+$: 775,3 $(M+Na)^+$, es$^-$: 773,3 $(M-H)^-$.

EJEMPLO 34E.

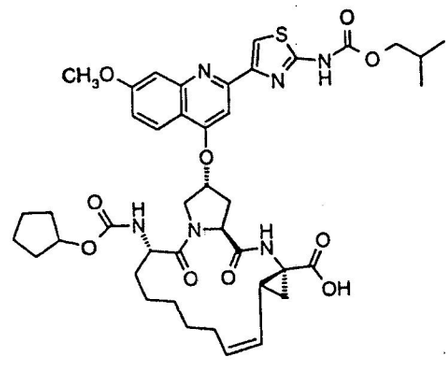
A una solución agitada del producto intermedio 2-amino-4-tiazolilo 34g (0,24 g, 0,32 mmoles) en CH_2Cl_2 (5 mL) a temperatura ambiente se añadió DIPEA (0,55 mL, 3,18 mmoles, 10 eq.) y cloroformato de metilo (0,13 mL, 1,6 mmoles, 5 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 6,5 h antes de ser concentrada bajo vacío. El material aislado crudo se hidrolizó después para dar el ácido carboxílico deseado como se describe en el Ejemplo 34 para dar el compuesto n° 818.



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,61 (s, 1H); 8,21-8,07 (m, 2H); 7,61-7,38 (m, 2H); 7,26 (d, J = 6,4 Hz, 1H); 7,19-7,10 (m, 1H); 5,60-5,47 (m, 2H); 5,27 (dd, J = 9,2 Hz, 1H); 4,63-4,53 (m, 1H); 4,47 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 4,13-4,04 (m, 1H); 3,93 (s, 3H); 3,92-3,87 (m, 2H); 3,79 (s, 3H); 2,42-2,30 (m, 2H); 2,17 (dd, J = 9,2 Hz, 1H); 1,81-1,68 (m, 2H); 1,63-1,29 (m, 16H); 1,23-1,10 (m, 2H). MS; es$^+$: 791,1 $(M+H)^+$, es$^-$: 789,1 $(M-H)^-$.

EJEMPLO 34F.

Siguiendo las condiciones descritas anteriormnete en el ejemplo 34E, pero usando cloroformiato de isobutilo, se obtuvo el producto intermedio análogo de carbamato sustituido. El material aislado crudo fue después hidrolizado para dar el compuesto deseado n° 819.

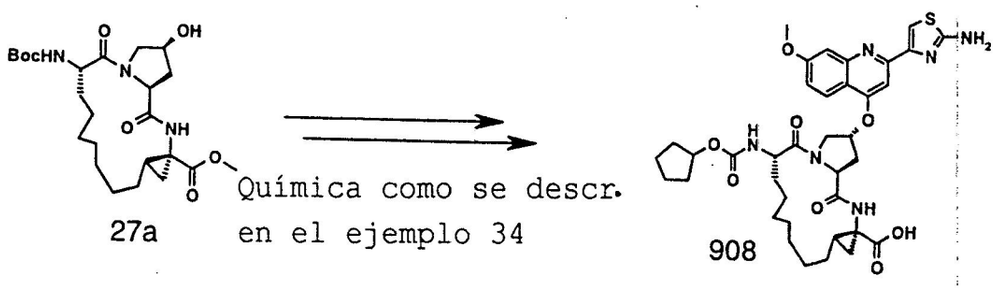


^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,62 (s, 1H); 8,47-8,27 (b s, 1H); 8,18 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,69-7,60 (m, 1H); 7,60-7,51 (m, 1H); 7,28 (d, J = 6,7 Hz, 1H); 7,28-7,19 (m, 1H); 5,70-5,60 (m, 1H); 5,52 (dd, J = 8,3 Hz, 1H); 5,27 (dd, J = 9,8 Hz, 1H); 4,63 (d, J = 11,8 Hz, 1H); 4,53-4,44 (m, 2H); 4,10-3,99 (m, 1H); 4,04 (d, J = 6,7 Hz, 2H); 3,95 (s, 3H); 3,94-3,87 (m, 1H); 2,65-2.53 (m, 1H); 2,46-2,34 (m, 1H); 2,16 (dd, J = 8,1 Hz, 1H); 2,03-1,91 (m, 1H); 1,79-1,09 (m, 20H); 0,95 (d, J = 6,7 Hz, 6H).MS; es$^+$: 833,2 $(M+H)^+$, es$^-$: 831,2 $(M-H)^-$.

EJEMPLO 35.

Síntesis del compuesto n° 908.

Partiendo del derivado 27a y usando la misma química que se describió en el ejemplo 34, se obtuvo el siguiente macrociclo saturado, compuesto n° 908 (Tabla 9).



27a

908

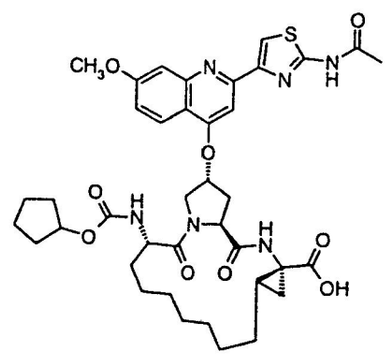
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,47 (s, 1H); 8,16 (d, J = 10 Hz, 1H); 8,15-8,07 (m, 1H); 7,82-7,63 (m, 2H); 7,53-7,43 (m, 2H);

7,33-7,22 (m, 1H); 7,13 (d, J = 7 Hz, 1H); 5,77-5,65 (m, 1H); 4,62-4,52 (m, 2H); 4,50-4,4 (m, 1H); 4,20-4,10 (m, 1H); 3,94 (s, 3H); 3,89-3,83 (m, 1H); 2,59-2,53 (m, 1H); 2,48-2,40 (m, 1H); 1,79-1,0 (m, 25H). MS; es$^+$: 735,2 $(M+H)^+$, es$^-$: 733,2 $(M-H)^-$.

EJEMPLO 35A.

Síntesis del compuesto n° 909.

Usando el mismo procedimiento que se describió en el ejemplo 35 pero usando N-acetiltiourea disponible comercialmente se obtuvo el compuesto n° 909 (Tabla 9).

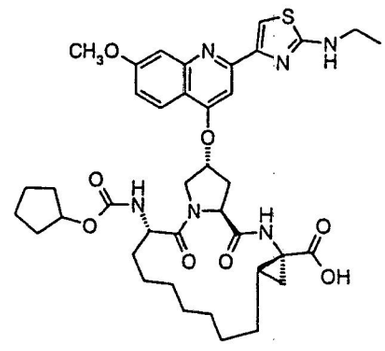


^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,53-8,41 (m, 2H); 8,20 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,68 (b s, 1H); 7,68 (b s, 1H); 7,27 (dd, J = 9,2 Hz, 1H); 7,15 (d, J = 6,4 Hz, 1H); 5,67 (b s, 1H); 4,65-4,50 (m, 3H); 4,44-4,37 (m, 1H); 4,21-4,13 (m, 1H); 3,96 (s, 3H); 3,99-3,86 (m, 1H); 2,62-2,39 (m, 2H); 2,24 (s, 3H); 1,78-1,67 (m, 3H); 1,67-1,01 (m, 22H).MS; es$^+$: 798,0 $(M+Na)^+$, es$^-$: 777,0 $(M+H)^+$.

EJEMPLO 35B.

Síntesis del compuesto n° 910.

Usando el mismo procedimiento que se describió en el ejemplo 35 pero usando N-etiltiourea disponible comercialmente se obtuvo el compuesto n° 910 (Tabla 9).

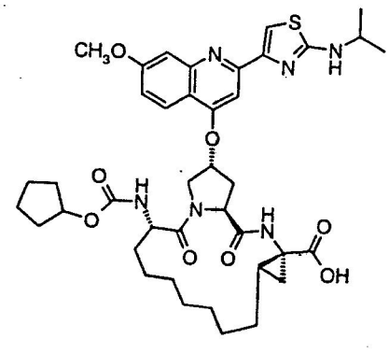


^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,47 (s, 1H); 8,29 (bs, 1H); 8,20 (d, J, 9,2 Hz, 1H); 8,09 (b s, 1H); 7,87 (s, 1H); 7,77 (s, 1H); 7,32 (dd, J = 9,2 Hz, 1H); 7,14 (dd, J =6,7 Hz, 1H); 5,78 (b s, 1H); 4,58 (dd, J = 8,1 Hz, 2H); 4,43 (b s, 1H); 3,97 (s, 3H); 3,87 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 3,55-3,46 (m, 2H); 2,63-2,53 (m, 1H); 2,47-2,41 (m, 1H); 1,78-1,00 (m, 25H); 1,25 (t, J = 7,3 Hz, 3H). MS; es$^+$: 763,1 $(M+H)^+$, es$^-$: 761,1 $(M-H)^-$.

EJEMPLO 35c.

Síntesis del compuesto n° 911.

Usando el mismo procedimiento que se describió en el ejemplo 35 pero usando N-isopropiltiourea disponible se obtuvo el compuesto n° 911 (Tabla 9).

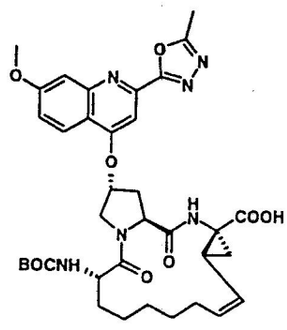


^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,47 (s, 1H); 8,29-8,19 (m, 1H); 8,19 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 8,09-8,0 (m, 1H); 7,83 (b s, 1H); 7,74 (b s, 1H); 7,31 (d, J = 8 Hz, 1H); 7,14 (d, J = 6,4 Hz, 1H); 5,76 (b s, 1H); 4,64-4,53 (m, 2H); 4,44 (b s, 1H); 4,22-

4,09 (m, 3H); 3,97 (s, 3H); 3,87 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 2,63-2,58 (m, 1H); 2,46-2,41 (m, 1H); 1,79-1,10 (m, 254H); 1,27 y 1,26 (2 x d, J = 6,5 Hz, 6H). MS; es$^+$: 777,0 $(M+H)^+$, es$^-$: 775,0 $(M-H)^-$.

EJEMPLO 36.

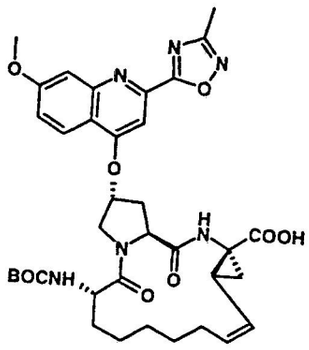
Síntesis del compuesto n° 716.



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 8,62 (s, 1H); 8,13 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,64-7,54 (m, 2H); 7,47 (d, J = 2,6 Hz, 1H); 7,16 (dd, J =9,2, 2,2 Hz, 1H); 7,03 (d, J = 6,0 Hz, 1H); 5,63 (s, 1H); 5,52 (q, J = 9,9 Hz, 1H); 5,26 (t, J = 8,9 Hz, 1H); 4,62 (d, J = 11,45 Hz, 1H); 4,45 (dd, J = 9,2, 8,27 Hz, 1H); 4,02 (m, 1H); 3,93 (s, 3H); 3,7 (dd, J = 7,6, 1,0 Hz, 1H); 2,66 (s, 3H); 2,55-2,65 (m, 1H); 2,35-2,45 (m, 1H(;2,17 (q, J = 8,6 Hz, 1H); 1,65-1,75 (m, 2H); 1,5-1,35 (m, 7H); 1,15 (s, 9H).
MS: 705 (M+1), 703 (M-1)

EJEMPLO 37.

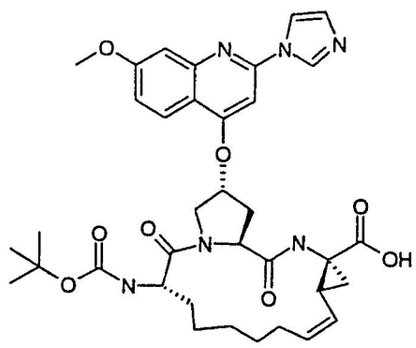
Síntesis del compuesto n° 717.



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm): 8,62 (s, 1H); 8,15 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 7,62 (s, 1H); 7,49 (s, 1H); 7,19 (dd, J = 9,2, 2,2 Hz, 1H); 7,02 (d, J = 5,4 Hz, 1H); 5,64 (s, 1H); 5,52 (q, J = 9,9 Hz, 1H); 5,26 (t, J = 9,2 Hz, 1H); 4,63 (d, J = 11,44 Hz, 1H); 4,45 (t, J = 9,2 Hz, 1H); 3,94 (s, 3H); 3,9-3,8 (m, 1H); 2,7-2,55 (m, 1H); 2,4-2,3 (m, 1H); 2,18 (q, J = 8,9 Hz, 1H); 1,75-1,65 (m, 2H); 1,5-1,2 (m, 7H); 1,14 (s, 9H).
MS: 705 (M+1), 703 (M-1)

EJEMPLO 38.

