



NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61P 31/14 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
C07K 5/08 (2006.01)
C07K 5/10 (2006.01)
C07K 5/12 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.10.06
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.05.21
(86)	Europeisk søknadsnr	12181546.8
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.07.17
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2013.01.02
(30)	Prioritet	2008.07.22, US, 135559 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA RS
(62)	Avdelt fra	EP2310095, med inndato 2009.07.17
(73)	Innehaver	Merck Sharp & Dohme Corp., 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065, USA MSD Italia S.r.l., Via Vitorchiano, 151, 00189 Rome, IT-Italia
(72)	Oppfinner	Harper, Steven, IRBMVia Pontina Km 30.600Pomezia, I-00040 Rome, IT-Italia Summa, Vincenzo, IRBMVia Pontina Km 30.600Pomezia, I-00040 Rome, IT-Italia Liverton, Nigel J., MERCK SHARP & DOHME CORP.126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ New Jersey 07065-0907, US-USA McCauley, John A., MERCK SHARP & DOHME CORP.126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ New Jersey 07065-0907, US-USA
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Kombinasjoner av en makrosyklisk kinoksalinforbindelse som er en HCV-NS3-proteaseinhibitor med andre HCV-midler
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2008/057209

Område for oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelse angår makrosykliske forbindelser som er anvendelige som inhibitorer av hepatitt C-virus(HCV)-NS3-protease, syntetisering av slike forbindelser og anvendelse av slike forbindelser for å behandle HCV-infeksjon og/eller redusere sannsynligheten for eller alvorligheten av HCV-infeksjon.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Infeksjon med hepatitt C-virus (HCV) er et alvorlig helseproblem som leder til kronisk leversykdom, som cirrhose og hepatocellulært karsinom, hos et vesentlig antall av de infiserte individer. Dagens behandlinger av HCV-infeksjon innbefatter immunterapi med rekombinant interferon- α alene eller i kombinasjon med nukleosidanalogen ribavirin.

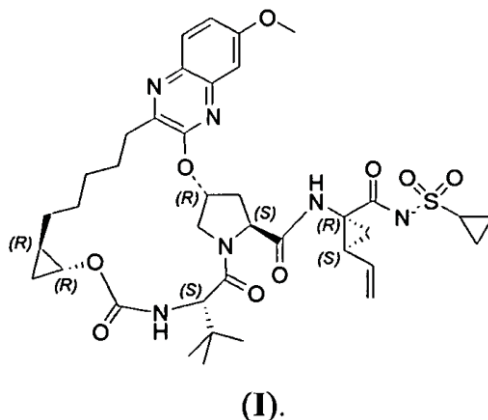
Mange viralt kodede enzymer er formodede mål for terapeutisk intervensjon, innbefattende en metallprotease (NS2-3), en serinprotease (NS3), en helikase (NS3) og en RNA-avhengig RNA-polymerase (NS5B). NS3-proteasen er lokalisert i det N-terminale domenet av NS3-proteinet. NS4A utgjør en kofaktor for NS3-aktivitet.

Potensielle behandlinger av HCV-infeksjon har vært diskutert i forskjellige henvisninger, innbefattende Balsano, Mini Rev. Med. Chem., 8(4):307-318, 2008, Rönn et al., Current Topics in Medicinal Chemistry, 8:533-562, 2008, Sheldon et al., Expert Opin. Investig. Drugs, 16(8):1171-1181, 2007, og De Francesco et al., Antiviral Research, 58:1-16, 2003.

Sammenfatning av oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelse angår en makrosyklisk forbindelse med formel (I) og farmasøytisk akseptable salter derav. Forbindelsen og saltene av denne er HCV-NS3-proteaseinhibitorer. Forbindelsen og saltene av denne har terapeutisk og forskningsmessige anvendelser.

Med et første aspekt av den foreliggende oppfinnelse beskrives således en forbindelse som har formel (I), eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:



Den foreliggende oppfinnelse angår også farmasøytiske preparater som inneholder en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelse, og fremgangsmåter for fremstilling av slike farmasøytiske preparater. Den foreliggende oppfinnelsen beskriver videre fremgangsmåter for å behandle eller redusere sannsynligheten for eller alvorligheten av HCV-infeksjon.

Andre utførelsesformer, aspekter og trekk ved den foreliggende oppfinnelse er enten beskrevet nærmere eller vil bli åpenbare ut fra den følgende beskrivelse, eksempler og vedføyde krav.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelse angår en forbindelse med formel (I) og farmasøytisk akseptable salter derav. Forbindelsen og farmasøytisk akseptable salter derav er anvendelige ved inhibering av HCV-NS3-protease, behandling av HCV-infeksjon og/eller reduisering av sannsynligheten for eller alvorligheten av en HCV-infeksjon. Profylaktiske anvendelser innbefatter f.eks. behandling etter mistenkt tidligere eksponering for HCV ved slike hendelser som blodtransfusjon, bytte av kroppsvæsker, bitt, nålestikk ved uhell eller eksponering for pasientens blod under kirurgi.

Som ingredienser i et farmasøytisk preparat kan forbindelsene og saltene være det primære aktive terapeutiske middel. Når det er hensiktsmessig, kan forbindelsen være kombinert med andre terapeutiske midler, innbefattende, men ikke begrenset til, andre HCV-antivirusmidler, antiinfektive midler, immunmodulatorer, antibiotika eller vaksiner.

NS3-inhibitorer er også anvendelige ved tilretteleggelse og utførelse av kartleggingsanalyser for antivirusforbindelser. For eksempel kan slike forbindelser anvendes til å isolere enzymmutanter, hvilke er utmerkede kartleggingsverktøy for kraftige antivirusforbindelser. Videre kan forbindelsene anvendes til å etablere eller bestemme bindingsstedet for andre antivirusmidler til HCV-protease, f.eks. ved konkurrerende inhibering.

Som beskrevet nærmere i eksempel 2, ble forbindelsen med formel (I) sammenlignet med forbindelsen i eksempler 110 og 118 i WO 2008/057209, og har mange forde-
ler.

Sammensetning og fremgangsmåter

Forskjellige utførelsesformer innbefatter følgende:

(a) Et farmasøytisk preparat som omfatter en effektiv mengde av en forbindelse med formel (I) og en farmasøytisk akseptabel bærer.

(b) Det farmasøytiske preparat ifølge (a), som videre omfatter et andre terapeutisk middel valgt blant HCV-antivirusmidler, immunmodulatorer og antiinfektive midler.

(c) Det farmasøytiske preparat ifølge (b), hvor HCV-antivirusmidlet er et anti-virusmiddel valgt blant HCV-proteaseinhibitorer og HCV-NS5B-polymeraseinhibitorer.

(d) En farmasøytisk kombinasjon som er (i) en forbindelse med formel (I), og (ii) et andre terapeutisk middel valgt fra gruppen bestående av HCV-antivirusmidler, immunmodulatorer og antiinfeksiøse midler; hvor både forbindelsen med formel (I) og det andre terapeutiske midlet benyttes i en mengde som gjør kombinasjonen effektiv for inhibering av HCV-NS3-protease eller for behandling av HCV-infeksjon og/eller reduserer sannsynligheten for eller alvorligheten av HCV-infeksjon.

(e) Kombinasjonen (d) hvor HCV-antivirusmidlet er et antivirusmiddel valgt fra gruppen bestående av HCV-proteaseinhibitorer og HCV-NS5B-polymeraseinhibitorer.

(f) Et farmasøytisk preparat for anvendelse ved en fremgangsmåte for å inhibere HCV-NS3-protease hos en pasient med behov for dette, hvilket omfatter å administrere til pasienten en effektiv mengde av en forbindelse med formel (I).

(g) Et farmasøytisk preparat for anvendelse ved en fremgangsmåte for å behandle HCV-infeksjon og/eller redusere sannsynligheten for eller alvorligheten av HCV-infeksjon hos en pasient med behov for dette, hvilket omfatter å administrere til pasienten en effektiv mengde av en forbindelse med formel (I).

(h) Et farmasøytisk preparat for anvendelse ved fremgangsmåten ifølge (g), hvor forbindelsen med formel (I) administreres i kombinasjon med en effektiv mengde av minst ett annet terapeutisk middel valgt blant HCV-antivirusmidler, immunmodulatorer og antiinfektive midler.

(i) Et farmasøytisk preparat for anvendelse ved fremgangsmåten ifølge (h), hvor HCV-antivirusmidlet er et antivirusmiddel valgt blant HCV-proteaseinhibitorer og HCV-NS5B-polymeraseinhibitorer.

(j) Et farmasøytisk preparat for anvendelse ved en fremgangsmåte for å inhibere HCV-NS3-protease hos en pasient med behov for dette, hvilket omfatter å administrere til pasienten det farmasøytiske preparatet ifølge (a), (b) eller (c), eller kombinasjonen ifølge (d) eller (e).

(k) Et farmasøytisk preparat for anvendelse ved en fremgangsmåte for å behandle HCV-infeksjon og/eller redusere sannsynligheten for eller alvorligheten av HCV-infeksjon hos en pasient med behov for dette, hvilket omfatter å administrere til pasienten det farmasøytiske preparatet ifølge (a), (b) eller (c), eller kombinasjonen ifølge (d) eller (e).

(l) Et farmasøytisk preparat innbefattende en forbindelse med formel (I) for anvendelse i medisin, for anvendelse til forhindring eller behandling av HCV-infeksjon, eller for anvendelse (i) i, (ii) som et medikament for, eller (iii) til tilberedning av et medikament for: (a) inhibere HCV-NS3-protease eller (b) behandle HCV-infeksjon og/eller redusere sannsynligheten for eller alvorligheten av HCV-infeksjon. Ved disse anvendelser kan forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse eventuelt benyttes i kombinasjon med ett eller flere andre terapeutiske midler valgt blant HCV-antivirusmidler, antiinfektive midler og immunmodulatorer.

I alle disse utførelsesformer kan forbindelsen eventuelt anvendes i form av et farmasøytisk akseptabelt salt.

Termen "eller," som anvendt her, angir alternativer som kan, når det er hensiktsmessig, bli kombinert. Således innbefatter termen "eller" hvert opplistet alternativ separat, samt som kombinasjonen av disse, så sant kombinasjonen ikke gjensidig utelukker hverandre.

