(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 435 799**

(51) Int. CI.:

A01N 41/06 (2006.01)
A61K 31/18 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2009 E 09819961 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2346329**

(54) Título: **Un método de inhibición del virus de la hepatitis C mediante combinación de una 5,6-dihidro-1H-piridin-2-ona y de uno o más compuestos antivirales adicionales**

(30) Prioridad:

09.10.2008 US 104152 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2013

(73) Titular/es:

ANADYS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
5871 Oberlin Drive Suite 200
San Diego, California 92121, US

(72) Inventor/es:

DRAGOVICH, PETER, S.;
THOMPSON, PEGGY, A. y
RUEBSAM, FRANK

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

DESCRIPCIÓN

Un método de inhibición del virus de la hepatitis C mediante combinación de una 5,6-dihidro-1H-piridin-2-ona y de uno o más compuestos antivirales adicionales

Campo de la invención

La invención se dirige a un método de tratar infecciones por el virus de la hepatitis C administrando N-{3-[1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida y uno o más compuestos antivirales adicionales o composiciones farmacéuticas que contienen tales compuestos.

Antecedentes de la invención

La hepatitis es un problema de salud principal en el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que 170 millones de personas son portadores crónicos del virus de la hepatitis C (VHC), con 4 millones de portadores en los Estados Unidos solo. En los Estados Unidos, la infección por VHC representa el 40% de la enfermedad hepática crónica y la enfermedad de VHC es la causa más común para el trasplante de hígado. La infección por VHC produce una infección crónica y aproximadamente el 70% de las personas infectadas desarrollarán cambios histológicos crónicos en el hígado (hepatitis crónica) con un riesgo del 10-40% de cirrosis y un riesgo en vida estimado del 4% de carcinoma hepatocelular. El CDC estima que cada año en los Estados Unidos hay 35.000 nuevos casos de infección por VHC y aproximadamente diez mil muertes atribuidas a enfermedad por VHC.

El estándar de cuidado actual es una combinación de interferón pegilado/ribavirina a un coste de aproximadamente 30.000$/año. Estos fármacos tienen problemas de dosificación difíciles y efectos secundarios y no alcanzan una respuesta virológica sostenida en un número significativo de pacientes diagnosticados. El tratamiento con interferón pegilado se asocia con síntomas amenazantes similares a la gripe, irritabilidad, incapacidad de concentrarse, ideas suicidas, y leucocitopenia. La ribavirina se asocia con anemia hemolítica y defectos de nacimiento.

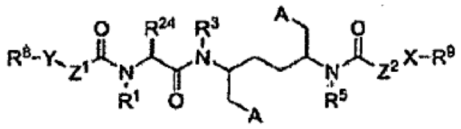
La respuesta global a esta terapia estándar es baja; ya que aproximadamente un tercio de los pacientes no responde. De los que responden, algunos recaen a los seis meses de completar 6-12 meses de terapia. Como consecuencia, la tasa de respuesta a largo plazo para todos los pacientes que inician el tratamiento es solo aproximadamente el 50%. La tasa de respuesta relativamente baja y los efectos secundarios significativos de la terapia actual de tratamientos de fármacos anti-VHC, unido a los efectos negativos a largo plazo de la infección crónica por VHC, producen una continua necesidad médica para terapia mejorada. Los fármacos antivirales para tratar enfermedades de virus de ARN como el VHC son poco, y como se ha descrito anteriormente con frecuencia se asocian con múltiples efectos adversos.

Un número de publicaciones han descrito inhibidores de NS5B útiles en el tratamiento de la infección de hepatitis C. Véase, por ejemplo, la publicación internacional No. WO 2008/124450 (que divulga ciertos compuestos 5,6-dihidro-1H-piridin-2-ona); la publicación de solicitud de patente en EE UU No. US 2008/0031852 (que describe compuestos [1,2-b]piridazinona; la publicación de solicitud de patente en EE UU No. US 2006/0189602 (que divulga ciertas piridazinonas); la publicación de solicitud de patente en EE UU No. US 2006/0252785 (que divulga heterocíclicos seleccionados); y las publicaciones internacionales No. WO 03/059356, WO 2002/098424 y WO 01/85172 (que describe cada uno una clase particular de tiadiazinas sustituidas).

Mientras que hay, en algunos casos, medicamentos disponibles para reducir los síntomas de la enfermedad, hay pocos fármacos para inhibir eficazmente la replicación del virus subyacente. La significancia y prevalencia de las enfermedades por virus de ARN, incluyendo pero no limitadas a infección crónica por el virus de la hepatitis C, y unido con la disponibilidad y eficacia limitadas de los fármacos antivirales actuales, han creado una necesidad apremiante y continua para nuevos fármacos para tratar estas enfermedades.

La heterogeneidad genética o naturaleza de cuasiespecie del VHC tiene implicaciones importantes para la terapia. Esta profunda mutabilidad genética puede permitir al virus escapar de la presión antivírica ejercida por el tratamiento con un único agente antiviral directo. En efecto, la selección de mutaciones que confieren resistencia bien a los inhibidores de la serina proteasa NS3 o a los inhibidores de la polimerasa dependiente de ARN NS5B tanto *in vivo* como *in vitro* se han descrito en la bibliografía. La resistencia a fármacos se puede minimizar mediante el uso apropiado de combinaciones de agentes que tienen una baja probabilidad de resistencia cruzada. Los ejemplos incluyen la combinación de inhibidores no nucleosídicos de la polimerasa vírica con inhibidores de la serina proteasa NS3 y/o inhibidores nucleosídicos de la polimerasa vírica. Además, las mutaciones en el virus que confieren resistencia a agentes antivirales directos no parecen afectar la sensibilidad a interferón. Por tanto, se anticipa que en futuro cercano, el tratamiento de VHC, especialmente el genotipo I, consistirá en un curso extendido de administración de combinaciones de agentes apropiadamente seleccionadas.

La solicitud de patente internacional WO 2009/008989 A1 divulga un compuesto de fórmula



o una sal, solvato y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, composiciones que contienen tales compuestos, así como métodos terapéuticos que incluyen la administración de tales compuestos. En esta fórmula Z^1 y Z^2 son cada uno independientemente -O- o -N(R^7)-; X e Y son cada uno independientemente arilo, arilalquilo, heterociclilo o heterociclilalquilo; R^1, R^3 y R^5 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, arilalquilo, y arilalquilo sustituido; cada R^7 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, carbociclilo, carbociclilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido; R^8 y R^9 cada uno son uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en H, alquilo, halógeno, arilo, heterociclilo y CN; y R^{24} se selecciona del grupo que consiste en -alquileno-NR^5-C(O)-R^{25}, -alquileno-C(O)-NR^5-R^{26}, -alquileno-N(R^{27})$_2$, -CH_2-heterociclilo y -CH_2-heterociclilo sustituido; R^{25} es alquilo, heterociclilalquilo, o heterociclilalquilo sustituido; R^{26} es un heterociclilo sustituido o sin sustituir; o R^{25} y R^{26} junto con el átomos de nitrógeno al que ambos se muestran unidos, forman un heterociclilo bicíclico sustituido o sin sustituir; cada R^{27} es independientemente un alquilo sustituido que puede ser igual o diferente; o cada R^{27}, junto con el átomo de nitrógeno al que ambos se muestran unidos, forma un heterociclilo bicíclico sustituido o sin sustituir.

Compendio de la invención

La presente invención describe un método *in vitro* de inhibición de la replicación del virus de la hepatitis C que comprende exponer el virus de la hepatitis C a una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende N-{3-[1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, o una sal o hidrato de la misma, y una composición que comprende uno o más compuestos antivirales adicionales seleccionados del grupo que consiste en: VBY-376, BMS-650032, MK-7009, TMC-435350, BI-201335, GS-9190, MK-3281, VCH-759 (VX-759), VCH-916, ABT-333, BMS-791325, PF-00868554 (filibuvir), IDX-184, RG7128, PSI-6130, BMS-790052, y ANA773.

En una forma de realización, el método comprende exponer el virus a las composiciones por separado o juntas, o a las composiciones combinadas.

En una forma de realización, el virus de la hepatitis C está en una célula hepática humana.

En otro aspecto, se divulga una combinación para su uso en el tratamiento o prevención de infección por el virus de la hepatitis C. La combinación para su uso comprende una composición que comprende N-{3-[1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, o una sal o hidrato de la misma, y una composición que comprende uno o más compuestos antivirales adicionales seleccionados del grupo que consiste en: VBY-376, BMS-650032, MK-7009, TMC-435350, BI-201335, GS-9190, MK-3281, VCH-759 (VX-759), VCH-916, ABT-333, BMS-791325, PF-00868554 (filibuvir), IDX-184, RG7128, PSI-6130, BMS-790052, ANA773, SCH900518 (narlaprevir), VX-813, VX-985, PHX1766, ABT-450, ACH-1625, ACH-1095, IDX136, IDX316, ITMN-5489, PSI-7851, VCH-222 (VX-222), ABT-072, BI207127, Debio-025, NIM-811, SCY-635, AZD2836, BMS-824393, PF-04878691, Locteron, interferón omega, PEG-Interferón lambda, GI-5005, taribavirina, VX-950 (telapravir), SCH-503034 (boceprevir), Interferón α-2a, e IMO-2125.

Las composiciones de la combinación para uso se pueden administrar por separado (por ejemplo, temporal o espacialmente) o juntas, o a las composiciones combinadas.

La combinación puede ser para su uso en un mamífero tal como un ser humano.

En aún otro aspecto, se divulga una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende N-{3-[1R,2S,7S,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, o una sal o hidrato de la misma, y uno o más compuestos antivirales adicionales seleccionados del grupo que consiste en: VBY-376, BMS-650032, MK-7009, TMC-435350, BI-201335, GS-9190, MK-3281, VCH-759 (VX-759), VCH-916, ABT-333, BMS-791325, PF-00868554 (filibuvir), IDX-184, RG7128, PSI-6130, BMS-790052, ANA773, SCH900518 (narlaprevir), VX-813, VX-985, PHX1766, ABT-450, ACH-1625, ACH-1095, IDX136, IDX316, ITMN-5489, PSI-7851, VCH-222 (VX-222), ABT-072, BI207127, Debio-025, NIM-811, SCY-635, AZD2836, BMS-824393, PF-04878691, BLX-833 (Locteron), interferón omega, PEG-Interferón lambda, taribavirina, e IMO-2125, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

En otra forma de realización, el uno o más compuestos antivirales se seleccionan de MK-7009, TMC-435350, BI-201335, PF-00868554 (filibuvir), IDX-184, RG7128, PSI-6130, BMS-790052, y ANA773.

También se divulgan composiciones que comprenden al menos dos agentes antivirales, uno de los cuales se selecciona del grupo que consiste en:

N-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-Fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida,
N-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-Fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de L-arginina,
N-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-Fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de L-lisina,
N-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-Fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de hemimagnesio,
N-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-Fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de sodio, y
N-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-Fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de potasio.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la CE_{50} de *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida (compuesto **2**) e interferón α-2a (IFN) probados solos o en combinación.

Las figuras 2a y 2b muestran la respuesta a dosis del agente antiviral PSI-6130 evaluado en presencia de concentraciones fijas de *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida (compuesto **2**).

Las figuras 3a y 3b muestran la respuesta a dosis del agente antiviral Telapravir evaluado en presencia de concentraciones fijas de *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida (compuesto **2**).

Descripción detallada de la invención

Donde se usan los siguientes términos en esta especificación, se usan como se definen a continuación:

Los términos “comprender”, “tener” e “incluir” se usan en el presente documento en un sentido amplio, no limitante.

El término “inmunomodulador” se refiere a productos naturales o sintéticos capaces de modificar el sistema inmunitario normal o anómalo mediante estimulación o supresión.

El término “prevenir” se refiere a la capacidad de un compuesto o composición de la invención para prevenir una enfermedad identificada en el presente documento en pacientes diagnosticados como que tienen la enfermedad o que están en riesgo de desarrollar tal enfermedad. El término también abarca prevenir la progresión adicional de la enfermedad en pacientes que ya padecen o tienen síntomas de tal enfermedad.

El término “paciente” o “sujeto” significa un animal (por ejemplo, vaca, caballo, oveja, cerdo, pollo, pavo, codorniz, gato, perro, ratón, rata, conejo, cobaya, etc.) o un mamífero, incluyendo animales quiméricos o transgénicos y mamíferos. En el tratamiento o prevención de infección por el VHC, el término “paciente” o “sujeto” preferiblemente significa un mono o un ser humano, lo más preferiblemente un ser humano. En una forma de realización específica el paciente o sujeto está infectado por o expuesto al virus de la hepatitis C. En ciertas formas de realización, el paciente es un lactante humano (edad 0-2), niño (edad 2-17), adolescente (edad 12-17), adulto (edad 18 y más) o paciente geriátrico (edad 70 y más). Además, el paciente incluye pacientes inmunocomprometidos tal como pacientes positivos para VIH, pacientes de cáncer, pacientes que se someten a inmunoterapia o quimioterapia. En una forma de realización particular, el paciente es un individuo sano, es decir, no muestra síntomas de otras infecciones víricas.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad del compuesto de la invención suficiente para proporcionar un beneficio en el tratamiento o la prevención de una enfermedad vírica, para retrasar o minimizar los síntomas asociados con la infección vírica o enfermedad vírica, o para curar o mejorar la enfermedad o infección o causa de la misma. En particular, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico *in vivo*. Usada en relación con una cantidad de un compuesto de la invención, el término preferiblemente abarca una cantidad no tóxica que mejora la terapia global, reduce o evita síntomas o causas de enfermedad, o aumenta la eficacia terapéutica de o sinergiza con otro agente terapéutico.

El término “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto de la invención u otro principio activo suficiente para producir la prevención de la infección, recaída, o propagación de la infección vírica. Una cantidad profilácticamente eficaz se puede referir a una cantidad suficiente para prevenir la infección inicial o la

recaída o propagación de la infección o una enfermedad asociada con la infección. Usada en relación con una cantidad de un compuesto de la invención, el término preferiblemente abarca una cantidad no tóxica que mejora la profilaxis global o aumenta la eficacia profiláctica de o sinergiza con otro agente profiláctico o terapéutico.

El término “en combinación” se refiere al uso de más un agente profiláctico y/o terapéutico simultánea o secuencialmente y de una manera que sus respectivos efectos son aditivos o sinérgicos.

El término “tratar” se refiere a:

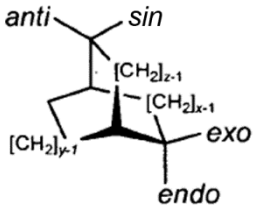
(i) prevenir que se produzca una enfermedad, trastorno o afección en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o afección, pero que aún no ha sido diagnosticado como que la tiene;
(ii) inhibir la enfermedad, trastorno o afección, es decir, parar su desarrollo; y
(iii) aliviar la enfermedad, trastorno o afección, es decir, producir regresión de la enfermedad, trastorno y/o afección.

Los términos “R” y “S” indican la configuración estereoquímica específica de un sustituyente en un átomo de carbono asimétrico en una estructura química como se dibuja.

El término “rac” indica que un compuesto es un racemato, que se define como una mezcla equimolar de un par de enantiómeros. Un compuesto “rac” no muestra actividad óptica. El nombre o fórmula químicos de un racemato se distingue de los de los enantiómeros mediante el prefijo (±)- o rac- (o racem-) o mediante los símbolos RS y SR.

Los términos “endo” y “exo” son descriptores de la orientación relativa de sustituyentes unidos a átomos no cabeza de puente en un biciclo[*x.y.z*]alcano (x≥y>z>0).

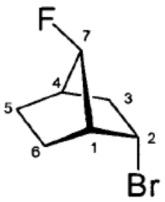
Los términos “sin” y “anti” son descriptores de la orientación relativa de sustituyentes unidos a átomos cabeza de puente en un biciclo[*x.y.z*]alcano (x≥y>z>0).



El término “exo” se da a un sustituyente (por ejemplo, Br unido a C-2 en el ejemplo posterior) que se oriente hacia el puente con numeración mayor (puente *z*, por ejemplo, C-7 en el ejemplo posterior); si el sustituyente está orientado lejos del puente con numeración mayor se le da la descripción “endo”.

El término “sin” se da a un sustituyente unido al puente con numeración mayor (puente z, por ejemplo, F unido a C-7 en el ejemplo posterior) y se orienta hacia el puente con numeración menor (puente x, por ejemplo C-2 y C-3 en el ejemplo posterior); si el sustituyente se orienta lejos del puente con menor numeración se le da la descripción “anti”.

2-exo-bromo-7-sin-fluoro-biciclo[2.2.1]heptano



2-endo-bromo-7-anti-fluoro-biciclo[2.2.1]heptano

Los términos “cis” y “trans” son descriptores que muestran la relación entre dos ligandos unidos a átomos separados que están unidos por un doble enlace o están contenidos en un anillo. Se dice que los dos ligandos están situados *cis* uno respecto al otro si están en el mismo lado del plano. Si están en lugares opuestos, su posición relativa se

describe como *trans*. El plano de referencia apropiado de un doble enlace es perpendicular al de los enlaces σ relevantes y pasa a través del doble enlace. Para un anillo es el plano medio del/de los anillo(s).

Como generalmente entienden los expertos en la materia, un compuesto ópticamente puro que tiene un centro quiral (es decir, un átomo de carbono asimétrico) es uno que consiste esencialmente en uno de los dos posibles enantiómeros (es decir, es enantioméricamente puro), y un compuesto ópticamente puro que tiene más de un centro quiral es uno que es tanto diastereoméricamente puro como enantioméricamente puro. Preferiblemente, los compuestos de la presente invención se usan en una forma que está al menos el 90% libre de otros enantiómeros o diastereómeros de los compuestos, es decir, una forma que contiene al menos el 90% de un único isómero (80% de exceso enantiomérico ("e.e.") o exceso diastereomérico ("e.d.")), más preferiblemente al menos el 95% (90% de e.e. o e.d.), incluso más preferiblemente al menos el 97,5% (95% e.e. o e.d.), y lo más preferiblemente al menos el 99% (98% de e.e. o e.d.).

Además, se pretende que la invención cubra formas solvatadas así como sin solvatar de los compuestos identificados, y puede incluir tanto formas hidratadas como no hidratadas. Otros ejemplos de solvatos incluyen los compuestos en combinación con isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, acetato de pentilo, ácido acético o etanolamina.

La invención también pretende cubrir formas deuteradas de *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Además de los compuestos de la invención, la invención incluye profármacos farmacéuticamente aceptables, metabolitos farmacéuticamente activos, y sales farmacéuticamente aceptables de tales compuestos y metabolitos.