Síntesis del compuesto n° 718.



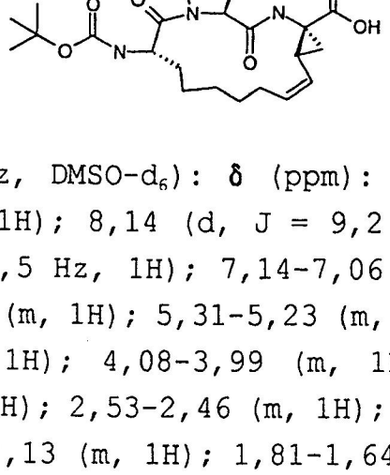
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm): 9,55 (s, 1H); 8,63 (s, 1H); 8,43 (s, 1H); 8,13 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,66 (s, 1H); 7,46 (s, 1H); 7,32 (d, J = 2,6 Hz, 1H); 7,10-7,07 (m, 2H); 5,64-5,54 (m, 1H); 5,59-5,48 (m, 1H); 5,33-5,23 (m, 1H); 4,73-4,61 (m, 1H); 4,45 (dd, J = 7,5, 9,1 Hz, 1H); 4,09-4,00 (m, 1H); 3,92 (s, 3H); 3,93-3,83 (m, 1H); 2,67-2,55 (m, 2H);

2,53-2,43 (m, 1H); 2,42-2,31 (m, 1H); 2,23-2,12 (m, 1H); 1,81-1,66 (m, 2H); 1,52-1,42 (m, 2H); 1,42-1,25 (m, 6H); 1,21 (s, 9H).

MS: 689,3 (M+1), 687,3 (M-1)

EJEMPLO 39.

Síntesis del compuesto n° 722.

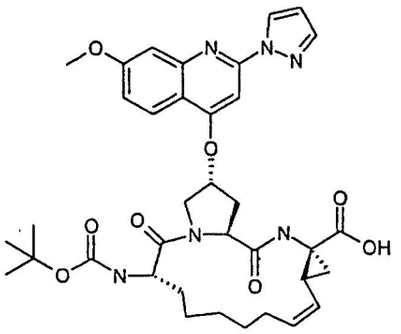


^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm): 9,70 (s, 1H); 8,64 (s, 1H); 8,26 (s, 1H); 8,14 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,45 (s, 1H); 7,30 (d, J = 2,5 Hz, 1H); 7,14-7,06 (m, 2H); 5,60-5,54 (m, 1H); 5,58-5,48 (m, 1H); 5,31-5,23 (m, 1H); 4,71-4,62 (m, 1H); 4,49-4,40 (m, 1H); 4,08-3,99 (m, 1H); 3,92-3,84 (m, 1H); 2,69-2,54 (m, 2H); 2,53-2,46 (m, 1H); 2,42-2,31 (m, 1H); 2,37 (s, 3H); 2,22-2,13 (m, 1H); 1,81-1,64 (m, 2H); 1,54-1,42 (m, 2H); 1,42-1,27 (m, 6H); 1,22 (s, 9H).

MS: 703,3 (M+1), 701,3 (M-1)

EJEMPLO 40.

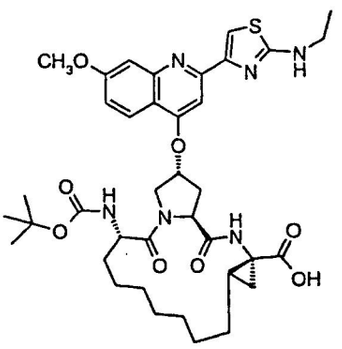
Síntesis del compuesto n° 733.



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm): 8,75 (m, 1H); 8,62 (s, 1H); 8,06 (d. J = 9,2 Hz, 1H); 7,88-7,87 (m, 1H); 7,48 (s, 1H); 7,28 (d, J=2,6 Hz, 1H); 7,05-7,00 (m, 2H); 6,64-6,63 (m, 1H); 5,62-5,58 (m, 1H); 5,55-5,49 (m, 1H); 5,28.5,24 (m, 1H); 4,64-4,61 (m, 1H); 4,48-4,44 (m, 1H); 4,07-4,03 (m, 1H); 3,91 (s, 3H); 3,92-3,85 (m, 1H); 2,67-2,54 (m, 2H); 2,53-2,45 (m, 1H); 2,41-2,34 (m, 1H); 2,20-2,14 (m, 1H); 1,75-1,69 (m, 2H); 1,50-1,43 (m, 2H); 1,41-1,32 (m, 6H); 1,17 (s, 9H).
MS: 689,3 (M+1), 687,2 (M-1)

EJEMPLO 41

Síntesis del compuesto n° 703.



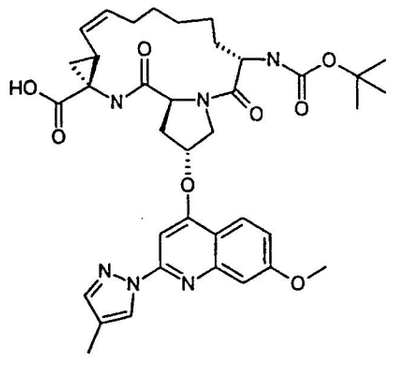
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ: 8,50 (s, 1H); 8,19 (s, 1H); 8,17 (s, 1H); 8,11-8,00 (m, 1H); 7,88-7,77 (m, 1H); 7,73 (s, 1H); 7,25 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 6,93 (d, J = 6 Hz, 1H); 5,89-5,68 (m, 1H); 4,62 (d, J = 11 Hz, 1H); 4,53 (dd, J = 8,3 Hz, 1H); 4,16-4,07 (m, 1H); 3,96 (s, 3H); 3,88 (bd, J = 9,5 Hz, 1H);

3,53-3,43 (m, 2H); 2,63-2,51 (m, 1H); 2,46-2,36 (m, 1H); 1,81-1,62 (m, 2H); 1,60-1,01 (m, 15H); 1,24 (t, 7,4 Hz, 3H); 1,17 (s, 9H).

MS; es$^+$: 751,1 $(M+H)^+$, es$^-$: 749,1 $(M-H)^-$.

EJEMPLO 42

Síntesis del compuesto n° 734.

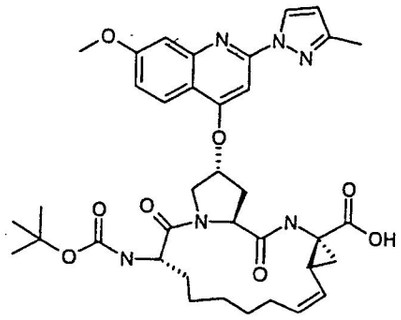


^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm): 8,62 (s, 1H); 8,54 (s, 1H); 8,04 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,70 (s, 1H); 7,43 (s, 1H); 7,24 (d, J = 2,6 Hz, 1H); 7,05-6,98 (m, 2H); 5,57-5,54 (m, 1H); 5,55-5,48 (m, 1H); 5,28-5,24 (m, 1H); 4,63-4,59 (m, 1H); 4,47-4,43 (m, 1H); 4,13-3,99 (m, 1H); 3,90 (s, 3H); 3,92-3,83 (m, 1H); 2,67-2,55 (m, 2H); 2,53-2,46 (m, 1H); 2,43-2,31 (m, 1H); 2,22-2,15 (m, 1H); 2,15 (3H); 1,75-1,70 (m, 2H); 1,51-1,42 (m, 2H); 1,41-1,28 (m, 6H); 1,17 (s, 9H).

MS:703,2 (M+1), 701,3 (M-1).

EJEMPLO 43

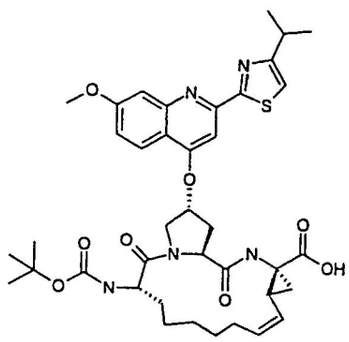
Síntesis del compuesto n° 738.



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm): 8,64 (d, J =2,5 Hz); 8,62 (s, 1H); 8,04 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,39 (s, 1H); 7,24 (d, J = 2,5 Hz, 1H); 7,04 (d, J = 6,0 Hz, 1H); 6,99 (dd, J = 2,2, 9,2 Hz, 1H); 6,43 (d, J = 2,2 Hz, 1H); 5,62-5,57 (m, 1H); 5,56-5,47 (m, 1H); 5,31-5,22 (m, 1H); 4,65-4,56 (m, 1H); 4,45 (dd, J = 7,6, 8,9 Hz, 1H); 4,07-4,00 (m, 1H); 3,90 (s, 3H); 3,88-3,84 (m, 1H); 2,68-2,56 (m, 2H); 2,54-2,43 (m, 1H); 2,42-2,31 (m, 1H); 2,34 (s, 3H); 2,24-2,14 (m, 1H); 1,80-1,64 (m, 2H); 1,52-1,43 (m, 2H); 1,43-1,27 (m, 6H); 1,18 (s, 9H). MS:703,2 (M+1), 701,2 (M-1).

EJEMPLO 44

Síntesis del compuesto n° 725.



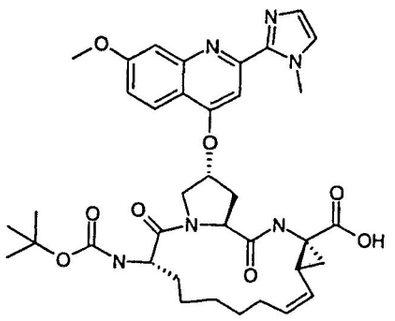
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm): 8,62 (s, 1H); 8,10 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,57 (s, 1H); 7,49 (s, 1H); 7,35 (d, J = 2,2 Hz, 1H); 7,09-7,03 (m, 2H); 5,65-5,61 (m, 1H); 5,55-5,49 (m, 1H); 5,28-5,24 (m, 1H); 4,62-4,57 (m, 1H); 4,49-4,45 (m, 1H); 4,08-4,01 (m, 1H); 3,93 (s, 3H); 3,92-3,86 (m, 1H); 3,20-3,14

(m, 1H); 2,65-2,56 (s, 1H); 2,53-2,47 (m, 1H); 2,42-2,35 (m, 1H); 2,22-2,15 (m, 1H); 1,79-1,68 (m, 2H); 1,50-1,43 (m, 2H); 1,41-1,28 (m, 12H); 1,18 (s, 9H).

MS:748,2 (M+1), 746,2 (M-1).

EJEMPLO 45

Síntesis del compuesto n° 726

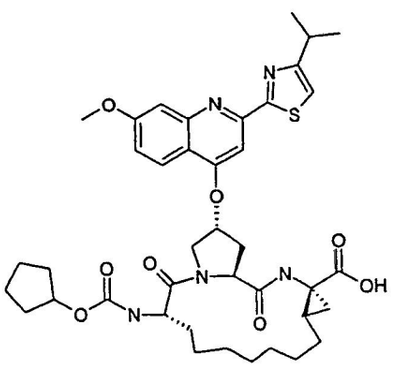


^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm): 8,64 (s, 1H); 8,10 (d, J = 9,5 Hz, 1H); 7,83-7,76 (m, 2H); 7,60 (s, 1H); 7,44-7,42 (m, 1H); 7,18-7,01 (m, 2H); 5,56-5,49 (m, 2H); 5,29-5,24 (m, 1H); 4,66-4,63 (m, 1H); 4,47-4,42 (m, 1H); 4,28 (s, 3H); 4,06-4,02 (m, 2H); 3,94 (s, 3H); 3,93-3,86 (m, 1H); 2,66-2,55 (m, 2H); 2,42-2,31 (m, 2H); 2,22-2,14 (m, 1H); 1,79-1,65 (m, 2H); 1,52-1,27 (m, 7H); 1,22 (s, 9H).

MS:703,2 (M+1), 701,3 (M-1).

EJEMPLO 46

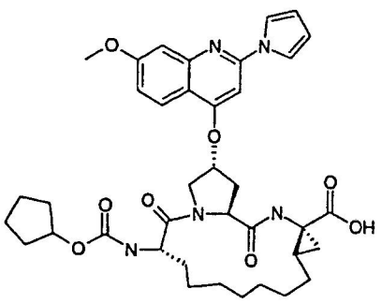
Síntesis del compuesto n° 906.