Henvisning til en forbindelse innbefatter også stabile komplekser av forbindelsen, så som et stabilt hydrat. En "stabil" forbindelse er en forbindelse som kan tilberedes og isoleres, og hvor strukturen og egenskapene forblir eller kan bringes til å forbli hovedsakelig uendret i en tidsperiode som er tilstrekkelig til at forbindelsen kan anvendes for formålene beskrevet her (f.eks. terapeutisk eller profylaktisk administrasjon til en pasient).

II. Administrasjon og preparater

Termen "administrasjon" og varianter derav (f.eks. "administrering" av en forbindelse) betyr å tilføre forbindelsen eller et prolegemiddel av forbindelsen til individet med behov for behandling. Når en forbindelse ifølge oppfinnelsen eller et prolegemiddel derav tilføres i kombinasjon med ett eller flere andre aktive midler (f.eks. antiviralmidler som er anvendelige for behandling av HCV-infeksjon), er både "administrasjon" og varianter av dette underforstått å innbefatte samtidig og sekvensiell tilførsel av forbindelsen eller salt derav og andre midler.

Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan administreres i form av farmasøytisk akseptable salter. Termen "farmasøytisk akseptabelt salt" refererer til et salt av moderforbindelsen som har aktivitet, og som ikke er biologisk eller på annen måte uønsket (f.eks. er verken toksisk eller på annen måte skadelig for resipienten). Egnede salter innbefatter syreaddisjonssalter som f.eks. kan dannes ved å blande en oppløsning av en forbindelse med en oppløsning av en farmasøytisk akseptabel syre, som saltsyre, svovelsyre, eddiksyre, trifluorediksyre eller benzoesyre. Forbindelser som har en sur gruppe, kan blandes med egnede farmasøytisk akseptable salter og gi f.eks. alkalimetallsalter (f.eks. natrium- eller kaliumsalter), jordalkalimetallsalter (f.eks. kalsium- eller magnesiumsalter) og salter dannet med egnede organiske ligander, så som kvaternære ammoniumsalter. Dersom det er til stede en syregruppe (-COOH) eller alkoholgruppe, kan det også benyttes farmasøytisk akseptable estere til å modifisere forbindelsens løselighet eller hydrolysekarakteristikk.

Som anvendt her, er termen "prolegemiddel" ment å omfatte en inaktiv legemiddelform av forbindelsen som blir konvertert til en aktiv legemiddelform eller forbindelse ved innvirkning av enzymer, kjemikalier eller metabolske prosesser i kroppen hos et individ som har fått administrert dette.

Som anvendt her, er termen "preparat" ment å omfatte et produkt som omfatter de spesifiserte ingredienser, samt ethvert produkt som resulterer, direkte eller indirekte, fra å kombinere de spesifiserte ingredienser.

Med "farmasøytisk akseptable" menes at ingrediensene i det farmasøytiske preparatet må være kompatible med hverandre og ikke være skadelige for resipienten.

Termen "subjekt" (alternativt referert til her som "pasient") anvendt her, refererer til et dyr, fortrinnsvis et pattedyr, mest foretrukket et menneske, som er objektet for behandling, observasjon eller forsøk.

Termen "effektiv mengde" angir en tilstrekkelig mengde til å utøve en terapeutisk eller profylaktisk virkning. For en pasient infisert med HCV, er en effektiv mengde tilstrekkelig til å oppnå én eller flere av følgende virkninger: redusere evnen hos HCV til å formere seg, redusere HCV-mengden og øke fjerningen av virus. For en pasient som ikke er infisert med HCV, er en effektiv mengde tilstrekkelig til å oppnå én eller flere av følgende: redusert utsatthet for HCV-infeksjon og redusert evne hos det infiserende viruset til å etablere vedvarende infeksjon for kronisk sykdom.

For målet med å inhibere HCV-NS3-protease og behandle HCV-infeksjon og/eller redusere sannsynligheten for eller alvorligheten av symptomer på HCV-infeksjon, kan forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse, eventuelt i form av et salt, administreres ved tiltak som frembringer kontakt mellom det aktive midlet og virkningsstedet for midlet. Forbindelsene kan administreres ved konvensjonelle tiltak som er tilgjengelige for anvendelse i sammenheng med farmasøytika, enten som individuelle terapeutiske midler eller i kombinasjon med terapeutiske midler. De kan administreres alene, men typisk blir de administrert sammen med en farmasøytisk bærer valgt på basis av den valgte administrasjonsrute og standard farmasøytisk praksis.

Forbindelser kan f.eks. administreres via én eller flere av følgende ruter: oralt, parenteralt (innbefattende subkutane injeksjoner, intravenøse, intramuskulære, intrasternale injeksjons- eller infusjonsteknikker), ved inhalering (som i sprayform), eller rektalt, i form av en enhetsdose av et farmasøytisk preparat som inneholder en effektiv mengde av forbindelsen og konvensjonelle ikke-toksiske, farmasøytisk akseptable bærere, adjuvanter og vehikler. Flytende preparater egnet for oral administrasjon (f.eks. suspensjoner, siruper, eliksirer og lignende) kan tilberedes i henhold til teknikker kjent i faget, og det kan benyttes ethvert av de vanlige media, så som vann, glykoler, oljer, alkoholer og lignende. Faste preparater egnet for oral administrasjon (f.eks. pulvere, piller, kapsler og tabletter), kan tilberedes i henhold til teknikker kjent i faget, og det kan benyttes slike faste eksipienser som stivelser, sukkere, kaolin, smøremidler, bindemidler, desintegrerende midler og lignende. Parenterale preparater kan tilberedes i henhold til teknikker kjent i faget, og det benyttes typisk sterilt vann som bærer og eventuelt andre ingredienser, så som oppløseliggjørende midler. Injiserbare oppløsninger kan tilberedes i henhold til fremgangsmåter kjent i faget, hvor bæreren omfatter en saltvannsløsning, en glukoseløsning

eller en oppløsning som inneholder en blanding av saltvann og glukose. Ytterligere veiledning for fremgangsmåter som er egnet for anvendelse ved fremstilling av farmasøytiske preparater ifølge den foreliggende oppfinnelse, og ingredienser som er egnet for anvendelse i preparatene, er gitt i Remington's Pharmaceutical Sciences, 20. utgave (utgiver A.R. Gennaro, Mack Publishing Co., 2000).

Forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen kan administreres oralt i et doseområde fra 0,001 til 1000 mg/kg av pattedyrets (f.eks. menneskets) kroppsvekt per dag i en enkelt dose eller i oppdelte doser. Ett doseområde er fra 0,01 til 500 mg/kg kroppsvekt per dag oralt i en enkelt dose eller i oppdelte doser. Et annet doseområde er fra 0,1 til 100 mg/kg kroppsvekt per dag oralt i en enkelt dose eller oppdelte doser. For oral administrasjon kan preparatene være i form av tabletter eller kapsler som inneholder 1,0-500 mg av den aktive ingrediens, særlig 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 og 750 mg av den aktive ingrediens for symptomatisk justering av dosen til pasienten som skal behandles. Det spesifikke dosenivået og doseringsfrekvensen for en bestemt pasient kan varieres og vil avhenge av en rekke faktorer, innbefattende aktiviteten av den spesifikke forbindelse som er benyttet, forbindelsens metabolske stabilitet og hvor lenge den virker, alder, kroppsvekt, generell helse, kjønn, diett, tidsmodus for administrasjon, ekskresjonshastighet, legemiddelkombinasjon, hvor alvorlig den bestemte tilstanden er og verten som underkastes terapi.

III. Kombinasjonsbehandling

De makrosykliske kinoksalinforbindelsene beskrevet her, kan anvendes i en kombinasjonsbehandling som involverer ett eller flere ytterligere terapeutiske midler. Ytterligere terapeutiske midler innbefatter dem som er rettet på HCV, som er rettet på et annet sykdomsforårsakende middel eller slike som forbedrer immunsystemet. Midler som forbedrer immunsystemet, innbefatter dem som generelt forbedrer en immunsystemfunksjon og slike som produserer en spesifikk immunrespons mot HCV. Ytterligere terapeutiske midler rettet på HCV innbefatter midler som er rettet på NS3 og midler som er rettet på andre HCV-aktiviteter, så som NS5A og NS5B, og midler som er rettet på vertscelleaktiviteter involvert i HCV-replikasjon.

Forskjellige HCV-inhibitorer er beskrevet i forskjellige publikasjoner. Makrosykliske forbindelser anvendelige som inhibitorer, er HCV-proteaseinhibitorene beskrevet i WO 06/119061, WO 7/015785, WO 7/016441, WO 07/148135, WO 08/051475, WO 08/051477, WO 08/051514, WO 08/057209. Ytterligere HCV-NS3-proteaseinhibitorer er beskrevet i internasjonale patentsøknader, publikasjoner WO 98/22496, WO 98/46630, WO 99/07733, WO 99/07734, WO 99/38888, WO 99/50230, WO 99/64442, WO 00/09543, WO 00/59929, WO 02/48116, WO 02/48172, britisk patentskrift nr. GB 2 337 262 og US patentskrift nr. 6 323 180.

Ytterligere eksempler på terapeutiske midler som kan være til stede i en kombinasjon, innbefatter ribavirin, levovirin, viramidin, thymosin- α -1, interferon- β , interferon- α , pegylert interferon- α (peginterferon-a), en kombinasjon av interferon- α og ribavirin, en kombinasjon av peginterferon- α og ribavirin, en kombinasjon av interferon- α og levovirin, og en kombinasjon av peginterferon- α og levovirin. Interferon- α innbefatter rekombinant interferon- α 2a (som ROFERON-interferon fra Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ), pegylert interferon- α 2a (PEGASYS), interferon- α 2b (som INTRON-A-interferon fra Schering Corp., Kenilworth, NJ), pegylert interferon- α 2b (PEGINTRON), et rekombinant konsensusinterferon (som interferon- α -con-1) og et rensset interferon- α -produkt. Amgens rekombinant konsensusinterferon har varemerket INFERGEN. Levovirin er L-enantiomeren av ribavirin, som har vist immunmodulerende aktivitet tilsvarende som for ribavirin. Viramidin representerer en analog av ribavirin beskrevet i WO 01/60379. De individuelle komponentene i kombinasjonen kan administreres separat på forskjellige tidspunkter i løpet av terapien, eller samtidig i en enkelt eller i oppdelte kombinasjonsformer.