"Un profármaco farmacéuticamente aceptable" es un compuesto que se puede convertir en condiciones fisiológicas o mediante solvólisis en el compuesto especificado o en una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto antes de mostrar su(s) efecto(s) farmacológico(s). Típicamente, el profármaco se formula con el/los objetivo(s) de estabilidad química mejorada, aceptación y cumplimiento por el paciente mejoradas, biodisponibilidad mejorada, duración de acción prolongada, selectividad de órgano mejorada, formulación mejorada (por ejemplo, hidrosolubilidad aumentada), y/o efectos secundarios disminuidos (por ejemplo, toxicidad). El profármaco se puede preparar fácilmente a partir de los compuestos de fórmula I usando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos por *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Chemistry,* 1, 172-178, 949-982 (1995). Véase también Bertolini et al., *J. Med. Chem.,* 40, 2011-2016 (1997); Shan, et al., *J. Pharm. Sci.,* 86 (7), 765-767; Bagshawe, *Drug Dev. Res.,* 34, 220-230 (1995); Bodor, *Advances in Drug Res.,* 13, 224-331 (1984); Bundgaard, *Design of Prodrugs* (Elsevier Press 1985); Larsen, *Design and Application of Prodrugs,* Drug Design and Development (Krogsgaard-Larsen et al., eds., Harwood Academic Publishers, 1991); Dear et al., *J. Chromatogr. B,* 748, 281-293 (2000); Spraul et al., *J. Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 10,* 601-605 (1992); y Prox et al., *Xenobiol.* 3, 103-112 (1992).

"Un metabolito farmacéuticamente activo" se pretende que signifique un producto farmacológicamente activo producido a través del metabolismo en el cuerpo de un compuesto especificado o sal del mismo. Después de entrar en el cuerpo, la mayoría de los fármacos son sustratos para las reacciones químicas que pueden cambiar sus propiedades físicas y efectos biológicos. Estas conversiones metabólicas, que habitualmente afectan la polaridad de los compuestos de fórmula I, alteran el modo en que los fármacos se distribuyen en y se excretan del cuerpo. Sin embargo, en algunos casos, se requiere el metabolismo de un fármaco para su efecto terapéutico. Por ejemplo, los fármacos anticáncer de la clase de antimetabolitos se deben convertir a sus formas activas después de que se hayan transportado a una célula cancerosa.

Puesto que la mayoría de los fármacos experimentan transformación metabólica de algún tipo, las reacciones bioquímicas que desempeñan un papel en el metabolismo de fármacos pueden ser numerosas y diversas. El sitio principal del metabolismo de fármacos es el hígado, aunque también pueden participar otros tejidos.

Un rasgo característico de muchas de estas transformaciones es que los productos metabólicos, o "metabolitos", son más polares que los fármacos parentales, aunque un fármaco polar algunas veces da un producto menos polar. Las sustancias con coeficientes de reparto lípido/agua altos, que pasan fácilmente a través de membranas, también difunden de vuelta fácilmente a partir de la orina tubular a través de las células tubulares renales al plasma. Por tanto, tales sustancias tienden a tener una depuración renal baja y una larga persistencia en el cuerpo. Si un fármaco se metaboliza a un compuesto más polar, uno con un coeficiente de reparto menor, su reabsorción tubular se reducirá mucho. Además, los mecanismos secretores específicos para aniones y cationes en los túbulos renales proximales y en las células hepáticas parenquimatosas operan sobre sustancias muy polares.

Como un ejemplo específico, la fenacetina (acetofenacetina) y la acetanilida son ambas agentes analgésicos y antipiréticos moderados, pero se transforman dentro del cuerpo a un metabolito más polar y más eficaz, p-hidroxiacetanilida (paracetamol), que se emplea ampliamente hoy. Cuando se da una dosis de acetanilida a una persona, los metabolitos sucesivos alcanzan el máximo y decaen en plasma secuencialmente. Durante la primera hora, la acetanilida es el principal componente del plasma. En la segunda hora, según cae el nivel de acetanilida, la

concentración del metabolito paracetamol alcanza un máximo. Por último, después de unas pocas horas, el principal componente del plasma es un metabolito adicional que es inerte y se puede excretar del cuerpo. Por tanto, las concentraciones en plasma de uno o más metabolitos, así como del fármaco mismo, pueden ser farmacológicamente importantes.

Se pretende que "una sal farmacéuticamente aceptable" signifique una sal que retiene la eficacia biológica de los ácidos y bases libres del compuesto especificado que no es biológicamente o de otra manera indeseable. Un compuesto de la invención puede poseer un grupo funcional suficientemente ácido, suficientemente básico o ambos, y según esto reaccionar con cualquiera de un número de bases inorgánicas u orgánicas, y ácidos inorgánicos y orgánicos, para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables ejemplares incluyen esas sales preparadas por reacción de los compuestos de la presente invención con un ácido mineral u orgánico o una base inorgánica, tal como sales que incluyen sulfatos, pirosulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, fosfatos, monohidrogenofosfatos, dihidrogenofosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, propionatos, decanoatos, caprilatos, acrilatos, formatos, isobutiratos, caproatos, heptanoatos, propiolatos, oxalatos, malonatos, succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butin-1,4-dioatos, hexin-1,6-dioatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, hidroxibenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, sulfonatos, xilenosulfonatos, fenilacetatos, fenilpropionatos, fenilbutiratos, citratos, lactatos, γ-hidroxibutiratos, glicolatos, tartratos, metano-sulfonatos, propanosulfonatos, naftalen-1-sulfonatos, naftalen-2-sulfonatos, y mandelatos.

Si una composición empleada en el contexto de la invención tiene una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier método adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido piranosidílico, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un α-hidroxiácido, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico, o similares.

Si una composición empleada en el contexto de la invención tiene un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar por cualquier método adecuado, por ejemplo, tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo, o similares. Los ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoniaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperacina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, aluminio y litio.

En el caso de agentes que son sólidos, los expertos en la materia entienden que los compuestos y sales inventivos pueden existir en diferentes formas cristalinas, cocristalinas o polimórficas, todas las cuales se pretende que estén dentro del ámbito de la presente invención y fórmulas especificadas.

Los agentes antivirales se seleccionan del grupo que consiste en: VBY-376 (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00557583), BMS-650032 (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00559247), MK-7009 (Lawitz, E. J.; et al., American Association for the Study of Liver Diseases, 59th Annual Meeting, San Francisco, 31 Octubre-4 Noviembre, 2008; Abstract # 211), TMC-435350 (Raboisson, P.; et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* 2008, *18,* 4853), BI-201335 (Manns, M. P.; et al., American Association for the Study of Liver Diseases, 59th Annual Meeting, San Francisco, 31 Octubre-4 Noviembre, 2008; Abstract # 1849), GS-9190 (Yang, C.; et al., Americal Association for the Study of Liver Diseases, 58th Annual Meeting, Boston, 2-6 Noviembre, 2007; Abstract # 1398), MK-3281 (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00635804), VCH-759 (Cooper, C.; et al., *J.* Hepatology, 2009, 51, 39), VCH-916 (Proulx, L.; et al. European Association for the Study of the Liver, 43rd Annual Meeting, Milán, Italia, 23-27 Abril 2008), ABT-333 (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00696904), BMS-791325 (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00664625), PF-00868554 (Shi, S.; et al., *Antimicrob. Agents Chemother,* 2009, 53, 2544), IDX-184 (Cretton-Scott, E.; et al., European Association for the Study of the Liver, 43rd Annual Meeting, Milán, Italia, 23-27 Abril, 2008; Abstract # 588), RG7128 (Clark, J. L.; et al., *J. Med. Chem.,* 2005, *48,* 5504) o su compuesto parental PSI-6130 (Stuyver, L. J.; et al., *Antiviral Chemistry and Chemotherapy,* 2006, *17,* 79), BMS-790052 (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00546715), y ANA773 (Anadys Pharmaceuticals, página web pública de la empresa (http://ir.anadyspharma.com/phoenix.zhtml?c=148908&p=irolnewsArticle&ID=1172413&highlight=)). También se divulga el uso de SCH900518 (Hughes, Y. et al.; *J. Hepatology,* 2009, *50,* S345), VX-813 (Vertex Pharmaceuticals, sitio web público de la empresa: http://www.vrtx.com/current-projects/drug-candidates/vx813.html), VX-985 (Vertex Pharmaceuticals, sitio web público de la empresa: http://www.vrtx.com/current-projects/drug-candidates/vx-985.html), PHX1766 (Phenomix Corp. sitio web público de la empresa: http://www.phenomixcorp.com/products-hepatitis_c.asp), ABT-450 (Abbott Laboratory, sitio web público de la empresa: littp://www.abbott.com/global/url/pressRelease/en_US/60.5:5/Press Release 0699.htm), ACH-1625 (Achillion Pharmaceuticals, sitio web público de la empresa: littp://www.achillion.com/main.aspx?pn=1625&fl=1), PSI-7851 (Furman, P.A., et al.; 15th International Symposium on HCV & Related Viruses, San Antonio, TX, 5-9 Octubre, 2008; Abstract # 275), VCH-222 (Cooper, C. et al.; *J. Hepatology,* 2009, *50,* S342), ABT-072 (Koev, G. et al.; *J.*

Hepatology, 2009, 50*,* S346), B1207127 (Larrey, D. et al.; *J. Hepatology,* 2009, 50, S383), Debio-025 (Coelmont, L. et al.; *Antimicob. Agents and Chemother.,* 2009, 53, 967*;* Herrmann, E. et al.; *J. Hepatology,* 2009, 50, S344*),* NIM-811 *(*Mlynar, E. et al.; *J. Gen. Virol.,* 1997, 78, 825*;* Lawitz, E. et al.; *J. Hepatology,* 2009, 50, S379*),* SCY-635 (Chatterji, U. et al.; *J. Biol. Chem.,* 2009, 284, 16998*),* AZD2836 (AztraZeneca sitio web público de la empresa: littp://www.astrazeneca-annualreports.com/2007/our_performance/therapy_area_review/infection_medicines/pipcline.asp), BMS-824393 (http://clinicaltrialsfeeds.org/clinicaltrials/show/NCT00971308), PF-04878691 (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00810758), Locteron (De Leede, L.G.; *J Interferon Cytokine Res,* 2008, 28, 113), interferón omega (Buckwold, V. E.; *Antiviral Res,* 2007, 73, 118), PEG-Interferon lambda (Marcello, T.; *Gastroenterology,* 2006, 131, 1887), taribavirina (Gish, R.G., et al., *J Hepatol.,* 2007, 47, 51), VX-950/telapravir (Sarrazin, C., et al., *Gastroenterology,* 2007, 132, 1767), SCH-503034/boceprevir (Njoroge, F. G., et al*., Acc. Chem. Res.,* 2008, 41, 50), Interferón α-2a, e IMO-2125 (TLR9) (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00728936).

Métodos de tratamiento y prevención de infecciones víricas de hepatitis C

Se divulgan composiciones y combinaciones para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por el virus de la hepatitis C en un paciente en necesidad de ello.

También se divulgan composiciones y combinaciones para su uso en introducir una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación de compuestos en el torrente sanguíneo de un paciente en la tratamiento y/o la prevención de infecciones víricas de hepatitis C.

La magnitud de una dosis terapéutica o profiláctica de una composición de la invención o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, en el tratamiento o la prevención aguda o crónica de una infección variará, sin embargo, con la naturaleza y gravedad de la infección, y la vía por la que se administra el principio activo. La dosis, y en algunos casos la frecuencia de dosis, también variará según la infección que se va a tratar, la edad, el peso corporal, y la respuesta del paciente individual. Las pautas de dosificación adecuadas las pueden seleccionar fácilmente los expertos en la materia con la debida consideración a tales factores.

Los usos de la presente invención son particularmente adecuados para pacientes humanos. En particular, los usos y dosis de la presente invención pueden ser útiles para pacientes inmunocomprometidos incluyendo, pero no limitados a, pacientes de cáncer, pacientes infectados con VIH, y pacientes con una enfermedad inmunodegenerativa. Además, los métodos pueden ser útiles para pacientes inmunocomprometidos actualmente en un estado de remisión. Los usos y dosis de la presente invención también son útiles para pacientes sometidos a otros tratamientos antivirales. Los usos de prevención de la presente invención son particularmente útiles para pacientes en riesgo de infección vírica. Estos pacientes incluyen, pero no están limitados a, personal sanitario, por ejemplo, médicos, enfermeras, trabajadores de centros de cuidados paliativos; personal militar; maestros; trabajadores de puericultura; pacientes que viajan a, o viven en, lugares extranjeros, en particular en lugares del tercer mundo, incluyendo trabajadores de ayuda social, misionarios y diplomáticos extranjeros. Por último, los métodos y composiciones incluyen el tratamiento de pacientes insensibles o pacientes resistentes al tratamiento tal como resistencia a inhibidores de polimerasa, inhibidores de proteasa, etc.

Dosis

La toxicidad y eficacia de los compuestos usados en el contexto de la invención se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticas es el índice terapéutico y se puede expresar como el cociente DL_{50}/DE_{50}.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en formular un intervalo de dosis de los compuestos para su uso en seres humanos. La dosis de tales compuestos está preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. Preferiblemente, la dosis está en un intervalo que incluye la DE_{95} con toxicidad manejable, más preferiblemente con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar en estos intervalos dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el contexto de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se pude formular una dosis en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración circulante en plasma que incluya la CE_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza una inhibición semimáxima de los síntomas) determinado en cultivo celular; de forma alternativa, la dosis del compuesto de fórmula I se puede formular en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración circulante en plasma del compuesto que corresponde a la concentración requerida para alcanzar una magnitud fijada de respuesta. Tal información se puede usar para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Los protocolos y composiciones divulgados en el presente documento preferiblemente se prueban *in vitro*, y después *in vivo*, para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de uso en seres humanos. Por ejemplo, los

ensayos *in vitro* que se pueden usar para determinar si la administración de un protocolo terapéutico específico está indicado, incluyen ensayos de cultivo celular *in vitro* en los que las células que responden a los efectos de *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida se exponen al ligando y se mide la magnitud de la respuesta mediante una técnica apropiada. La evaluación de las composiciones de combinación se evalúa después con respecto a la potencia de la combinación. Las composiciones para uso según la invención se pueden probar en sistemas modelo animales adecuados antes de probarlas en seres humanos, incluyendo pero no limitados a, en ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, hámsteres, etc. Los compuestos se pueden usar después en los ensayos clínicos apropiados.

La magnitud de una dosis terapéutica o profiláctica de *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma en combinación con un segundo agente antiviral en el tratamiento o la prevención aguda o crónica de una infección o afección variará con la naturaleza y gravedad de la infección, y la vía por la que se administra el principio activo. La dosis, y tal vez la frecuencia de la dosis, también variará según la infección que se va a tratar, la edad, peso corporal, y respuesta del paciente individual. Las pautas de dosificación adecuadas las pueden seleccionar fácilmente los expertos en la materia con la debida consideración de tales factores. En una forma de realización, la dosis administrada depende del compuesto específico que se va a usar, y el peso y el estado del paciente. Además, la dosis puede ser diferente para varios segundos agentes antivirales particulares; las dosis adecuadas se pueden predecir en base a las medidas *in vitro* anteriormente mencionadas y en base a estudios animales, de modo que serán adecuadas dosis menores para esas composiciones que muestran eficacia a menores concentraciones que otras composiciones cuando se miden en sistemas descritos o referenciados en el presente documento. En general, la dosis de *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida por día está en el intervalo desde aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg, preferiblemente aproximadamente de 1 a 25 mg/kg, más preferiblemente aproximadamente de 2,5 a 15 mg/kg. Para el tratamiento de seres humanos infectados por virus de la hepatitis C, se administra desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 15 g por día en aproximadamente de una a cuatro divisiones al día, preferiblemente de 100 mg a 12 g al día, más preferiblemente de 100 mg a 2000 mg al día.

Además, la dosis diaria recomendada de cada agente en la composición se puede administrar en ciclos como agentes individuales o en combinación con otros agentes terapéuticos. En una forma de realización, la dosis diaria se administra en una única dosis o en dosis igualmente divididas. En una forma de realización relacionada, la dosis diaria recomendada se puede administrar una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana o cinco veces a la semana.

En una forma de realización, las composiciones de la invención se administran para proporcionar distribución sistémica del compuesto en el paciente. En una forma de realización relacionada, las composiciones de la invención se administran para producir un efecto sistémico en el cuerpo.

En otra forma de realización, las composiciones de la invención se administran a través de administración oral, mucosa (incluyendo sublingual, yugal, rectal, nasal o vaginal), parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, inyección embolada, intraarterial o intravenosa), transdérmica, o tópica. En una forma de realización específica, la composiciones de la invención se administran a través de administración mucosa (incluyendo sublingual, yugal, rectal, nasal o vaginal), parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, inyección embolada, intraarterial o intravenosa), transdérmica, o tópica. En una forma de realización más específica, las composiciones de la invención se administran a través de administración oral. En una forma de realización más específica, las composiciones de la invención no se administran a través de administración oral.

Diferentes cantidades terapéuticamente eficaces pueden ser aplicables para diferentes infecciones, como sabrán fácilmente los expertos en la materia. De forma similar, cantidades suficientes para tratar o prevenir tales infecciones, pero insuficientes para causar, o suficientes para reducir, efectos adversos asociados con las terapias convencionales también están abarcadas por las cantidades de dosis y frecuencia de dosis descritas anteriormente.

Composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas unitarias individuales que comprenden una composición de la invención, o sales o hidratos farmacéuticamente aceptables de las mismas, también están abarcadas por la invención. Las formas farmacéuticas individuales de la invención pueden ser adecuadas para la administración oral, mucosa (incluyendo sublingual, yugal, rectal, nasal o vaginal), parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, inyección embolada, intraarterial o intravenosa), transdérmica, o tópica. Las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas de la invención típicamente también comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. También se contemplan formas farmacéuticas estériles.

En una forma de realización alternativa, la composición farmacéutica abarcada por esta forma de realización incluye una composición de la invención, o sales o hidratos farmacéuticamente aceptables de la misma, y al menos un

agente terapéutico adicional. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales incluyen, pero no están limitados a, los enumerados anteriormente.

La composición, forma y tipo de formas farmacéuticas típicamente variará dependiendo de su uso. Por ejemplo, un forma farmacéutica usada en el tratamiento agudo de una enfermedad o un enfermedad relacionada puede contener cantidades mayores de uno o más principios activos que contiene que una forma farmacéutica usada en el tratamiento crónico de la misma enfermedad. De forma similar, una forma farmacéutica parenteral puede contener cantidades menores de uno o más de los principios activos que contiene que una forma farmacéutica oral usada para tratar la misma enfermedad o trastorno. Estas y otras maneras en que las formas farmacéuticas específicas abarcadas por esta invención variarán entre sí serán fácilmente aparentes para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences,* 18ª ed., Mack Publishing, Easton PA (1990). Los ejemplos de formas farmacéuticas incluyen, pero no están limitados a: comprimidos; comprimidos oblongos; cápsulas, tal como cápsulas de gelatina elásticas blandas; sellos; pastillas; tabletas; dispersiones; supositorios; pomadas; cataplasmas (emplastos); pastas; polvos; vendas; cremas; tiritas; soluciones; parches; aerosoles (por ejemplo, espráis o inhaladores nasales); geles; formas farmacéuticas líquidas adecuadas para la administración oral o mucosa a un paciente incluyendo suspensiones (por ejemplo, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas, emulsiones de aceite en agua, o emulsiones de agua en aceite), soluciones, y elixires; formas farmacéuticas líquidas adecuadas para la administración parenteral a un paciente; y sólidos estériles (por ejemplo, sólidos cristalinos o amorfos) que se pueden reconstituir para proporcionar formas farmacéuticas líquidas para la administración parenteral a un paciente.