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm): 8,46 (s, 1H); 8,06 (d, J = 9,2 Hz, 1H); 7,57 (s, 1H); 7,49 (s, 1H); 7,34 (m, 1H); 7,14-7,05 (m, 2H); 5,63-5,58 (m, 1H); 4,66-4,61 (m, 1H); 4,54-4,44 (m, 2H); 4,23-4,18 (m, 1H); 3,93 (s, 3H); 3,92-3,88 (m, 1H); 3,21-3,14 (m, 1H); 2,44-2,33 (m, 1H); 1,35 (d, J = 7 Hz, 6H); 1,73-1,01 (m, 26H).
MS:762,0 (M+1), 759,9 (M-1).

EJEMPLO 47

Síntesis del compuesto n° 907.



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm): 8,46 (s, 1H); 7,98 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 7,91-7,89 (m, 2H); 7,23-7,21 (m, 2H); 7,07-7,00 (m, 2H); 6,35-6,32 (m, 2H); 5,64-5,58 (m, 1H); 4,65-4,61 (m, 1H); 4,53-4,47 (m, 2H); 4,24-4,19 (m, 1H); 3,90 (s, 3H); 3,86-3,84 (m, 1H); 2,40-2,33 (m, 1H); 1,73-1,01 (m, 26H).
MS:702,0 (M+1), 699,9 (M-1).

EJEMPLO 48.

Ensayo fluorogénico 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 de 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 expre-

sión de baculovirus pFastBac™ (Gibco/BRL). La secuencia del vector incluye una región que codifica una secuencia N-terminal de 28 restos que contiene una etiqueta e 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°C. Durante la expresión ocurre auténtica autoproteolisis para producir un complejo de proteína NS3-NS4A covalente y estable (denominado de longitud completa "FL" [Full Lenght]). El cultivo infectado se recolectó 48 a 64 horas después mediante centrifugación 4°C. 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 Pharmacia. La His-NS3-NS4AFL se eluyó en forma pura en más del 90% (según SDS-PAGE), usando un gradiente de imidazol de 50 a 400 mM. La His-NS3-NS4AFL se almacenó a -80°C 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 apagado internamente antranil-DDIVPAbu[C(C)-O]-AMY(3-NO_2)TW-OH en presencia de varias concentraciones de inhibidor fueron incubados con 1,5 nM de His-NS3-NS4AFL durante 45 min a 23°C. La concentración final de DMSO no sobrepasó de 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; lon-

gitud de onda de emisión: 423 nm).

El % de inhibición se calculó con la ecuación siguiente:

$$100 - [(fluo_{inh}-fluo_{blanco})/(fluo_{ctl}-fluo_{blanco})x100]$$

Se aplicó un ajuste 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 49.

Ensayo radiométrico de la NS3 proteasa de HCV recombinante.

El sustrato usado para el ensayo radiométrico de la NS3 proteasa de HCV recombinante, DDIVPC-SMSYTW, es segmentado entre los restos cisteína y serina por la enzima. La secuencia DDIVPC-SMSYTW corresponde al sitio de segmentación natural NS5A/NS5B en el que el resto cisteína en P2 ha sustituido a una prolina. El sustrato peptídico DDIVPC-SMSYTW y el trazador biotina-DDIVPC-SMS[^{125}I-Y]TW se incubaron con la NS3 proteasa recombinante en ausencia o en presencia de inhibidores. La separación del sustrato de los productos se llevó a cabo añadiendo a la mezcla de ensayo esferas de agarosa recubiertas con avidina, y filtrando a continuación. La cantidad de producto SMS[^{125}I-Y]TW encontrado en el filtrado (con o sin inhibidor) permitió el cálculo del porcentaje de conversión del sustrato y del porcentaje de inhibición.

A. Reactivos.

El Tris y Tris-Hcl (UltraPure) fueron obtenidos de Life Technologies. El glicerol (UltraPure), MES y BSA fueron suministrados por Sigma®. El TCEP se obtuvo de Pierce, el DMSO de Aldrich® y el NaOH de Anachemia®.

Tampón de ensayo: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicerol al 30% (p/v), CHAPS al 2% (p/v), BSA 1 mg/mL, TCEP 1 mM (TCEP se añade inmediatamente antes de usarlo a partir de una solución madre 1M en agua).

Sustrato: DDIVPC-SMSYTW, 25 µM de concentración final (desde una solución madre 2 mM en DMSO almacenada a -20°C para evi-

tar la oxidación).

Trazador: sustrato monoyodado reducido (biotina-DDIVPC-SMS[^{125}I-Y]TW) (aprox. 1 nM de concentración final).

NS3 proteasa de HCV tipo 1b, 25 nM de concentración final (desde una solución madre en fosfato sódico 50 mM, pH 7,5, 10% de glicerol, NaCl 300 mM, DTT 5 mM, 0,01% de NP-40).

B. Protocolo.

El ensayo se realizó en una placa de polipropileno de 96 pocillos. Cada pocillo contenía:

20 µL de sustrato/trazador en tampón para ensayo;
10 µL de inhibidor en 20% de DMSO/tampón para ensayo;
10 µL de NS3 proteasa 1b.

El blanco (sin inhibidor y sin enzima) y el testigo (o control) (sin inhibidor) fueron también preparados en la misma placa de ensayo.

La reacción enzimática se inició mediante la adición de la solución de enzima y la mezcla de ensayo se incubó durante 60 minutos a 23°C con agitación suave. Se añadieron veinte (20) µL de NaOH 0,025 N para apagar la reacción enzimática.

Se añadieron veinte (20) µL de esferas de agarosa recubiertas con avidina (suministradas por Pierce®) en una placa de filtración Millipore® MADP N65. La mezcla de ensayo apagada se transfirió a la placa de filtración y se incubó durante 60 minutos a 23°C con agitación suave.

Las placas se filtraron usando un aparato Millipore® MultiScreen Vaccuum Manifold Filtration, y 40 µL del filtrado se pasaron a una placa opaca de 96 pocillos que contenía 60 µL de fluido de centelleo por pocillo.

Los filtrados se sometieron a conteo en un instrumento Packard® TopCount usando un protocolo de ^{125}I durante 1 minuto.

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 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 50.

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 cisteina: 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 aprox. 30% de conversión, determinada en un lector de microplacas UV Thermomax® o un lector de placas Perkin-Elmer® LS50B 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, 3% DMSO, 0,01% Tween-20 con

[100 µM Succ-AAPF-pNA y 250 pM α-quimotripsina], [133 µM Succ-AAA-pNA y 8 nM elastasa porcina], [133 µM Succ-AAV-pNA y 8 nM elastasa leucocitaria];

o

[100 mM $NaHPO_4$ pH 6, EDTA 1 mM, DMSO al 3&, TCEP 1 mM, 0,01% de Tween-20, 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 de inhibidor (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, 0,02% Tween-20, 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, 0,02% Tween-20, inhibidor 1,5 mM-0,3µM, 15% v/v DMSO).

Después de 60 minutos de preincubación a temperatura ambiente, 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 temperatura ambiente durante 60 minutos, 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, 0,02 % Tween-20, 15% DMSO (v/v). 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 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 51.

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 (llamada NS3) que expresa parte de la poliproteína no estructural del HCV fusionada con la proteína tTA a través de un sitio de segmentación NS5A-NS5B por el orden siguiente: NS3-NS4A-NS4B-NS5A-(NS5B)tTA en donde (NS5B) representa los 6 primeros aminoácidos de NS5B. Esta poliproteína se expresa bajo el control del promotor CMV,

la otra (llamada SEAP) que expresa la proteína reporter, fosfatasa alcalina secretada (SEAP), bajo la regulación de un promotor respondedor a tTA.

La primera construcción conduce a la expresión de una poliproteína a partir de la cual las diferentes proteínas maduras se liberan por segmentación par la NS3 proteasa. Se cree que las proteínas virales maduras forman un complejo en la membrana del retículo endoplasmático. La tTA es una proteína de fusión, descrita por Gossen y Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992): 5547-5551), que contiene un dominio de unión de DNA y un activador transcripcional. La liberación de la proteína tTA requiere una segmentación dependiente de NS3 en el sitio de segmentación NS5A-NS5B entre NS5A y ella misma. Esta última segmentación permite que la tTA migre al núcleo y transactive el gen de la SEAP. Por consiguiente, la reducción de la actividad proteolítica de NS3 conduce al confinamiento de tTA en el citoplasma y al concomitante descenso de la actividad de SEAP.

Para controlar actividades celulares distintas de la inhibición de la NS3 proteasa que son debibidas al compuesto, se hace una co-transfección paralela con una construcción que expresa tTA sólo y la misma construcción reporter de forma que la actividad de SEAP es independiente de la NS3 proteasa.

Protocolo del ensayo: Células Huh-7, desarrolladas en CHO-SFMII (Life Technologies) + 10% de FCS (suero de ternera fetal) fueron co-transfectadas con las dos construcciones de

DNA en las proporciones siguientes:
7 µg de NS3 + 500 ng de SEAP + 800 µL de FuGENE (Boehringer Mannheim) por 4 x 10^6 células Huh-7. Después de 5 horas 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}.

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 9 eran activos en el ensayo enzimático presentado en el Ejemplo 48. Un número acompañado por un asterisco (*) representa actividad enzimática obtenida con el ensayo radiométrico presentado en el Ejemplo 49 con valores de IC_{50} por debajo de 50 μM. En estos ensayos enzimáticos, se usó la escala siguiente:

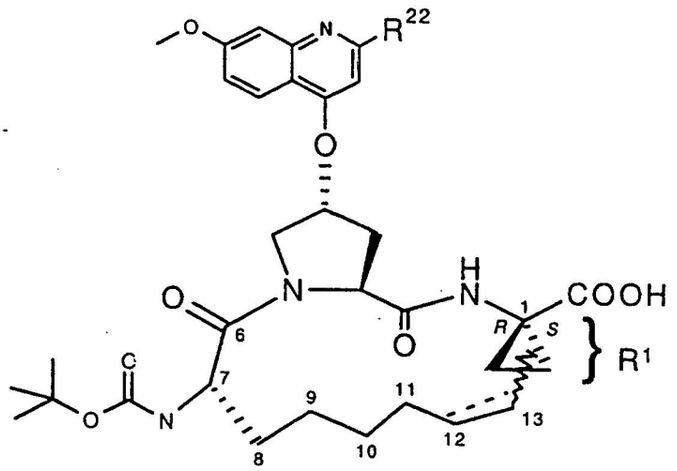
A ≥ 1 μM; 1 μM > B > 0,1 μM; y C ≤ 0,1 μM.

Se analizaron varios compuestos en los ensayos de especificidad presentados en el Ejemplo 50, y se encontró que eran específicos para la NS3 proteasa: En general, los resultados de los diferentes ensayos de especificidad son los siguientes: HLE > 300 μM; PPE > 300 μM; α-Chym. > 300 μM; Cat. B > 300 μM, lo que indica que estos compuestos son altamente específicos hacia la NS3 proteasa del CHV y no es de esperar que muestren efectos secundarios graves. Además, algunos de estos compuestos fueron analizados en el ensayo basado en células descrito en el Ejemplo 51, y se encontró que tenían actividad con un valor de EC_{50} inferior a 10 μM, lo cual es una firme indicación de que estos compuestos pueden atravesar la membrana de la célula. En particular, se han evaluado compuestos de las Tablas 7, 8 y 9 en el ensayo celular y el resultado se ha indicado en la última columna. En este ensayo celular, se usó la codificación siguiente: A > 1 μM; B ≤ 1 μM.

Las abreviaturas siguientes se usan en las tablas que siguen a continuación:

MS: datos espectrales de masas por electropulverización; m/z MH^+ excepto cuando se indique de otra forma mediante un asterisco* = m/z MH^-; Ac; acetilo; Bn: bencilo; Boc: terc-butiloxicarbonilo; Ph: fenilo; Pr: propilo.