Ribavirin, levovirin og viramidin kan utøve sine anti-HCV-virkninger ved å modulere intracellulære samlinger av guaninnukleotider via inhibering av det intracellulære enzymet inosinmonofosfatdehydrogenase (IMPDH). IMPDH er det hastighetsbegrensende enzymet i biosynteseruten i *de novo* guaninnukleotidbiosyntesen. Ribavirin blir lett fosforylert intracellulært, og monofosfatderivatet er en inhibitor av IMPDH. Inhibering av IMPDH representerer således et annet nyttig mål for å finne frem til inhibitorer av HCV-replikasjon. Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan derfor også administreres i kombinasjon med en inhibitor av IMPDH, så som VX-497, som er beskrevet i internasjonale patentsøknader, publikasjoner WO 97/41211 og WO 01/00622; en annen IMPDH-inhibitor er den beskrevet i WO 00/25780; eller mykofenolatmofetil. Se A.C. Allison og E.M. Eugui, 44 (suppl.) Agents Action, 165 (1993).

For behandling av HCV-infeksjon kan forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse også administreres i kombinasjon med antivirumidlet amantadin (1-amino-adamantan). For en omfattende beskrivelse av dette midlet, se J. Kirschbaum, 12, Anal. Profiles Drug Subs., 1-36 (1983).

For behandling av HCV-infeksjon kan forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse også administreres i kombinasjon med antivirumidlet polymeraseinhibitor R7128 (Roche).

Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan for behandling av HCV-infeksjon også kombineres med de antivirale 2'-C-forgrenede ribonukleosider beskrevet av R.E. Harry-O'Kuru et al., 62, J. Org. Chem., 1754-59 (1997); M.S. Wolfe et al., 36, Tet. Lett., 7611-14 (1995); US patentskrift nr. 3 480 613; og internasjonale patentsøknader, publikasjoner WO 01/90121, WO 01/92282, WO 02/32920, WO 04/002999, WO 04/003000 og WO 04/002422. Slike 2'-C-forgrenede ribonukleosider innbefatter, men er ikke begrenset til, 2'-C-metylcytidin, 2'-C-metyluridin, 2'-C-metyladenoin, 2'-C-

metylguanosen og 9-(2-*C*-metyl- β -D-ribofuranosyl)-2,6-diaminopurin og den korresponderende aminosyreester av ribose-*C*-2'-, *C*-3'- og *C*-5'-hydroksyler og de korresponderende eventuelt substituerte sykliske 1,3-propandiolester av 5'-fosfatderivatene.

Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan også kombineres for
 5 behandling av HCV-infeksjon med andre nukleosider som har anti-HCV-egenskaper, som dem beskrevet i internasjonale patentsøknader, publikasjoner WO 02/51425, WO 01/79246, WO 02/32920, WO 02/48165 og WO2005/003147 (innbefattende R1656, (2'*R*)-2'-deoksy-2'-fluor-2'-*C*-metylcytidin, vist som forbindelser 3-6 på side 77); WO 01/68663; WO 99/43691; WO 02/18404 og WO 2006/021341, og US patentsøknad,
 10 publikasjonsnummer US 2005/0038240, innbefattende 4'-azidonukleosider, så som R1626, 4'-azidocytidin; US patentsøknad, publikasjonsnummer US 2002/0019363, US 2003/0236216, US 2004/0006007 og US 2004/0063658; og internasjonale patentsøknader, publikasjoner WO 02/100415, WO 03/026589, WO 03/026675, WO 03/093290, WO 04/011478, WO 04/013300 og WO 04/028481.

15 For behandling av HCV-infeksjon kan forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse også administreres i kombinasjon med et middel som er en inhibitor av HCV-NS5B-polymerase. Slike HCV-NS5B-polymeraseinhibitorer som kan anvendes som kombinasjonsterapi, innbefatter, men er ikke begrenset til, dem beskrevet i internasjonale patentsøknader, publikasjoner WO 02/057287, WO 02/057425, WO 03/068244,
 20 WO 2004/000858, WO 04/003138 og WO 2004/007512; US patentskrift nr. 6 777 392 og US patentsøknad, publikasjon US 2004/0067901. Andre slike HCV-polymeraseinhibitorer innbefatter, men er ikke begrenset til, valopicitabin (NMR-283; Idenix) og 2'-F-2'-beta-metylcytidin (se også WO 2005/003147).

I én utførelsesform er nukleosid-HCV-NS5B-polymeraseinhibitorer som anvendes i kombinasjon med de foreliggende HCV-NS3-proteaseinhibitorer, valgt blant
 25 følgende forbindelser: 4-amino-7-(2-*C*-metyl- β -D-arabinofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-7-(2-*C*-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-metyl-amino-7-(2-*C*-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-dimetyl-amino-7-(2-*C*-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-syklopropyl-
 30 amino-7-(2-*C*-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-7-(2-*C*-vinyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-7-(2-*C*-hydroksymetyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-7-(2-*C*-fluormetyl-o-D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-5-metyl-7-(2-*C*-metyl-o-D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-7-(2-*C*-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo-
 35 [2,3-*d*]pyrimidin-5-karboksytsyre; 4-amino-5-brom-7-(2-*C*-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-5-klor-7-(2-*C*-metyl-(3-*D*-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-5-fluor-7-(2-*C*-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 2,4-diamino-7-(2-*C*-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 2-amino-7-(2-*C*-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 2-amino-4-syklo-

propylamino-7-(2-C-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 2-amino-7-(2-C-metyl-o-D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on; 4-amino-7-(2-C-etyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-7-(2-C,2-O-dimetyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 7-(2-C-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on; 2-amino-5-metyl-7-(2-C,2-O-dimetyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on; 4-amino-7-(3-deoksy-2-C-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-7-(3-deoksy-2-C-metyl- β -D-arabofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-2-fluor-7-(2-C-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-7-(3-C-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-7-(3-C-metyl-[3-C-xylofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-7-(2,4-di-C-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; 4-amino-7-(3-deoksy-3-fluor-2-C-metyl- β -D-ribofuranosyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin; og de korresponderende 5'-trifosfater; eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan for behandling av HCV-infeksjon også kombineres med ikke-nukleosidinhibitorer av HCV-polymerase, som dem beskrevet i internasjonale patentsøknader, publikasjoner WO 01/77091; WO 01/47883; WO 02/04425; WO 02/06246; WO 02/20497; WO 2005/016927 (særlig JTK003); og HCV-796 (Viropharma Inc.).

I én utførelsesform er ikke-nukleosid-HCV-NS5B-polymeraseinhibitorer som anvendes i kombinasjon med de foreliggende HCV-NS3-proteaseinhibitorer valgt blant følgende forbindelser: 14-sykloheksyl-6-[2-(dimetylamino)etyl]-7-okso-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-6-(2-morfolin-4-yletyl)-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-6-[2-(dimetylamino)etyl]-3-metoksy-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-3-metoksy-6-metyl-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; metyl-({[(14-sykloheksyl-3-metoksy-6-metyl-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-yl)karbonyl]amino} sulfonyl)-acetat; ({[(14-sykloheksyl-3-metoksy-6-metyl-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-yl)karbonyl]amino} sulfonyl)eddiksyre; 14-sykloheksyl-*N*-[(dimetylamino)-sulfonyl]-3-metoksy-6-metyl-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksamid; 3-klor-14-sykloheksyl-6-[2-(dimetylamino)etyl]-7-okso-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; *N'*-(11-karboksy-14-sykloheksyl-7,8-dihydro-6*H*-indol[1,2-*e*][1,5]benzoksazocin-7-yl)-*N,N*-dimetyletan-1,2-diamin-bis(trifluoracetat); 14-sykloheksyl-7,8-dihydro-6*H*-indol[1,2-*e*][1,5]benzoksazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-6-metyl-7-okso-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-3-metoksy-6-metyl-7-okso-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-6-[2-(dimetylamino)etyl]-3-metoksy-7-okso-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-6-[3-(dimetylamino)propyl]-7-okso-5,6,7,8-tetrahydro-

indol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-7-okso-6-(2-piperidin-1-yletyl)-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-6-(2-morfolin-4-yletyl)-7-okso-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-6-[2-(dietylamin)etyl]-7-okso-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-6-(1-metylpiiperidin-4-yl)-7-okso-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-*N*-[(dimetylamin)sulfonyl]-7-okso-6-(2-piperidin-1-yletyl)-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksamid; 14-sykloheksyl-6-[2-(dimetylamin)etyl]-*N*-[(dimetylamin)sulfonyl]-7-okso-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksamid; 14-syklopentyl-6-[2-(dimetylamin)etyl]-7-okso-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 6-allyl-14-sykloheksyl-3-metoksy-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-syklopentyl-6-[2-(dimetylamin)etyl]-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 14-sykloheksyl-6-[2-(dimetylamin)etyl]-5,6,7,8-tetrahydroindol[2,1-*a*][2,5]benzodiazocin-11-karboksylysyre; 13-sykloheksyl-5-metyl-4,5,6,7-tetrahydrofuro[3',2':6,7][1,4]diazocin[1,8-*a*]indol-10-karboksylysyre; 15-sykloheksyl-6-[2-(dimetylamin)etyl]-7-okso-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-indol[2,1-*a*][2,6]benzodiazonin-12-karboksylysyre; 15-sykloheksyl-8-okso-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-indol[2,1-*a*][2,5]benzodiazonin-12-karboksylysyre; 13-sykloheksyl-6-okso-6,7-dihydro-5*H*-indol[1,2-*d*][1,4]benzodiazepin-10-karboksylysyre; og farmasøytisk akseptable salter derav.

IV. Evaluering av forbindelser

Forbindelser beskrevet her, kan evalueres med hensyn til forskjellige aktiviteter, så som evnen til å inhibere HCV-NS3-aktivitet, HCV-repliconaktivitet og HCV-replikasjonsaktivitet ved å anvende teknikker vel kjent i faget (se f.eks. Carroll et al., J. Biol. Chem., 278:11979-11984, 2003).