Las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas típicas comprenden uno o más soportes, excipientes o diluyentes. Los excipientes adecuados son bien conocidos para los expertos en la técnica de la farmacia, y en el presente documento se proporcionan ejemplos no limitantes de excipientes. Si un excipiente particular es adecuado para la incorporación en una composición farmacéutica o forma farmacéutica depende de una variedad de factores bien conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, el modo en que la forma farmacéutica se administrará a un paciente. Por ejemplo, las formas farmacéuticas orales tales como comprimidos pueden contener excipientes no adecuados para su uso en formas farmacéuticas parenterales. La idoneidad de un excipiente particular también puede depender de los principios activos específicos en la forma farmacéutica.

Esta invención abarca además composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas anhídridas que comprenden principios activos, ya que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, la adición de agua (por ejemplo, el 5%) está ampliamente aceptado en las técnicas farmacéuticas como un medio de simular almacenamiento a largo plazo para determinar características tales como la vida útil o la estabilidad de formulaciones a lo largo del tiempo. Véase, por ejemplo, Carstensen, *Drug Stability: Principles & Practice,* 2d. Ed., Marcel Dekker, NY, NY, 1995, pp. 379-80. En efecto, el agua y el calor aceleran la descomposición de algunos compuestos. Por tanto, el efecto del agua en una formulación puede ser de gran significación puesto que la hidratación y/o humedad se encuentran comúnmente durante la fabricación, manejo, embalaje, almacenamiento, transporte y uso de las formulaciones.

Las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas anhídridas de la invención se pueden preparar usando ingredientes anhídridos o que contienen poca humedad y condiciones de baja hidratación o baja humedad.

Una composición farmacéutica anhídrida se debe preparar y almacenar de modo que su naturaleza anhídrida se mantenga. Según esto, las composiciones anhídridas preferiblemente se empaquetan usando materiales que se sabe que previenen la exposición al agua de modo que se pueden incluir en kits de formulación adecuados. Los ejemplos de embalaje adecuado incluyen, pero no están limitados a, papeles metálicos, plásticos, envases de dosis unitarias (por ejemplo, viales), blísteres y bandas herméticamente sellados.

La invención abarca además composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos que reducen la velocidad a la que un principio activo se descompone. Tales compuestos, que se denominan en el presente documento "estabilizantes", incluyen, pero no están limitados a, antioxidantes tales como ácido ascórbico, reguladores de pH, o tampones de sales.

Como las cantidades y tipo de excipientes, las cantidades y tipos específicos de principios activos en una forma farmacéutica pueden ser diferentes dependiendo de factores tales como, pero no limitados a, la vía por la que se va a administrar a los pacientes. Sin embargo, las formas farmacéuticas típicas de la invención comprenden composiciones de la invención, o sales o hidratos farmacéuticamente aceptables de las mismas, comprenden de 0,1 mg a 1500 mg por unidad para proporcionar dosis de aproximadamente 0,01 a 200 mg/kg al día.

Formas farmacéuticas orales

Las composiciones farmacéuticas de la invención que son adecuadas para la administración oral se pueden presentar como formas farmacéuticas discretas, tal como, pero no están limitadas a, comprimidos (por ejemplo, comprimidos masticables), comprimidos oblongos, cápsulas y líquidos (por ejemplo, jarabes con sabor). Tales formas farmacéuticas contienen cantidades predeterminadas de principios activos, y se pueden preparar por

métodos de farmacia que conocen bien los expertos en la materia. Véase en general, *Remington's Pharmaceutical Sciences,* 18ª ed., Mack Publishing, Easton PA (1990).

Las formas farmacéuticas orales típicas de la invención se preparan combinando los principios activos en una mezcla estrecha con al menos un excipiente según las técnicas de composición farmacéuticas convencionales. Los excipientes pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Por ejemplo, los excipientes adecuados para su uso en formas farmacéuticas líquidas orales o en aerosol incluyen, pero no están limitados a, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes y agentes colorantes. Los ejemplos de excipientes adecuados para su uso en formas farmacéuticas sólidas (por ejemplo, polvos, comprimidos, cápsulas y comprimidos oblongos) incluyen, pero no están limitadas a, almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes y agentes disgregantes.

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas farmacéuticas orales más ventajosas, en cuyo caso se emplean excipientes sólidos. Si se desea, los comprimidos se pueden recubrir mediante técnicas acuosas o no acuosas estándares. Tales formas farmacéuticas se pueden preparar por cualquiera de los métodos de farmacia. En general, las composiciones farmacéuticas y las formas farmacéuticas se preparan mezclando de forma uniforme y estrecha los principios activos con soportes líquidos, soportes sólidos finamente divididos, o ambos, y después dando forma al producto en la presentación deseada si es necesario.

Por ejemplo, se puede preparar un comprimo mediante compresión o moldeo. Los comprimidos por compresión se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada los principios activos en forma suelta tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un excipiente. Los comprimidos moldeados se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los ejemplos de excipientes que se pueden usar en formas farmacéuticas orales de la invención incluyen, pero no están limitados a, aglutinantes, rellenos, disgregantes y lubricantes. Los aglutinantes adecuados para su uso en las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas incluyen, pero no están limitados a, almidón de maíz, fécula de patata, u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tal como goma arábiga, alginato de sodio, ácido algínico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica), polivinilpirrolidona, metilcelulosa, almidón pregelatinizado, hidroxipropilmetilcelulosa (por ejemplo, Nos. 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina, y mezclas de los mismos.

Los ejemplos de rellenos adecuados para su uso en las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas divulgadas en el presente documento incluyen, pero no están limitados a, talco, carbonato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, y mezclas de los mismos. El aglutinante o relleno en las composiciones farmacéuticas de la invención típicamente está presente desde aproximadamente el 50 hasta aproximadamente el 99 por ciento en peso de la composición farmacéutica o forma farmacéutica.

Las formas adecuadas de celulosa microcristalina incluyen, pero no están limitadas a, los materiales vendidos como AVICEL-PH-101, AVICEL-PH-103 AVICEL RC-581, AVICEL-PH-105 (disponibles de FMC Corporation, American Viscose Division, Avicel Sales, Marcus Hook, PA) y mezclas de las mismas. Un aglutinante específico es una mezcla de celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica vendida como AVICEL RC-581. Los excipientes o aditivos anhídridos o de baja humedad adecuados incluyen AVICEL-PH-103™ y Almidón 1500 LM.

Los disgregantes se usan en las composiciones de la invención para proporcionar comprimidos que se disgregan cuando se exponen a un medio acuoso. Los comprimidos que contienen demasiado disgregante se pueden disgregar en almacenamiento, mientras que los que contienen demasiado poco no se disgregan a la velocidad deseada o en las condiciones deseadas. Por tanto, se debe usar una cantidad suficiente de disgregante que ni sea demasiada ni demasiado poca para alterar perjudicialmente la liberación de los principios activos para formas las formas farmacéuticas orales sólidas de la invención. La cantidad de disgregante usada varía basándose en el tipo de formulación, y es fácilmente discernible por los expertos en la materia. Las composiciones farmacéuticas típicas comprenden desde aproximadamente el 0,5 hasta aproximadamente el 15 por ciento en peso de disgregante, especialmente desde aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 5 por ciento en peso de disgregante.

Los disgregantes que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas de la invención incluyen, pero no están limitados a, agar-agar, ácido algínico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa de sodio, crospovidona, polacrilina potásica, glicolato sódico de almidón, fécula de patata o tapioca, almidón pregelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas, y mezclas de los mismos.

Los lubricantes que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas de la invención incluyen, pero no están limitados a, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite de vaselina, aceite de vaselina fluido, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite

de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de soja), estearato de zinc, oleato de etilo, laureato de etilo, agar, y mezclas de los mismos. Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice syloid (AEROSIL 200, fabricado por W.R. Grace Co. de Baltimore, MD), un aerosol coagulado de sílice sintética (comercializada por Degussa Co. de Plano, TX), CAB-O-SIL (un producto de dióxido de silicio pirogénico vendido por Cabot Co. de Boston MA), y mezclas de los mismos. Si se usan, los lubricantes típicamente se usan en una cantidad de menos de aproximadamente el 1 por ciento en peso de las composiciones farmacéuticas o las formas farmacéuticas en las que se incorporan.

Formas farmacéuticas de liberación retrasada

Los principios activos de la invención se pueden administrar por medio de liberación controlada o por dispositivos de administración que conocen bien los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, los descritos en las patentes en EE UU Nos.: 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; y 4.008.719, 5.674.533, 5.059.595, 5.591.767, 5.120.548, 5.073.543, 5.639.476, 5.354.556, y 5.733.566. Tales formas farmacéuticas se pueden usar para proporcionar liberación lenta o controlada de uno o más principios activos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos multicapa, micropartículas, liposomas, microesferas, o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Las formulaciones de liberación controlada adecuadas conocidas para los expertos en la materia, incluyendo las descritas en el presente documento, se pueden seleccionar fácilmente para su uso con los principios activos de la invención. Por tanto, la invención abarca formas farmacéuticas unitarias individuales adecuadas para la administración oral tales como, pero no limitadas a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina y comprimidos oblongos que están adaptadas para la liberación controlada.

Todos los productos farmacéuticos de liberación controlada tienen un fin común de mejorar la terapia del fármaco sobre la alcanzada por sus homólogos no controlados. Idealmente, el uso de una preparación de liberación controlada óptimamente diseñada en el tratamiento médico se caracteriza por el empleo de un mínimo de sustancia farmacéutica para curar o controlar la afección en una mínima cantidad de tiempo. Las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen actividad extendida del fármaco, frecuencia de dosis reducida, y cumplimiento del paciente aumentado. Además, las formulaciones de liberación controlada se pueden usar para afectar el tiempo de inicio de la acción u otras características, tales como niveles en sangre del fármaco, y por tanto puede afectar a la aparición de efectos secundarios (por ejemplo, adversos).

La mayoría de las formulaciones de liberación controlada se diseñan para liberar inicialmente una cantidad de fármaco (principio activo) que produce rápidamente el efecto terapéutico deseado, y la liberación gradual y continuamente de otras cantidades de fármaco para mantener este nivel de efecto terapéutico o profiláctico durante un periodo de tiempo extendido. Para mantener este nivel constante de fármaco en el cuerpo, el fármaco se debe liberar de la forma farmacéutica a una velocidad que sustituirá la cantidad de fármaco que se metaboliza y excreta del cuerpo. La liberación controlada de un principio activo se puede estimular mediante varias condiciones incluyendo, pero no limitadas a, pH, temperatura, enzimas, agua, u otras condiciones fisiológicas o compuestos.

Formas farmacéuticas parenterales

Las formas farmacéuticas parenterales se pueden administrar a pacientes por varias vías incluyendo, pero no limitadas a, subcutánea, intravenosa (incluyendo inyección embolada), intramuscular e intraarterial. Debido a que su administración típicamente evita las defensas naturales del paciente contra contaminantes, las formas farmacéuticas parenterales son preferiblemente estériles o capaces de ser esterilizadas antes de la administración a un paciente. Los ejemplos de formas farmacéuticas parenterales incluyen, pero no están limitadas a, soluciones listas para inyección, productos secos y/o liofilizados listos para disolverse o resuspenderse en un vehículo farmacéuticamente aceptable para inyección (polvos reconstituibles), suspensiones listas para inyección, y emulsiones.

Los vehículos adecuados que se pueden usar para proporcionar formas farmacéuticas parenterales de la invención los conocen bien los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a: agua para inyección USP; vehículos acuosos tales como, pero no limitados a, inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, e inyección de Ringer con lactato; vehículos miscibles con agua tales como, pero no limitados a, alcohol etílico, polietilenglicol y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos tales como, pero no limitados a, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

También se pueden incorporar compuestos que aumentan la solubilidad de uno o más de los principios activos divulgados en el presente documento en las formas farmacéuticas parenterales de la invención.

Formas farmacéuticas transdérmicas

Las formas farmacéuticas transdérmicas incluyen parches de “tipo depósito” o de “tipo matriz”, que se pueden aplicar a la piel y llevarse durante un periodo de tiempo específico para permitir la penetración de una cantidad deseada de los principios activos.

Los excipientes adecuados (por ejemplo, soportes y diluyentes) y otros materiales que se pueden usar para proporcionar formas farmacéuticas transdérmicas y tópicas abarcadas por esta invención los conocen bien los expertos en las técnicas farmacéuticas, y dependen del tejido particular al que se aplicará una composición farmacéutica o forma farmacéutica determinada. Con ese hecho en la mente, los excipientes típicos incluyen, pero no están limitados a, agua, acetona, etanol, etilenglicol, propilenglicol, butan-1,3-diol, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, aceite de vaselina, y mezclas de los mismos.

Dependiendo del tejido específico que se va a tratar, se pueden usar componentes adicionales antes de, junto con, o posteriormente al tratamiento con los principios activos de la invención. Por ejemplo, se pueden usar potenciadores de penetración para ayudar a la administración de los principios activos al tejido. Los potenciadores de penetración adecuados incluyen, pero no están limitados a: acetona, varios alcoholes tales como etanol, oleilo y tetrahidrofurilo; sulfóxidos de alquilo tales como sulfóxido de dimetilo; dimetilacetamida; dimetilformamida; polietilenglicol; pirrolidonas tal como polivinilpirrolidona; grados de Kollidon (povidona, polividona); urea; y varios ésteres de azúcar solubles e insolubles en agua tal como Tween 80 (polisorbato 80) y Span 60 (monoestearato de sorbitano).

El pH de una composición farmacéutica o forma farmacéutica, o del tejido al que se aplica la composición farmacéutica o forma farmacéutica, también se puede ajustar para mejorar la administración de uno o más principios activos. De forma similar, la polaridad de un soporte solvente, su fuerza iónica, o tonicidad se pueden ajustar para mejorar la administración. También se pueden añadir compuestos tales como estearatos a las composiciones farmacéuticas o formas farmacéuticas para alterar ventajosamente la hidrofilicidad o lipofilicidad de uno o más principios activos de modo que se mejore la administración. A este respecto, los estearatos pueden servir como un vehículo lipídico para la formulación, como un agente emulsionante o tensioactivo, y como potenciadores de administración o agente potenciador de la penetración. Se pueden usar diferentes sales, hidratos o solvatos de los principios activos para ajustar adicionalmente las propiedades de la composición resultante.

Formas farmacéuticas tópicas

Las formas farmacéuticas tópicas de la invención incluyen, pero no están limitadas a, cremas, lociones, pomadas, geles, soluciones, emulsiones, suspensiones u otras formas que conoce el experto en la materia. Véase, por ejemplo, *Remington’s Pharmaceutical Sciences,* 18ª ed., Mack Publishing, Easton PA (1990) e *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms,* 4ª ed., Lea & Febiger, Filadelfia (1985).

Los excipientes adecuados (por ejemplo, soportes y diluyentes) y otros materiales que se pueden usar para proporcionar las formas farmacéuticas transdérmicas y tópicas abarcadas por esta invención los conocen bien los expertos en las técnicas farmacéuticas, y dependen del tejido particular al que se aplicará una composición farmacéutica o forma farmacéutica determinada. Con ese hecho en la mente, los excipientes típicos incluyen, pero no están limitados a, agua, acetona, etanol, etilenglicol, propilenglicol, butan-1,3-diol, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, aceite de vaselina, y mezclas de los mismos.

Dependiendo del tejido específico que se va a tratar, se pueden usar componentes adicionales antes de, junto con, o posteriormente al tratamiento con los principios activos de la invención. Por ejemplo, se pueden usar potenciadores de penetración para ayudar a la administración de los principios activos al tejido. Los potenciadores de penetración adecuados incluyen, pero no están limitados a: acetona, varios alcoholes tales como etanol, oleilo y tetrahidrofurilo; sulfóxidos de alquilo tales como sulfóxido de dimetilo; dimetilacetamida; dimetilformamida; polietilenglicol; pirrolidonas tal como polivinilpirrolidona; grados de Kollidon (povidona, polividona); urea; y varios ésteres de azúcar solubles e insolubles en agua tal como Tween 80 (polisorbato 80) y Span 60 (monoestearato de sorbitano).

Formas farmacéuticas mucosas

Las formas farmacéuticas mucosas de la invención incluyen, pero no están limitadas a, soluciones oftálmicas, espráis y aerosoles, u otras formas que conoce el experto en la materia. Véase, por ejemplo, *Remington’s Pharmaceutical Sciences,* 18ª ed., Mack Publishing, Easton PA (1990) e *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms,* 4ª ed., Lea & Febiger, Filadelfia (1985). Las formas farmacéuticas adecuadas para tratar tejidos mucosas en la cavidad bucal se pueden formular como colutorios o como geles orales. En una forma de realización, el aerosol comprende un soporte. En otra forma de realización, el aerosol no tiene soporte.

Las composiciones de la invención también se pueden administrar directamente a los pulmones por inhalación. Para la administración por inhalación, una composición se puede administrar convenientemente a los pulmones mediante un número de diferentes dispositivos. Por ejemplo, un inhalador de dosis medida (“MDI”) que utiliza botes que contienen un propelente de bajo punto de ebullición adecuado, por ejemplo, se puede usar diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado para administrar un compuesto de fórmula I directamente al pulmón. Los dispositivos MDI están disponibles de un número de suministradores tales

como 3M Corporation, Aventis, Boehringer Ingelheim, Forest Laboratories, Glaxo-Wellcome, Schering Plough y Vectura.

De forma alternativa, se puede usar dispositivo inhalador de polvo seco (DPI) para administrar una composición de la invención al pulmón (véase, por ejemplo, Raleigh *el al., Proc. Amer. Assoc. Cancer Research Annual Meeting, 1999,* 40, 397. Los dispositivos DPI típicamente usan un mecanismo tal como un estallido de gas para crear una nube de polvo seco dentro de un envase, que puede inhalar después el paciente. Los dispositivos DPI también se conocen bien en la técnica y se pueden comprar de un número de vendedores que incluyen, por ejemplo, Fisons, Glaxo-Wellcome, Inhale Therapeutic Systems, ML Laboratories, Qdose y Vectura. Una variación popular es el sistema DPI de dosis múltiple ("MDDPI"), que permite la administración de más de una dosis terapéutica. Los dispositivos MDDPI están disponibles de empresas tales como AstraZeneca, GlaxoWellcome, IVAX, Schering Plough, SkyePharma y Vectura. Por ejemplo, se pueden formular cápsulas y cartuchos de gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón para estos sistemas.