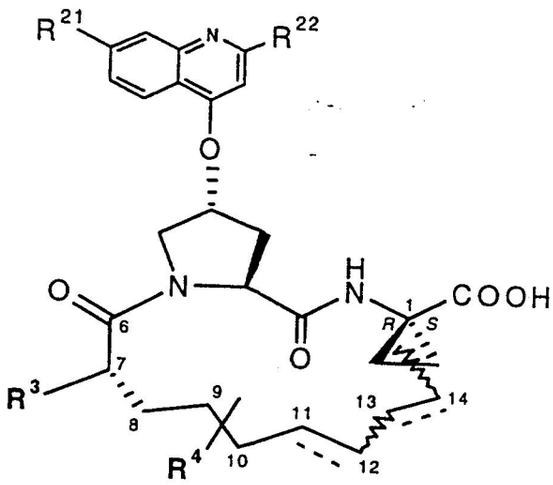
TABLA 1



estereoisómero simple en R^1

Comp. nº	doble enlace	estereoq. enlace R^1	R^{22}	MS	actividad enzimática
101	12,13-trans	1R, D syn resp. amida	fenilo	685,8	A*
102	ninguno	1R, D syn resp. ácido	fenilo	687,2	C
103	ninguno	1R, D syn resp. amida	fenilo	687,2	A*

TABLA 2



estereoisómero simple en R^1

Comp. nº	R^3	R^4	doble enlace	estereoq. enlace R^1	R^{21}	R^{22}	MS	act enz.
202	NH-Boc	H	11-12 trans	1R o 1S, D syn resp. ácido	H	H	593,7	B
203	NH-acetilo	H	11,12-trans	1R o 1S, D syn resp. ácido	H	H	535,6	A
205	NH-Boc	11-OH 12-OH cis	ninguno	1R o 1S, D syn resp. ácido	H	H	627,7	B
206	NH-Boc	--	13,14-cis	1R, D syn resp. ácido	H	H	593,7	C
207	NH-Boc	--	13,14-cis	1R, D syn resp. ácido	OMe	H	623,7	C
208	NH-Boc	H	13,14-cis	1R, D syn resp. ácido	OMe	fenilo	699,8	C
209	NH-C(O)-NH-t-Bu	H	13,14-cis	1R, D syn resp. ácido	OMe	fenilo	698,8	C

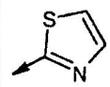
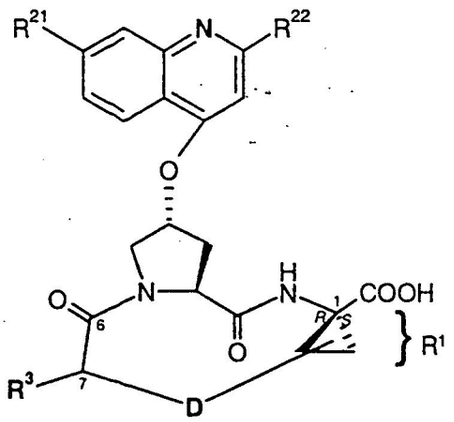
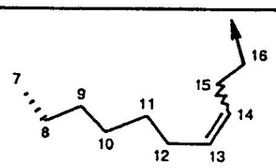
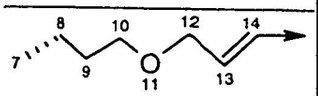
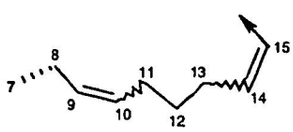
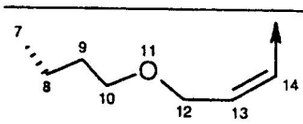
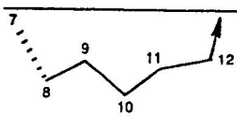
Comp. nº	R^3	R^4	doble enlace	estereoq. enlace R^1	R^{21}	R^{22}	MS	act. enz.
210	NH-Boc	H	13,14-cis	1S, D syn resp. ácido	OMe	fenilo	699,8	A*
211	NH_2	H	13,14-cis	1R, D syn resp. ácido	OMe	fenilo	599,7	C
213	OH (un isómero)	H	13,14-cis	1R, D syn resp. ácido	OMe	H	524,6	B
214	NH-Boc	10-oxo	13,14-cis	1R, D syn resp. ácido	OMe	fenilo	713,8	C
215	NH-Boc	H	ninguno	1R, D syn resp. ácido	OMe	fenilo	701,8	C
217	NH-Boc	10-OH (mezcla diastereo.)	13,14-cis	1R, D syn resp. ácido	OMe	fenilo	715,8	C
218	NH-Boc	10-oxo	13,14-cis	1R, D syn resp. amida	OMe	fenilo	713,8	C
219	NH-Ac	H	ninguno	1R, D syn resp. ácido	OMe	fenilo	643,2	C
220	NH-Boc	H	13,14-cis	1R, D syn resp. amida	OMe		706,2	C

TABLA 3



estereoisómero simple en R^1

Comp. nº	R^3	-D-	estereoq. enlace R^1	R^{21}	R^{22}	MS	act. enz.
301	NH-Boc		1R o 1S. D syn resp. ácido	H	H	621,7	B
302	NH-Boc		1R. D syn resp. amida	OMe	Ph	671	A
303	NH-Boc		1R. D syn resp. amida	OMe	Ph	701,3	B
304	NH-Boc		1R . D syn resp. ácido	OMe	Ph	711,1	C
305	OH		1R. D syn resp. ácido	OMe	Ph	602,2	B
306	NH-Boc		1R. D syn resp. amida	OMe	Ph	673,2	A*

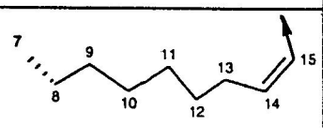
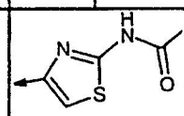
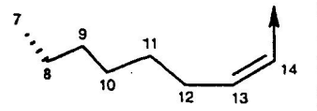
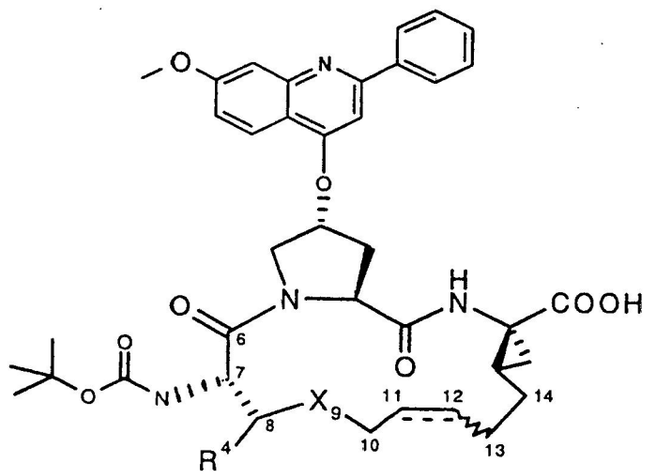
Comp. nº	R^3	-D-	estereoq. enlace R^1	R^{21}	R^{22}	MS	act. enz.
307	NH-Boc		1R, D syn resp. ácido	OMe		777	C
308	NH-Ac		1R, D syn resp. ácido	OMe	OEt	609,2	C

TABLA 4

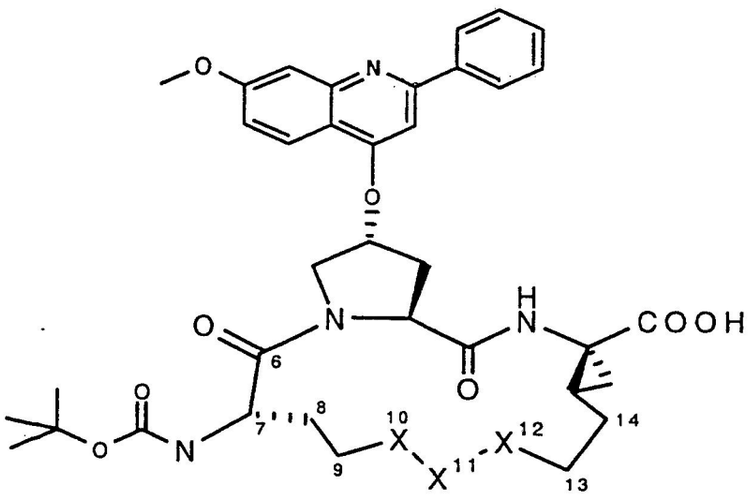


enlace D-R^1 syn resp. al ácido

Comp. nº	R^4	9-X	doble enlace 11,12	MS	actividad enzimática
401	H	CH_2	trans	699,3	C
402	H	CH_2	cis	699,4	B
403	H	O	trans	701,3	C
404	Me	O	trans	715,3	B

Comp. n°	R^4	9-X	doble enlace 11,12	MS	actividad enzimática
405	Me	O	trans	715,2	C
406	H	O	ninguno	703,3	C
407	Me	O	ninguno	717,3	B
408	Me	O	ninguno	717,3	C
409	Me	O	cis	715,2	B
410	Me	S	trans	731,3	C
411	Me	S	cis	731,3	A*
412	8-$(Me)_2$	9-S	cis	745,3	A

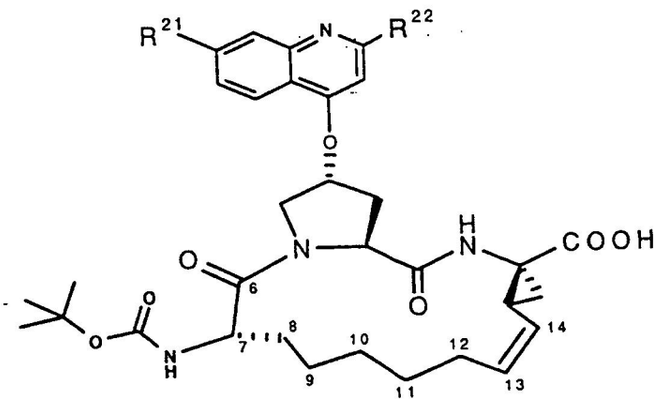
TABLA 5



enlace D-R^1 syn resp. al ácido

Comp. nº	10-X	11-X	12-X	MS	actividad enzimática
501	CH_2	O	CH_2	703,2	C
502	CH_2	CH_2	CH_2	701	C
503	CH_2	CH_2	NH	702,3	A
504	CH_2	CH_2	N(Me)	716,3	A*
505	CH_2	CH_2	N(CO)Me	744,3	B
506	CH_2	CH_2	N(CO)Ph	806,3	B
507	NH	CH_2	CH_2	702,3	C
508	N(CO)Me	CH_2	CH_2	744,3	C

TABLA 6



enlace D-R^1 syn resp. al ácido

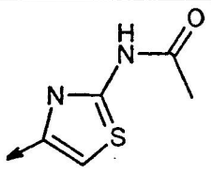
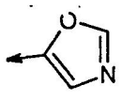
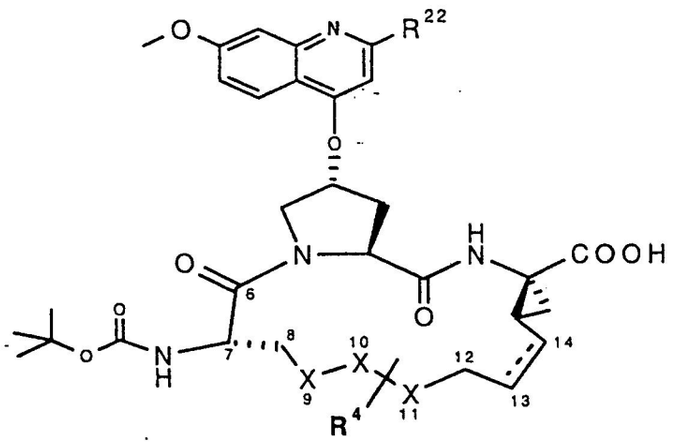
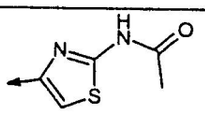
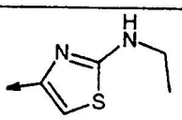
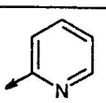
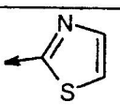
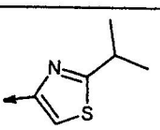
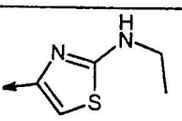
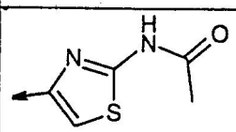
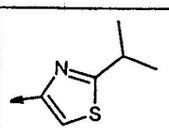
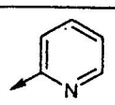
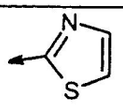
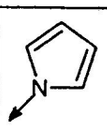
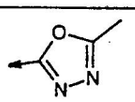
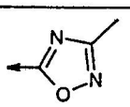
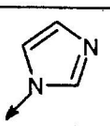
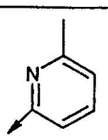
Comp. nº	R^{21}	R^{22}	MS	actividad enzimática
601	$N(Me)_2$		776,2	C
602	OH	(CF_3)	675,2*	C
603	OMe		690,1	C