En slik analyse er tidsresorberende fluorescens(TRF)- analyse av HCV-NS3-protease, som beskrevet nedenfor og av Mao et al., Anal. Biochem., 373:1-8, 2008, og i internasjonal patentsøknad, publikasjon WO 2006/102087. En NS3-proteaseanalyse kan utføres f.eks. med et sluttvolum på 100 µl analysebuffer som inneholder 50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 15 % glyserol, 0,15 % TRITON X-100, 10 mM DTT og 0,1 % PEG 8000. NS3- og NS4A-protease er preinkubert med forskjellige konsentrasjoner av inhibitorer i DMSO i 30 minutter. Reaksjonen startes ved å tilsette TRF-peptidsubstratet (sluttkonsentrasjon 100 nM). NS3-formidlet hydrolyse av substratet stoppes etter 1 time ved romtemperatur med 100 µl av 500 mM MES, pH 5,5. Produktfluorescens detekteres ved å anvende enten et VICTOR V2- eller FUSION-fluorofotometer (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences) med eksitering ved 340 nm og emisjon ved 615 nm med en 400 µs forsinkelse. Det velges testing av konsentrasjoner av forskjellige enzymformer,

slik at det resulterer i et forhold mellom signal og bakgrunn (S/B) på 10-30. IC₅₀-verdier utledes ved å anvende en standard fireparameters tilpasning til dataene. K_i-verdier utledes fra IC₅₀-verdier ved å benytte følgende formel:

$$IC_{50} = K_i (1 + [S]/K_M) \quad \text{Lign. (1)}$$

hvor [S] er konsentrasjonen av substratpeptidet i reaksjonsblandingen, og K_M er Michaelis konstant. Se P. Gallinari et al., 38, BIOCHEM., 5620-32 (1999); P. Gallinari et al., 72, J. VIROL., 6758-69 (1998); M. Taliani et al., 240, ANAL. BIOCHEM., 60-67 (1996); Mao et al., Analytical Biochemistry, 373:1-8, 2008.

V. Generell fremgangsmåte for fremstilling av forbindelse

Den foreliggende oppfinnelse angår også prosesser for fremstilling av forbindelser med formel (I). Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan lett fremstilles i henhold til følgende reaksjonsskjemaer og eksempler, eller modifikasjoner derav, ved å anvende lett tilgjengelige startmaterialer, reagenser og konvensjonelle synteseprosedyrer. Ved disse reaksjonene er det også mulig å gjøre bruk av varianter som i seg selv er kjent av fagmannen. Andre fremgangsmåter for fremstilling av forbindelser ifølge oppfinnelsen vil lett være åpenbare for fagmannen i lys av følgende reaksjonsskjemaer og eksempler. Så sant annet ikke er angitt, er alle variabler som definert ovenfor. De følgende reaksjonsskjemaer og eksempler tjener kun til å illustrere oppfinnelsen og praktiseringen av denne.

Olefinmetatesekatalysatorer innbefatter følgende rutheniumbaserte typer: F. Miller et al., 118, J. Am. Chem. Soc., 9606 (1996); G. Kingsbury et al., 121, J. Am. Chem. Soc., 791 (1999); H. Scholl et al., 1, ORG. LETT., 953 (1999); US patentsøknad, publikasjon US 2002/0107138; K. Furstner et al., 64, J. Org. Chem., 8275 (1999). Anvendelsen av disse katalysatorene ved ringlukkende metatase er vel kjent i litteraturen (f.eks. Trnka og Grubbs, 34, ACC. CHEM. RES., 18 (2001).

Følgende eksempler tjener kun til å illustrere oppfinnelsen og praktiseringen av denne. Eksemplene skal ikke anses som begrensninger av oppfinnelsens omfang.

Liste over forkortelser

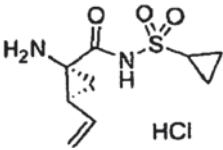
DCM / CH ₂ Cl ₂	diklormetan
DCE	1,2-dikloreten
DIEA	diisopropyletylamin
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoksid
Dppf	difenylfosfinferrocen
Et ₂ O	dietyleter

	EtOAc	etylacetat
	HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametyluronium-heksafluorofosfat
	HCl	saltsyre
5	TMSCl	klortrimetylsilan
	TBAF	tetrabutylammoniumfluorid
	DMAP	dimetylamino-pyridin
	MeCN	acetonitril
	MeOH	metanol
10	Pd/C	palladium på karbon
	TBTU	O-benzotriazol-1-yl- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametyluroniumtetrafluorborat
	TFA	trifluoreddiksyre
	THF	tetrahydrofuran
	Flashkromatografi	rensing ved å anvende Biotage Horizon silikagelpatron og spesifisert gradient av mobil fase
15	HPLC	Automatisert masse- eller UV-trigget, høyoppløselig væskeskromatografi ved å anvende surgjort MeCN- og H ₂ O-gradienter som mobil fase
	MHz	megahertz

20

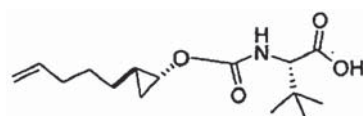
Syntetisering av mellomprodukter

Mellomprodukter A

Mellomprodukt nr.	Struktur	Navn	Litt.henv.
A1		(1R,2S)-1-amino- <i>N</i> -(syklopropylsulfonyl)-2-vinylsyklopropan-karboksamidhydrogenklorid	Wang et al., US 6 995 174

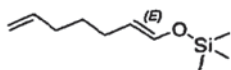
25

Mellomprodukt B1: 3-metyl-*N*-({[(1R,2R)-2-pent-4-en-1-yl-syklopropyl]oksy} karbonyl)-L-valin



30

Trinn 1: [(1E)-hepta-1,6-dien-1-yloksy](trimetyl)silan



En oppløsning (0,5 M) av butenylmagnesiumbromid i THF (1,4 ekv.) ble behand-
 let ved -78 °C med Cu(I)Br.SMe₂ (0,05 ekv.) og HMPA (2,4 ekv.). Blandingen ble omrørt
 5 i 10 minutter, deretter ble en oppløsning (1 M) av akrolein (1 ekv.) og TMSCl (2 ekv.) i
 THF tilsatt i løpet av 2 timer, slik at temperaturen i oppløsningen holdt seg under -68 °C.
 Den resulterende blanding ble omrørt ved -78 °C i 2 timer, deretter behandlet med over-
 skudd av Et₃N og fortynnet med heksan. Etter å ha nådd romtemperatur, ble blandingen
 behandlet med en liten porsjon H₂O og filtrert gjennom CELITE. Filtratet ble vasket ti
 10 ganger med H₂O og deretter med saltlake. Det organiske laget ble tørket, og flyktige
 stoffer ble fjernet, hvilket ga et residu som ble destillert under redusert trykk (20 mbar).
 Fraksjonen samlet opp ved 80-86 °C inneholdt tittelforbindelsen (58 %) som en fargeløs
 væske. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,19 (d, J = 11,6 Hz, 1 H), 5,85-5,75 (m, 1 H),
 5,02-4,92 (m, 3 H), 2,08-2,02 (m, 2 H), 1,94-1,88 (m, 2 H), 1,46-1,38 (m, 2 H), 0,18 (s,
 15 9 H).

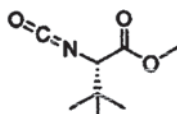
Trinn 2: Trans-2-pent-4-en-1-ylsyklopropanol



20

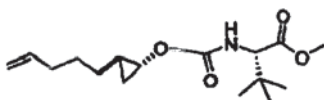
En oppløsning (0,45 M) av den foregående forbindelse i heksan ble behandlet
 med en oppløsning (15 %) av Et₂Zn (1,2 ekv.) i toluen, og den resulterende oppløsning
 ble avkjølt i et isbad. Dijodmetan (1,2 ekv.) ble tilsatt dråpevis, deretter ble oppløsningen
 omrørt i 1 time før den ble varmet til 20 °C. Pyridin (6 ekv.) ble tilsatt, og oppslemmingen
 25 ble omrørt i 15 minutter, deretter helt på petroleumseter. Blandingen ble filtrert gjentatte
 ganger gjennom CELITE inntil det var oppnådd en transparent oppløsning. Denne
 blandingen ble konsentrert ved 100 mbar, og oppløsningen som var tilbake (som inne-
 holdt trimetyl [(trans)-2-pent-4-en-1-ylsyklopropyl]oksy} silan, toluen og pyridin), ble
 fortynnet ytterligere med THF. Blandingen ble avkjølt til 0 °C, deretter behandlet dråpe-
 30 vis med en oppløsning (1 M) av TBAF (1,2 ekv.) i THF. Etter 10 minutter fikk
 blandingen oppvarmes til 20 °C, og etter ytterligere 1 time ble den helt i H₂O. Vannfasen
 ble ekstrahert med EtOAc, og de kombinerte organiske ekstrakter ble vasket med saltlake
 og deretter tørket. Fjerning av flyktige stoffer ga et residu som ble rensset med flash-
 kromatografi (eluent 0-66 % Et₂O/petroleumseter), hvilket ga tittelforbindelsen (71 %)
 35 som en fargeløs væske. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5,85-5,75 (m, 1 H), 5,00 (dd, J =
 17,1, 1,6 Hz, 1 H), 4,94 (br d, J = 10,4 Hz, 1 H), 3,20 (åpenbart dt, J = 6,4, 2,5 Hz, 1 H),
 2,10-2,04 (m, 2 H), 1,52-1,44 (m, 2 H), 1,29-1,19 (m, 1 H), 1,15-1,07 (m, 1 H), 0,95-0,87
 (m, 1 H), 0,71-0,66 (m, 1 H), 0,31 (åpenbart q, J = 6,0 Hz, 1 H).

Trinn 3: Metyl-3-metyl-*N*-(oksometylen)-L-valinat



En oppløsning (0,39 M) av metyl-3-metyl-L-valinat i en 2:1-blanding av mettet vannløsning av NaHCO₃ og CH₂Cl₂ ble avkjølt i et isbad og hurtig omrørt. Blandingen ble behandlet med trifosgen (0,45 ekv.) i én porsjon, og den resulterende blanding ble omrørt i 0,5 time. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med CH₂Cl₂, og lagene ble separert. Vannfasen ble ekstrahert med CH₂Cl₂, og deretter ble de kombinerte organiske lag vasket med saltlake og tørket. Fjerning av løsningsmidlet ga tittelforbindelsen som en klar olje som ble holdt i 12 timer under vakuum (0,1 mbar), deretter anvendt direkte i det etterfølgende trinnet. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,79 (s, 3 H), 3,75 (s, 1 H), 1,00 (s, 9 H).