Otro tipo de dispositivo que se puede usar para administrar una composición de la invención al pulmón es un dispositivo de espray líquido suministrado, por ejemplo, por Aradigm Corporation. Los sistemas de espray líquido usan agujeros de boquilla extremadamente pequeños para aerosolizar formulaciones de fármacos líquidas que después se pueden inhalar directamente al pulmón.

En una forma de realización, se usa un dispositivo nebulizador para administrar una composición de la invención al pulmón. Los nebulizadores crean aerosoles a partir de formulaciones de fármacos líquidas usando, por ejemplo, energía ultrasónica para formar partículas finas que se pueden inhalar fácilmente. (Véase, por ejemplo, Verschoyle *et al., British J. Cancer,* 1999, 80, Supl 2, 96). Los ejemplos de nebulizadores incluyen dispositivos suministrados por Sheffield/Systemic Pulmonary Delivery Ltd. (Véase, Armer *et al.,* Patente en EE UU No. 5.954.047; van der Linden *et al.,* Patente en EE UU No. 5.950.619; van der Linden *et al.,* Patente en EE UU No. 5.970.974), Aventis y Batelle Pulmonary Therapeutics.

En una forma de realización, se usa un dispositivo aerosol electrohidrodinámico ("EHD") para administrar composiciones de la invención al pulmón. Los dispositivos de aerosol EHD usan energía eléctrica para aerosolizar soluciones o suspensiones de fármacos líquidas (véase, por ejemplo, Noakes *et al.,* Patente en EE UU No. 4.765.539; Coffee, Patente en EE UU No., 4.962.885; Coffee, solicitud PCT, WO 94/12285; Coffee, solicitud PCT, WO 94/14543; Coffee, solicitud PCT, WO 95/26234, Coffee, solicitud PCT, WO 95/26235, Coffee, solicitud PCT, WO 95/32807). Las propiedades electroquímicas de la formulación de los compuestos de fórmula I pueden ser parámetros importantes para optimizar cuando se administra este fármaco al pulmón con un dispositivo de aerosol EHD y tal optimización la realiza rutinariamente el experto en la materia. Los dispositivos de aerosol EHD pueden administrar fármacos más eficazmente al pulmón que las tecnologías de administración pulmonar existentes. Los expertos en la materia conocerán otros métodos de administración intrapulmonar de los compuestos de fórmula I.

Las formulaciones de fármacos líquidas adecuadas para su uso con nebulizadores y dispositivos de espray líquidos y dispositivos de aerosol EHD típicamente incluirán una composición de la invención con un soporte farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el soporte farmacéuticamente aceptable es un líquido tal como alcohol, agua, polietilenglicol o un perfluorocarbono. Opcionalmente, se puede añadir otro material para alterar las propiedades de aerosol de la solución o suspensión de la composición de la invención. Preferiblemente, este material es líquido tal como un alcohol, glicol, poliglicol o un ácido graso. Otros métodos de formular soluciones o suspensiones de fármacos líquidas adecuadas pata su uso en dispositivos de aerosol las conocen los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Biesalski, patente en EE UU No. 5.112.598; Biesalski, 5.556.611). Una composición de la invención también se puede formular en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, una composición de la invención también se puede formular como una preparación de absorción lenta. Tales formulación de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

De forma alternativa, se pueden emplear otros sistemas de administración farmacéutica. Liposomas, emulsiones, sistemas autoemulsionantes (SEDDS) y automicroemulsionantes (SMEDDS) son ejemplos bien conocidos de vehículos de administración que se pueden usar para administrar composiciones de la invención. Tales sistemas también pueden contener ácidos grasos, sales biliares y mezclas de mono-, di- y triglicéridos para aliviar los potenciales efectos alimenticios. Otros excipientes lípidos funcionales incluyen ésteres de glicerol, ésteres de PEG, ésteres de propilenglicol y ésteres de poliglicerol. Ciertos solventes orgánicos, tales como dimetilsulfóxido también se pueden emplear, aunque habitualmente al coste de mayor toxicidad. Una composición de la invención también se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una forma de realización, se usa una bomba (Sefton,

CRC Crit. Ref Biomed Eng., 1987, 14, 201; Buchwald *et al., Surgery,* 1980, 88, 507; Saudek *et al., N. Engl. J. Med.,* 1989, 321, 574). En otra forma de realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release,* Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance,* Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.,* 1983, 23, 61; véase también Levy *et al., Science,* 1985, 228, 190; During *et al., Ann. Neurol.,* 1989,25,351; Howard *et al., J. Neurosurg.,* 71, 105 (1989). En aún otra forma de realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada en la proximidad de la diana de los compuestos usados en el contexto de la invención, por ejemplo, el pulmón, requiriendo de esta manera solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release, supra,* vol. 2, pp. 115 (1984)). Se pueden usar otros sistemas de liberación controlada (véase, por ejemplo, Langer, *Science,* 1990, 249, 1527).

Los excipientes adecuados (por ejemplo, soportes y diluyentes) y otros materiales que se pueden usar para proporcionar las formas farmacéuticas transdérmicas y tópicas abarcadas por esta invención los conocen bien los expertos en las técnicas farmacéuticas, y dependen del tejido particular al que se aplicará una composición farmacéutica o forma farmacéutica determinada. Con ese hecho en la mente, los excipientes típicos incluyen, pero no están limitados a, agua, etanol, etilenglicol, propilenglicol, butan-1,3-diol, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, aceite de vaselina, y mezclas de los mismos, que son no tóxicos y farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de tales ingredientes adicionales se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences,* 18ª ed., Mack Publishing, Easton PA (1990).

El pH de una composición farmacéutica o forma farmacéutica, o del tejido al que se aplica la composición farmacéutica o forma farmacéutica, también se puede ajustar para mejorar la administración de uno o más principios activos. De forma similar, la polaridad de un soporte solvente, su fuerza iónica, o tonicidad se pueden ajustar para mejorar la administración. También se pueden añadir compuestos tales como estearatos a las composiciones farmacéuticas o formas farmacéuticas para alterar ventajosamente la hidrofilicidad o lipofilicidad de uno o más principios activos de modo que se mejore la administración. A este respecto, los estearatos pueden servir como un vehículo lipídico para la formulación, como un agente emulsionante o tensioactivo, y como un potenciador de la administración o agente potenciador de la penetración. Se pueden usar diferentes sales, hidratos o solvatos de los principios activos para ajustar adicionalmente las propiedades de la composición resultante.

Kits

También se divulga un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases que comprenden una composición de la invención útil para el tratamiento o la prevención de una infección por el virus de la hepatitis C. Además se divulga un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases que comprenden un compuesto de fórmula I útil para el tratamiento o la prevención de una infección por el virus de la hepatitis C y uno o más envases que comprenden un agente terapéutico adicional, incluyendo, pero no limitado a, los enumerados anteriormente, en particular un agente antiviral, un interferón, un agente que inhibe enzimas víricas, o un agente que inhibe la replicación vírica, preferiblemente el agente terapéutico adicional es específico para VHC o demuestra actividad anti-VHC.

Además se divulga un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases que comprenden uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociado con tal(es) envase(s) puede estar un aviso en la forma prescrita por un organismo estatal que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, aviso que refleja la aprobación por el organismo de la fabricación, uso o venta para la administración humana.

La *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida para combinación con uno o más compuesto antivirales adicionales se puede preparar usando las rutas de reacción y esquemas de síntesis descritos posteriormente, empleando las técnicas generales conocidas en la técnica usando materiales de partida que están fácilmente disponibles. La síntesis de compuestos no ejemplificados según la invención se puede realizar exitosamente mediante modificaciones aparentes para los expertos en la materia, por ejemplo, protegiendo adecuadamente grupos interferentes, cambiando a otros reactivos adecuados conocidos en la técnica, o haciendo modificaciones rutinarias de las condiciones de reacción. De forma alternativa, otras reacciones divulgadas en el presente documento o generalmente conocidas en la técnica se reconocerán como que tienen aplicabilidad para preparar otros compuestos de la invención.

Preparación de compuestos

En los esquemas de síntesis descritos a continuación, a menos que se indique de otra manera todas las temperaturas se muestran en grados Celsius y todas las partes y porcentajes son en peso.

Los reactivos se compraron de suministrados comerciales tales como Aldrich Chemical Company o Lancaster Synthesis Ltd., y se usaron sin purificación adicional a menos que se indique de otra manera. Todos los solventes se

adquirieron de suministradores comerciales tales como Aldrich, EMD Chemicals o Fisher y se usaron como se recibieron.

Las reacciones mostradas posteriormente se hicieron generalmente con una presión positiva de argón o nitrógeno a una temperatura ambiente (a menos que se indique de otra manera) en solventes anhídridos, y los matraces de reacción tenían ajustados tabiques de goma para la introducción de sustratos y reactivos a través de jeringas. El material de vidrio se secó en un horno y/o se secó con calor.

Las reacciones se ensayaron por TCL y/o se analizaron por LC-MS o HPLC y se terminaron juzgadas por el consumo de material de partida. La cromatografía en capa fina analítica (TLC) se realizó en placas de vidrio precubiertas con gel de sílice 60 F_{254} placas de 0,25 mm (EMD Chemicals), y se visualizaron con luz UV (254 nm) y/o yodo en gel de sílice y/o calentamiento con colorantes de TLC tal como ácido fosfomolíbdico etanólico, solución de ninhidrina, solución de permanganato de potasio o solución de sulfato cérico. La cromatografía en capa fina preparativa (prepTLC) se realizó en placas de vidrio precubiertas con gel de sílice 60 F_{254} placas de 0,5 mm (20 x 20 cm, de Thompson Instrument Company), y se visualizaron con luz UV (254 nm).

Los tratamientos finales típicamente se hicieron doblando el volumen de reacción con el solvente de reacción o solvente de extracción y después lavando con las soluciones acuosas indicadas usando el 25% en volumen del volumen de extracción a menos que se indique de otra manera. Las soluciones de producto se secaron sobre Na_2SO_4 y/o $MgSO_4$ anhídrido antes de la filtración y evaporación de los solventes a presión reducida en un evaporador rotatorio y anotado como solventes eliminados al vacío. La cromatografía en columna se completó a presión positiva usando gel de sílice 60 de Merck, alúmina neutra de malla 230-400 o malla 50-200, cromatografía rápida ISCO usando columnas de gel de sílice preempaquetadas SuperFlash. La hidrogenolisis se hizo a la presión indicada en los ejemplos o a presión ambiente.

Los espectros de ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN se registraron en un instrumento Varian Mercury-VX400 que opera a 400 MHz. Los espectros de RMN se obtuvieron como soluciones de $CDCl_3$ (descritos en ppm), usando cloroformo como el estándar de referencia (7,27 ppm para protón y 77,00 para carbono), CD_3OD (3,4 y 4,8 ppm para protones y 49,3 ppm para carbono), DMSO-d_6 (2,49 para protón), o internamente trimetilsilano (0,00 ppm) cuando fue apropiado. Se usaron otros solventes de RMN según se necesitó. Cuando se describen multiplicidades de picos, se usan las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuatriplete), m (multiplete), br (ensanchado), bs (singlete ancho), dd (doblete de dobletes), dt (doblete de tripletes). Las constantes de acoplamiento, cuando se dan, se describen en hercios (Hz).

Los espectros de infrarrojos (IR) se registraron en un espectrómetro ATR FT-IR como aceites o sólidos puros, y cuando se dan se describen en números de onda (cm^{-1}). Los espectros de masas descritos son (+)-ES o APCI (+) LC/MS realizados por el Departamento de Química Analítica de Anadys Pharmaceuticals, Inc. Los análisis de elementos fueron realizados por Atlantic Microlab, Inc. en Norcross, GA. Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato capilar abierto, y están sin corregir.

Los valores de exceso enantiomérico (ee) se determinaron mediante análisis de HPLC usando las columnas Chiralpak (Chiral Technologies Inc.) AS-RH 2,1 × 150 mm, 5 micrómetros, λ = 132 nm o AS-RH, 4,6 × 250 mm, 5 micrómetros, λ = 310 nm.

AS-RH 2,1 × 150 mm, 5 micrómetros: separación por HPLC con gradiente binario. Solvente A: ácido fórmico al 0,1% en agua, solvente B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. Inyectados 10 µl de muestra disuelta en metanol al 50% - agua al 50% [0,1 mg/ml].

Tiempo (min)	% de B	Flujo (ml/min)
0,0	55	0,3
5,0	95	0,3
5,5	95	0,3
6,0	55	0,3
12,0	55	0,3

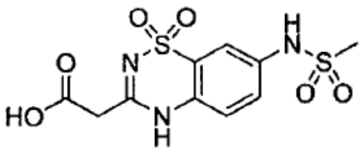
AS-RH 4,6 × 250 mm, 5 micrómetros: separación por HPLC con gradiente binario. Solvente A: TFA al 0,05% en agua, solvente B: TFA al 0,05% en acetonitrilo. Inyectados 3-5 µl de muestra disuelta en acetonitrilo [1 mg/ml].

Tiempo (min)	% de B	Flujo (ml/min)
0,0	50	0,8
8,0	95	0,8
10,0	95	0,8
11,0	50	0,8
13,0	50	0,8

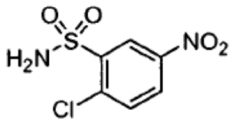
Las rutas de síntesis y procedimientos experimentales descritos pueden utilizar muchas abreviaturas químicas comunes, 2,2-DMP (2,2-dimetoxipropano), Ac (acetilo), ACN (acetonitrilo), Bn (bencilo), BnOH (alcohol bencílico), Boc (tert-butoxicarbonilo), Boc_2O (dicarbonato de ditertbutilo), Bz (benzoilo), CSI (isocianato de clorosulfonilo), DBU (1,8-diazabiciclo[5,4,0]undec-7-eno), DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), DCE (1,2-dicloroetano), DCM (diclorometano), DEAD (dietilazodicarboxilato), DIEA (diisopropiletilamina), DMA (N,N-dimetilacetamida), DMAP (4-(N,N-dimetilamino)piridina), DMF (N,N-dimetilformamida), DMSO (dimetil sulfóxido), EDC (clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida), Et (etilo), EtOAc (acetato de etilo), EtOH (etanol), HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), HBTU (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio), HF (fluoruro de hidrógeno), HOAc (ácido acético), HOBT (1-hidroxibenzotriazol hidrato), HPLC (cromatografía líquida de alta presión), IPA (alcohol isopropílico), KHMDS (bis(trimetilsilil)amida de potasio), $(KN(TMS)_2$ (bis(trimetilsilil)amida de potasio), KO^tBu (tert-butóxido de potasio), LDA (diisopropilamida de litio), MCPBA (ácido 3-cloroperibenzoico), Me (metilo), MeCN (acetonitrilo), MeOH (metanol), $NaBH(OAc)_3$ (triacetoxiborohidruro de sodio), $NaCNBH_3$ (cianoborohidruro de sodio), NaH (hidruro de sodio), $NaN(TMS)_2$ (bis(trimetilsilil)amida de sodio), NaOAc (acetato de sodio), NaOEt (etóxido de sodio), Phe (fenilalanina), PPTS (p-toluenosulfonato de piridinio), PS (polímero soportado), Py (piridina), pyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio), TEA (trietilamina), TFA (ácido trifluoroacético), TFAA (anhídrido trifluoroacético), THF (tetrahidrofurano), TLC (cromatografía de capa fina), Tol (toluoilo), Val (valina), y similares.

La preparación de *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida y sus sales se divulga en la solicitud en EE UU No, 12/061.499.

Ejemplo 1: Ácido (7-metanosulfonilamino-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-3-il)-acético

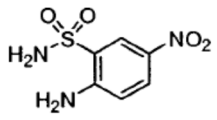


a) 2-Cloro-5-nitrobencenosulfonamida



A una solución de cloruro de tionilo (11 ml) y ácido 2-cloro-5-nitrobencenosulfónico (4,78 g, 20,1 mmoles) se añadió N,N-dimetilformamida (0,92 µl) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 4 horas. La mezcla de reacción se extinguió después cuidadosamente echándola en agua y el producto se aisló por filtración al vacío. El cloruro de sulfonilo se disolvió en una cantidad mínima de tolueno y después se añadió a una mezcla de solución acuosa concentrada de hidróxido de amonio (25 ml) y tetrahidrofurano (25 ml) a -10ºC. Después de agitar durante 2 horas la reacción se extinguió añadiendo solución acuosa de ácido clorhídrico 6,0 M hasta que se alcanzó pH 4,0. Las fases se separaron y la fase orgánica se concentró al vacío a una papilla. Se añadió pentano y el producto se aisló por filtración al vacío para dar 2-cloro-5-nitrobencenosulfonamida (2,0 g, 8,48 mmoles, 42,4%), como un sólido. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 7,94 (d, 1H, *J*= 8,8 Hz), 7,97 (bs, 2H), 8,40 (dd, 1H, J_1 = 8,6 Hz, J_2 = 3,1 Hz), 8,64 (d, 1H, *J*= 3,1 Hz).

b) 2-Amino-5-nitrobencenosulfonamida



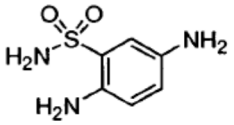
Se cargaron 2-cloro-5-nitrobencenosulfonamida (1,95 kg, 8,30 moles), carbonato de amonio (1,983 kg, 20,64 moles) y sulfato de cobre (II) (394 g, 2,47 moles) en un autoclave y si diluyeron con una solución acuosa de hidróxido de amonio al 30% (11,7 l, 330 moles). La mezcla se calentó a 118ºC durante 3 días y después se enfrió a 23ºC. La mezcla se filtró y los sólidos se lavaron después con agua (20 l). Este sólidos se disolvió en metanol caliente (20 ml/g), y la mezcla se filtró para eliminar los sólidos sin disolver. El filtrado se almacenó a 4ºC durante la noche, y el producto sólido resultante se filtró después. El filtrado se concentró parcialmente por destilación al vacío y, cuando el concentrado se enfrió a 23ºC, el producto sólido se eliminó por filtración. Las dos cosechas de sólido se combinaron y se secaron adicionalmente al vacío a 45ºC para dar el producto deseado 2-amino-5-nitrobencenosulfonamida (1,10

kg, 5,06 moles, 61%), como un sólido. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 6,89 (d, *J*= 9,3 Hz, 1H), 7,12 (bs, 2H), 7,57 (bs, 2H), 8,07 (dd, J_1 = 9,0 Hz, J_2 = 2,6 Hz, 1H), 8,43 (d, *J*= 3,0 Hz, 1H).