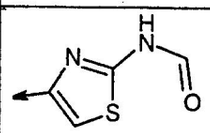
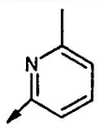
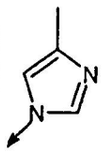
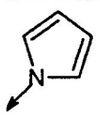
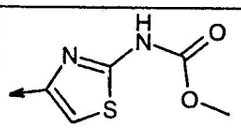
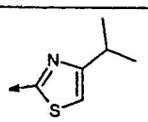
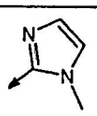
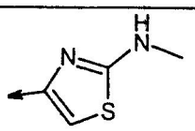
TABLA 7

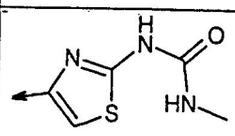
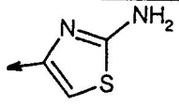
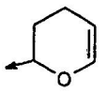
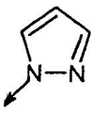
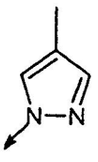
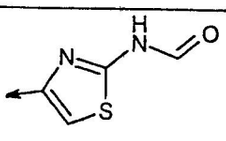
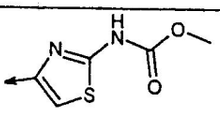
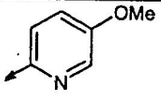
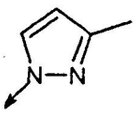


enlace D-R^1 syn resp. al ácido

Cp. #	R^4	$X^9; X^{10;}$ o X^{11}	doble enlace 13,14	R^{22}	MS	act. celul.
701	H	11-O	Cis	phenyl	701.3	A
702	H	CH_2	Cis		763.1	B
703	H	CH_2	No		751.4	B
704	H	CH_2	Cis		700.3	B
705	H	CH_2	Cis		706.2	B
707	H	CH_2	Cis		748.2	B
708	H	CH_2	Cis		749.2	B

Cp #	R^4	X^9; X^{10}; o X^{11}	doble enlace 13,14	R^{22}	MS	act. celul.
709	H	CH_2	No		765.2	B
710	H	CH_2	No		750.1	B
711	H	CH_2	No		702.2	B
712	H	CH_2	Cis	-OEt	667.3	B
713	H	CH_2	No		708.1	B
714	H	CH_2	No	-OEt	669.3	B
715	H	CH_2	Cis		688.3	B
716	H	CH_2	Cis		705.3	A
717	H	CH_2	Cis		705.2	B
718	H	CH_2	Cis		689.3	B
719	H	CH_2	Cis		714.2	B

Cp #	R^4	X^9; X^{10}; o X^{11}	doble enlace 13,14	R^{22}	MS	act. celul.
720	H	CH_2	No		751.2	B
721	H	CH_2	No		716.3	B
722	H	CH_2	Cis		703.3	B
723	H	CH_2	No		690.3	B
724	H	CH_2	No		781.1	B
725	H	CH_2	Cis		748.2	B
726	H	CH_2	Cis		703.2	B
727	H	CH_2	Cis	-CH_2-OMe	667.3	A
728	H	CH_2	Cis	Me	637.3	A
729	H	CH_2	Cis		735.2	B

Cp #	R^4	X^9; X^{10}; o X^{11}	doble enlace 13,14	R^{22}	MS	act. celul.
730	H	CH_2	No:		780.1	B
731	H	CH_2	Cis		721.1	B
732	H	CH_2	Cis		705.3	A
733	H	CH_2	Cis		689.3	B
734	H	CH_2	Cis		703.2	B
735	H	CH_2	Cis		749.2	B
736	H	CH_2	Cis		779.2	B
737	H	CH_2	Cis		730.2	B
738	H	CH_2	Cis		703.2	B
739	10-(R) Me	CH_2	No	Ph	715.2	B
740	10- (S) Me	CH_2	—	Ph	715.3	B

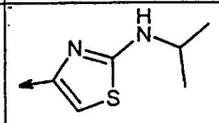
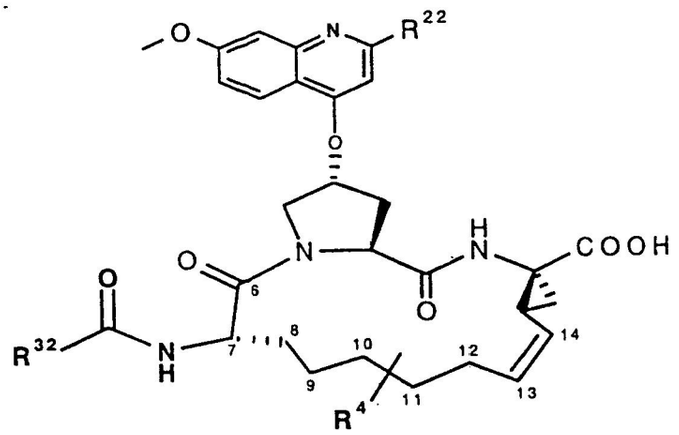
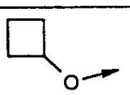
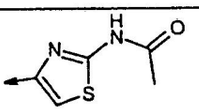
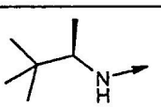
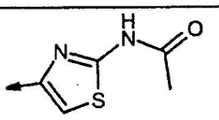
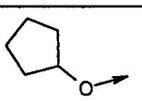
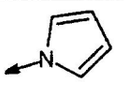
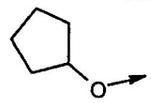
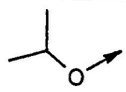
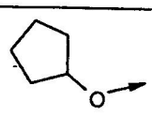
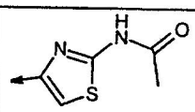
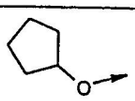
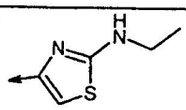
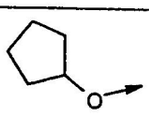
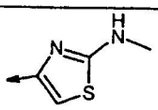
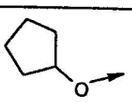
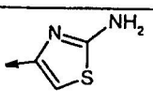
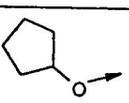
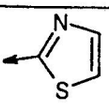
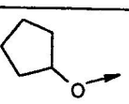
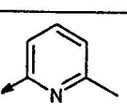
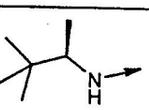
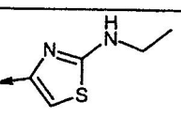
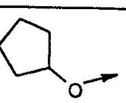
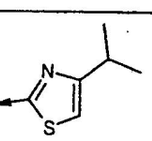
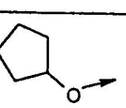
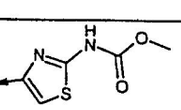
C. #	R^4	X^9; X^{10}; o X^{11}	doble enlace 13,14	R^{22}	MS	act. celul.
741	H	CH_2	Cis		763.1	B

TABLA 8



enlace D-R^1 syn resp. al ácido; doble enlace 13,14: cis

Cp #	R^{32}	R^4	R^{22}	MS	act. celul.
801		H		761.2	B
803	*n*-Pr	H	OEt	637.3	A
804		H		790.3	B
805		H		700.1	B
806		H	OEt	663.2	A

Cp #	R^{32}	R^4	R^{22}	MS	act. celul.
807		H	OEt	679.3	B
808		H	OEt	653.2	A
809		H		775.1	B
810		H		761.2	B
811		H		747.2	B
812		H		733.2	B
813		H	OEt	691.3	B
814		H		718.3	B
815		H		726.3	B
816		H		776.3	B
817		H		760.2	B
818		H		791.1	B

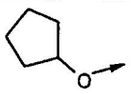
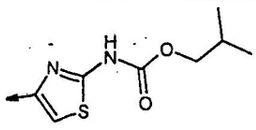
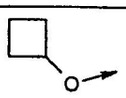
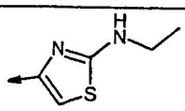
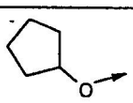
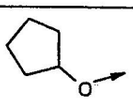
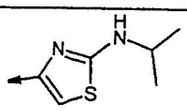
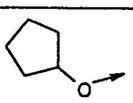
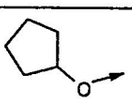
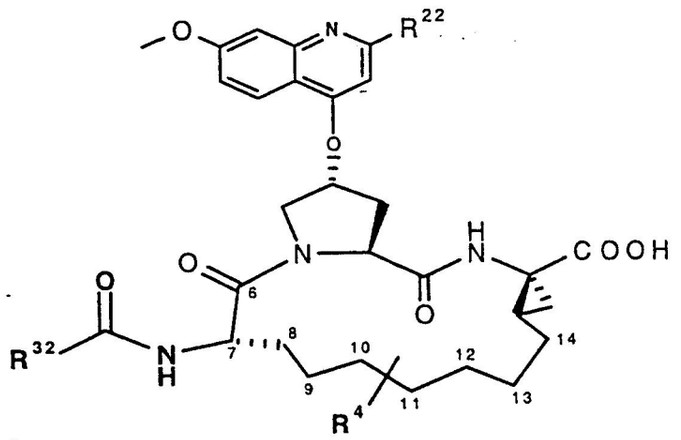
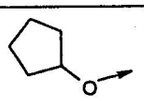
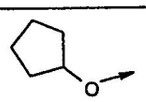
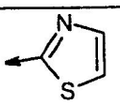
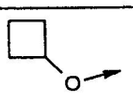
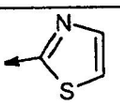
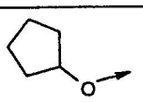
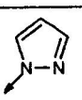
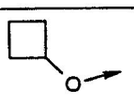
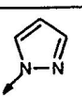
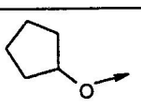
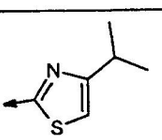
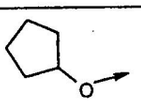
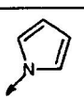
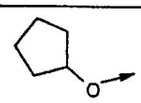
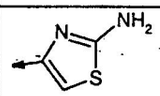
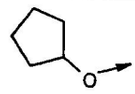
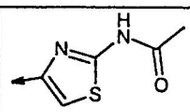
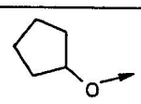
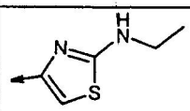
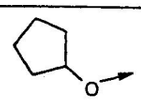
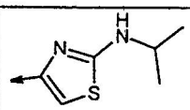
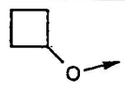
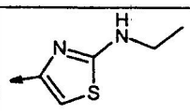
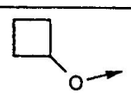
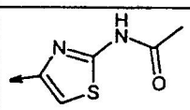
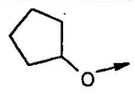
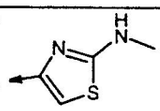
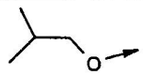
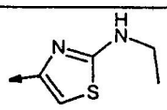
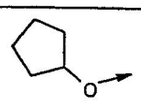
Cp #	R^{32}	R^4	R^{22}	MS	act. celul.
819		H		833.2	B
820		H		747.2	B
821		H		700.9	B
822		H		775.4	B
823		H		715.2	B
824		10- (R) Me	OEt	693.0	B

TABLA 9



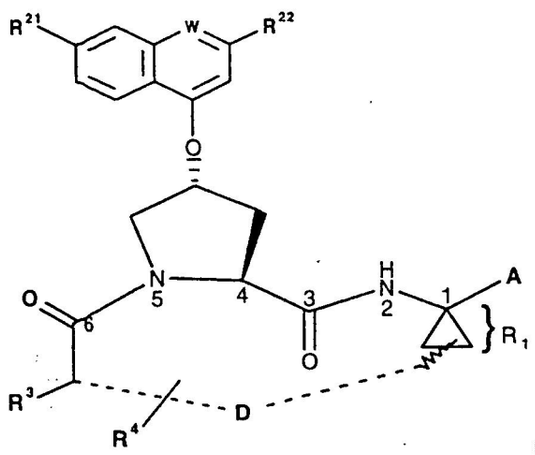
enlace D-R^1 syn resp. al ácido

Cp #	R^{32}	R^4	R^{22}	MS	act. celul.
901		H	OEt	681.3	B
902		H		719.9	B
903		H		705.9	B
904		H		703.0	B
905		H		689.0	B
906		H		762.0	B
907		H		702.0	B

Cp #	R^{32}	R^4	R^{22}	MS	act. celul.
908		H		735.2	B
909		H		777.0	B
910		H		763.1	B
911		H		777.0	B
912		H		748.9	B
913		H		762.9	B
914		H		749.0	B
915		H		751.1	B
916		10 (R) Me	OEt	695.2	B