Trinn 4: Metyl-3-metyl-*N*-({[(1R,2R)-2-pent-4-en-1-ylsyklopropyl]oksy} karbonyl)-L-valinat og metyl-3-metyl-*N*-({[(1S,2S)-2-pent-4-en-1-ylsyklopropyl]oksy} karbonyl)-L-valinat



En oppløsning (0,45 M) av trans-2-pent-4-en-1-ylsyklopropanol i toluen ble behandlet med metyl-3-metyl-*N*-(oksometylen)-L-valinat (1,1 ekv.) og deretter DMAP (1 ekv.). Den resulterende blanding ble varmet under reflux i 12 timer, deretter avkjølt til 20 °C. H₂O og EtOAc ble tilsatt, og det organiske laget ble skilt fra og vasket med 1 N HCl, saltlake, og tørket. Fjerning av flyktige stoffer ga et residu som ble renset to ganger med flashkromatografi (eluent 0-30 % Et₂O/petroleumseter). De første fraksjoner inneholdt metyl-3-metyl-*N*-({[(1R,2R)-2-pent-4-en-1-ylsyklopropyl]oksy} karbonyl)-L-valinat (38 %) som en olje. MS (ES⁺) m/z 298 (M + H)⁺.

De senere fraksjoner inneholdt metyl-3-metyl-*N*-({[(1S,2S)-2-pent-4-en-1-ylsyklopropyl]oksy} karbonyl)-L-valinat (28 %) som en olje. MS (ES⁺) m/z 298 (M + H)⁺.

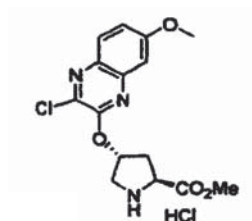
Trinn 5: 3-metyl-*N*-({[(1R,2R)-2-pent-4-en-1-ylsyklopropyl]oksy} karbonyl)-L-valin



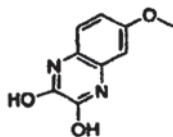
En oppløsning (0,1 M) av metyl-3-metyl-*N*-({[(1*R*,2*R*)-2-pent-4-en-1-ylsyklopropyl]oksy} karbonyl)-*L*-valinat i en 2:1-blanding av MeOH/H₂O ble behandlet med LiOH.H₂O (4 ekv.) og deretter varmet ved 60 °C i 4 timer. Blandingen ble avkjølt og konsentrert til halve volumet, deretter fortynnet med EtOAc og surgjort med vandig HCl (1 N). Det organiske laget ble skilt fra og vasket med saltlake, deretter tørket. Fjerning av flyktige stoffer ga tittelforbindelsen (98 %) som en olje. MS (ES⁺) *m/z* 284 (M + H)⁺.

Mellomprodukter C

Mellomprodukt C1: Metyl-(4*R*)-4-[(3-klor-7-metoksykinoksalin-2-yl)oksy]-*L*-prolinat-hydrogenklorid



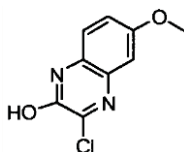
Trinn 1: 6-metoksykinoksalin-2,3-diol



En suspensjon av 4-metoksybenzen-1,2-diamindihydrogenklorid i dietyloksalat (8 ekv.) ble behandlet med Et₃N (2 ekv.) og deretter varmet ved 150 °C i 2 timer.

Blandingen ble avkjølt og filtrert, og deretter ble det oppsamlede faste stoff vasket med H₂O og EtOH. Residuet ble tørket, hvilket ga tittelforbindelsen (69 %). MS (ES⁺) *m/z* 193 (M + H)⁺.

Trinn 2: 3-klor-6-metoksykinoksalin-2-ol

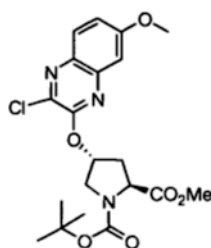


En oppløsning (1,53 M) av 6-metoksykinoksalin-2,3-diol i DMF ble behandlet med SOCl₂ (1 ekv.) og varmet ved 110 °C. Etter 1,5 timer ble reaksjonsblandingen avkjølt og helt i vandig HCl (1 N). Det resulterende presipitatet ble filtrert og vasket med H₂O og

Et₂O. Det tørkede faste stoffet inneholdt overveiende tittelforbindelsen som en blanding av 6-metoksykinoksalin-2,3-diol og 2,3-diklor-6-metoksykinoksalin. Dette materialet ble anvendt direkte i det etterfølgende trinnet. MS (ES⁺) m/z 211 (M + H)⁺.

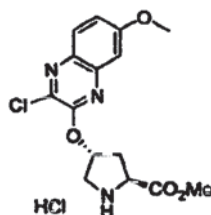
Trinn 3

- 5 1-tert.-butyl-2-metyl-(2S,4R)-4-[(3-klor-7-metoksykinoksalin-2-yl)oksy]pyrrolidin-1,2-dikarboksylat



- En oppløsning (0,35 M) av 3-klor-6-metoksykinoksalin-2-ol i NMP ble behandlet med Cs₂CO₃ (1,5 ekv.) og 1-tert.-butyl-2-metyl-(2S,4S)-4-
 10 oksy}pyrrolidin-1,2-dikarboksylat (1,1 ekv.). Den resulterende blanding ble omrørt ved 50 °C i 18 timer, deretter ble en ytterligere porsjon (0,1 ekv.) av 1-tert.-butyl-2-metyl-(2S,4S)-4-
 15 oksy}pyrrolidin-1,2-dikarboksylat tilsatt. Etter omrøring i 2 timer ble blandingen avkjølt og fortynnet med H₂O og EtOAc. De organiske faser ble vasket med vandig HCl (1 N), mettet vannløsning av NaHCO₃ og saltlake. Den tørkede organiske fase ble konsentrert til et residu som ble rensert med flashkromatografi (0-60 % EtOAc/petroleumseter), hvilket ga tittelforbindelsen (35 % fra to trinn) som et fast stoff. MS (ES⁺) m/z 438 (M + H)⁺.

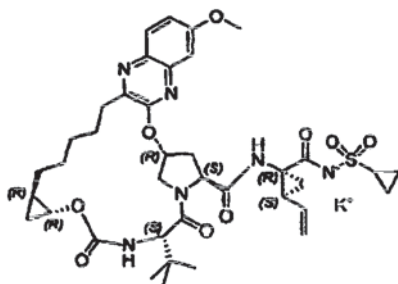
Trinn 4: Mety (4R)-4-[(3-klor-7-metoksykinoksalin-2-yl)oksy]-L-prolinat-hydrogenklorid



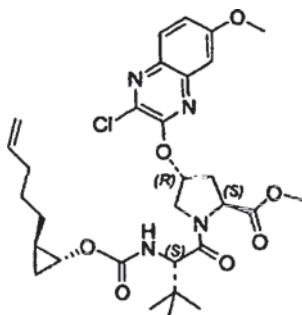
- En oppløsning (0,62 M) av 1-tert.-butyl-2-metyl-(2S,4R)-4-[(3-klor-7-metoksy-
 25 kinoksalin-2-yl)oksy]pyrrolidin-1,2- dikarboksylat i CH₂Cl₂ ble behandlet med en oppløsning (4 M) av HCl i dioksan (5 ekv.). Blandingen ble omrørt ved 20 °C i 2 timer, deretter behandlet med en oppløsning (4 M) av HCl i dioksan (2 ekv.). Etter 5 timer ble reaksjonen bedømt å være fullstendig, og blandingen ble konsentrert under redusert trykk. Residuet ble trituret med Et₂O, hvilket ga tittelforbindelsen (95 %) som et fast stoff. MS (ES⁺) m/z 338 (M + H)⁺.

Eksempel 1

Kalium- {[(1R,2S)-1- ({[(1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-tert.-butyl-14-metoksy-3,6-diokso-1,1a,3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradekahydro-8H-7,10-metansykloprona[18,19]-[1,10,3,6]dioksadiazasyklononadecin[11,12-b]ginoksalin-8-yl]karbonyl} amino)-2-vinylsyklopropyl]karbonyl} (syklouropylsulfonyl)azanid

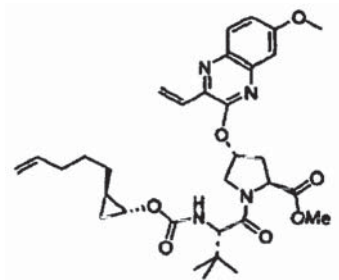


Trinn 1: Metyl-3-metyl-N- ({[(1R,2R)-2-pent-4-en-1-ylsyklopropyl]oksy} karbonyl)-L-valyl-(4R)-4-[(3-klor-7-metoksykinoksalin-2-yl)oksy]-L-prolinat



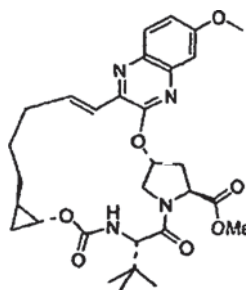
En oppløsning (0,2 M) av metyl-(4R)-4-[(3-klor-7-metoksykinoksalin-2-yl)oksy]-L-prolinat-hydrogenklorid i DMF ble behandlet med 3-metyl-N- ({[(1R,2R)-2-pent-4-en-1-ylsyklopropyl]oksy} karbonyl)-L-valin (1,1 ekv.), DIEA (5 ekv.) og HATU (1,2 ekv.). Den resulterende blanding ble omrørt ved 20 °C i 5 timer, deretter fortynnet med EtOAc. Det organiske laget ble skilt fra og vasket med vandig HCl (1 N), mettet vannløsning av NaHCO₃ og saltlake. Den tørkede organiske fase ble konsentrert under redusert trykk, hvilket ga et residu som ble rensed med flashkromatografi (eluent 10-30 % EtOAc/petroleumseter), hvilket ga tittelforbindelsen (96 %) som en olje. MS (ES⁺) m/z 604 (M + H)⁺.