De forma alternativa, se puede preparar 2-amino-5-nitrobencenosulfonamida como sigue:

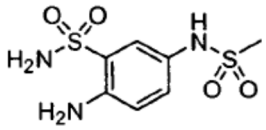
Se resuspendió ácido 2-amino-5-nitrobencenosulfónico (200,00 g, 0,917 moles) en sulfolano templado (250 ml) y la suspensión se calentó a 80ºC. Se añadió oxicloruro de fósforo (126 ml, 1,375 moles) y la mezcla resultante se calentó a 110-120ºC y se agitó durante 4 horas. La solución resultante se enfrió a 60ºC y se añadió gota a gota a una solución acuosa concentrada de hidróxido de amonio (800 ml, 11,9 moles) a <10ºC. El matraz se enjuagó con sulfolano templado (50 ml) y el lavado se añadió a la mezcla de reacción anterior. La suspensión resultante se agitó a 25ºC durante 1 hora, se calentó a 95ºC y se agitó durante 1 hora. La mezcla se enfrió a 80ºC y el pH se ajustó a 6-8 con solución acuosa de ácido clorhídrico 3,0 M (~600 ml) y se dejó enfriar a 25ºC. La suspensión verde oscura se filtró, y la torta del filtro húmeda se lavó con agua (300 ml) y se secó a 60ºC durante la noche para dar el producto crudo (140 g) como un sólido verde-amarillo. El producto crudo se disolvió en solución acuosa de hidróxido de sodio 0,5 M (1,4 l, 0,7 moles). Se añadió carbón (14 g) y la mezcla se calentó a reflujo y se agitó durante 15 minutos, La mezcla se filtró a través de Celite y se lavó con solución acuosa de hidróxido de sodio 0,5 M (100 ml). El pH del filtrado se ajustó a 6-8 con solución acuosa concentrada de ácido clorhídrico (~60 ml) y la suspensión se dejó enfriar a 25ºC. La mezcla se filtró y la torta de filtro húmeda se lavó con agua (200 ml) y se secó a 60ºC durante la noche para dar el producto deseado, 2-amino-5-nitrobencenosulfonamida (130 g, 0,599 moles, 65%) como un polvo amarillo brillante.

c) 2,5-Diaminobencenosulfonamida



Se cargaron 2-amino-5-nitrobencenosulfonamida (5,00 kg, 23,0 moles), metanol (65 l), tetrahidrofurano (65 l) y paladio al 10% sobre carbono (250 g) en un autoclave. La mezcla se cicló con purgas de nitrógeno e hidrógeno (3 ×) y la mezcla se agitó después con hidrógeno (50 psi) a 23ºC durante la noche. El catalizador se eliminó por filtración y el filtrado se concentró después al vacío para dar un sólido marrón. El sólido se secó adicionalmente al vacío a 45ºC para dar el producto deseado 2,5-diaminobencenosulfonamida (4,21 kg, 22,4 moles, 98%), como un sólido. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 4,54 (2H, bs), 4,98 (2H, bs), 6,55 - 6,60 (2H, m), 6,87 (1H, d, *J*= 2,2 Hz), 6,99 (2H, bs). LC-MS (ESI) calculada para $C_6H_9N_3O_2S$ 187,04, determinada 188,3 [$M+H^+$].

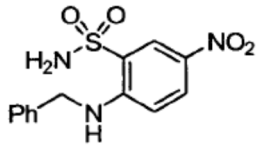
d) 2-Amino-5-metanosulfonilamino-bencenosulfonamida



Se disolvió 2-amino-5-nitrobencenosulfonamida (4,20 kg, 22,4 moles) en diclorometano (120 l) y piridina (8,00 kg, 89,9 moles), y la solución resultante se enfrió a 0ºC. Se añadió lentamente cloruro de metanosulfonilo (2,80 kg, 24,4 moles), y la mezcla resultante se dejó calentar a 23ºC y se agitó durante 2 días. La mezcla se filtró y el sólido resultante se lavó con diclorometano (2 × 20 l). El sólido se diluyó con agua (100 l) y solución acuosa de ácido clorhídrico 1,0 M (25 l), y después se agitó a 23ºC durante 1 hora. La mezcla se filtró y el sólido resultante se lavó con agua (20 l) y después con metil-tert-butil éter (2 × 10 l). El sólido se secó adicionalmente al vacío a 45ºC para dar el producto deseado, 2-amino-5-metanosulfonilamino-bencenosulfonamida (4,39 kg, 16,5 moles, 73%) como un sólido rosa pálido. ^{1}H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ: 2,89 (3H, s), 6,82 (1H, d, *J*= 8,5 Hz), 7,20 (1H, dd, J_1 = 8,5 Hz, J_2 = 2,5 Hz), 7,58 (1H, d, *J*= 2,5 Hz). LC-MS (ESI) calculada para $C_7H_{11}N_3O_4S_2$ 265,02, determinada 266,0 [$M+H^+$].

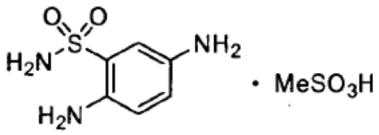
Alternativamente, se puede preparar 2-amino-5-metanosulfonilamino-bencenosulfonamida como sigue:

a') 2-Bencilamino-5-nitro-bencenosulfonamida



Una mezcla de 2-cloro-5-nitro-bencenosulfonamida (2,20 kg, 9,30 moles), bencilamina (1,5 l, 13,9 moles), trietilamina (2,5 l, 18,1 moles), y acetonitrilo (22,0 l) se calentó a 92ºC durante 20 horas. La mezcla se enfrió después a 40ºC, y después se concentró parcialmente al vacío. El residuo se añadió a agua a 0ºC (22,0 l) y la suspensión resultante se dejó calentar a 23ºC y se agitó durante 2 horas. La suspensión se filtró y el sólido se lavó después con agua (5 l). El sólido lavado se resuspendió en etanol absoluto (11 l), y después se filtró y lavó con etanol absoluto (5 l). El sólido se secó adicionalmente al vacío a 45ºC para dar el producto deseado, 2-bencilamino-5-nitro-bencenosulfonamida (2,40 kg, 7,81 moles, 84%), como un sólido amarillo. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 4,64 (2H, d, *J*= 4,6 Hz), 6,81 (1H, d, *J* = 9,4 Hz), 7,23 - 7,44 (6H, m), 7,77 (2H, bs), 8,11 (1H, dd, J_1 = 9.4 Hz, J_2 = 2,3 Hz), 8,49 (1H, d, *J*= 3,1 Hz). LC-MS (ESI) calculada para $C_{13}H_{13}N_3O_4S$ 307,06, determinada 308,2 [M+H$^+$] (100%), 615,2 [2M-H$^+$] (81%).

b') Metanosulfonato de 2,5-diamino-bencenosulfonamida

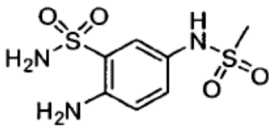


Se añadió lentamente ácido metanosulfónico (465 ml, 7,16 moles) a una solución de 2-bencilamino-5-nitro-bencenosulfonamida (2,20 kg, 7,16 moles) y tetrahidrofurano (11,0 l). La solución resultante se añadió a una mezcla de paladio al 10% sobre carbono (220 g de catalizador húmedo en agua al 50%) y agua (1,1 l) en un reactor de hidrogenación. La mezcla se diluyó adicionalmente con etanol absoluto (21,0 l) y después se hidrogenó con hidrógeno a 55 psi a 50ºC durante 21 horas. Se añadió paladio al 10% sobre carbono (55 g de catalizador húmedo en agua al 50%) adicional, y se siguió la hidrogenación a 55 psi y 50ºC durante 22 horas. La suspensión resultante se diluyó con agua (1,1 l) y la suspensión se filtró después a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se concentró parcialmente al vacío y después se diluyó con acetonitrilo (15,4 l). La solución de nuevo se concentró parcialmente al vació y se diluyó con acetonitrilo (15,4 l). La suspensión resultante se concentró parcialmente al vacío y se dejó agitar a 23ºC durante 2 horas. La suspensión se filtró y el sólido se lavó después con acetonitrilo (3 l). El sólido se secó adicionalmente al vacío a 45ºC para dar el producto deseado metanosulfonato de 2,5-diamino-bencenosulfonamida (1,88 kg, 6,64 moles, 93%). como un sólido púrpura. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 2,34 (3H, s), 6,05 (2H, b), 6,87 (1H, d, J=8,6Hz), 7,20 (1H, dd, J_1 = 8,6Hz,J_2 = 2,3 Hz), 7,38 (2H, s), 7,53 (1H, d, *J*= 2,3 Hz), 9,62 (3H, b). LC-MS (ESI) calculada para $C_6H_9NO_2S$ 187,04, determinada 187,9 [M+H$^+$].

Alternativamente, se puede preparar metanosulfonato de 2,5-diamino-bencenosulfonamida como sigue:

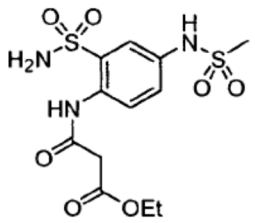
Se resuspendieron 2-amino-5-nitrobencenosulfonamida (preparada como se describe en el ejemplo 1b, 100,00 g, 0,460 moles) y paladio al 5% sobre carbono (húmedo, 5,00 g) en etanol (2 l) y agua (100 ml). Se añadió ácido metanosulfónico (33 ml, 0,51 moles), y la mezcla resultante se calentó a 55ºC y se agitó con hidrógeno atmosférico durante 8 horas. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró al vacío a un volumen de aproximadamente 450 ml. Al concentrado se añadió acetonitrilo (1 l) y la mezcla resultante se agitó a 25ºC durante la noche. La suspensión se filtró para dar el producto deseado, metanosulfonato de 2,5-diamino-bencenosulfonamida (122,36 g, 0,432 moles, 93,8%) como un sólido púrpura.

c') 2-Amino-5-metanosulfonilamino-bencenosulfonamida



Se resuspendió metanosulfonato de 2,5-diamino-bencenosulfonamida (1,80 kg, 6,35 moles) en acetonitrilo (24 l). Se añadió piridina (1,55 l, 19,1 moles), seguido por la adición lenta cuidadosa de cloruro de metanosulfonilo (517 ml, 6,68 moles). Después de agitar a 23ºC durante 20 horas, la mezcla se concentró parcialmente al vacío a 55ºC. Se añadió agua (18 l) al concentrado, y la suspensión resultante se agitó a 23ºC durante 2 horas. El sólido se filtró y después se lavó con agua (4 l) y se secó al aire en el filtro. El sólido se resuspendió en etanol absoluto (9 l), se agitó a 23ºC durante 9 horas, y después se filtró. El sólido se lavó con etanol absoluto (2 × 2 l) y después se secó adicionalmente al vacío a 50ºC para dar el producto deseado, 2-amino-5-metanosulfonilamino-bencenosulfonamida (1,45 kg, 5,48 moles, 86%), como un sólido púrpura.

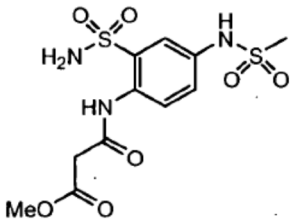
e) Éster etílico del ácido N-(4-metanosulfonilamino-2-sulfamoil-fenil)-malonámico



Se disolvió 2-amino-5-metanosulfonilamino-bencenosulfonamida (23,27 g, 87,81 mmoles) en N,N-dimetilacetamida (100 ml) y éter dietílico (100 ml). Se añadió 3-cloro-3-oxo-propionato de etilo (13,88 g, 92,20 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó a 25ºC durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (400 ml) y se extrajo con agua (400 ml). La fase acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (2 × 200 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y la mayor parte del solvente se eliminó al vacío hasta un volumen de ~100 ml.

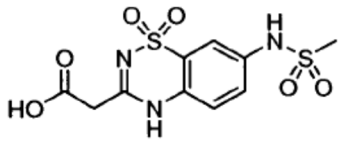
A la solución agitada se añadieron hexanos (~100 ml) tras lo cual se formó un precipitado. El precipitado se recogió por filtración al vacío, se lavó con hexanos y se secó a alto vacío para dar el producto analíticamente puro éster etílico del ácido N-(4-metanosulfonilamino-2-sulfamoil-fenil)-malonámico (31,22 g, 85,53 mmoles, 97,4%), como un sólido marrón claro. ^{1}H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ: 1,31 (3H, t, *J*= 7,0 Hz), 3,00 (3H, s), 3,59 (2H, s), 4,25 (2H, cuatriplete, *J*= 6,9 Hz), 7,42 - 7,45 (1H, m), 7,86 (1H, m), 7,92 (1H, d, *J*= 8,8 Hz).

f) Éster metílico del ácido N-(4-metanosulfonilamino-2-sulfamoil-fenil)-malonámico



Se disolvió 2-amino-5-metanosulfonilamino-bencenosulfonilamida (preparada como se describe en el ejemplo 1d, 1,70 kg, 6,40 moles) en tetrahidrofurano (35 l) y después se enfrió a 0ºC. Se añadió lentamente 3-cloro-3-oxo-propionato de metilo (792 ml, 7,40 moles), y la mezcla resultante se dejó calentar después hasta 23ºC y se agitó durante 2 días. El solvente se eliminó al vacío, y el residuo se diluyó después con agua (4 l) y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (2 l). El sólido resultante se filtró, y después se lavó con agua (5 l). El sólido se resuspendió en metanol caliente (15 ml/g) y después se enfrió a 23ºC y se filtró para dar el producto deseado éster metílico del ácido N-(4-metanosulfonilamino-2-sulfamoil-fenil)-malonámico (1,68 kg, 4,61 moles, 72%), como un sólido marrón. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 3,02 (3H, s), 3,60 (2H, s), 3,66 (3H, s), 7,38 (1H, dd, J_1= 2,3 Hz, J_2 = 8,6 Hz), 7,53 (2H, bs), 7,73 (1H, d, *J*= 2,4 Hz), 7,83 (1H, d, *J*= 8,7 Hz), 9,43 (1H, s), 9,99 (1H, s).

g) Ácido (7-metanosulfonilamino-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-3-il)-acético

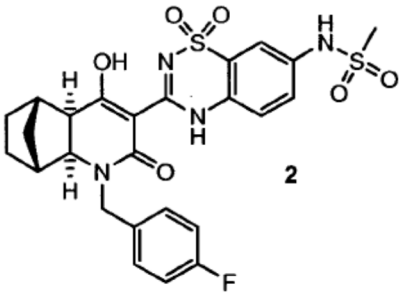


El éster etílico del ácido N-(4-metanosulfonilamino-2-sulfamoil-fenil)-malonámico (preparado como se describe en el ejemplo 1e, 9,55 g, 26,16 mmoles) se disolvió en solución acuosa de hidróxido de sodio al 8% (262 ml) y se calentó a 100ºC durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 0ºC y la solución se acidificó añadiendo lentamente solución acuosa de ácido clorhídrico 12,0 M hasta que se alcanzó pH 1-2. Se empezó a formar un precipitado y la suspensión se dejó agitar durante 30 minutos a 0ºC. El precipitado se recogió por filtración al vacío, se lavó con agua fría, y se secó a alto vacío, para dar el producto puro ácido (7-metanosulfonilamino-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-3-il)-acético (7,20 g, 21,621 mmoles, 82,6%) como un sólido rosado, ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 3,03 (3H, s), 3,56 (2H, s), 7,33 (1H, d, *J*= 9,1 Hz), 7,52 - 7,54 (2H, m), 10,09 (1H, s), 12,24 (1H, s), 13,02 (1H, bs). LC-MS (ESI) calculada parar $C_{10}H_{11}N_3O_6S_2$ 333,01, determinada 334,1 [M+H$^+$].

De forma alternativa, se puede preparar el puro ácido (7-metanosulfonilamino-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-3-il)-acético como sigue:

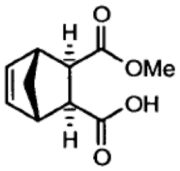
El éster metílico del ácido N-(4-metanosulfonilamino-2-sulfamoil-fenil)-malonámico (preparado como se describe en el ejemplo 1g, 1,35 kg, 3,69 moles) se añadió a solución acuosa de hidróxido de sodio al 3,8% en peso (14,0 kg). La mezcla resultante se agitó a 23ºC durante 30 horas, y después se enfrió a 0ºC. Se añadió lentamente una solución acuosa de ácido clorhídrico 2,0 M (9,72 l), se siguió agitando a 0ºC durante 30 minutos, y la mezcla se filtró después. El sólido se lavó con agua (1,4 l) y después se transformó en papilla en una mezcla de metanol (1,4 l) y éter etílico (2,7 l). Después de filtrar, el sólido se lavó con éter dietílico (2 × 1,4 l) y se secó adicionalmente al vacío a 23ºC para dar el producto deseado ácido (7-metanosulfonilamino-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-3-il)-acético (1,07 kg. 3,21 moles, 87%), como un sólido marrón claro.

Ejemplo 2: *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida



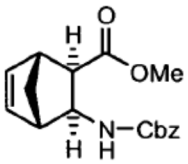
2

a) Ácido (1S,2S,3R,4R)-3-(metoxicarbonil)biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxílico



El material de partida (a) se preparó como se describe en *J. Org. Chem.* **2000,** *65,* 6984-6991. Se resuspendió anhídrido cis-5-norborneno-exo-2,3-dicarboxílico (5 g, 30,45 mmoles) en una mezcla 1:1 de tolueno y tetracloruro de carbono (610 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos. Se añadió quinina (10,87 g, 33,5 mmoles) y el matraz de desgasó y se volvió a llenar con nitrógeno. La solución se enfrió a -55ºC. Mientras se agitaba, se añadió metanol (3,7 ml, 91,35 mmoles). La mezcla se agitó a -55ºC durante 16 horas. Tras calentar a 25ºC, la mezcla se concentró al vacío a una espuma. La espuma se disolvió en una mezcla de acetato de etilo (400 ml) y solución acuosa de ácido clorhídrico 1,0 M (400 ml). Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó adicionalmente con solución acuosa de ácido clorhídrico 1,0 M (2 × 200 ml), solución acuosa saturada de salmuera (100 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y concentró al vacío para dar el producto deseado, ácido (1S,2S,3R,4R)-3-(metoxicarbonil)biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxílico (5,95 g, 3,03 mmoles, 99%), como un aceite transparente. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 1,31 (1H, d, *J* = 8,5 Hz), 1,98 (1H, d, *J*= 8,6 Hz), 2,51 (2H, d, *J*= 1,6 Hz), 2,95 (2H, bs), 3,52 (3H, s), 6,17 - 6,21 (2H, m), 12,16 (1H, s).

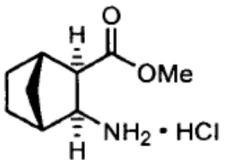
b) (1R,2R,3S,4S)-3-{[(benziloxi)carbonil]amino}biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxilato de metilo



El ácido (1S,2S,3R,4R)-3-(metoxicarbonil)biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxílico (5,9 g, 30 mmoles) se disolvió en tetrahidrofurano anhídrido (133 ml). El matraz se desgasó y se volvió a llenar con nitrógeno y la mezcla se enfrió a 0ºC. Se añadió trietilamina (12,64 ml, 90 mmoles) seguido por la adición gota a gota de cloroformato de etilo (5,72 ml, 60 mmoles) con agitación vigorosa. Se observó precipitación inmediata. La mezda se agitó a 0ºC durante 1 hora. Se disolvió acida sódica (5,86 g, 90 mmoles) en agua (40 ml) y se añadió a la mezcla de reacción a 0ºC. La mezcla se agitó a 0ºC durante 5 minutos. Se eliminó el baño de hielo. La mezcla se calentó a 25ºC y se siguió agitando durante 2 horas. La mezcla se echó en agua (300 ml) y el producto se extrajo en acetato de etilo (300 ml). La fase orgánica se lavó adicionalmente con solución acuosa medio saturada de bicarbonato de sodio (2 × 100 ml), solución acuosa saturada de salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y concentró al vacío para dar un

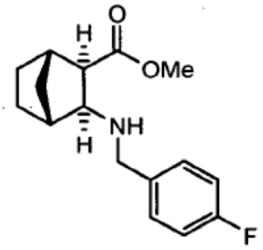
aceite marrón claro. El aceite se disolvió en benceno anhídrido (66 ml) y se sometió a reflujo mientras se agitaba en nitrógeno durante 2 horas. Tras enfriar a 25ºC la solución se concentró al vacío para dar un aceite marrón claro. El aceite se disolvió en diclorometano (40 ml) y se añadió alcohol bencílico (3,41 ml, 33 mmoles) seguido por trietilamina (8,44 ml, 60 mmoles). La mezcla se sometió a reflujo en nitrógeno durante 16 horas. Tras enfriar a 25ºC la solución se concentró al vacío para dar un aceite espeso. La purificación por cromatografía rápida en columna (gel de sílice 60 de Merck, 40-63 µm; 1ª columna: hexanos/acetato de etilo 3:1; 2ª columna: diclorometano/pentano/éter dietílico 2:4:1) dio el producto deseado (1R,2R,3S,4S)-3-{[(benziloxi)carbonil]amino}biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxilato de metilo (6,95 g, 23,09 mmoles 77%), como un aceite amarillo claro. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 1,59 (1H, d, *J*= 9,3 Hz), 1,96 (1H, d, *J*= 9,3 Hz), 2,66 (1H, d, *J*= 7,9 Hz), 2,75 (1H, s), 2,96 (1H, s), 3,59 (3H, s), 4,01 (1H, t, *J*= 8,5 Hz), 5,09 (2H, q, *J*= 10,4 Hz), 5,46 (1H, d, *J*= 9,4 Hz), 6,17 - 6,22 (2H, m), 7,29 - 7,36 (5H, m). LC-MS (ESI) calculada para $C_{17}H_{19}NO_4$ 301,13, determinada 258,1 (100%), 302.2 [M+H$^+$] (70%), 603,5 [2M+H$^+$] (20%).

c) (1S,2R,3S,4R)-3-aminobiciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilato de metilo clorhidrato



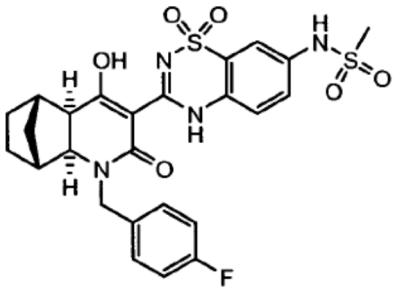
Se disolvió (1R,2R,3S,4S)-3-{[(benziloxi)carbonil]amino}biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxilato de metilo (1 g, 3,32 mmoles) en acetato de etilo (15 ml). Se añadió paladio al 5% sobre carbono (120 mg). El matraz se desgasó y se volvió a llenar con gas hidrógeno a través de un globo. La mezcla se agitó a 25ºC durante 16 horas. La mezcla se pasó a través de un tapón de Celite y el filtrado se concentró al vacío para dar un aceite transparente espeso. El aceite se disolvió en éter dietílico (10 ml) y se añadió gota a gota, con agitación vigorosa, a una mezcla de solución de ácido clorhídrico 4,0 M en 1,4-dioxano (1,8 ml) en éter dietílico (18 ml). El producto deseado empezó a precipitar como un sólido blanco. Se añadió éter dietílico adicional (10 ml) y la mezcla se agitó durante 10 minutos. El precipitado se recogió por filtración al vacío, se lavó con éter dietílico adicional (2 × 8 ml). El sólido se secó adicionalmente la vacío durante 1 hora para dar el producto deseado, (1S,2R,3S,4R)-3-aminobiciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilato de metilo clorhidrato (0,64 g, 3,11 mmoles, 94%). ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 1,17 - 1,27 (3H, m), 1,40 - 1,61 (2H, m), 1,91 (1H, d, *J*= 10,7 Hz), 2,36 (1H, d, *J*= 4,1 Hz), 2,44 (1H, d, *J*= 3,1 Hz), 2,75 (1H, d, *J*=7,8 Hz), 3,30 - 3,38 (1H, m), 3,61 (3H, s), 8,05 (3H, bs). LC-MS (ESI) calculada para $C_9H_{15}NO_2$ (amina libre) 169,11, determinada 170,3 [M+H$^+$] (100%), 339,3 [2M+H$^+$] (50%).

d) (1S,2R,3S,4R)-3-[(4-fluorobenil)amino]biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilato de metilo



Se disolvió (1S,2R,3S,4R)-3-aminobiciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilato de metilo clorhidrato (preparado como se describe en el ejemplo 2c, 0,5 g, 2,43 mmoles) en metanol (12 ml). Se añadió acetato de sodio (0,4 g, 4,86 mmoles) seguido por tamices moleculares en polvo de 4Å (0,5 g) y 4-fluoro-benzaldehído (0,302 g, 2,43 mmoles). Se añadió cianoborohidruro de sodio (0,305 g, 4,86 mmoles) y la mezcla se agitó a 25ºC durante 16 horas. La mezcla se echó en una mezcla de solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (200 ml) y acetato de etilo (300 ml). Después de agitar, ambas fases se pasaron a través de un tapón de Celite. La fase orgánica se lavó adicionalmente con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (100 ml), solución acuosa saturada de salmuera (100 ml) se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró al vacío para dar el producto crudo, (1S,2R,3S,4R)-3-[(4-fluorobenzil)amino]biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilato de metilo (0,663 g, 2,39 mmoles, 98%), como un aceite transparente. LC-MS (ESI) calculada para $C_{16}H_{20}FNO_2$ 277,15, determinada 278,2 [M+H$^+$].

e) *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida

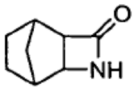


Se disolvió (1S,2R,3S,4R)-3-[(4-fluorobenil)amino]biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilato de metilo (0,6 g, 2,16 mmoles) en N,N-dimetilformamida anhídrida (20 ml). Se añadió ácido (7-metanosulfonilamino-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4tiadiazin-3-il)-acético (preparado como se describe en el ejemplo 1, 0,72 g, 2,16 mmoles) seguido por N-metilmorfolina (0,5 ml, 4,54 mmoles). La mezcla se agitó hasta que se disolvió todo, aproximadamente 5 minutos. Se añadió clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,435 g, 2,27 mmoles) y la mezcla se agitó a 25ºC durante 45 minutos. Se añadió trietilamina (0,91 ml, 6,48 mmoles) y la mezcla se agitó a 50ºC durante 16 horas.

Tras enfriar a 25ºC, la solución se diluyó con acetato de etilo (300 ml) y se lavó con solución acuosa de ácido clorhídrico 1,0 M (3 × 300 ml), solución acuosa saturada de salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró al vacío para dar un aceite dorado. La purificación por cromatografía rápida en columna (gel de sílice 60 de Merck, 40-63 µm, del 0 al 0,75% de metanol en diclorometano) dio el producto como una espuma blanca. La espuma se disolvió en metanol (10 ml) y el producto se precipitó mediante la adición de una solución acuosa de ácido clorhídrico 1,0 M (20 ml) mientras se agitaba. El sólido se recogió mediante filtración al vacío y se secó adicionalmente al vacío para dar el producto deseado, *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida (0,573 g, 1,02 mmoles, 47%), como un polvo blanco. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 1,16 - 1,22 (2H, m), 1,37 - 1,65 (4H, m), 2,49 - 2,53 (1H, m), 2,63 (1H, d, *J*= 2,3 Hz), 3,02 (1H, d, *J*= 8,5 Hz), 3,05 (3H, s), 3,52 (1H, d, *J*= 9,4 Hz), 4,41 (1H, d, *J*= 15,6 Hz), 4,95 (1H, d, *J*= 15,6 Hz), 7,14 (2H, t, *J*=9,0 Hz), 7,32 (2H, dd, J_1= 8,1 Hz, J_2 = 5,7 Hz), 7,50 (1H, dd, J_1= 9,5 Hz, J_2= 2,3 Hz), 7,55 - 7,57 (2H, m), 10,17 (1H, s). LC-MS (EST) calculada para $C_{25}H_{25}FN_4O_6S_2$ 560,12, determinada 561.3 [M+H$^+$]. ee = 90% [Análisis por HPLC: Chiralpak As-RH 2,1 × 150 mm, 5 micrómetros a temperatura ambiente, Solvente A - Solvente B (véase la tabla para el gradiente), 0,3 ml/min, 312 nm, t1 = 4,3 min (principal), t2 = 6,0 min].

De forma alternativa se puede preparar *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida como sigue:

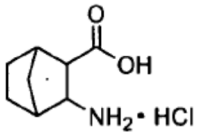
f) (rac-di-exo)-3-aza-triciclo[4.2.1.0^{2,5}]nonan-4-ona



rac-di-*exo*

Se disolvió biciclo[2.2.1]hept-2-eno (1000 g, 10,6 moles) en acetato de etilo (1,7 l) y la solución resultante se enfrió a 0ºC. Se añadió isocianato de clorosulfonilo (969 ml, 11,1 moles) a 0-20ºC durante 30 minutos. La mezcla se dejó calentar a 25ºC y se agitó durante 4 horas, después se enfrió a 0ºC. Una mezcla de sulfito de sodio (1500 g, 11,9 moles) en agua (6 l) se añadió a 0-20ºC. La suspensión lechosa se agitó a 25ºC durante 30 minutos y se enfrió a 0ºC. Se añadió una solución acuosa de hidróxido de sodio al 50% (1,6 l, 30,3 moles) a 0-15ºC para ajustar a pH 7. Se añadió una solución acuosa saturada de carbonato de sodio (300 ml) para ajustar el pH a 7.5-8,0. La mezcla se filtró y el sólido se lavó con acetato de etilo (3 × 2 l) y el sólido se desechó. Los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con solución acuosa saturada de salmuera (2 l), se secaron sobre sulfato de magnesio y se filtraron. La solución se concentró al vacío a sequedad para dar el producto deseado, (rac-di-exo)-3-aza-triciclo[4.2.1.0^{2,5}]nonan-4-ona (1220 g, 8,9 moles, 84%), como un sólido vidrioso blanco. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,02 - 1,11 (2H, m), 1,24 (1H, dt, J_1 = 10,9 Hz, J_2 = 1,6 Hz), 1,51 - 1,72 (3H, m), 2,37 - 2,37 (1H, m), 2,43-2,44 (1H, m), 2,99-3,00 (1H, m), 3,40 (1H, d, *J* = 3,4 Hz), 5,73 (1H, bs).

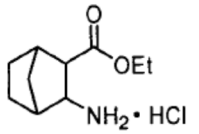
g) Clorhidrato del ácido *(rac-di-exo)-3*-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico



rac-di-*exo*

Se añadió a (rac-di-exo)-3-aza-triciclo[4.2.1.$0^{2,5}$]nonan-4-ona (23,37 g, 170,4 mmoles) una solución acuosa de ácido clorhídrico 12,0 M (150 ml). La mezcla se agitó a 25ºC durante 12 horas. El solvente se evaporó al vacío y el compuesto crudo se secó a alto vacío durante 0,5 horas. El compuesto crudo se trituró y filtró para dar clorhidrato del ácido *(rac-di-exo)-3*-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico (28,43 g, 148,3 mmoles, 87%), como un sólido blanco. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1,15 - 1,26 (3H, m), 1,42 - 1,59 (2H, m), 1,87 (1H, d, *J*= 10,3 Hz), 2,33 (1H, d, *J*= 3,4 Hz), 2,45 (1H, d, *J*= 2,3 Hz), 2,67 (1H, d, *J*= 7,6 Hz), 3,23 - 3,26 (1H, m), 7,93 (3H, bs), 12,73 (1H, bs).

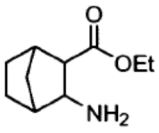
h) Clorhidrato del éster etílico del ácido *(rac-di-exo)-3*-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico



rac-di-*exo*

A etanol absoluto (75 ml) a -10ºC se añadió cloruro de tionilo (4,1 ml, 54,5 mmoles) gota a gota seguido por clorhidrato del ácido *(rac-di-exo)-3*-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico (9,60 g, 50,1 mmoles). La mezcla se agitó a 0ºC durante 1 hora, a 25ºC durante 4 horas, y se calentó a reflujo durante 0,5 horas. La solución se concentró al vacío y se secó a alto vacío para dar el clorhidrato del éster etílico del ácido *(rac-di-exo)-3*-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico crudo (11,01 g, 50,1 mmoles, 100%), como un sólido blancuzco. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1,17 - 1,27 (3H, m), 1,21 (3H, t, *J*= 7,0 Hz), 1,43 - 1,57 (2H, m), 1,91 (1H, d, *J*= 10,0 Hz), 2,36 (1H, d, *J*= 3,9 Hz), 2,42 (1H, d, *J*= 3,0 Hz), 2,72 (1H, d, *J*= 7,6 Hz), 3,28 (1H, d, *J* = *8,3* Hz), 4,00 - 4,13 (2H, m), 8,06 (3H, bs).

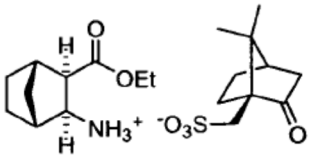
i) Éster etílico del ácido *(rac-di-exo)-3*-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico



rac-di-*exo*

Al clorhidrato del éster etílico del ácido *(rac-di-exo)-3*-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico (11,01 g, 50,1 mmoles) se añadió solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (50 ml) y la mezcla se agitó a 25ºC durante 0,5 horas. El producto crudo se extrajo con acetato de etilo (3 × 100 ml). La solución se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró al vacío y se secó a alto vacío durante 2 horas para dar el éster etílico del ácido *(rac-di-exo)-3*-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico crudo (8,17 g, 44,6 mmoles, 89%), como un aceite marrón. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,10 - 1,26 (3H, m), 1,29 (3H, t, *J*= 7,0 Hz), 1,45 - 1,62 (2H, m), 1,86 (2H, bs), 1,95 (1H, dt, J_1= 10,3 Hz, J_2 = 1,9 Hz), 2,09 (1H, d, *J*= 4,5 Hz), 2,49 (1H, d, *J*= 4,2 Hz), 2,56 (1H, d, *J*= 9,0 Hz), 3,24 (1H, d, *J*=7,7 Hz), 4,09 -4,21 (2H, m).

j) (1'S)-(+)-10-camforsulfonato de (1R,2S,3R,4S)-3-etoxicarbonil-biciclo[2.2.1]hept-2-il-aminio



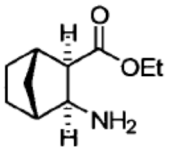
A una solución del éster etílico del ácido *(rac-di-exo)-3*-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico (408,47 g, 2,98 moles) en acetato de etilo (500 ml) se añadió una solución de ácido (1S)-(+)-10-camforsulfónico (691,70 g, 2,98 moles) en etanol (800 ml) a 50-75ºC durante 30 minutos. La solución resultante se agitó a 70ºC durante 1 hora. Se añadió más acetato de etilo (2,7 l) a >55ºC. La solución se dejó enfriar a 50ºC y se sembró con (1'S)-(+)-10-camforsulfonato de (1R,2S,3R,4S)-3-etoxicarbonil-biciclo[2.2.1]hept-2-il-aminio (aprox. 20 mg). La mezcla se dejó

enfriar a 25ºC y se agitó durante 16 horas. La suspensión se filtró y la torta del filtro húmeda se lavó con acetato de etilo (2 × 500 ml). La sal cruda se recristalizó de etanol (600 ml) y acetato de etilo (3 l) para dar el producto deseado, (1'S)-(+)-10-camforsulfonato de (1R,2S,3R,4S)-3-etoxicarbonil-biciclo[2.2.1]hept-2-il-aminio (334,84 g, 0,806 moles, 27%, >99,5% ed), como un sólido blanco. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0,84 (3H, s), 1,08 (3H, s), 1,30 (3H, t, *J*= 6,9 Hz), 1,32-1,43 (4H, m), 1,58-1,75 (3H, m), 1,89 (1H, d, *J*= 17,7 Hz), 1,95-2,07 (3H, m), 2,33 (1H, dt, J_1 = 18,4 Hz, J_2 = 3,9 Hz), 2,53 (1H, s), 2,58-2,65 (1H, m), 2,69 (1H, d, *J* = 2,9 Hz), 2,76-2,79 (2H, m), 3,26 (1H, d, *J*= 14,1 Hz), 3,60 (1H, d, *J*= 7,4 Hz), 4,14-4,27 (2H, m), 7,80 (3H, bs).

De forma alternativa se puede preparar el (1'S)-(+)-10-camforsulfonato de (1R,2S,3R,4S)-3-etoxicarbonil-biciclo[2.2.1]hept-2-il-aminio como sigue:

Se disolvió (rac-di-exo)-3-aza-triciclo[4.2.1.0^{2,5}]nonan-4-ona (preparada como se describe en el ejemplo 2f, 1220 g, 8,9 moles) en acetato de etilo (1,7 l). La solución se calentó a 50ºC y una solución de ácido (1S)-(+)-10-camforsulfónico (2066 g, 8,9 moles) en etanol (2,5 l) a 50-75ºC durante 30 minutos. La solución resultante se agitó a 70ºC durante 2 horas. Se añadió más acetato de etilo (8 l) produciendo que la temperatura cayera a >55ºC y la solución se sembró con (1'S)-(+)-10-camforsulfonato de (1R,2S,3R,4S)-3-etoxicarbonil-biciclo[2.2.1]hept-2-il-aminio (aprox. 100 mg). La mezcla se dejó enfriar a 25ºC y se agitó durante 16 horas. El precipitado se recogió por filtración y la torta del filtro húmeda se lavó con acetato de etilo (2 × 2 l). La sal cruda se secó a 25ºC durante 48 horas y después se recristalizó de etanol (2 l) y acetato de etilo (2,5 l) para dar el producto deseado, (1'S)-(+)-10-camforsulfonato de (1R,2S,3R,4S)-3-etoxicarbonil-biciclo[2.2.1]hept-2-il-aminio (920 g, 2,21 moles, 25%, >99,9% ed), como un sólido blanco.

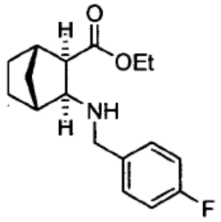
k) Éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico



Al (1'S)-(+)-10-camforsulfonato de (1R,2S,3R,4S)-3-etoxicarbonil-biciclo[2.2.1]hept-2-il-aminio (2,76 g, 6,64 moles) se añadió acetato de etilo (28 ml) y solución acuosa saturada de carbonato de sodio (28 ml) y la mezcla se agitó a 25ºC durante 0,5 horas. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 × 50 ml). La solución se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró al vacío y se secó a alto vacío durante 1 hora para dar el éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico (1,15 g, 6,28 mmoles, 95%) como un aceite incoloro. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,10 -1,26 (3H, m), 1,29 (3H, t, *J*= 7,0 Hz), 1,45 - 1,62 (2H, m), 1,86 (2H, bs), 1,95 (1H, dt, J_1 = 10,3 Hz, J_2 = 1,9 Hz), 2,09 (1H, d, *J*=4,5 Hz), 2,49 (1H, d, *J*= 4,2 Hz), 2,56 (1H, d, *J*= 9,0 Hz), 3,24 (1H, d, *J*= 7,7 Hz), 4,09 - 4,21 (2H, m).

Para determinar el exceso enantiomérico, el éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico se derivó a la sal (S)-mandelato como sigue: A una solución del éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico (34,2 mg, 0,187 mmoles) en acetato de etilo (1 ml) se añadió ácido (S)-α-hidroxifenilacético (28,7 mg, 0,187 mmoles) y la mezcla se agitó a 25ºC durante 0,5 horas. El sólido se filtró a alto vacío para dar (S)-α-hidroxifenilacetato de (1R,2S,3R,4S)-3-etoxicarbonil-biciclo[2.2.1]hept-2-il-aminio (11,4 mg, 0,034 mmoles, 18%, ed = 97%) como un sólido blanco. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,08 - 1,20 (3H, m), 1,28 (3H, t, *J*= 7,1 Hz), 1,50 -1,59 (2H, m), 1,79 (1H, d, *J*= 10,9 Hz), 2,23 (1H, s), 2,46 - 2,48 (2H, m), 3,04 (1H, d, *J*= 7,8 Hz), 4,05 - 4,18 (2H, m), 4,89 (1H, s), 5,49 (3H, bs), 7,22 - 7,31 (3H, m), 7,43 (2H, d, *J*= 6,9 Hz).

l) Éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-(4-fluorobencilamino)-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico



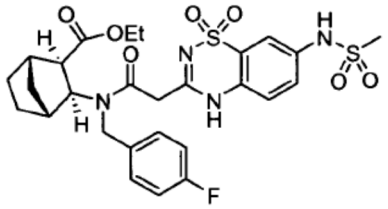
A una solución del éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-amino-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico (1,15 g, 6,28 mmoles) en etanol (30 ml) se añadió 4-fluorobenzaldehído (0,68 ml, 6,31 mmoles), ácido acético glacial (0,4 ml, 6,99 mmol) y cianoborohidruro de sodio (1,04 g, 15,7 mmoles) a 25ºC. Después de agitar durante 3 horas, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (50 ml) y se extinguió con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (50 ml) durante 0,5 horas. La mezcla se filtró a través de Celite. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con

acetato de etilo (2 × 50 ml). Cuando todo el solvente se eliminó, se formó un sólido. El sólido se filtró, se lavó con agua, y se secó al vacío para dar el producto deseado, el éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-(4-fluorobencilamino)-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico (1,74 g, 5,97 mmoles, 95%), como un sólido blanco. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,05 - 1,16 (2H, m), 1,21 (1H, dt, J_1= 8,0 Hz, J_2= 1,6 Hz), 1,27 (3H, t, J= 7,4 Hz), 1,45 - 1,61 (2H, m), 1,94 (1H, dt, J_1= 10,1 Hz, J_2 = 1,9 Hz), 2,28 (1H, d, J= 3,9 Hz), 2,43 (1H, d, J= 3,3 Hz), 2,60 (1H, dd, J_1 = 8,8 Hz, J_2= 1,5 Hz), 2,94 (1H, d, J= 7,8 Hz), 3,66 (1H, d, J= 13,2 Hz), 3,80 (1H, d, J= 13,5 Hz), 4,13 (2H, q, J= 7,0 Hz), 6,97 (2H, t, J= 8,5 Hz), 7,26 (2H, t, J= 7,1 Hz).

De forma alternativa, se puede preparar el éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-(4-fluorobencilamino)-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico como sigue:

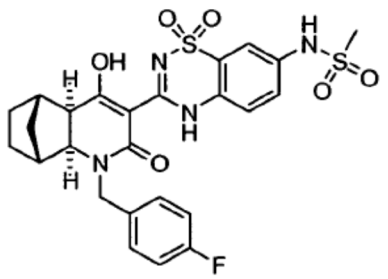
Se resuspendieron (1'S)-(+)-10-camforsulfonato de (1R,2S,3R,4S)-3-etoxicarbonil-biciclo[2.2.1]hept-2-il-aminio (preparado como se describe en el ejemplo 2j, 2000 g, 4,81 moles) y carbonato de potasio en polvo (1320 g, 9,62 moles) en acetato de etilo (20 l). La suspensión se agitó a 25ºC durante 16 horas y se filtró. El filtrado de acetato de etilo se concentró al vacío para dar la amina libre (1050 g) como un líquido. El líquido se disolvió en etanol (10 l) y se añadieron 4-fluoroaldehído (558 ml, 5,3 moles) y ácido acético (362 ml, 6,3 moles), produciendo que la temperatura subiera a 28-30ºC. La solución se dejó enfriar a 25ºC y se agitó durante 30 minutos. Se añadió una solución turbia de cianoborohidruro de sodio (756 g, 12,03 moles) en etanol (5 l) en 20 minutos, produciendo que la temperatura subiera a 45-50ºC. La mezcla se dejó enfriar a 25ºC y se agitó durante 16 horas. La mezcla se concentró al vacío a un volumen de aproximadamente 13-14 l. Se añadió agua (1-2 l), y la mezcla resultante se concentró al vacío adicionalmente. Se añadieron una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (4 l) y agua (4 l) con agitación. El pH se ajustó a 8,0-8,5 añadiendo solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio adicional (~500 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora antes de que se recogieran los sólidos por filtración y la torta del filtro húmeda se lavó con agua (2 l). El sólido se secó al vacío a 35ºC durante 64 horas para dar el producto deseado, éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-(4-fluorobencilamino)-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico (1350 g, 4,63 moles, 96%), como un sólido blanco.

m) Éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-{(4-fluorobencil)-[2-(7-metanosulfonilamino-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-3-il)-acetil]-amino}-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico



A una solución del éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-(4-fluorobencilamino)-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico (100,6 mg, 0,345 mmoles) en N,N-dimetilformamida (3,0 ml) se añadió ácido (7-metanosulfonilamino-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-3-il)-acético (preparado como se describe en el ejemplo 1, 120,8 mg, 0,362 mmoles), 4-dimetilaminopiridina (10,6 mg, 0,086 mmoles) y clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (70,9 mg, 0,362 mmoles). Después de agitar a 25ºC durante 12 horas, la mezcla se diluyó con acetato de etilo y se acidificó con solución acuosa de ácido clorhídrico 1,0 M a pH 1. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 × 20 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y concentró al vacío, y se secó a alto vacío para dar el producto crudo, éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-{(4-fluorobencil)-[2-(7-metanosulfonilamino-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-3-il)-acetil]-amino}-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico, como un aceite ligeramente amarillo. El producto crudo se usó en el siguiente paso sin purificación adicional. LC-MS (ESI) calculada para $C_{27}H_{31}FN_4O_7S_2$ 606,16, determinada 607,2 [M+H$^+$].

n) *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida

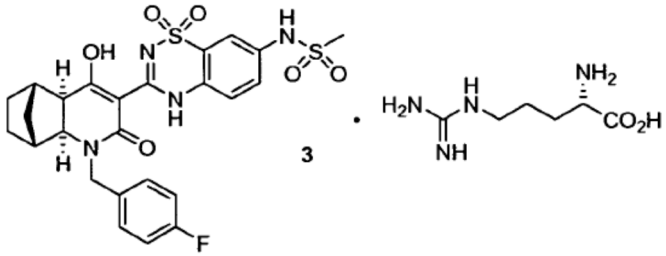


A una solución del éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-{(4-fluorobencil)-[2-(7-metanosulfonilamino-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-3-il)-acetil]-amino}-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico crudo en etanol absoluto (3 ml) se añadió una solución al 21% en peso de etóxido de sodio en etanol (0,51 ml, 1,37 mmoles). Después de agitar a 60ºC durante 2 horas, la mezcla se diluyó con acetato de etilo y se acidificó con solución acuosa de ácido clorhídrico 1,0 M a pH 1. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 × 20 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y concentró al vacío. La mezcla cruda se purificó mediante cromatografía rápida en columna (columna Teledyne Isco RediStep; acetato de etilo del 0 al 100% en hexanos) para dar el producto deseado, *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida (131,5 mg, 0,235 mmoles, 68% sobre dos pasos), como un sólido blancuzco. ^{1}H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 1,28 (2H, d, *J*= 11,0 Hz), 1,47 (1H, t, *J*= 10,8 Hz), 1,57 - 1,74 (3H, m), 2,56 (1H, d, *J*= 3,2 Hz), 2,75 (1H, d, *J*= 2,3 Hz), 2,96 (1H, d, *J*= 9,2 Hz), 3,02 (3H, s), 3,58 (1H, d, *J*= 9,2 Hz), 4,42 (1H, d, *J*= 15,5 Hz), 5,03 (1H, d, *J* = 15,7 Hz), 7,04 (2H, t, J= 8,5 Hz), 7,31 (2H, dd, J_1 = 7,9 Hz, J_2= 5,5 Hz), 7,37 (1H, d, *J* = 8,8 Hz), 7,54 (1H, dd, J_1 = 8,3 Hz, J_2 = 2,3 Hz), 7,69 (1H, d, *J*= 2,3 Hz). LC-MS (ESI) calculada para $C_{25}H_{25}FN_4O_6S_2$ 560,12, determinada 561,4 [M+H$^+$]. ee = 98,5% [Análisis por HPLC: Chiralpak As-RH 2,1 × 150 mm, 5 micrómetros a temperatura ambiente, Solvente A - Solvente B (véase la tabla para el gradiente), 0,3 ml/min, 312 nm, t1 = 7,58 min (principal), t2 = 8,95 min].

De forma alternativa, se puede preparar *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida como sigue:

Se disolvieron ácido (7-metanosulfonilamino-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-3-il)-acético (preparado como se describe en el ejemplo 1g, 1,88 kg, 5,63 moles) y éster etílico del ácido (1S,2R,3S,4R)-3-(4-fluoro-bencilamino)-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxílico (preparado como se describe en el ejemplo 2l, 1,72 kg, 5,91 moles) en acetonitrilo (18,8 l) a 23ºC. Se añadió N-metilmorfolina (1,25 kg, 12,4 moles) y la suspensión resultante se agitó a 23ºC durante 1 hora. La suspensión se enfrió a 0ºC y se añadió clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (1,19 kg, 6,20 moles) de una vez. La mezcla se agitó a 0ºC durante 3 horas, y después se dejó calentar a 23ºC y se agitó durante la noche. Se añadió trietilamina (1,88 kg, 18,6 moles) y la mezcla se calentó después a 50ºC durante 3 horas. La mezcla se concentró parcialmente al vacío a 45ºC, y después se diluyó con acetato de etilo (22,5 l) y se lavó con solución acuosa de ácido clorhídrico 2,0 M (22,6 l). La fracción acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo (2 × 9,4 l). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución acuosa de ácido clorhídrico 1,0 M (10,4 l) y después con agua (18,8 l). La fracción orgánica resultante se filtró a través de Celite (600 g) y el filtrado se concentró después parcialmente al vacío a 45ºC. Se añadió etanol absoluto (5,6 l) al residuo, y la mezcla se calentó después a 50ºC con agitación. Se añadió diclorometano (400 ml) en porciones hasta que se inició la cristalización. Se añadió etanol absoluto (20,7 l) en porciones durante 1 hora, y la mezcla resultante se agitó a 23ºC durante la noche. La mezcla se filtró y el sólido se lavó después con etanol absoluto (1,9 l). El sólido se secó adicionalmente al vacío a 45ºC para dar el producto deseado, *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida (2,46 kg, 4,39 moles, 78%), como un sólido cristalino blancuzco.

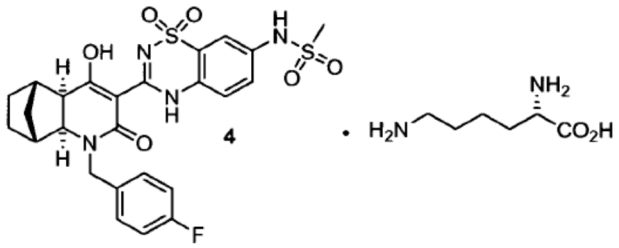
Ejemplo 3: *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de L-arginina



Se disolvió *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida (preparada como se describe en el ejemplo 2, 0,280 g, 0,499 mmoles) en acetonitrilo (5,0 ml). Se añadió una solución acuosa de L-arginina 0,1 M (3,0 ml, 0,3 moles), que fue seguido por la adición de una solución 0,1 M de L-arginina en 1-propanol (2,0 ml, 0,2 mmoles). Después de agitar durante 6 horas a 23ºC, el matraz se abrió a la atmósfera y la suspensión se agitó durante 16 horas. El sólido se recogió por filtración y se secó adicionalmente al vacío a 23ºC para dar el producto deseado, *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de L-arginina, monohidrato (0,257 g, 0,341 mmoles, 68%), como un sólido cristalino. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ: 0,96 - 1,17 (2H, m), 1,28 (1H, t ap., *J*= 10,0 Hz), 1,35 - 1,82 (7H, m), 2,33 (1H, d ap., *J*= 3,0 Hz), 2,43 (1H, d, *J*= 9,3 Hz), 2,97 (3H, s), 3,00 - 3,17 (2H, m), 3,23 (1H, d, *J*= 9,3 Hz), 4,21 (1H, d, *J*= 15,3 Hz), 4,94 (1H, d, *J* = 15,3 Hz), 7,04 - 7,15 (3H, m), 7,27 (2H, dd, *J*= 5,7, 8,7 Hz), 7,35 (1H, dd, *J*=

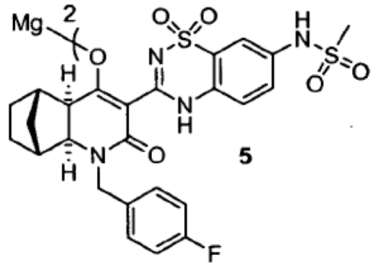
2,5, 8,9 Hz), 7,35 - 7,51 (4H, m), 8,82 (1H, br s), 15.29 (1H, br s). Anal. calculado para $C_{31}H_{39}FN_8O_8S_2 \cdot H_2O$: C, 49,46; H, 5,49; N, 14,88; O, 19,13; S, 8,52; F, 2,52; determinado: C, 49,49; H, 5,23; N, 14,96; O, 18,69; S, 8,82; F, 2,81. p.f. = 216 °C (DSC).

Ejemplo 4: *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de L-lisina



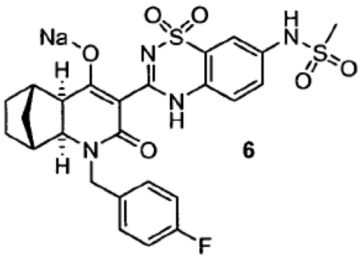
Se disolvió *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida (preparada como se describe en el ejemplo 2, 0,090 g, 0,160 mmoles) en acetonitrilo (2,5 ml). Se añadió una solución acuosa de L-lisina (0,469 ml de una solución 50 mg/ml en agua, 0,160 moles). El solvente se dejó evaporar bajo un flujo de nitrógeno y se añadió etanol (0,5 ml). La mezcla se agitó a 35ºC durante 2 días, y después se sumergió en un baño ultrasónico. Se añadió agua (0,5 ml), y la mezcla se agitó a 23ºC para dar el producto deseado *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de L-lisina, monohidrato (0,070 g, 0,096 mmoles, 60%), como un sólido cristalino. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ: 0,96 - 1,15 (2H, m), 1,22 - 1,76 (10H, m), 2,34 (1H, d ap., *J*= 2,7 Hz), 2,43 (1H, d, *J*= 9,3 Hz), 2,74 - 2,78 (2H, m), 2,97 (3H, s), 3,18 - 3,29 (1H, m), 4,21 (1H, d, *J*= 15,3 Hz), 4,95 (1H, d, *J*= 15,6 Hz), 7,07 - 7,18 (3H, m), 7,27 (2H, dd, *J*= 5,7, 8,7 Hz), 7,36 (1H, dd, *J*= 2,4, 8,7 Hz), 7,44 (1H, d, *J*= 2,4 Hz), 15,31 (1H, br s). Anal. calculado para $C_{31}H_{39}FN_6O_8S_2 \cdot H_2O$: C, 51,37; H, 5,70; N, 11,59; O, 19,87; S, 8,85; F, 2,62; determinado: C, 51,13; H, 5,52; N, 11,63; O, 20,07; S, 9,20; F, 2.71. p.f. = 200 °C (DSC).

Ejemplo 5: *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de hemimagnesio



Se disolvió *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida (preparada como se describe en el ejemplo 2, 0,465 g, 0,829 mmoles) en acetona (9,0 ml). Se añadió una solución al 7-8% en peso de metóxido de magnesio en metanol (0,593 ml, 0,414 mmoles). El solvente se evaporó, y el residuo se diluyó después con agua (0,9 ml) y acetona (1,8 ml). La mezcla resultante se agitó a 23ºC durante 16 horas. El sólido se recogió por filtración y se secó adicionalmente al vacío a 23ºC para dar el producto deseado, *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de hemimagnesio, trihidrato (0,377 g, 0,602 mmoles, 73%), como un sólido cristalino. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ: 0,96 - 1,17 (2H, m), 1,22 - 1,58 (4H, m), 2,33 (1H, br s), 2,44 (1H, d, *J*= 9,6 Hz), 2,98 (3H, s), 3,23 (1H, d, *J*= 9,3 Hz), 4,21 (1H, d, *J*= 14,7 Hz), 4,94 (1H, d, *J*= 15,3 Hz), 7,03 - 7,19 (3H, m), 7,21 - 7,48 (4H, m), 9,81 (1H, br s), 15,35 (1H, br s). Anal. calculado para $C_{25}H_{24}N_4O_6FS_2 \cdot 0.5\ Mg \cdot 3\ H_2O$: C, 47,98; H, 4,83; N, 8,95; O, 23,01; S, 10,25; F, 3,04; Mg, 1,94; determinado: C, 47,66; H, 4,89; N, 8,98; O, 23,00; S, 11,36; F, 3,09; Mg, 1,82. p.f. = 184 °C (DSC).

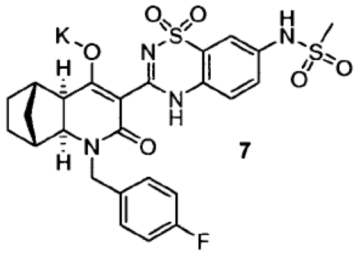
Ejemplo 6: *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de sodio



6

Se resuspendió *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida (preparada como se describe en el ejemplo 2, 0,407 g, 0,726 mmoles) en etanol (11,0 ml). Se añadieron una solución acuosa de hidróxido de sodio 1,0 M (0,726 ml, 0,726 mmoles) y agua (1,0 ml). La mezcla se sembró con un cristal de *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de sodio (producida de un lote separado), y la mezcla se agitó después a 23ºC durante 1 día. El sólido se recogió por filtración y se secó adicionalmente al vacío para dar el producto deseado, *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de sodio, hidrato (2,25 equiv. molar en agua) (0,235 g, 0,377 mmoles, 52%), como un sólido cristalino. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ: 0,99 - 1,11 (2H, m), 1,28 (1H, t ap., *J*= 10,2 Hz), 1,36 - 1,53 (3H, m), 2,33 (1H, d ap., *J*= 2,7 Hz), 2,42 (1H, d, J= 9,3 Hz), 2,97 (3H, s), 3,22 (1H, d, *J*= 9,3 Hz), 4,20 (1H, d, *J*= 15,3 Hz), 4,95 (1H, d, *J*= 15,3 Hz), 7,09 - 7,16 (3H, m), 7,25 - 7,36 (3H, m), 7,42 (1H, d, *J*=2,4 Hz), 9,79 (1H, s), 15,32 (1H, s). Anal. calculado parar $C_{25}H_{24}FN_4NaO_6S_2 \cdot 2{,}25\ H_2O$: C, 48,19; H, 4,61; N, 8,99; O, 21,18; S, 10,29; F, 3,05; Na, 3,69; determinado: C, 48,14; H, 4,67; N, 8,97; O, 21,07; S, 10,25; F, 3,13; Na, 3,87. p.f. = 182-188 °C (DSC).

Ejemplo 7: *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de potasio



7

Se disolvió *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida (preparada como se describe en el ejemplo 2, 0,281 g, 0,501 mmoles) en metil-etil-cetona (8,0 ml). Se añadió una solución acuosa de hidróxido de potasio 0,5 M (1,0 ml, 0,500 mmoles). La solución se sembró con *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de potasio cristalino (producida de un lote separado), y la mezcla se agitó después a 23ºC durante 3 horas. El sólido se recogió por filtración y se secó adicionalmente al vacío para dar el producto deseado, *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^{6}-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, sal de potasio, hidrato (0,75 equiv. molar en agua) (0,127 g, 0,207 mmoles, 41%), como un sólido cristalino. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ: 0,99 - 1,11 (2H, m), 1,27 (1H, t ap., *J*= 10,3 Hz), 1,36 - 1,54 (3H, m), 2,33 (1H, br s), 2,42 (1H, d, *J*= 9,0 Hz), 2,95 (3H, s), 3,22 (1H, d, *J*= 9,3 Hz), 4,20 (1H, d, *J* = 15,3 Hz), 4,96 (1H, d, *J* = 15,6 Hz), 7,09 - 7,15 (3H, m), 7,25 -7,34 (3H, m), 7,41 (1H, d, *J*= 2,7 Hz), 9,84 (1H, br s), 15,30 (1H, s). Anal. calculado para $C_{25}H_{24}FKN_4O_6S_2 \cdot 0{,}75\ H_2O$: C, 49,05; H, 4,20; N, 9,15; O, 17,64; S, 10,48; F, 3,10; K, 6,39; determinado: C, 48,82; H, 4,11; N, 9,06; O, 17,35; S, 10,37; F, 3,18; K, 6,75. p.f. = 278 °C (DSC).

Ensayos biológicos

Se puede demostrar la capacidad de los compuestos de inhibir la replicación del VHC en los siguientes ensayos *in vitro*.

Protocolo del ensayo de replicón de VHC basado en luciferasa

El componente de cultivo celular del ensayo se realiza esencialmente como se describe en Bartenschlager et al., *Hepatology,* 2002, *35,* 694-703, en donde se siembran células Huh-luc/neo-ET con VHC en crecimiento exponencial a 6 × 10^{3} células/pocillo en una placa de ensayo de 96 pocillos. 24 horas después las células se tratan con varias

concentraciones del compuesto o combinación de compuestos en triplicado usando tanto relaciones fijas como matrices en cuadrícula de los agentes de prueba y se cultivan durante 72 horas. La actividad luciferasa en los pocillos se determina usando el reactivo Bright-Glo (Promega, Madison, Wisconsin) con un luminómetro (Wallac 1420 Multilabel HTS Counter Víctor 2). El control de fondo es células con replicón tratadas con BILN-2061 100 nM, un inhibidor de la proteasa del VHC. Se determina el % de inhibición para cada concentración de compuesto o combinación de compuestos respecto al control negativo (sin compuesto) para calcular la CE_{50}. En el caso de ANA773, medios acondicionados de PBMC humanas de múltiples donantes se juntan después del tratamiento con 100 µM del activo de ANA773 durante 24 horas.

Evaluación de combinaciones de agentes

Se evaluó el compuesto **2** en combinación con interferón α-2a, Telaprevir (inhibidor de la proteasa NS3/4 del VHC, también conocido como VX-950), PSI-6130 el agente activo de R7128 (inhibidor nucleosídico de NS5B de VHC) y ANA773 (agonista de TLR7). Se determina la concentración inhibidora del 50% (CE_{50}) de cada compuesto o combinación de compuestos independientemente para determinar el intervalo de concentraciones usado para caracterizar la interacción de dos agentes en la inhibición del replicón del VHC. Cada compuesto se prueba individualmente y en combinación en diluciones en serie de dos o tres veces por encima y por debajo de la CE_{50}. La relación de los dos compuestos probados o bien permaneció fija o varía a lo largo del intervalo de dosificación para explorar la mayor superficie de combinación.

Los datos de las combinaciones se analizan usando CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, Mo.), un programa informático basado en el método de Chou y Talalay, *J. Biol. Chem.,* 1977, 252, 6438-64442. Se calculan los valores del índice de combinación (IC) para cada combinación experimental a los niveles de CE_{50}, CE_{75}, y CE_{90}. Valores del IC de <1, 1 y >1 indican sinergia, un efecto aditivo y antagonismo, respectivamente.

En general, las combinaciones que son ampliamente antagonísticas no son adecuadas para terapia de combinación in vivo. Las combinaciones que son sinérgicas o aditivas pueden ofrecer mayor beneficio que el esperado por la acción de los agentes individuales solo. La combinación del compuesto 2 con interferón α-2a (IFN), un componente del estándar de ayuda actual, produce un aumento sustancial en potencia comparado con cada agente dosificado independientemente (figura 1). Un análisis de los datos de combinación mediante CalcuSyn demuestra una interacción sinérgica con un índice IC de 0,2±0,04 (tabla 1).

Tabla 1. Efectos de combinación del compuesto **2** con otros agentes.

Agentes[a]	Índice de combinación (IC)[b] de CalcuSyn
	CE_{90} ± DE
IFN/Compuesto **2**	0,2 ±0,04
PSI-6130/Compuesto **2**	0,5 ±0,2
Telaprevir/Compuesto **2**	0,7 ± 0,4
ANA773/Compuesto **2**	0,8 ±0,1

[a] Las relaciones de concentraciones fijas descritas son condiciones donde las concentraciones iniciales de ambos agentes están 10 veces por encima de sus valores de CE_{50}.
[b] Valores de IC entre 0,90 y 1,10 = aditivo; <0,90 = sinergia; >1,10 = antagonismo.

La combinación del compuesto **2** con los agentes antivirales directos, PSI-6130 y Telaprevir se muestran en las figuras 2 y 3 donde se evalúa la respuesta a la dosis de PSI-6130 y Telaprevir cada una en presencia de concentraciones fijas del compuesto **2**. Las curvas de respuesta a la dosis en las figuras 2a y 3a ilustran que a bajas concentraciones de PSI-6130 o Telaprevir, el % de inhibición está dictado por la cantidad de compuesto **2** presente. La normalización de los datos de inhibición permite que el efecto del compuesto **2** sobre la actividad de los otros agentes antivirales directos se observe claramente. A concentraciones fácilmente alcanzadas clínicamente, la presencia del compuesto **2** aumenta la potencia tanto de PSI-6130 (4-5 veces) como de Telaprevir (2-3 veces), véase las figuras 2b, 3b y la tabla 2.

Tabla 2. Efecto antiviral de PSI-6130 y Telaprevir combinados con el compuesto 2

Compuesto **2** (ng/ml)	CE_{90}, µM
	PSI-6130
0	11,6
6	6,0
17	2,4
	Telaprevir
0	2,8
6	2,4
17	1,9
170	1,3

La evaluación de los datos de combinación del compuesto **2** con PSI-6130, Telaprevir y ANA773 mediante CalcuSyn demuestra interacciones sinérgicas con índices IC <1 determinados para todas las combinaciones (véase la tabla 1).

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para inhibir la replicación del virus de la hepatitis C que comprende exponer el virus de la hepatitis C a una cantidad terapéuticamente eficaz de de una composición que comprende *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, o una sal o hidrato de la misma, y una composición que comprende uno o más compuestos antivirales adicionales seleccionados del grupo que consiste en: VBY-376, BMS-650032, MK-7009, TMC-435350, BI-201335, GS-9190, MK-3281, VCH-759, VCH-916, ABT-333, BMS-791325, PF-00868554, IDX-184, RG7128, PSI-6130, BMS-790052, y ANA773.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el virus de la hepatitis C está en una célula humana.

3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho uno o más compuestos antivirales adicionales es PSI-6130.

4. Una combinación de (i) una composición que comprende *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, o una sal o hidrato de la misma, y (ii) una composición que comprende uno o más compuestos antivirales adicionales seleccionados del grupo que consiste en: VBY-376, BMS-650032, MK-7009, TMC-435350, BI-201335, GS-9190, MK-3281, VCH-759, VCH-916, ABT-333, BMS-791325, PF-00868554, IDX-184, RG7128, PSI-6130, BMS-790052, y ANA773 para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por el virus de la hepatitis C.

5. La combinación para uso según la reivindicación 4, en donde el sujeto es un ser humano.

6. La combinación para uso según las reivindicaciones 4 o 5, en donde en el uso en el tratamiento o la prevención de una infección por el virus de la hepatitis C las composiciones se administran por separado.

7. La combinación para uso de las reivindicaciones 4-6, en donde dicho uno o más agentes antivirales adicionales se seleccionan de MK-7009, TMC-435350, BI-201335, PF-00868554, IDX-184, RG7128, PSI-6130, BMS-790052, y ANA773.

8. La combinación para uso de la reivindicación 7, en donde dicho uno o más compuestos antivirales adicionales es PSI-6130.

9. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de de una composición que comprende *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, o una sal o hidrato de la misma, y una composición que comprende uno o más compuestos antivirales adicionales seleccionados del grupo que consiste en: VBY-376, BMS-650032, MK-7009, TMC-435350, BI-201335, GS-9190, MK-3281, VCH-759, VCH-916, ABT-333, BMS-791325, PF-00868554, IDX-184, RG7128, PSI-6130, BMS-790052, y ANA773 y un soporte farmacéuticamente aceptable.

10. La composición de la reivindicación 9, en donde dicho uno o más agentes antivirales adicionales se seleccionan de MK-7009, TMC-435350, BI-201335, PF-00868554, IDX-184, RG7128, PSI-6130, BMS-790052, y ANA773.

11. La composición de la reivindicación 10, en donde dicho uno o más compuestos antivirales adicionales es PSI-6130.

12. La composición de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la sal de *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-1λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida se selecciona del grupo que consiste en: L-arginina, L-lisina, hemimagnesio, sodio y potasio.

13. La combinación para uso de la reivindicación 4, en donde la combinación es una combinación de (i) *N*-{3-[(1R,2S,7R,8S)-3-(4-fluoro-bencil)-6-hidroxi-4-oxo-3-aza-triciclo[6.2.1.$0^{2,7}$]undec-5-en-5-il]-1,1-dioxo-1,4-dihidro-λ^6-benzo[1,2,4]tiadiazin-7-il}-metanosulfonamida, y (ii) una composición que comprende PSI-6130.

14. La combinación para uso según la reivindicación 13, en donde el sujeto es un ser humano.

15. La combinación para uso según las reivindicaciones 13 o 14, en donde en el uso en el tratamiento o la prevención de una infección por el virus de la hepatitis C las composiciones se administran por separado.

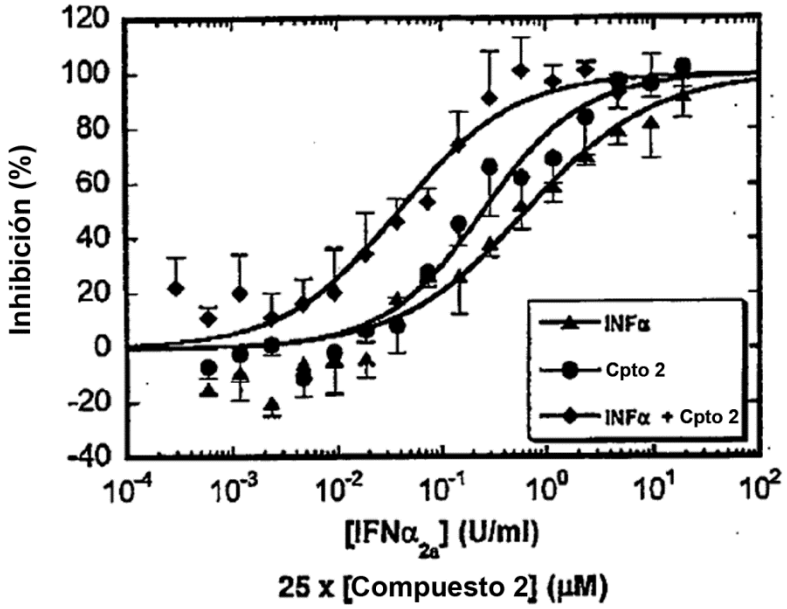

120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
Inhibición (%)
INFα
Cpto 2
INFα + Cpto 2
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
102
[IFNα2a] (U/ml)
25 x [Compuesto 2] (μM)

Figura 1

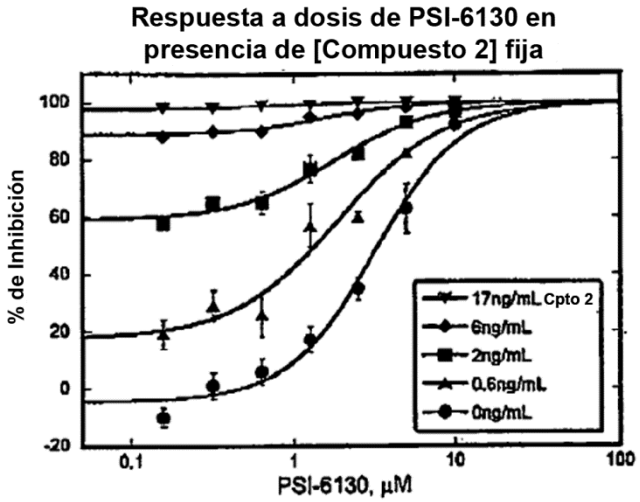


Figura 2a

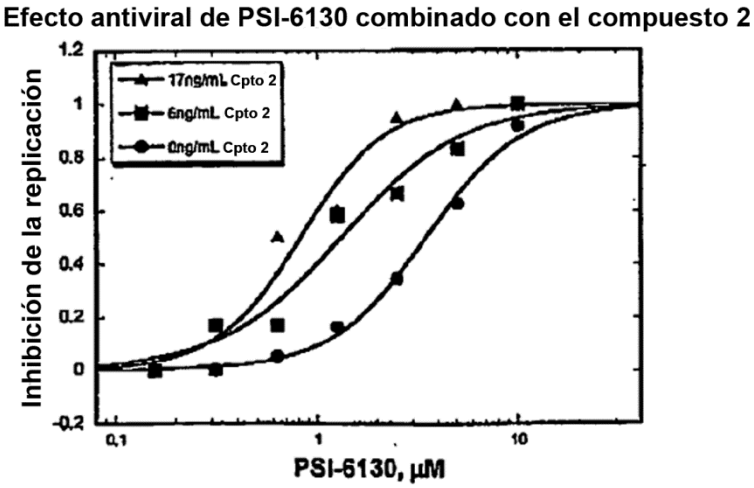


Figura 2b

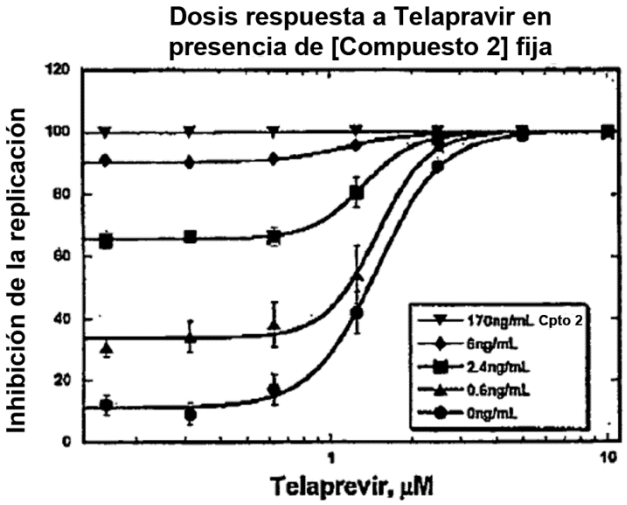


Figura 3a

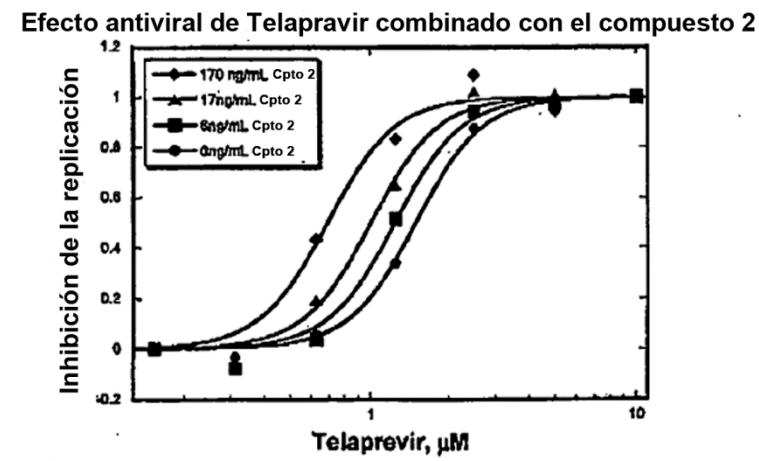


Figura 3b