REIVINDICACIONES

1ª. Un compuesto de fórmula (I):



(I)

en la que W es CH o N,

R^{21} es H, halo, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, haloalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, cicloalcoxi C_3-C_6, hidroxi o $N(R^{23})_2$, en donde cada R^{23} es independientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;

R^{22} es H, halo, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, haloalquilo C_1-C_6, tioalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, cicloalcoxi C_3-C_6, alcoxi C_2-C_7-alquilo, cicloalquilo C_3-C_6, arilo C_6 o C_{10} o Het, en donde Het es un heterociclo de cinco, seis o siete miembros, saturado o insaturado, que contiene de uno a cuatro heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; estando dichos cicloalquilo, arilo o Het sustituidos con R^{24},

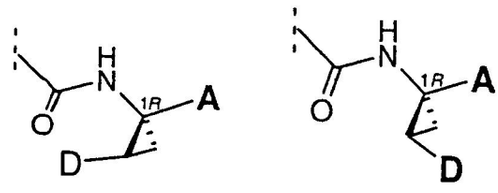
en donde R^{24} es H, halo, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, alcoxi C_1-C_6, cicloalcoxi C_3-C_6, NO_2, $N(R^{25})_2$; NH-C(O)-R^{25}, o NH-C(O)-NH-R^{25}, en donde cada R^{25} es independientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;

o R^{24} es NH-C(O)-OR^{26} en donde R^{26} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;

R^3 es hidroxi, NH_2, o un grupo de fórmula -NH-R^{31}, en donde R^{31} es arilo C_6 o C_{10}, heteroarilo, -C(O)-R^{32}, -C(O)-NHR^{32}, o -C(O)-OR^{32},

en donde R^{32} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;
D es una cadena de alquileno de 5 a 10 átomos saturada o insaturada, que contiene opcionalmente uno a tres heteroátomos independientemente elegidos entre O, S o N-R^{41}, en donde R^{41} es H, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, o -C(O)-R^{42} en donde R^{42} es alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6 o arilo C_6 o C_{10};
R^4 es H o de uno a tres sustituyentes en cualquier átomo de carbono de dicha cadena D, siendo dicho sustituyente elegido independientemente entre el grupo formado por alquilo C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, hidroxi, halo, amino, oxo, tio o tioalquilo C_1-C_6,
y
A es una amida de fórmula -C(O)-NH-R^5 en donde R^5 se elige entre el grupo formado por alquilo C_1-C_8, cicloalquilo C_3-C_6, arilo C_6 o C_{10} o aralquilo C_7-C_{16};
o A es un ácido carboxílico o una sal o éster del mismo.

2ª. Un compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, en donde dicho resto R^1 se elige entre los dos diastereoisómeros distintos representados por las estructuras (i) y (ii):

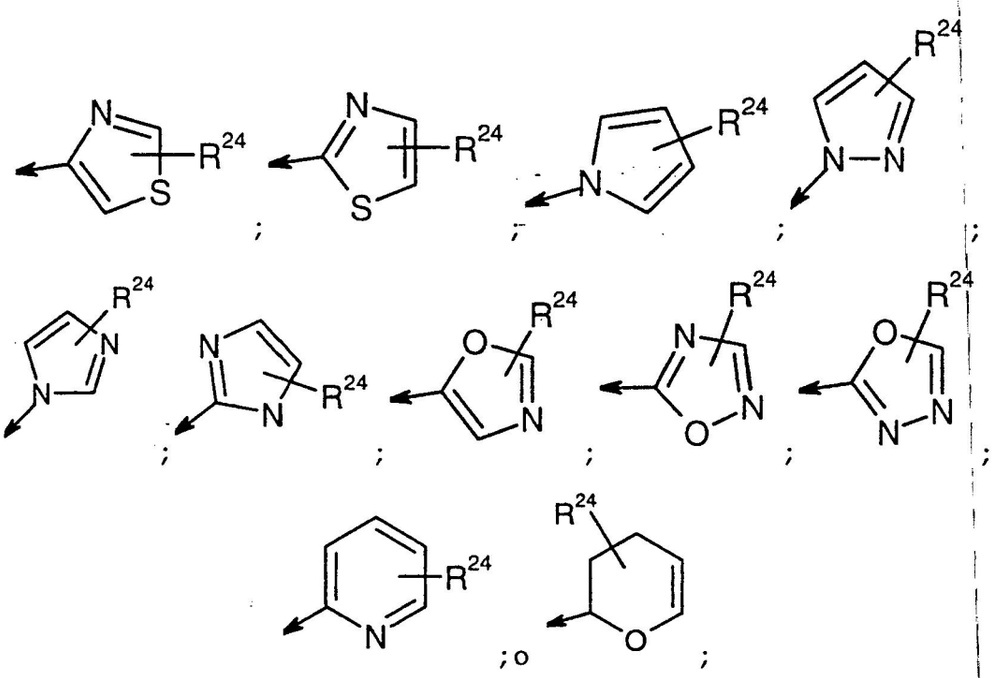


D syn respecto a la amida (i) o D syn respecto a A (ii)

3ª. El compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 2ª, en la que D está unido *syn* respecto a A como se representa por la fórmula (ii).

4ª. El compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1ª, en donde W es N;
R^{21} es H, alquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, hidroxi, cloro o $N(R^{23})_2$, en donde R^{23} es H o alquilo C_1-C_6;

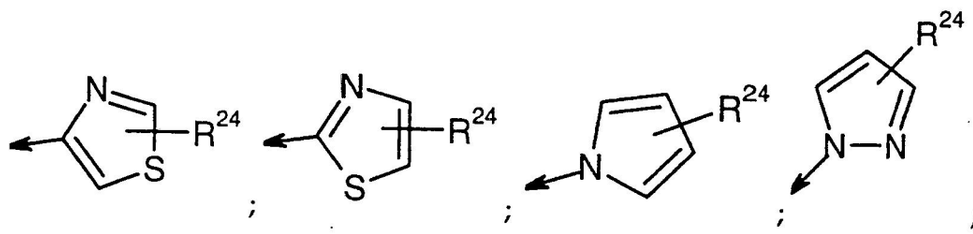
R^{22} es H, tioalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, fenilo o Het elegido entre el grupo formado por:

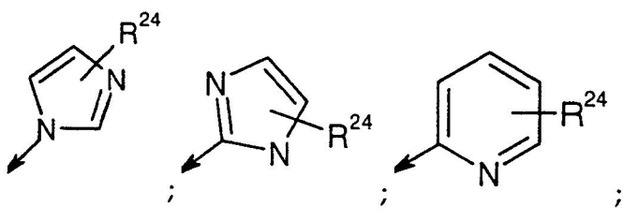


en donde R^{24} es H, alquilo C_1-C_6, NH-R^{25}, NH-C(O)-R^{25}; NH-C(O)-NH-R^{25},
en donde cada R^{25} es independientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;
o NH-C(O)-OR^{26} en donde R^{26} es alquilo C_1-C_6.

5ª. Un compuesto de fórmula I según la reivindicación 4ª, en donde R^{21} es H o alcoxi C_1-C_6.

6ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 4ª, en donde R^{22} es alcoxi C_1-C_4, fenilo o Het elegido entre el grupo formado por:



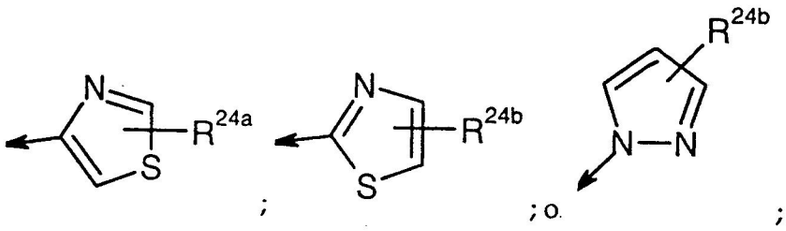


en donde R_{24} es H, alquilo C_1-C_6, NH-R^{25} o NH-C(O)-R^{25};

en donde cada R^{25} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6; o NH-C(O)-OR^{26} en donde R^{26} es como se definió en la reivindicación 4ª.

7ª. Un compuesto de fórmula I según la reivindicación 6ª, en donde R^{21} es metoxi.

8ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 7ª, en donde R^{22} es etoxi, o Het elegido entre el grupo formado por:



en donde R^{24a} es NH-R^{25} o NH-C(O)-R^{25}; en donde R^{25} es alquilo C_1-C_6;

o R^{24a} es NH-C(O)-OR^{26} en donde R^{26} es alquilo C_1-C_6, y R^{24b} es H o alquilo C_1-C_6.

9ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, en donde R^3 es una amida de fórmula NH-C(O)R^{32} o una urea de fórmula NH-C(O)-NH-R^{32} o un carbamato de fórmula NH-C(O)-OR^{32}, en donde R^{32} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6.

10ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 9ª, en donde R^3 es una urea o un carbamato, en donde R^{32} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_4-C_6.

11ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 10ª, en donde R^3 es un carbamato y R^{32} es terc-butilo, ciclobutilo o ciclopentilo.

12ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, en donde D es una cadena de alquileno saturada o insaturada, de 6 a 8 átomos de carbono, que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos elegidos independientemente entre O, S o N-R^{41}, en donde R^{41} es H, alquilo C_1-C_6, o acilo C_2-C_7.

13ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 12ª, en donde D contiene opcionalmente un heteroátomo elegido entre NH ó N-acilo C_2-C_7.

14ª. El compuesto según la reivindicación 13ª, en donde dicho heteroátomo se elige entre NH ó N(Ac).

15ª. El compuesto según la reivindicación 13ª, en donde dicha cadena D contiene 7 átomos.

16ª. El compuesto según la reivindicación 15ª, en donde dicho heteroátomo está en la posición 10 de dicha cadena D.

17ª. El compuesto según la reivindicación 13ª, en donde dicha cadena D es saturada.

18ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 12ª, en donde D es una cadena de alquileno saturada o insaturada, de 6 a 8 átomos, que contiene opcionalmente un heteroátomo elegido entre O ó S.

19ª. El compuesto según la reivindicación 18ª, en donde dicha cadena D contiene 7 átomos.

20ª. El compuesto según la reivindicación 19ª, en donde dicho heteroátomo está en la posición 9 de dicha cadena D.

21ª. El compuesto según la reivindicación 20ª, en donde dicha cadena D está sustituida en posición 8 con R^4, en donde R^4 es H o alquilo C_1-C_6.

22ª. El compuesto según la reivindicación 21ª, en donde dicho R^4 es H o metilo.

23ª. El compuesto según la reivindicación 22ª, en donde dicho R^4 es H o 8-(S)-Me.

24ª. El compuesto según la reivindicación 23ª, en donde dicha cadena D es saturada.

25ª. El compuesto según la reivindicación 19ª, en donde dicha cadena contiene un doble enlace en posición 11,12.

26ª. El compuesto según la reivindicación 25ª, en donde dicho doble enlace es *trans*.

27ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 12ª, en donde D es una cadena de alquileno todo carbono de 6 a 8 átomos, saturada o insaturada.

28ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 27ª, en donde D es una cadena de 7 átomos.

29ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 28ª, en donde D es saturada.

30ª. El compuesto según la reivindicación 29ª, en donde dicha cadena D está sustituida con R^4, en donde R^4 es H, oxo, hidroxi, alcoxi o alquilo.

31ª. El compuesto según la reivindicación 30ª, en donde dicho R^4 es H o alquilo C_1-C_6.

32ª. El compuesto según la reivindicación 31ª, en donde dicho R^4 es H o metilo.

33ª. El compuesto según la reivindicación 32ª, en donde dicho R^4 es H o 10-(S)-Me.

34ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 28ª, en donde D contiene un doble enlace.

35ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 34ª, en donde dicho doble enlace está en posición 13,14 de dicha cadena D.

36ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 35ª, en donde dicho doble enlace es *cis*.

37ª. El compuesto según la reivindicación 36ª, en donde dicha cadena D está sustituida con R^4, en donde R^4 es H, oxo, hidroxi, alcoxi C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6.

38ª. El compuesto según la reivindicación 37ª, en donde dicho R^4 es H o alquilo C_1-C_6.

39ª. El compuesto según la reivindicación 38ª, en donde dicho R^4 es H o metilo.

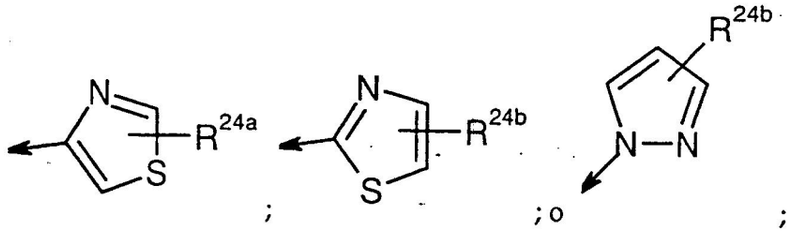
40ª. El compuesto según la reivindicación 39ª, en donde dicho R^4 es H o 10-(S)-Me.

41ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, en donde A es un ácido carboxílico.

42ª. Un compuesto según la reivindicación 1ª, en donde W es N;
R^3 es un grupo de fórmula o -NH-C(O)-NHR^{32} ó -NH-C(O)-OR^{32}, en donde R^{32} es alquilo C_1-C_4 o cicloalquilo C_4-C_6.;

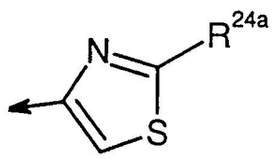
D es una cadena de alquileno de 6 a 8 átomos, saturada o insaturada, unida a R^1 *syn* respecto a A, que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos elegidos independientemente entre O, S, ó N-R^{41} en donde R^{41} es H o acilo C_2-C_7;
R^4 es H, o de uno a tres sustituyentes elegidos independientemente entre hidroxi, o alquilo C_1-C_6; y
A es un ácido carboxílico, o una sal o éster del mismo aceptable farmacéuticamente.

43ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 42ª, en donde R^{21} es H o metoxi;
R^{22} es alcoxi C_1-C_6 o Het elegido entre el grupo formado por:



en donde R^{24a} es H, alquilo C_1-C_6, NH-R^{25}, NH-C(O)-R^{25} o NH-C(O)-NH-R^{25}, en donde R^{25} es H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;
o R^{24a} es NH-C(O)-OR^{26}, en donde R^{26} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;
y R^{24b} es H o alquilo C_1-C_6;
R^3 es urea de fórmula N-C(O)-NHR^{32} o un carbamato de fórmula N-C(O)-OR^{32}, en donde R^{32} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6;
D es una cadena de alquileno de 7 átomos que contiene opcionalmente un doble enlace en posición 11,12 o 13,14;
conteniendo dicha cadena D opcionalmente un heteroátomo elegido independientemente entre O, S, NH, N(Me) o N(Ac); y
R^4 es H o alquilo C_1-C_6.

44ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 43ª, en donde R^{21} es metoxi y R^{22} es etoxi o



en donde R^{24a} es NH-alquilo C_1-C_4, NH-C(O)-alquilo C_1-C_4, NH-C(O)-O-alquilo C_1-C_4, o NH-C(O)-NH-alquilo C_1-C_4;
D es una cadena C7 todo carbono, saturada o que contiene un doble enlace *cis* en posición 13,14.

45ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, elegido entre el grupo formado por todos los compuestos de la Tabla 1.

46ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, elegido entre el grupo formado por todos los compuestos de la Tabla 2.

47ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, elegido entre el grupo formado por todos los compuestos de la Tabla 3.

48ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, elegido entre el grupo formado por todos los compuestos de la Tabla 4.

49ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, elegido entre el grupo formado por todos los compuestos de la Tabla 5.

50ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, elegido entre el grupo formado por todos los compuestos de la Tabla 6.

51ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, elegido entre el grupo formado por todos los compuestos

de la Tabla 7.

52ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, elegido entre el grupo formado por todos los compuestos de la Tabla 8.

53ª. El compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, elegido entre el grupo formado por todos los compuestos de la Tabla 9.

54ª. Un método para inhibir la replicación del virus de la hepatitis C exponiendo el virus a una cantidad inhibidora de NS3 proteasa viral de la hepatitis C del compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª.

55ª. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad viralmente eficaz anti-hepatitis C de un compuesto de fórmula I según la reivindicación 1ª, o una sal o éster del mismo aceptable farmacéuticamente, mezclada con un medio vehículo o agente auxiliar aceptable farmacéuticamente.

56ª. La composición farmacéutica según la reivindicación 55ª, que comprende además un agente inmunomodulador adicional.

57ª. La composición farmacéutica según la reivindicación 56ª, en la que dicho agente inmunomodulador se elige entre el grupo formado por interferones α, β y δ.

58ª. La composición farmacéutica según la reivindicación 55ª, que comprende además un agente antiviral.

59ª. La composición farmacéutica según la reivindicación 58ª, en la que dicho agente antiviral se elige entre el grupo fromado por ribavirina y amantadina.

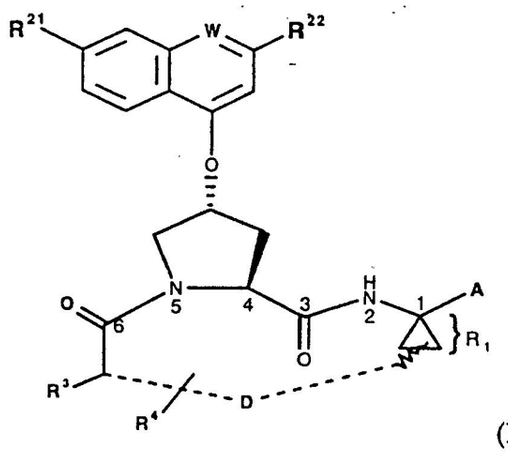
60ª. La composición farmacéutica según la reivindicación 55ª, que comprende además otro inhibidor de proteasa del HCV.

61ª. La composición farmacéutica según la reivindicación 55ª, que comprende además un inhibidor de otras dianas en el ciclo vital del HCV, tales como helicasa, polimerasa o metaloproteasa.

62ª. El uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 55ª para la preparación de un medicamento para tratar una infección viral de hepatitis C en un mamífiero.

RESUMEN DE LA DESCRIPCION.

La presente invención cubre compuestos macrocíclicos de fórmula I activos in vitro y en ensayos celulares contra la NS3 proteasa del virus de la hepatitis C.



(I)

en la que W es CH o N; R^{21} es H, halo, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo, haloalquilo, alcoxi C_1-C_6, cicloalcoxi, hidroxi o $N(R^{23})_2$, en donde cada R^{23} es independientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalcoxi; y R^{22} es H, halo, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, haloalquilo C_1-C_6, tioalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, cicloalcoxi C_3-C_6, alcoxi C_2-C_7-alquilo, cicloalquilo C_3-C_6, arilo C_6 o C_{10} o Het, en donde Het es un heterociclo de cinco, seis o siete miembros, saturado o insaturado, que contiene de uno a cuatro heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; estando dichos cicloalquilo, arilo o Het sustituidos con R^{24}, en donde R^{24} es H, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, alcoxi C_1-C_6, cicloalcoxi C_3-C_6, NO_2, $N(R^{25})_2$; NH-C(O)-R^{25}, o NH-C(O)-NH-R^{25}, en donde cada R^{25} es independientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6; o R^{24} es NH-C(O)-OR^{26}, en donde R^{26} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6; R^3 es hidroxi, NH_2, o un grupo de fórmula -NH-R^{31}, en donde R^{31} es arilo C_6 o C_{10}, heteroarilo, -C(O)-R^{32}, -C(O)-OR^{32} o -C(O)-NHR^{32}, en donde R^{32} es alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6; D es una cadena de alquileno de 5 a 10 átomos, saturada o insaturada, que contiene opcionalmente uno a tres heteroátomos independientemente elegidos entre O, S o N-R^{41}, en donde R^{41} es H, alquilo

C_1-C_6, cicloalquilo, o -C(O)-R^{42} en donde R^{42} es alquilo C_1-C_6, cicloalquilo o arilo C_6 o C_{10}; R^4 es H o de uno a tres sustituyentes en cualquier átomo de carbono de dicha cadena D, siendo dicho sustituyente elegido independientemente entre el grupo formado por alquilo C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, hidroxi, halo, amino, oxo, tio o tioalquilo C_1-C_6, y A es una amida de fórmula -C(O)-NH-R^5 en donde R^5 se elige entre el grupo formado por alquilo C_1-C_8, cicloalquilo C_3-C_6, arilo C_6 o C_{10} o aralquilo C_7-C_{16}; o A es un ácido carboxílico o una sal o éster del mismo aceptable farmacológicamente.

Consulado General de Colombia

CERTIFICATION No.499

11041.
00569

La suscrita Cónsul de Colombia en Montreal, Canadá
vistos los documentos presentados por los interesados,

C E R T I F I C A :

- Que ante la Cámara de Notarios de Quebec se encuentra debidamente registrada la señora TERESA OLEDZKA, como Notaria Pública ante quien se autenticó la firma del signatario del poder anexo.
  Que la firma y sello del Señor Michel Poulin son los que usa y acostumbra en sus actos como Secretario de la Cámara de Notarios de Quebec.

- Que la empresa **BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD / BOEHINGER INGELHEIM (CANADA) LTÉE.** existe como una sociedad de cárácter público y está constituída de acuerdo con las leyes de la Provincia de Quebec, Canadá y cumple su objeto social conforme a las mismas.

- Que el señor PAUL C. ANDERSON en su carácter de Vice Presidente de Investigación y Desarrollo de la mencionada entidad, está autorizado para firmar el poder anexo y su firma fué autenticada ante la Notaria ya citada. Que el señor Anderson es el representante legal y que en consecuencia, con su firma compromete jurídicamente a la empresa.

- Que el domicilio social de la empresa **BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD / BOEHINGER INGELHEIM (CANADA) LTÉE** es la ciudad de Laval, Provincia de Quebec, Canadá.

El Cónsul no asume responsabilidad por el contenido de los documentos.

La presente certificación se expide a los cinco (05) días del mes de noviembre de mil novecientos noventa y siete (1997).

PILAR VARGAS ALVAREZ
Cónsul 2Ex

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FOTOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
23 DIC 1999
PABLO MENDEZ BARAJAS

Pagado: Impuesto de Timbre US$ 6.-
Derechos Consulares US$ 100.-
TOTAL US$ 106.-

1010 SHERBROOKE STREET WEST, SUITE 420, MONTREAL, QUEBEC, CANADA H3A 2R7
TEL.: (514) 849-2929 FAX: (514) 849-4324

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

302217

LA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA D.C.
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FOTOSTATICA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

1 2 DIC 1999

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1999 DIC -3 P 12:06

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1991

CONSULADO GE

Chambre des notaires du Québec

CAA-27215

162

PROVINCE OF QUEBEC
CANADA

I, Michel Poulin, Secretary of the Chambre des notaires du Québec, Canada, hereinafter called the "Chamber", said Chamber having its Head Office in the City of Montreal, constituted under the laws of said Province of Quebec, and being the sole and only Chamber of Record for all Notaries in said Province, said Chamber having a seal, the whole as enacted by the law 17-18 Elizabeth II, 1968, ch. 70, amended on July 6th, 1973 to conform to the Professional Code (R.S.Q., c.C-26).

DO HEREBY CERTIFY that Mtre Teresa Oledzka, notary residing at Montreal in the Judicial District of Montreal of said Province, who signed the certificate of proof of acknowledgment on the hereto attached instrument, was at the time of taking such proof of acknowledgment a practising Notary and Public Officer, having been duly commissioned and sworn as such and his name is entered on the Roll of the Order of Notaries of said Province of Quebec, that his jurisdiction extends over the whole of said Province of Quebec and his term of office is for life; that therefore he is at the date hereof a person authorized to take and certify affidavits and solemn declarations and to take proof and acknowledgment of all deeds and other instruments, and to certify as such Notary both originals and copies thereof or either of them to be recorded in said Province, the whole in accordance with and as required by the said Notarial Act and the laws of said Province of Quebec.

AND moreover I have compared the signature: "Teresa Oledzka, notary" affixed to said instrument, with that deposited in the "Register of Official Signatures of Notaries" (said Register being kept only by me and remaining of record only in my office), and, as required by said Notarial Act and laws, such signature is the official signature of said person and the impression of his official seal on said certificate is also genuine.

THAT further in my said capacity of Secretary of the said Chamber, I am the only authority under the laws of said Province to issue the present certificate.

WITNESS my hand and the official seal of said Chamber at Montreal, this 17th day of October 1997.