Trinn 2: Metyl-3-metyl-N-({[(1R,2R)-2-pent-4-en-1-ylsyklopropyl]oksy}karbonyl)-L-valyl-(4R)-4-[(7-metoksy-3-vinylkinoksalin-2-yl)oksy]-L-prolinat



En oppløsning (0,1 M) av metyl-3-metyl-N-({[(1R,2R)-2-pent-4-en-1-ylsyklopropyl]oksy}karbonyl)-L-valyl-(4R)-4-[(3-klor-7-metoksykinoksalin-2-yl)oksy]-L-prolinat i EtOH ble behandlet med kaliumtrifluor(vinyl)borat (1,5 ekv.) og trietylamin (1,5 ekv.). Den resulterende blanding ble avgasset, deretter ble PdCl₂(dppf)-CH₂Cl₂-adduktet (0,1 ekv.) tilsatt. Blandingen ble varmet under reflux i 1 time, deretter avkjølt til romtemperatur og fortynnet med H₂O og EtOAc. Den organiske fase ble skilt fra, vasket med H₂O og saltlake, og deretter tørket. Fjerning av flyktige stoffer ga et residu som ble rensset med flashkromatografi (20-30 % EtOAc/petroleumseter), hvilket ga tittelforbindelsen som et gult skum som ble anvendt direkte i det etterfølgende trinnet. MS (ES⁺) m/z 595 (M + H)⁺.

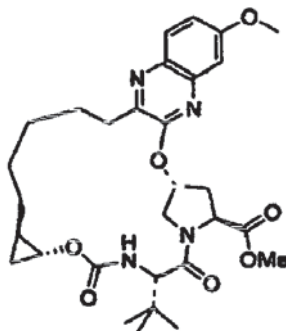
Trinn 3: Metyl-(1aR,5S,8S,10R,18E,22aR)-5-tert.-butyl-14-metoksy-3,6-diokso-1,1a,3,4,5,6,9,10,20,21,22,22a-dodekahydro-8H-7,10-metansyklopropa[18,19]-[1,10,3,6]dioksadiazasyklononadecin[11,12-b]kinoksalin-8-karboksylat



En oppløsning (0,02 M) av metyl-3-metyl-N-({[(1R,2R)-2-pent-4-en-1-ylsyklopropyl]oksy}karbonyl)-L-valyl-(4R)-4-[(7-metoksy-3-vinylkinoksalin-2-yl)oksy]-L-prolinat i DCE ble varmet til 80 °C og deretter behandlet med Zhan 1-katalysator (0,15 ekv.). Den resulterende blanding ble omrørt ved 80 °C i 1 time, deretter avkjølt til romtemperatur og konsentrert under redusert trykk. Residuet ble rensset med flashkromatografi (20-50 % EtOAc/petroleumseter), hvilket ga tittelforbindelsen (25 % fra to trinn) som et skum. MS (ES⁺) m/z 567 (M + H)⁺.

Trinn 4: Metyl-(1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-tert.-butyl-14-metoksy-3,6-diokso-
1,1a,3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradekahydro-8H-7,10-metansyklopropa[18,19]-
[1,10,3,6]dioksadiazasyklononadecin[11,12-b]kinoksalin-8-karboksylat

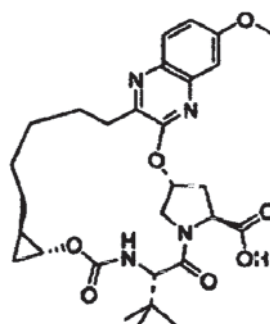
5



En oppløsning (0,05 M) av metyl-(1aR,5S,8S,10R,18E,22aR)-5-tert.-butyl-14-
 metoksy-3,6-diokso-1,1a,3,4,5,6,9,10,20,21,22,22a-dodekahydro-8H-7,10-metansyklo-
 propa[18,19][1,10,3,6]dioksadiazasyklononadecin[11,12-b]kinoksalin-8-karboksylat i
 10 MeOH/dioksan (forhold 1:1) ble behandlet med Pd/C (8 vekt%). Den resulterende
 blanding ble omrørt under hydrogenatmosfære i 4 timer. Katalysatoren ble filtrert fra, og
 filtratet ble konsentrert under redusert trykk, hvilket ga tittelforbindelsen (98 %) som et
 fast stoff. MS (ES^+) m/z 569 ($M + H$)⁺.

15

Trinn 5: (1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-tert.-butyl-14-metoksy-3,6-diokso-1,1a,3,4,5,6,9,10,-
18,19,20,21,22,22a-tetradekahydro-8H-7,10-metansyklopropa[18,19]-
[1,10,3,6]dioksadiazasyklononadecin[11,12-b]kinoksalin-8-karboksylsyre

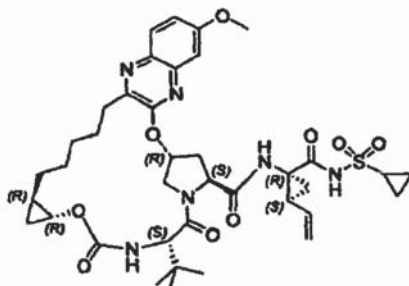


20

En oppløsning (0,1 M) av metyl-(1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-tert.- butyl-14-
 metoksy-3,6-diokso-1,1a,3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradekahydro-8H-7,10-metan-
 syklopropa[18,19][1,10,3,6]dioksadiazasyklononadecin[11,12-b]kinoksalin-8-karboksylat
 25 i en 1:1-blanding av H₂O/THF ble behandlet med LiOH.H₂O (3 ekv.). Den resulterende
 blanding ble omrørt ved 20 °C i 18 timer, surgjort med vandig HCl (0,2 M) og fortynnet
 med EtOAc. Den organiske fase ble skilt fra, vasket med vandig HCl (0,2 M) og saltlake,

og deretter tørket. Fjerning av flyktige stoffer ga tittelforbindelsen (98 %) som et fast stoff. MS (ES^+) m/z 555 ($\text{M} + \text{H}$)⁺.

Trinn 6: (1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-tert.-butyl-*N*-((1R,2S)-1-{[(syklopropylsulfonyl)-amino]karbonyl}-2-vinylsyklopropyl)-14-metoksy-3,6-diokso-1,1a,3,4,5,6,9,10,18,-19,20,21,22,22a-tetradekahydro-8H-7,10-metansyklopropana[18,19][1,10,3,6]-dioksadiazasyklononadecin[11,12-b]kinoksalin-8-karboksamid



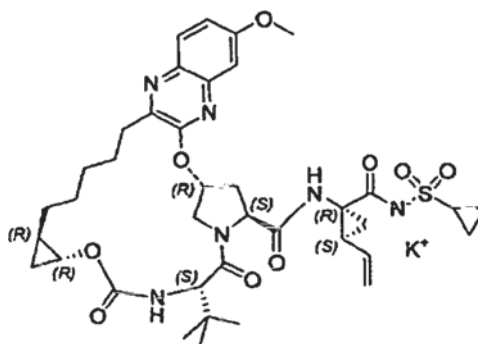
10

En oppløsning (0,1 M) av (1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-tert.-butyl-14-metoksy-3,6-diokso-1,1a,3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradekahydro-8H-7,10-metansyklopropana[18,19][1,10,3,6]dioksadiazasyklononadecin[11,12-b]kinoksalin-8-karboksylsyre i CH_2Cl_2 ble behandlet med (1R,2S)-1-{[(syklopropylsulfonyl)amino]karbonyl}-2-vinylsyklopropanaminiumklorid (1,3 ekv.), DIEA (3 ekv.), DMAP (1,5 ekv.) og TBTU (1,45 ekv.). Den resulterende blanding ble omrørt ved 20 °C i 18 timer og deretter fortynnet med EtOAc. Oppløsningen ble vasket med vandig HCl (0,2 M), mettet vannløsning av NaHCO_3 og saltlake. De organiske fasene ble tørket og konsentrert, hvilket ga et residu som ble rensed med flashkromatografi (eluent 2,5 % MeOH/ CH_2Cl_2), hvilket ga tittelforbindelsen (89 %) som et fast stoff. ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 172,32, 170,63, 169,04, 159,86, 156,95, 154,74, 148,10, 140,41, 133,55 (2 signaler), 128,94, 118,21, 117,58, 105,89, 74,88, 59,75, 58,71, 55,68, 54,13, 54,01, 40,13, 34,49, 34,04, 33,76, 32,68, 30,71, 30,43, 28,55, 27,69, 27,28, 26,38, 21,98, 18,49, 10,67, 5,69, 5,46; MS (ES^+) m/z 767 ($\text{M} + \text{H}$)⁺.

25

Trinn 7: Kalium- {[(1R,2S)-1-({ [(1aR,5S,8S,10R,22aR)-5-tert.-butyl-14-metoksy-3,6-diokso-1,1a,3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-tetradekahydro-8H-7,10-metansyklopropa-[18,19][1,10,3,6]dioksadiazasyklononadecin[11,12-b]kinoksalin-8-yl]karbonyl}amino)-2-vinylsyklopropyl]karbonyl} (syklooropylsulfonyl)azanid

5

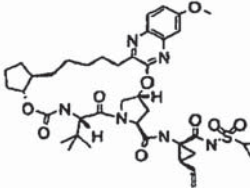
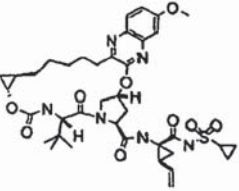
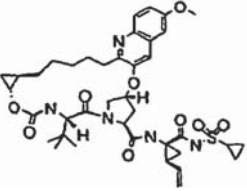


Det foregående materialet ble tatt opp i EtOH, og den resulterende oppløsning (0,025 M) ble avkjølt til 0 °C. En oppløsning (0,02 M) av tert.-BuOK (1,5 ekv.) i EtOH ble tilsatt, hvilket ledet til dannelse av et presipitat. Blandingen ble omrørt ved 20 °C i 18 timer, deretter ble det faste stoffet samlet opp ved filtrering. Dette materialet ble vasket med EtOH og tørket, hvilket ga tittelforbindelsen (93 %) som et hvitt, krystallinsk, fast stoff. MS (ES⁺) m/z 767 (M + H)⁺.

Eksempel 2: Sammenligning av forskjellige forbindelser

Forbindelsen fra eksempel 1 ble sammenlignet med forbindelsen fra eksempler 110 og 118 i WO 2008/057209. Resultatene er vist i tabeller 1 og 2 nedenfor. Som illustrert i tabellene og diskusjonen av resultatene, viste forbindelsen med formel (I) seg å ha flere fordelaktige egenskaper sammenlignet både med forbindelsen fra WO 2008/057209, eksempel 118, og forbindelsen fra WO 2008/057209, eksempel 110.

Tabell 1

	WO 2008/057209 Eksempel 118	Eksempel 1	WO 2008/057209 Eksempel 110
Struktur			
NS 3/4A Inhiberende aktivitet' (Ki) 1b	< 0,016 nM	< 0,016 nM	< 0,016 nM
Replicon- aktivitet ² EC ₅₀ gt1b	3 nM	2 nM	5 nM
Rotteplasma AUC @ 25mpk per os ³	38,5 μM.h	20,6 μM.h	5,8 μM.h
Rottelever- konsentrasjon @ 24h (25 mpk per os) ³	18,4 μM	27,9 μM	8,5 μM
Hundeplasma AUC @ 5mpk per os ³	10,9 μM.h	48,6 μM.h	1,0 μM.h
Hundelever- konsentrasjon @ 24h (5mpk per os) ³	Ikke tilgjengelig	120 μM	3,3 μM
Kovalent proteinbinding in vivo ⁴	Rotte @ 6h plasma = BLQ , lever = 30 ± 3pmol/mg protein	Rotte @ 6h plasma = LOQ , lever = LOQ	Rotte @ 6h plasma = BLQ, lever = BLQ
Fysikalske egenskaper ⁵	Kaliumsaltet dis- proporsjonerte ikke i oppløsning.	Kaliumsaltet dis- proporsjonerte ikke i oppløsning.	Kaliumsaltet dispropor- sjonerte til krystallinsk nøytral form i oppløsning
Ki: Inhiberingskonstant, angivelse < 0,016 nM viser at observert aktivitet er mindre enn 0,016 nM, den nøyaktige mengde under 0,016 nM ble ikke bestemt ved analysen; EC50: effektiv konsentrasjon som ga mindre enn 50 % virusreplikasjon; gt: genotype; AUC: areal under kurven for plasmakonsentrasjon/tid; LOQ: kvantifiseringsgrense (3 pmol/mg); BLQ: under kvantifiseringsgrense			

Forbindelse med formel (I) sammenlignet med WO 2008/057209, eksempel 110

Fordelaktige egenskaper hos forbindelsen med formel (I) versus forbindelsen fra WO 2008/057209, eksempel 110, er følgende:

- 1) fysikalske egenskaper (ingen saltdisproporsjonering for forbindelsen med formel (I));
- 2) farmakokinetisk profil hos rotter etter administrasjon av kaliumsaltet; og
- 3) levereksponering (målorgan).

Forskjellene i egenskaper er særlig fordelaktige for formuleringen og administrasjonen av forbindelsen som har formel (I) sammenlignet med forbindelsen fra WO 2008/057209, eksempel 110. Mangelen på saltdisproporsjonering for forbindelsen som har formel (I), gjør det mulig å oppløse 1,8 mg/ml av K^+ -saltformen av forbindelsen ifølge eksempel 1 i vann. Selv om K^+ -saltformen av forbindelsen fra WO 2008/057209, eksempel 110, har forbedret løselighet i vann (9,7 mg/ml), vil den således oppløste forbindelse disproporsjonere og gi en krystallinsk, zwitterionisk form som har lav løselighet i vann ($< 0,009$ mg/ml). Denne manglende oppførsel hos forbindelsen ifølge eksempel 1 gir en uventet fordel ved formuleringen av den for farmasøytisk administrasjon og resulterer i forbedrede farmakokinetiske egenskaper, som rapportert i tabell 1 (plasma-AUC og levereksponering hos rotte og hund). Høy plasma- og levereksponering i prekliniske arter er fordelaktig for valget av sikre og effektive doser for anvendelse ved behandling av pasienter.

Forbindelse med formel (I) sammenlignet med WO 2008/057209, eksempel 118

En observert fordel med forbindelsen som har formel (I) sammenlignet med WO 2008/057209, eksempel 118, er resistensprofilen mot forskjellige mutantzymer. I tråd med data fra kliniske studier med antivirusedmidler fra beslektede klasser (f.eks. HIV-proteaseinhibitorer), og også fra studier med HCV-NS3-proteaseinhibitorer (f.eks. VX-950, telaprevir), er det forventet at virusresistens kan utvikles som respons på behandling med dagens forbindelser. Forbindelsen ifølge eksempel 1 viser forbedret enzymaffinitet (K_i) mot forskjellige mutantzymer som er kjent å gi resistens mot HCV-NS3-proteaseinhibitorer. I tabell 2 oppsummeres aktivitet mot forskjellige mutantzymer. En fordel med forbindelse 1 kan således være en økt barriere mot utvikling av resistente virus når den administreres til pasienter. Den gir også den mulige fordel å behandle pasienter som ikke har respondert på andre terapier på grunn av utvikling av resistens, siden forbindelse 1 kan inhibere det resistente viruset.

Tabell 2
Ki-verdier¹ vs. 1b mutantenzym (nM)

1b SKIFT	D168T	D168A	D168E	D168G	D168V	D168Y	D168Q
Eksempel 1	0,18	0,43	0,04	0,08	0,14	0,22	0,12
cmp 118	0,78	0,86	0,12	0,45	0,65	1,5	0,42
1b SKIFT	A156S	A156T	A156V	R155K	R155Q	R155G	R155N
Eksempel 1	0,05	5,2	11	0,07	0,43	0,63	0,13
cmp 118	0,10	3,4	15	0,08	1,9	2,3	0,56
¹ Sammenligningsdata samlet i samme kjøring ved enzymanalyser							

5 Ytterligere forventede fordelaktige egenskaper hos forbindelsen med formel (I) versus forbindelsen i WO 2008/057209, eksempel 110, innbefatter følgende:

- 1) lav kovalent binding *in vivo*; og
- 2) høy plasma- og levereksponering.

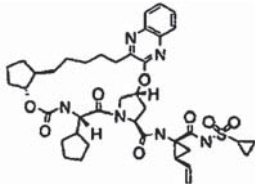
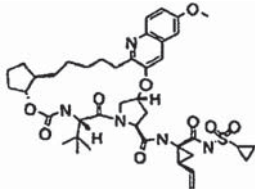
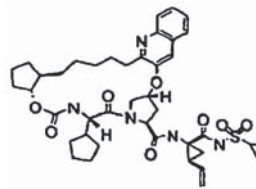
10 Forbindelsen med formel (I) ble funnet å ha svært gode kovalente bindingskarakteristika *in vivo* og farmakokinetiske egenskaper. Basert på observert kovalent binding *in vivo* og farmakokinetiske egenskaper hos forbindelsen i eksempel 1 og forbindelsen i WO 2008/057209, eksempel 118, har forbindelsen med formel (I) signifikant bedre kovalente bindingskarakteristika *in vivo* og farmakokinetiske egenskaper.

15 Forbindelser som bindes kovalent til proteiner, eller som danner metabolitter som deretter blir kovalent bundet til proteiner, gir mulig opphav til bivirkninger hos pasienter, så som immunologiske toksisiteter forårsaket av antistoffresponser på legemiddel-protein-konjugatet, og andre idiosynkratiske toksisiteter (se Chem. Res. Toxicol., 2004, 17, 3-16).

20 Forbindelsen i eksempel 1 viste udetekterbar binding til plasmaproteiner etter oral administrasjon av en enkeltdose på 20 mg/kg til rotter (se tabell 1). Under analoge betingelser viste forbindelsen i WO 2008/057209, eksempel 118, detekterbar binding til rotteleverproteiner (se tabell 1) og kan derfor anses å være en mindre fordelaktig forbindelse for administrasjon til humane subjekter enn forbindelsen med formel (I).

25 I tabell 3 gis noen ytterligere data for kovalent binding *in vivo* observert for beslektede forbindelser fra WO 2008/057209 som inneholder (R,R)-trans-2-alkylsyklopentanolgruppen inkorporert i eksempel 118.

Tabell 3

	WO 2008/057209 Eksempel 108	WO 2008/057209 Eksempel 103	WO 2008/057209 Eksempel 96
Struktur			
Kovalent protein- binding in vivo ⁴	Rotte @ 6h plasma = 15 pmol ekv./mg lever = 38 pmol ekv./mg	Rotte @ 6h plasma = 6 pmol ekv./mg lever = 24 pmol ekv./mg	Rotte @ 6h plasma = 6 pmol ekv./mg lever = 63 pmol ekv./mg

Det er fordelaktig å ha høy plasma- og levereksponering ved prekliniske tester for effektivt å demonstrere at den potensielle legemiddelkandidaten ikke medfører uønskede toksisiteter. Det er også mer sannsynlig at en forbindelse som har høy lever- og plasmaeksponering hos dyr, viser den samme oppførsel hos mennesker enn at den ikke gjør det. Med en slik forbindelse kan den påkrevde effektive eksponering hos mennesker nås med en lavere dose, som er fordelaktig både med hensyn til kostnad og enkel fremstilling av legemidlet, men som potensielt også reduserer sannsynligheten for bivirkninger. Målorganeksponering ved multiple prekliniske tester gir et rasjonale at høy målorganeksponering er oppnåelig med forbindelsen hos pasienter, og høy levereksponering hos både rotte og hund gir en pålitelig evaluering av preklinisk toksisitet. Høy levereksponering er særlig fordelaktig for HCV, siden dette er målorganet for legemidlet.

Forbindelsen i eksempel 1 har en svært god plasma- og levereksponering hos rotte. Den observerte rottelevereksponering var på et høyere nivå enn for forbindelse 118 og forbindelse 110 i WO 2008/057209 (se tabell 1). Basert på disse resultater og på testing av mange forskjellige forbindelser fra WO 2008/057209 ved oral administrasjon til både rotte (25 mpk) og hund (5 mpk), er forbindelsen med formel (I) forventet å ha levereksponering hos hund som er større enn forbindelse 118 og forbindelse 110 i WO 2008/057209.

Metoder

NS-3/4A-inhiberende aktivitet' (K_i): NS-3/4A-inhiberende aktivitet ble bestemt som beskrevet i kapittel IV: Evaluering av forbindelser, *supra*, og av Mao et al., Anal. Biochem., 373:1-8, 2008.

Repliconaktivitet² EC₅₀: Repliconaktivitet ble bestemt ved å benytte prosedyrene beskrevet av Carroll et al., J. Biol. Chem., 278:11979-11984, 2003, og Olsen et al., Anti Microb. Agents, 48:3944-3953, 2004.

Rotteplasma AUC ved 25 mpk per OS³: Testforbindelser ble oppløst i et egnet doseringsvehikkel for i.v. administrasjon (f.eks. 20 %:60 %:20 % av DMSO:PEG-400:vann) eller administrasjon per os (f.eks. 10 % Polysorbat 80:90 % vann, eller 100 % PEG400). Administrasjon til dyr (n = 3) ble foretatt med en overkryssingsstudie utformet for ikke-gnagere. Plasmaprøver ble samlet opp på tidspunkter mellom 2 minutter og 24 timer, og nivået av forbindelse ble bestemt med RP-HPLC. Leverprøver ble samlet inn post mortem fra rotter og etter bedøvelse (0,5 time før biopsi) hos hund. Leverprøver ble
10 veid, homogenisert og fortynnet ved å anvende teknikker som er kjent av fagmannen, og nivåene av forbindelser ble bestemt med RP-HPLC.

Farmakokinetiske parametere ble beregnet basert på ikke-kompartimentanalyse (f.eks. ved å anvende WATSON®, WINNOLIN®). Predosekonsentrasjoner som var
15 under kvantifiseringsgrensen (BLQ), ble gitt verdi 0. For estimering av oral AUC ble den første BLQ-verdien i terminalfase gitt en verdi lik 1/2 laveste kvantifiseringsgrense, mens påfølgende verdier i terminalfasen ble gitt verdi 0. Standard farmakokinetiske parametere CL_p, V_{dss}, halveringstid (bare for IV), % F, C_{maks}, T_{maks}, AUC_{0-sist}, AUC_{0-infinitet} ble beregnet. AUC-verdier ble beregnet ved å anvende lineær trapezoidmetode for stigende
20 konsentrasjoner og log-trapezoidmetoden for fallende konsentrasjoner.

Kovalent binding *in vivo*⁴: Testforbindelser ble hensiktsmessig radiomerket (3H), og en 20 mg/kg dose som inneholdt 25-75 mCi/rotte (renhet > 98,5 %) radioaktivitet ble tilberedt ved kombinasjon av den kalde forbindelsen og fordampet forrådsløsning med radiosporstoff. Denne blandingen ble oppløst i et doseringsvehikkel som var egnet for
25 administrasjon per os (se ovenfor), deretter administrert oralt til rotte (n = 3 per tidspunkt, 2 timer, 6 timer, 24 timer). Plasma og lever ble samlet opp og hurtigfrost/lagret ved -80 °C før analyse.

Telling av plasmaprøvene: Anbring en 200 µl alikvot i et 20 ml scintillasjons-glass. Tilsett 500 µl SOLVABLE™ og inkuber i 1 time under risting ved 55 °C. Fjern, la
30 avkjøle før tilsetning av 15 ml scintillasjonscocktail, og tell. Plasmaprøver (200 µl alikvot) ble deretter prosessert som beskrevet nedenfor for leverproteiner.

Homogenisering av vev: Veide leverprøver ble fortynnet med 2 volumdeler 100 mM fosfatbuffer (pH 7,4) og homogenisert på is.

Telling av leverhomogenat: Alikvoter ble anbrakt i et 20 ml scintillasjonsglass, fortynnet med 1 ml SOLVABLE™ og inkubert i 1 time under risting ved 55 °C. Etter
35 fjerning fra inkubatoren og avkjøling ble det tilsatt 15 ml scintillasjonscocktail og 30 % H₂O₂, og radioaktiviteten ble telt.

Presipitering av protein: Ta 500 µl alikvot, tilsett 1:8 av homogenat:acetonitril (dersom det mistenkes at forbindelsen har lav løselighet i acetonitril, kan det velges et annet løsningsmiddel), rist og sentrifuger (3500 rcf i 20 min). Kast overliggende væske.

Resuspensjon av proteinpresipitat: Foreta ultralydbehandling (minste intensitet, < 5 s) og foreta risting i 80 % MeOH:20 % vann inntil pelleten smuldrer.

Vask av proteinpellet: 2-5 ml 80:20 MeOH:vann. Om nødvendig, fjern 1,0 ml av overliggende væske, tilsett 15 ml scintillasjonscocktail og tell. Fortsett å vaske proteinpelleten inntil radioaktiviteten i overliggende væske er < 200 DPM, eller DPM slutter å avta med mer enn 200 i påfølgende vaskinger.

Oppløsning av sluttpellet: 1 ml av 1 N NaOH eller SOLVABLE™, inkubert ved 50 °C over natten eller inntil fullstendig oppløst.

Telling av sluttpellet: 1 ml av oppløst pellet, 15 ml scintillasjonscocktail (dersom det anvendes en annen scintillasjonscocktail enn ULTIMA GOLD™, kan pelleten kreve nøytralisering med 1 N HCl), og tell.

Proteinkonsentrasjon i sluttpellet: BCA- eller BIO-RAD-sett ved å anvende BSA som standard.

Telling av blindprøver: 15 ml scintillasjonscocktail i duplikat.

Telling av doseløsning: Tell et kjent volum av doseløsningen i triplikat.

Dataanalyse: Ta middelverdien av tellingene av radioaktivitet (DPM) av doseløsningen og beregn doseløsningens spesifikke aktivitet i µCi/mol. Ta middelverdien av tellingene av radioaktivitet i blindprøvene. Subtraher middelverdien av tellingene i blindprøven fra foretatte tellinger i hver lever- og plasmapellet. Beregn mengden radioaktivitet (µCi) per volumenhet (l) for hver lever- og plasmapellet. Beregn konsentrasjonen av radioaktivitet i hver plasma- og leverpellet ved å dividere verdien oppnådd ovenfor (µCi/l) med den spesifikke aktiviteten (µCi/mol). Beregn mengden kovalent bundet radioaktivitet til protein i pmol/mg protein.

Telling av blindprøver: 15 ml scintillasjonscocktail i duplikat.

Telling av doseløsningen: Tell et kjent volum av doseløsningen i triplikat.

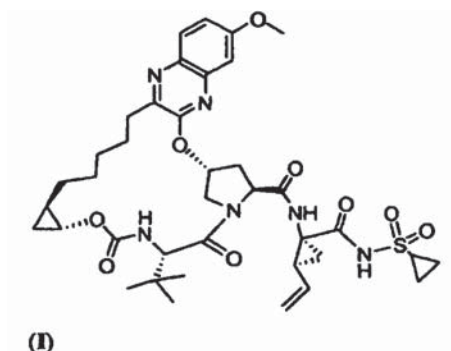
Fysikalske egenskaper⁵: De krystallinske testforbindelsene (kaliumsalt, ca. 5 mg) ble veid ut i et glasskar, og vann eller vandig buffer ble tilsatt (100 µl). Den oppnådde slurryen ble omrørt i 24 timer ved romtemperatur. Etter sentrifugering ble overliggende væske analysert ved reversfase-HPLC og løseligheten ved likevekt ble bestemt ved å sammenligne med en kalibreringskurve. En del av det faste materialet ble overført på en XRPD-plate, tørket og deretter analysert med røntgenpulverdiffraksjon [XRPD]. XRPD-mønsteret ble sammenlignet med positive kontrollprøver for krystallinsk K⁺-salt, krystallinske, zwitterioniske (eller sure) og amorfe former av testforbindelsen. En ytterligere bestemmelse av saltformen ble oppnådd med en andre porsjon av det faste materialet som ble analysert ved 400 MHz, NMR (Bruker), etter oppløsning i DMSO-d₆. ¹H-NMR-spektra ble sammenlignet med de positive kontrollprøvene beskrevet ovenfor.

Andre utførelsesformer ligger innenfor de følgende krav. Selv om mange utførelsesformer har blitt vist og beskrevet, kan ulike modifikasjoner utføres uten å avvike fra rammen av den foreliggende oppfinnelse definert ved kravene.

P a t e n t k r a v

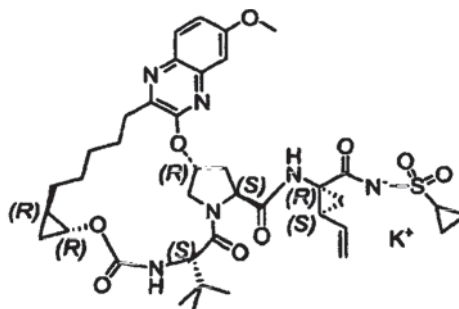
1. Kombinasjon av en forbindelse som har formel (I), eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

5



og én eller flere ytterligere terapeutiske midler.

10 2. Kombinasjon ifølge krav 1, hvor forbindelsen med formel (I) har strukturen:



15 3. Kombinasjon ifølge krav 1, hvor det ytterligere terapeutiske middelet er rettet mot HCV eller forsterker immunsystemet.

4. Kombinasjon ifølge krav 1, hvor det terapeutiske middelet som er rettet mot HCV rettes mot NS3, NS5A, NS5B eller vertscelleaktiviteter involvert i HCV-replikasjon.

20 5. Kombinasjon ifølge krav 1, 3, 3 eller 4, hvor det ytterligere terapeutiske middelet er ribavirin, levovirin, viramidin, thymosin alpha-1, interferon-β, interferon-α eller peginterferon-α.

25 6. Kombinasjon ifølge krav 5, hvor det ytterligere terapeutiske middelet er en kombinasjon av interferon-α og ribavirin eller en kombinasjon av peginterferon-α og ribavirin.

7. Kombinasjon ifølge krav 1, 2 eller 3, hvor det ytterligere terapeutiske middelet er det antivirale middelet polymeraseinhibitor R7128.