Mtre MICHEL POULIN
Secretary

COPIA NOTARIO SEX O ENCARGADO DEL CIRCULO
SANTAFE DE BOGOTA. HAGO CONSTAR QUE
ESTA COPIA FOTOSTATICA COINCIDE CON EL ORI-
GINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
23 DIC 1999
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

27226

ELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª Nº 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

163

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned/Yo (nosotros), abajo firmado (s)
BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA), Ltd.
of/domiciliado (s) en 2100 Cunard, Laval,
Québec, CANADA

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª Nº 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª Nº 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy
8th day of October , 1997
in/en Laval, Québec, Canada

Signature / Firma

Paul C. Anderson
Vice President, R & D

23 DIC 1999
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODERE-3 (MINUTA Nº 12.1.1.2.6 USA)

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los ___ días del mes de _____ de 19_____

ante mí, Notario Público de _____

compareció(eron) personalmente _____

_____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this ___ day of _____ 19_____

before me, a Notary Public of _____

personally appeared _____

_____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

_____ Notario Público — Notary Public _____

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 8 de OCTUBRE de 19 97

compareció(eron) ante mí
PAUL C. ANDERSON

a quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en representación de la Sociedad/compañía

denominada BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD.
BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTEE

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:* (1) Articulos de Vigencia de Sociedad Comercial de Canadá, Ottawa, Canada, 25 de nov. de 1980. (2) Resolucion de la Junta Directiva Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd., Burlington, Ontario, Canada, 1º de enero de 1997.

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:
BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD.
BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTEE

2.1. Que _____

es una Sociedad/Compañía legalmente constituída y existente

de acuerdo con las leyes de CANADA

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE EL FINAL QUE ANTECEDE ES IGUAL AL QUE SE TUVO A LA VISTA
23 DIC 1999
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO SEXTO

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
2100 CUNARD, LAVAL, QUEBEC, CANADA

2.3. Que el objeto u objeto para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) _____

_____

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad LAVAL

Estado QUEBEC, CANADA

Hoy 8 OCTUBRE 1997 de

_____ Notary Public

* Los documentos deben identificar

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 8th day of October 19 97

appeared before me
Paul C. Anderson

who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Corporation/Company

named Boehringer Ingelheim (Canada, Ltd
Boehringer Ingelheim (Canada) Ltée

I Certify:

1. That I have seen the following documents:* (1) Articles of Continuance, Canada Business Corp. Act, Ottawa, Canada, Nov. 25, 1980 (2) Resolution of the Board of Directors Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd., Burlington, Ontario, Canada, Jan. 1, 199

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd
Boehringer Ingelheim (Canada) Ltée

is a Corporation/Company legally constituted and in existence

in accordance with the laws of Canada

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
2100 Cunard, Laval, Québec, Canada

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Paul C. Anderson

_____

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City Laval

State Québec, Canada

This 8th day of OCT. 19 97

Teresa Oledzka, Notary P.

TERESA OLEDZKA, NOTAIRE
1117 Ste-Catherine Ouest, Suite 403
Montréal, Québec H3B 1H9

* Documents must be identified with date and origin.

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 05.113.98 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor al mismo tiempo que la presente. Esta traducción ha sido preparada por Bernarda R. de Martínez, Traductora Oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia mediante Resolución No. 683 de 1991.

(Se traducen sellos y legalizaciones que aparecen a continuación de un documento escrito en inglés y español por medio del cual **BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA), Ltd.,** otorga Poder a favor de **GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO y LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ.**

Dado y firmado hoy 8 de octubre de 1997, en Laval, Québec, Canadá, por Paul C. Anderson, Vicepresidente, Investigación y Desarrollo.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de la sociedad **BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA), Ltda.,** expedido el 8 de octubre de 1997, en Laval, Québec, Canadá.

(Firmado), Teresa Oledzka, Notario

(Sello notarial en tinta), Teresa Oledzka, NOTARIO, 1117, Ste-Catherine Ouest, Suite 403 Montréal, Québec H3B 1H9

Cámara

de Notarios

de Canadá

NOTARIO SEXTO ENCARGADO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA. HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FOTOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

23 DIC 1999

PABLO PEREZ BARAJAS NOTARIO (E)

CAA-27215

165

PROVINCIA DE QUÉBEC

CANADÁ

Yo, **Michel Poulin**, Secretario de la Cámara de Notarios de Québec, Canadá, de aquí en adelante denominada la "Cámara", que tiene su Oficina Principal en la Ciudad de Montreal, constituida bajo las leyes de la mencionada Provincia de Québec, y siendo la única Cámara de Registro para todos los Notarios de dicha Provincia que tiene sello, de acuerdo a lo establecido por la ley 17-18 de Elizabeth II, 1968, modificada el 6 de julio de 1973 bajo el Código Profesional (R.S.Q., c.C-26).

POR EL PRESENTE CERTIFICO que la Dra. Teresa Oledzka, notario domiciliado en Montreal en el Distrito Judicial de Montreal de la Provincia mencionada, quien firmó el certificado de prueba de reconocimiento en el instrumento adjunto al presente documento, era en el momento de recibir dicha prueba o reconocimiento Notario Público en ejercicio, debidamente comisionado y juramentado como tal y su nombre registrado en el Registro de la Orden de Notarios de la mencionada Provincia de Québec, que su jurisdicción cubre toda la Provincia de Québec y su período del cargo es vitalicio; que por lo tanto, en la fecha del presente documento es una persona autorizada para recibir y certificar declaraciones juramentadas y declaraciones formales y para

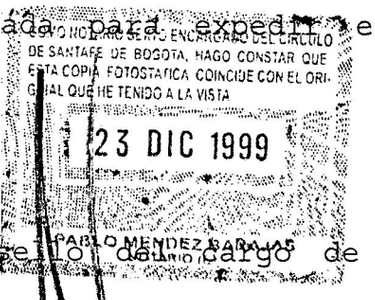
CONSULADO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FOTOSTATICA COINCIDE CON EL ORI... DE HECHO EN LA VISTA
23 DIC 1999

166

recibir la prueba y reconocimiento de escrituras y otros instrumentos, y para certificar como Notario tanto los originales como las copias de los mismos, o cualesquiera de ellos que se deban registrar en la Provincia mencionada, todo de acuerdo con y como lo exigen la Ley Notarial y las leyes de la Provincia de Québec.

Además, he comparado la firma: "Teresa Oledzka, notario" estampada en el instrumento, con la que se encuentra depositada en el "Registro Oficial de Firmas de Notarios" (el que guardo únicamente yo y permanece como constancia en mi oficina), y, como lo exigen dicha Ley Notarial y las leyes, la firma mencionada es la firma oficial de dicha persona y la impresión de su sello oficial que aparece en el certificado es auténtico.

QUE además, en mi calidad de Secretario de la Cámara mencionada, de acuerdo con las leyes de dicha Provincia, Soy la única autorizada para expedir este certificado.



DAN FE mi firma y sello oficial en cargo de la mencionada Cámara de Montreal, hoy 17 de octubre de 1997.

(Firma facsimilar), Michel Poulin

(Impreso), Dr. Michel Poulin, Secretario

167

27226

(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en Montreal.)

(En español), Certificación del cargo y firma de TERESA OLEDZKA, de la firma, sello y cargo de MICHEL POULIN, de la existencia legal de la empresa BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) y de la autoridad que tenía su Vicepresidente de Investigación y Desarrollo, PAUL C. ANDERSON, para firmar el Poder anexo. Esta certificación fue expedida por el **CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN MONTREAL**, bajo el **No. 499**, de fecha **05 de noviembre de 1997** y firmada por Pilar Vargas Alvarez, Cónsul 2Ex. Pagados Impuesto de Timbre y Derechos Consulares por valor de veintiún dólares.

(Al dorso), Legalización de la firma que antecede expedida por el **MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES** bajo el **No. 302217**, de fecha **3 de diciembre de 1997** y firmada por el Jefe de Legalizaciones.

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA. HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FOTOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

23 DIC 1999

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, 7 de mayo de 1998

COLO 11041 803 001 8

BRM.1

Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1991

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

IDENTIFICADO(S) CON C.C. NO.(S)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA,

08 MAY 1998

NOTARIO

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

99 MAY - 8 11:44

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

EL SUSCRITO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FOTOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

23 DIC 1999

PABLO MENDEZ SARAJAS
NOTARIO (E)

168

CAVELIER
ABOGADOS

TELEFAX.(57)(1) 2358850
CABLES CAVELEYES
TELEX:45479

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª, No.72-35
BOGOTA 8, COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL:CAVE
TELEFONO:(57)(1) 2120100

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA),LTD.

Poder conferido el: 08-10-97

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,

GERMAN CAVELIER
T.P.A. No. 832
C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

Acepto:

EMILIO FERRERO
T.P.A. Nº 31.929
C.C. No. 438.019 de Usaquén

COMO NOTARIO SESENTA ENCARGADO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FOTOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
23 DIC 1999
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

2e-780-2

Nota:

Los folios 172, 173 Extracto para publicación fueron retirados para publicar.

Marzo 12/02

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Santafé de Bogotá D. C. 22 ABR. 1998

Ante Mí JUAN MANUEL POTES MARTINEZ

NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA

Compareció(aron) personalmente:

quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C. 2877924 438019

y dejó(aron) Libreta(s) Militar(es) 832 - 31929

en Bogotá, y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y que el contenido del mismo es cierto.

Ante mí se firma esta diligencia.

EL SUSCRITO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FOTOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

23 DIC 1999

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

REPUBLICA DE COLOMBIA
Juan Manuel Potes Martinez
NOTARIO SEXTO
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

169

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 18,928
FECHA : MARZO 21 DE 2000

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00024874 00000000 Folios: 174
Fecha (AMD): 2000-04-05 17:34:12
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00024-9	746752	32,225,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL : $	608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
PAGADURIA

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

C/c 11041-80[illegible] 1

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00024874 ( ) Folios: 174
Fecha (AMD): 2000-04-05 17:34:12
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

170

mercio
ENCIA

175

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCIÓN [ ] **MODELO DE UTILIDAD [ ]**

- Nombre e identificación del Solicitante [ ]
- Nombre e identificación del Inventor [ ]
- Título o nombre de la Invención [ ]
- Descripción [ ]
- Reivindicaciones [ ]
- Resumen [ ]
- Comprobante de Pago [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Nombre e identificación del peticionario [ ]
- Nombre e identificación del inventor o diseñador [ ]
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse [ ]
- Representación gráfica [ ]
- Comprobante de pago [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

_____.
Firma Responsable

Fecha:_____.

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

EXPEDIENTE 00-024874

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención:**

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó, en forma correcta el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de enero del 2000).

SI [x] **NO [ ]** **EXTEMPORANEAMENTE [ ]** Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.

SI [ ] **NO [x]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI [ ] **NO [x]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI [ ] **NO [x]** **CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS**

OBSERVACIONES JURIDICAS CONVENIO DE PARIS: En todo caso, deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, **en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses**, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la perdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI [ ] **NO [x]** Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI [ ] **NO [x]** Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C.,6 de abril del 2000.

EXAMINADOR JURIDICO: Código 202002

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia

~~177~~ 172

2000-06-13

1º EXAMEN DE FORMA

Radicación no 00-24874

Concepto Técnico no 895 Clasificación Internacional de Patentes A61K 38/00 (2000)

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención:**

SI [X] NO [ ]	Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a).
SI [X] NO [ ]	Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a).
SI [X] NO [ ]	Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e).
SI [X] NO [ ]	Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b).
SI [X] NO [ ]	Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c).
SI [X] NO [ ]	Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
SI [X] NO [ ]	Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980).
SI [ ] NO [X]	Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d).
SI [X] NO [ ]	Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94.
SI [ ] NO [X]	Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94.
SI [X] NO [ ]	Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
SI [X] NO [ ]	Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
SI [ ] NO [X]	**CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI [X] NO [ ] ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C., Junio 13/00

EXAMINADOR TÉCNICO
Código 202010

178
173

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
1° EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TÉCNICO Nº 895

EXPEDIENTE Nº 0-24874 IPC A61K 38/00

Debe tenerse en cuenta que en el capítulo reivindicatorio no debe hacerse referencia al capítulo descriptivo. Por este motivo, las reivindicaciones 45 a 53 deben corregirse de forma tal que en ellas se establezca claramente los compuestos a los que se hace referencia en cada reivindicación.

Debe tenerse en cuenta que el uso como tal no es patentable en Colombia. Por este motivo, la reivindicación 62 debe modificarse de forma tal que no se reivindique el uso de la composición farmacéutica de la invención, sino la composición como tal.

Al corregir las reivindicaciones, debe anexarse un nuevo capítulo reivindicatorio.

Adjuntar el arte final de la figura característica (fórmula I) en tamaño 6 cm X 6 cm y 12 cm X 12 cm.

Santa Fe de Bogotá D.C., 13 de junio de 2000

Examinador Técnico de Patentes
Q.F. Cód. 202010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

174

2000-07-06

EXPEDIENTE 00-024874

AUTO 0986

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor Emilio Ferrero, como apoderado del solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiendo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE
Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los 04 JUL 2000

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 06 JUL 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI____ NO____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia