

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 996**

51 Int. Cl.:
A61K 31/351 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
C07D 309/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08721158 .7**
96 Fecha de presentación: **03.03.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2123271**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **FÁRMACO PARA EL TRATAMIENTO DE GRIPE.**

30 Prioridad:
07.03.2007 JP 2007056872

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.01.2012

73 Titular/es:
Daiichi Sankyo Company, Limited
3-5-1, Nihonbashi-Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-0023, JP

72 Inventor/es:
YAMASHITA, Makoto y
KAWAOKA, Yoshihiro

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 372 996 T3

DESCRIPCIÓN

Fármaco para el tratamiento de gripe

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un producto terapéutico o profiláctico contra la gripe H5N1 que comprende determinados compuestos representados por la fórmula (I) como ingrediente activo.

Técnica anterior

10 La infección de aves por el virus de la gripe aviar H5N1 se ha propagado desde 2003 a amplias zonas que incluyen Asia, Europa y África. Se han encontrado seres humanos infectados con este virus no sólo en Asia, sino también en Oriente Próximo y en África. Se cree que si aparece un tipo nuevo de virus de la gripe H5N1 y su infección comienza, la infección se extenderá rápidamente propagándose por todo el mundo (es decir, provocando una pandemia de gripe) debido a que la mayor parte de las personas no posee inmunidad frente a ese virus y el virus de la gripe se propaga por infección de gotas y por infección transmitida por el aire. Hasta la fecha, más de la mitad de los pacientes humanos infectados por el virus de la gripe H5N1 han muerto. De este modo, el virus es altamente patógeno. Se sabe que han tenido lugar durante el siglo XX tres pandemias de gripe: epidemia de gripe de 1918, la gripe asiática y la gripe de Hong Kong. Debido a la epidemia de gripe de 1918, que provocó la mayor cantidad de pacientes, se estima que aproximadamente 20-40 millones de personas murieron en todo el mundo y aproximadamente 0,5 millones de personas en Japón.

15 Según un informe del Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar japonés, realizado en noviembre de 2005, si un nuevo tipo de virus de la gripe se propaga, el número de pacientes que serán atendidos por médicos en Japón como resultado de la infección con ese virus se estima en aproximadamente 18-25 millones. Además, si la patogenicidad de ese nuevo tipo de virus de la gripe es grave, el número de pacientes que serán ingresados se estima en aproximadamente 0,2 millones, mientras que el número de personas que fallecerán se estima en aproximadamente 0,64 millones. Por lo tanto, no sólo se teme el riesgo para la salud, sino también la influencia significativa que tiene sobre las actividades sociales.

25 De este modo, un nuevo tipo de gripe puede provocar una enfermedad muy grave. Se precisa un desarrollo rápido de productos terapéuticos eficaces.

30 Aunque se ha informado que el zanamivir (en particular el hidrato de zanamivir) y el oseltamivir (en particular, fosfato de oseltamivir o carboxilato de oseltamivir), que son productos terapéuticos contra la gripe con actividad inhibitoria de la neuraminidasa muestran una actividad inhibitoria contra el virus de la gripe H5N1, se desean compuestos con una actividad más notable (documento distinto de patente 1 ó 2). Además, se ha informado de cepas del virus de la gripe H5N1 contra los que el oseltamivir no muestra ninguna actividad inhibitoria (es decir, cepas del virus resistentes al oseltamivir). Se desean compuestos que posean una actividad inhibitoria contra estas cepas del virus de la gripe H5N1 resistentes al oseltamivir (documento distinto de patente 1 ó 2).

35 Se sabe que los compuestos representados por la fórmula (I) son útiles como productos terapéuticos contra la gripe con actividad inhibitoria de la neuraminidasa (documentos de patente 1 a 3). No obstante, no se ha informado de que estos compuestos tengan una actividad inhibitoria contra el virus de la gripe H5N1. Además, las estructuras de los compuestos representados por la fórmula (I) semejan la estructura del zanamivir pero tienen una estructura completamente diferente de la del oseltamivir.

Documento distinto de patente 1: Nature, 2005, vol. 437, página 1108

40 Documento distinto de patente 2: N. Engl. J. Med., 2005, vol. 353, (25):2667-72

Documento de patente 1: Patente de Estados Unidos Nº 6340702 (Patente japonesa Nº 3209946)

Documento de patente 2: Patente de Estados Unidos Nº 6451766 (Publicación de patente japonesa Nº Hei 10-109981)

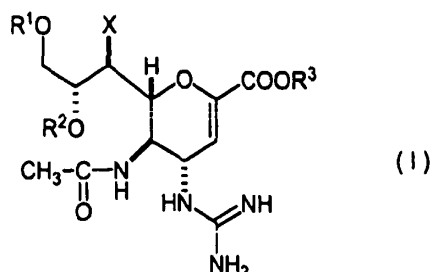
45 Documento de patente 3: Patente de Estados Unidos Nº 6844363 (Publicación de patente japonesa Nº 2002-012590)

Divulgación de la invención**Problema que debe solucionarse con la invención**

50 Los inventores han investigado diligentemente sobre productos terapéuticos o profilácticos contra la gripe. Los inventores de la presente invención han encontrado que determinados compuestos representados por la fórmula general (I) son extremadamente útiles como productos terapéuticos o profilácticos contra la gripe H5N1. La presente invención se ha realizado sobre la base de este hallazgo.

Medios para resolver el problema

La presente invención proporciona un producto terapéutico o profiláctico contra la gripe H5N1 tal como se divulga a continuación. Los compuestos representados por la fórmula general (I) tienen la estructura siguiente:



- 5 en la que R¹ y R² pueden ser iguales o diferentes uno de otro y cada uno representa un átomo de hidrógeno o un grupo alcanoilo con 2 a 20 átomos de carbono; X representa un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi con 1 a 4 átomos de carbono o un grupo alcaniloxi con 2 a 20 átomos de carbono; y R³ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo con 1 a 20 átomos de carbono; a condición de que se excluyan los compuestos de la fórmula general (I) en la que cada uno de R¹ y R² sea un átomo de hidrógeno, X sea un grupo hidroxilo y R³ sea un átomo de hidrógeno.

Según la presente invención se proporciona:

(1) Un compuesto seleccionado del grupo constituido por:

- ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-hexanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- 15 ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-octanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-decanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-dodecanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico, y
- 20 ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-tetradecanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- para su uso en el tratamiento o la prevención de la gripe H5N1.

(2) Uso de un compuesto seleccionado del grupo constituido por :

- ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-hexanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- 25 ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-octanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-decanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-dodecanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico, y
- 30 ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-tetradecanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la gripe H5N1.

- En la divulgación anterior, los compuestos representados por la fórmula general (I) pueden ejemplificarse por los derivados de ácido 2-desoxi-2,3-didehidro-N-acetilneuramínico descritos en el documento de patente de Estados Unidos Nº 6340702 (documento de patente japonesa 3209946), el documento de patente de Estados Unidos Nº 6451766 (Publicación de patente japonesa Nº Hei 10-109981)), el documento de patente de Estados Unidos Nº 6844363 (Publicación de patente japonesa Nº 2002-012590), etc.

En los compuestos que se reivindican en la reivindicación 1 y que están representados por la fórmula general (I), cuando R¹ o R² es un grupo alcanoilo, cuando X es un grupo alcaniloxi o cuando R³ es un grupo alquilo, R¹O-,

R²O-, X o R³OCO forma individualmente un grupo éster. Cuando el compuesto que se reivindica en la reivindicación 1 posee estos grupos ésteres, el compuesto puede ser un profármaco (Development of Pharmaceuticals, publicado por Hirokawa Shoten, 1990, vol. 7, "Molecular Design", páginas 163-198). Una vez administrado, el grupo éster descrito anteriormente en el compuesto que se reivindica en la reivindicación 1 se convierte en un grupo hidroxilo o carboxilo por medio de un proceso metabólico *in vivo* (por ejemplo, hidrólisis), y el compuesto producido mediante esta conversión muestra actividad farmacológica (véanse, por ejemplo, los ejemplos de ensayo 1' a 4' en el documento de patente de Estados Unidos N° 6451766 y los ejemplos de ensayo 1 a 4 en la Publicación de patente japonesa N° Hei 10-109981).

Debido a que los compuestos que se reivindican en la reivindicación 1 poseen un grupo guanidino o un grupo carboxi en sus moléculas, los compuestos son capaces de formar una sal farmacéuticamente aceptable uniéndose a un ácido o una base farmacéuticamente no tóxicos.

Los ejemplos de "sal farmacéuticamente aceptable" incluyen sales de ácidos halohídricos tales como fluorhidrato, clorhidrato, bromhidrato y yodhidrato; sales de ácidos inorgánicos tales como nitrato, perclorato, sulfato y fosfato; alcanosulfonatos tales como metanosulfonato, etanosulfonato y trifluorometanosulfonato; arilsulfonatos tales como bencenosulfonato y p-toluenosulfonato; sales de ácidos orgánicos tales como acetato, trifluoroacetato, citrato, tartrato, oxalato y maleato; sales de aminoácidos tales como sal de glicina, sal de lisina, sal de arginina, sal de ornitina, sal de ácido glutámico y sal de ácido aspártico; sales de metales alcalinos tales como sal de litio, sal de sodio y sal de potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como sal de calcio y sal de magnesio; sales de metales tales como sal de aluminio, sal de hierro, sal de cinc, sal de cobre, sal de níquel y sal de cobalto; sales de aminas orgánicas o sales de amoniaco orgánico tales como sal de amonio, sal de t-octilamina, sal de dibencilamina, sal de morfolina, sal de glucosamina, sal de etilendiamina, sal de guanidina, sal de dietilamina, sal de trietilamina, sal de dicitlohexilamina, sal de procaína, sal de etanolamina, sal de dietanolamina, sal de piperazina y/o sal de tetrametilamonio. Preferentemente, la sal farmacológicamente aceptable es una sal de metal alcalino, una sal de ácido orgánico o una sal de ácido inorgánico.

Los compuestos que se reivindican en la reivindicación 1 pueden formar hidratos o solvatos cuando se dejan al aire o se mezclan con agua o un disolvente orgánico.

Las sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o solvatos de los compuestos que se reivindican en la reivindicación 1 descritos anteriormente están incluidos en el ámbito del ingrediente activo del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención.

Los compuestos que se reivindican en la reivindicación 1 son extremadamente útiles como productos terapéuticos o profilácticos contra la gripe H5N1. La gripe H5N1 diana puede ser una gripe provocada por un virus de la gripe H5N1 sensible o resistente al oseltamivir. Preferentemente, la gripe H5N1 diana es una gripe provocada por un virus de la gripe H5N1 resistente al oseltamivir. El virus de la gripe H5N1 sensible al oseltamivir puede ser, por ejemplo, A/Hanoi/30408/2005 (clon 7), mientras que el virus de la gripe H5N1 resistente al oseltamivir puede ser, por ejemplo, A/Hanoi/30408/2005 (clon 9). Desde otro punto de vista, los compuestos que se reivindican en la reivindicación 1 son también útiles como productos terapéuticos o profilácticos contra la gripe provocada por virus de la gripe resistentes al oseltamivir (no limitados a virus H5N1).

Efecto de la invención

Los compuestos que se reivindican en la reivindicación 1 son extremadamente útiles como productos terapéuticos o profilácticos contra la gripe H5N1 y también son útiles como productos terapéuticos y profilácticos contra la gripe provocada por virus de la gripe H5N1 resistentes al oseltamivir.

La presente memoria descriptiva abarca el contenido de la memoria descriptiva y/o las figuras de la Solicitud de patente japonesa N° 2007-56872, sobre cuya base la presente solicitud de patente reivindica prioridad.

Mejor forma de llevar a cabo la invención

Los compuestos que se reivindican en la reivindicación 1, que son los ingredientes activos de los productos terapéuticos y profilácticos de la presente invención, pueden prepararse según los procedimientos divulgados en el documento de patente de Estados Unidos N° 6340702 (documento de patente japonesa 3209946), el documento de patente de Estados Unidos N° 6451766 (Publicación de patente japonesa N° Hei 10-109981), el documento de patente de Estados Unidos N° 6844363 (Publicación de patente japonesa N° 2002-012590), etc., o procedimientos equivalentes a estos procedimientos.

Cuando los compuestos que se reivindican en la reivindicación 1 se usan como productos terapéuticos o profilácticos contra la gripe, los compuestos pueden administrarse (i) tal como son, o (ii) en forma de una preparación formulada en mezcla con excipientes, diluyentes o similares apropiados farmacológicamente aceptables (por ejemplo, en forma de comprimido, cápsula, gránulo, polvo, jarabe, ungüento, líquido, suspensión, aerosol o sello).

Estas preparaciones pueden prepararse por medio de procedimientos bien conocidos usando aditivos tales como excipientes, aglutinantes, agentes disgregantes, lubricantes, estabilizantes, correctores, agentes de suspensión, diluyentes y disolventes para preparaciones.

Los ejemplos del excipiente incluyen: sacáridos tales como lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y sorbitol; derivados de almidón tales como almidón de maíz, almidón de patata, α -almidón, dextrina y carboximetil almidón; derivados de celulosa tales como celulosa cristalina, hidroxipropil celulosa de baja sustitución, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de calcio y carboximetil celulosa de sodio reticulada internamente; goma arábica; dextrano; pululano; silicatos tales como anhídrido de ácido silícico ligero, silicato de aluminio sintético y aluminometasilicato de magnesio; fosfatos tales como fosfato de calcio, carbonatos tales como carbonato de calcio y sulfatos tales como sulfato de calcio.

Los ejemplos del aglutinante incluyen los excipientes enumerados anteriormente: gelatina; polivinilpirrolidona y macrogol.

Los ejemplos del agente disgregante incluyen: los excipientes enumerados anteriormente y derivados de almidón o celulosa modificados químicamente tales como croscarmelosa de sodio, carboximetil almidón sódico y polivinilpirrolidona reticulada.

Los ejemplos del lubricante incluyen: talco; ácido esteárico, sales metálicas de ácido esteárico tales como estearato de calcio y estearato de magnesio; sílice coloidal, Vee gum; ceras tales como cera de abejas y espermaceti; ácido bórico; glicol; ácidos carboxílicos tales como ácido fumárico o ácido adípico; carboxilatos de sodio tales como benzoato de sodio; sulfatos tales como sulfato de sodio; leucina; lauril sulfatos tales como lauril sulfato de sodio y lauril sulfato de magnesio; ácidos silícicos tales como anhídrido de ácido silícico e hidrato de ácido silícico y los derivados de almidón enumerados anteriormente como ejemplos de excipientes.

Los ejemplos del estabilizante incluyen: ésteres de ácido para-hidroxibenzoico tales como metilparabeno y propilparabeno; alcoholes tales como clorobutanol, alcohol bencílico y alcohol fenetílico; cloruro de benzalconio; fenoles tales como fenol y cresol; timerosal; anhídrido acético y ácido sórbico.

Los correctores pueden ser, por ejemplo, edulcorantes, acidulantes o aromas de uso convencional.

El agente de suspensión puede ser, por ejemplo, polisorbato 80 o carboximetil celulosa de sodio.

El disolvente para preparaciones puede ser, por ejemplo, agua, etanol o glicerol.

El producto terapéutico o profiláctico de la presente invención puede administrarse oral o parenteralmente. Preferentemente, el producto terapéutico o profiláctico se administra usando un procedimiento de administración que permita suministrar el ingrediente activo al tejido del aparato respiratorio (tejido de la cavidad oral, cavidad nasal, tracto respiratorio o tejido pulmonar) del receptor que es la vía principal de infección por el virus de la gripe. Los procedimientos de administración puede ser, por ejemplo, por medio de gotas nasales, administración transnasal, transpulmonar o intraoral. Generalmente, el ingrediente activo puede administrarse en forma de solución, suspensión o polvos secos. Las soluciones y las suspensiones son acuosas y pueden prepararse generalmente con agua (por ejemplo, agua estéril o agua exenta de pirógeno) sola o con agua y un disolvente auxiliar farmacológicamente aceptable (por ejemplo, etanol, propilenglicol, polietilenglicol o PEG 400). Dichas soluciones o suspensiones pueden incluir además otros excipientes, antisépticos (por ejemplo, cloruro de benzalconio), solubilizantes/tensioactivos tales como polisorbato (por ejemplo, Tween 80, Span 80 o cloruro de benzalconio), tampones, reguladores de la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio), potenciadores de la absorción o agentes espesantes. Las suspensiones pueden contener, además, agentes de suspensión (por ejemplo, celulosa microcristalina o carboximetil celulosa de sodio). Las soluciones y las suspensiones se administran directamente a la cavidad nasal o a la cavidad oral usando medios convencionales (tales como goteros, pipetas o pulverizadores). Las soluciones y las suspensiones pueden suministrarse en forma de dosis individual o múltiple. En este último caso, es preferente que se proporcione un medio para medir la dosis. Cuando se usa para la administración un gotero o una pipeta, el paciente se administra a sí mismo un volumen específico apropiado de la solución o la suspensión. Cuando se usa un pulverizador, la solución o la suspensión puede administrarse mediante una bomba de pulverización dosificadora. La administración al tracto respiratorio o a los pulmones puede realizarse usando una formulación en aerosol en forma de un paquete presurizado compuesto por el ingrediente activo y un propulsor apropiado [por ejemplo, gas tal como clorofluorocarbono (CFC), diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono]. Preferentemente, la formulación en aerosol contiene un tensioactivo tal como lecitina. Los niveles de dosificación del ingrediente activo pueden regularse proporcionando el instrumento de administración correspondiente con una válvula dosificadora. Además, el ingrediente activo puede proporcionarse en forma de un polvo seco del mismo. Alternativamente, el ingrediente activo puede proporcionarse en forma de una mezcla de polvos obtenida mezclando el ingrediente activo con una base en polvo apropiada tal como lactosa, almidón, derivado de almidón (por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa) o polivinilpirrolidona (PVP). Es preferente que el polvo seco descrito anteriormente o mezcla en polvo forme un gel en la cavidad nasal. El polvo seco o la mezcla en polvo descritos anteriormente pueden suministrarse en una forma de una dosificación unidad, por ejemplo, cápsulas o cartuchos hechos de gelatina o envases alveolados, y administrarse a partir de estas cápsulas, cartuchos

o envases alveolados con un inhalador. En formulaciones que se van a administrar al tracto respiratorio o a los pulmones (incluidas composiciones para administración intranasal), el tamaño de partícula del ingrediente activo es generalmente pequeño. El ingrediente activo con dicho tamaño de partícula pequeño puede obtenerse mediante un procedimiento tal como la submicronización, que es bien conocido en el sector de la formulación de fármacos.

5 También es posible usar una formulación que esté diseñada para liberar el ingrediente activo de un modo mantenido.

El producto terapéutico o profiláctico de la presente invención se administra del modo más preferente en forma de una mezcla en polvo por inhalación a través de la nariz o la boca.

10 El producto terapéutico o profiláctico de la presente invención puede usarse en combinación con otros productos terapéuticos. Los ejemplos preferentes de otros productos terapéuticos que pueden usarse incluyen productos terapéuticos contra la gripe tales como oseltamivir (en particular, fosfato de oseltamivir o carboxilato de oseltamivir), zanamivir (en particular hidrato de zanamivir), amantadina (en particular, clorhidrato de amantadina), rimantadina y ribarina. Cuando se usan en dichas combinaciones, los ingredientes activos individuales pueden administrarse sucesiva o simultáneamente bien en forma de formulaciones farmacéuticas separadas o bien en forma de una

15 composición farmacéutica única que contenga todos los ingredientes activos. Cuando los productos terapéuticos o profilácticos de la presente invención se usan en combinación con otros productos terapéuticos que son activos contra el mismo virus diana, los niveles de la dosis del ingrediente activo respectivo pueden ser los mismos que, o diferentes a, los empleados cuando se usan solos.

20 La administración del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención se inicia dependiendo de la necesidad cuando haya tenido lugar una pandemia o cuando una persona vaya a una zona en la que se ha propagado la gripe entre las aves. La administración puede realizarse de 1 a 7 veces por semana, aumentándose o disminuyéndose la frecuencia dependiendo de la necesidad. Cuando ha tenido lugar una pandemia, es posible aumentar el número de dosis o la administración se inicia por adelantado si el contagio vírico es inminente, si una persona está viviendo en un grupo, si una persona está viviendo o trabaja en un lugar que reúne muchas personas

25 no especificadas (por ejemplo, guarderías, parvularios, escuelas, compañías/empresas, hospitales, residencias de ancianos, cines, bibliotecas, salas de conciertos o estadios deportivos) o si una persona va a visitar alguno de estos lugares. Incluso cuando una persona vaya a ir a una zona en la que la gripe está propagada en aves con fines de investigación, de viaje o similares, es posible aumentar el número de dosis o iniciar la administración por adelantado. "Aumentar el número de dosis" significa administrar, por ejemplo, una al día. "Administrar por adelantado" significa

30 administrar antes de que una persona realice una acción que pueda provocar una infección de gripe o administrar después de esa acción pero antes de la aparición de la gripe.

Aunque el nivel de dosificación del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención variará dependiendo del tipo de ingrediente activo que se use, la extensión de la propagación de la gripe y las condiciones del paciente (peso corporal, edad, etc.), si se administra a seres humanos por inhalación, es deseable administrar el ingrediente

35 activo a una dosis de 10 µg a 5 mg por kg de peso corporal aproximadamente de una a 7 veces por semana a una a 3 veces al día.

El ingrediente activo del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención es capaz de inhibir la nueraminidasa, que es esencial para la proliferación del virus de la gripe H5N1, inhibiendo, de este modo, la proliferación de este virus. Esta actividad inhibitoria de nueraminidasa puede evaluarse, por ejemplo, mediante los

40 procedimientos que se describen más adelante. No obstante, el procedimiento de evaluación no está limitado a los procedimientos siguientes.

Por ejemplo, es posible evaluar cuantitativamente la actividad inhibitoria de la nueraminidasa del ingrediente activo del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención mezclando virus de la gripe H5N1 que tengan actividad enzimática de nueraminidasa con un sustrato para neuraminidasa preparando, de este modo, un sistema

45 de reacción para la detección de actividad enzimática, y añadiendo el ingrediente activo del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención a este sistema.

Alternativamente, también es posible evaluar cuantitativamente la actividad inhibitoria de proliferación del virus de la gripe H5N1 del ingrediente activo del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención infectando células

50 cultivadas con virus de la gripe H5N1 para preparar, de este modo, un sistema experimental para la formación de placas basada en la proliferación vírica, añadiendo el ingrediente activo al sistema, y midiendo una disminución en el número o tamaño de las placas o la cantidad de virus en el caldo de cultivo.

El efecto terapéutico o profiláctico sobre la infección por virus de la gripe que proporciona el producto terapéutico o profiláctico de la presente invención puede evaluarse usando procedimientos que se describen más adelante. No obstante, el procedimiento de evaluación no está limitado a los procedimientos siguientes.

55 Por ejemplo, una cantidad apropiada del ingrediente activo del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención se administra en forma de una solución, suspensión o polvo al aparato respiratorio de un vertebrado (tal como un ser humano, ratón, rata, hurón, cerdo o pájaro) usando un procedimiento de administración tal como gotas nasales, administración o inhalación intranasal, intratraqueal o intrapulmonar. En un momento apropiado entre

inmediatamente después de la administración y un mes después de la administración, el virus de la gripe se inhala o se añade gota a gota a la nariz una vez de modo que el vertebrado se infecte. Subsiguientemente, se observa o se mide cualquier síntoma de gripe (por ejemplo, fiebre; dolor de cabeza; malestar general; dolor de articulaciones; dolor muscular; síntomas del aparato respiratorio tales como tos y esputos; la cantidad de virus contenida en el fluido en el exudado faríngeo, descarga nasal o fluido de lavado pulmonar; supervivencia o muerte, etc.). De este modo, es posible evaluar el efecto terapéutico o profiláctico de interés.

Alternativamente, se prepara un grupo de seres humanos, a los que se administra una cantidad apropiada del ingrediente activo del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención al tracto respiratorio (incluido el pasaje a través de la nariz) mediante administración o inhalación oral, rectal, nasal, local (incluida intraoral o sublingual), vaginal, parenteral (incluida intramuscular, subcutánea e intravenosa) en la zona en la que la gripe está extendida. Por otra parte, se prepara otro grupo de seres humanos a los que no se administra el ingrediente activo del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención. Después de un periodo específico, las proporciones de personas que se infectaron con el virus de la gripe que desarrollaron cualquier síntoma de gripe en ambos grupos se examinan estadísticamente. De este modo, es posible evaluar el efecto terapéutico o profiláctico de interés.

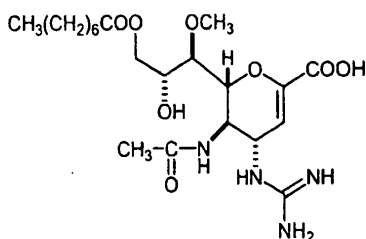
Para evaluar el efecto profiláctico en ratones, el ingrediente activo del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención en forma disuelta en solución salina fisiológica o en un tampón apropiado se administra intranasalmente añadiendo una cantidad adecuada de la solución gota a gota a la cavidad nasal. Los ratones se infectan intranasalmente con virus de la gripe del mismo modo en un momento apropiado entre inmediatamente después de la administración y un mes después de la administración. Después de la infección, los pulmones se retiran de cada ratón y se realiza la medición de las valoraciones de virus en los pulmones. De este modo, puede evaluarse el efecto profiláctico. Si el virus de la gripe que se usa provoca una infección letal en ratones, el efecto profiláctico puede evaluarse observando la supervivencia y muerte de los ratones.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá más específicamente con referencia a los ejemplos de preparación, ejemplos y ejemplos de formulación siguiente. No obstante, el alcance de la invención no está limitada a estos ejemplos.

Ejemplo de preparación 1:

Ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-octanoil-2,3,4,5-tetradesoxi-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosóico



(1) Se disolvió 5-acetamido-4-(N,N'-bis-t-butiloxycarbonil)guanidino-9-O-octanoil-2,3,4,5-tetradesoxi-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosóico de difenilmetilo (3,46 g, 4,1 mmol) divulgado en el ejemplo 35 (i) del documento de patente de Estados Unidos Nº 6340702 (documento de patente japonesa Nº 3209946) en cloruro de metileno (27 ml) y ácido trifluoracético (14 ml). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución de reacción se concentró a sequedad a presión reducida y después se realizaron tres ciclos de destilación azeotrópica a sequedad con tolueno (5 ml). El material oleoso resultante se disolvió en acetato de etilo (10 ml). La solución se vertió en solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (50 ml). El pH de la solución resultante se ajustó a 8,5 añadiendo solución acuosa de carbonato de sodio al 20 %. Después, la solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y su pH se ajustó a 5,0 con ácido clorhídrico (3 ml) y después se agitó a temperatura ambiente durante otra hora. La solución se agitó adicionalmente durante 1 hora mientras se enfriaba en hielo. Subsiguientemente, los cristales precipitados se filtraron con succión y se secaron al vacío durante 10 horas a una temperatura exterior de 50 °C. Los cristales resultantes se dejaron al aire durante 1 día para obtener, de este modo, el compuesto objeto en forma de un cristal hidratado (0,97 g; rendimiento del 51 %).

Espectro de absorción de infrarrojos (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3412, 2929, 2856, 1676, 1401, 1320, 1285, 1205, 1137, 722. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H (400MHz, CD_3OD) δ ppm: 5,88 (1H, d, $J=2,5$ Hz), 4,45 (3H, m), 4,27 (1H, dd, $J=10,0$ Hz, 10,0 Hz), 4,15 (1H, m), 3,47 (2H, m), 3,42 (3H, s), 2,37 (2H, t, $J=7,4$ Hz), 2,10 (3H, s), 1,31 (2H, m), 1,20-1,40 (8H, m), 0,85-0,95 (3H, m).

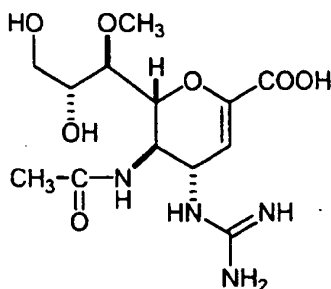
Espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (100MHz, CD_3OD) δ ppm: 176,5, 173,7, 164,7, 158,9, 146,7, 108,7, 80,1, 78,0, 69,3, 66,8, 61,4, 52,4, 35,1, 32,8, 30,2, 30,1, 26,0, 23,7, 22,8, 14,4.

(2) El compuesto objeto se obtuvo también mediante el procedimiento que se describe a continuación.

Se sometió sal de ácido trifluoroacético de ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-octanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico (3,0 g, 5,1 mmol) divulgada en el ejemplo 35 (ii) del documento de patente de Estados Unidos N° 6340702 (documento de patente japonesa N° 3209946) a cromatografía en columna de fase inversa [Cosmosil 75C 18PREP (nacalai tesque)], 100 g] y se eluyó con metanol/agua (0/1-1/1-2/1). Las fracciones que contenían el compuesto de interés se concentraron al vacío. Los cristales precipitados se filtraron con succión y se secaron al vacío. Los cristales resultantes se dejaron al aire durante un día y, de este modo, proporcionaron el compuesto el compuesto activo en forma de un cristal hidratado (1,2 g; rendimiento del 49 %). Los datos de propiedades del compuesto resultante fueron consecuentes con los del compuesto obtenido en (1) anteriormente.

Ejemplo de preparación 2:

Ácido 5-acetamido-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico



Se purificó sal de ácido trifluoroacético de ácido 5-acetamido-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico (3,0 g, 5,1 mmol) divulgada en el **ejemplo 28** (viii) del documento de patente de Estados Unidos N° 6340702 (documento de patente japonesa N° 3209946) en una columna de resina de intercambio iónico [Dowex-50X; (i) agua y (ii) solución acuosa de amonio al 5 %] y se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna de fase inversa [Cosmosil 75C 18PREP (nacalai tesque); agua]. Las fracciones que contenían el compuesto de interés se concentraron al vacío. El sólido resultante se lavó con metanol, se filtró y se secó para, de este modo, proporcionar el compuesto objeto (1,43 g) en forma de un sólido incoloro.

Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H (400MHz, CD_3OD) δ ppm: 5,64 (1H, d, $J=2,0$ Hz), 4,43 (2H, m), 4,22 (1H, dd, $J=10,0$ Hz, 10,0 Hz), 4,00 (1H, m), 3,85 (1H, dd, $J=10,0$ Hz, 2,4 Hz), 3,68 (1H, dd, $J=10,0$ Hz, 5,5 Hz), 3,58 (1H, m), 3,43 (3H, s).

Nótese que el compuesto del ejemplo de preparación 2 es el que deriva del compuesto del ejemplo de preparación 1 cuando se metaboliza *in vivo*. En otras palabras, el compuesto del ejemplo de preparación 1 es un profármaco del compuesto del ejemplo de preparación 2, mientras que el compuesto del ejemplo de preparación 1 es la forma activa por sí misma.

Ejemplo 1. Ensayo de la actividad inhibitoria de neuraminidasa

El ensayo siguiente se realizó según el procedimiento divulgado en Nature, 2005, vol. 437, página 1108 con las modificaciones necesarias.

Una solución de virus H5N1 diluido para dar una actividad de neuraminidasa de 800 a 1.200 unidades de fluorescencia se mezcló con un compuesto de ensayo ajustado a una concentración 0,01 a 100.000 nM. La mezcla se hizo reaccionar a 37 °C. Subsiguientemente, se añadió ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-a-D-N-acetilneuramínico en forma de sustrato al sistema de reacción, que se hizo reaccionar adicionalmente durante 1 hora a 37 °C. Después, se realizaron las mediciones a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 465 nm. A partir de la intensidad de fluorescencia resultante, las tasas de inhibición (%) del compuesto de ensayo a diversas concentraciones se calcularon tomando la actividad de neuraminidasa en ausencia del compuesto de ensayo como el 100 %. Se calculó la concentración del compuesto de ensayo que da una inhibición del 50 % de la actividad enzimática (CI_{50}). Los resultados se muestran en la tabla 1.

Teniendo una actividad inhibitoria de la neuraminidasa potente contra cepas del virus de la gripe H5N1 resistentes y sensibles al oseltamivir, el ingrediente activo del compuesto terapéutico o profiláctico de la presente invención muestra una actividad inhibitoria excelente incluso contra cepas del virus de la gripe H5N1 resistentes al oseltamivir.

Tabla 1. Actividad inhibitoria de la neuraminidasa (CI₅₀, nM)

	Cepa sensible al oseltamivir	Cepa resistente al oseltamivir
Compuesto del ejemplo de preparación 2	0,33	1,3
Zanamivir	0,96	0,81
Carboxilato de oseltamivir	0,34	550
Cepa sensible al oseltamivir: A/Hanoi/30408/2005 (clon 7)		
Cepa resistente al oseltamivir: A/Hanoi/30408/2005 (clon 9)		

Ejemplo 2. Ensayo de actividad inhibitoria de proliferación vírica

Se inoculó virus de la gripe H5N1 a células MDCK de tal modo que se formaran de 50 a 100 placas por pocillo. Los virus fueron absorbidos a las células a 37 °C durante 1 hora. Después, se superpuso un medio agar que contenía un compuesto de ensayo a concentraciones de 0,1 a 1000 nM y las células MDCK se cultivaron durante 2 días. Subsiguientemente, el cultivo resultante se fijó y se tizó con Crystal Violet al 0,1 % disuelto en metanol al 19 % y, después, se midió el número y el diámetro de las placas. Con el fin de calcular la tasa de inhibición sobre la base del área de la placa, se calculó la suma del cuadrado de cada diámetro de placa. Se calculó la tasa de inhibición (%) del compuesto de ensayo a diversas concentraciones tomando la tasa de inhibición en ausencia del compuesto de ensayo como el 100 %. Después, se calculó la concentración del compuesto de ensayo proporcionando una inhibición del 50 % de proliferación vírica (CI₅₀). Los resultados se muestran en la tabla 2.

Teniendo una actividad inhibitoria de la proliferación vírica potente contra cepas del virus de la gripe H5N1 sensibles o resistentes al oseltamivir, el ingrediente activo del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención muestra una actividad inhibitoria de la proliferación vírica bastante destacada en comparación con el zanamivir.

Tabla 2. Actividad inhibitoria de la proliferación vírica (CI₅₀, nM)

	Cepa sensible al oseltamivir	Cepa resistente al oseltamivir
Compuesto del ejemplo de preparación 2	0,43	13
Zanamivir	3,3	32
Carboxilato de oseltamivir	0,11	1400
Cepa sensible al oseltamivir: A/Hanoi/30408/2005 (clon 7)		
Cepa resistente al oseltamivir: A/Hanoi/30408/2005 (clon 9)		

Ejemplo 3. Ensayo de tratamiento de ratón infectado 1

Se administra una solución salina fisiológica sola o un compuesto de ensayo disuelto en una solución salina fisiológica a varias concentraciones a ratones Balb/c intranasalmente. Siete días después de la administración, el virus de la gripe H5N1 se inocula intranasalmente a ratones para provocar una infección. El día 1, día 2 y día 3 después de la infección, se retiran los pulmones de los ratones y se determina cuantitativamente el virus de la gripe H5N1 contenido en los mismos. De este modo, se evalúa el efecto inhibitorio de la proliferación del compuesto de ensayo sobre el virus de la gripe H5N1.

Los ratones a los que se administró el ingrediente activo del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención muestran una disminución significativa de la cantidad de virus contenido en el pulmón, en comparación con los ratones a los que se administró sólo solución salina fisiológica.

Ejemplo 4. Ensayo de tratamiento de ratón infectado 2

Se administraron a los ratones compuestos de ensayo del mismo modo que en el ejemplo 3. Después, se observó la supervivencia de los ratones a los que se había inoculado virus de la gripe H5N1 hasta el día 20 después de la infección.

- 5 Casi todos los ratones a los que se administró solución salina fisiológica mueren dentro de un intervalo de 20 días después de la infección, pero algunos de los ratones a los que se había administrado el ingrediente activo del producto terapéutico o profiláctico de la presente invención están todavía vivos incluso 20 días después de la infección.

- 10 Específicamente, se administraron a los ratones (Balb/c, hembras, seis semanas de edad) gota a gota intranasalmente 50 µl de una solución que contenía 80 ufp (unidades formadoras de placas) de A/Hanoi/UT30408(clon 7)/2005 (H5N1) aislado de pacientes infectados con el virus de la gripe aviar H5N1. El compuesto del ejemplo de preparación 1 se disolvió en solución salina fisiológica y se disolvió Tamiflu Dry Syrup™ al 3 % (fosfato de oseltamivir) en agua destilada. La concentración del compuesto del ejemplo de preparación 1 se ajustó para que proporcionara una dosis de 70 ó 700 µg/kg/50 µl. La concentración de fosfato de oseltamivir se ajustó para que proporcionara una dosis de 0,5, 5 ó 50 mg/kg/200 µl. El compuesto del ejemplo de preparación 1 se administró intranasalmente una vez 2 horas después de la infección. El fosfato de oseltamivir se administró oralmente una vez 2 horas después de la infección y dos veces por día durante los cinco días siguientes, dando un total de 10 veces. Los resultados se muestran en términos del número de ratones supervivientes el día 6, día 8, día 10, día 15 y día 20 después de la infección. Cada grupo de ensayo estaba constituido por 10 ratones.

- 20 Tabla 3.

	Día 10	Día 15	Día 20
Solución salina fisiológica sola	0	0	0
Compuesto del ejemplo de preparación 1 (70 µg/kg)	7	3	2
Compuesto del ejemplo de preparación 1 (700 µg/kg)	7	7	6
Fosfato de oseltamivir (0,5 mg/kg)	4	3	2
Fosfato de oseltamivir (5 mg/kg)	6	3	2
Fosfato de oseltamivir (50 mg/kg)	9	8	8

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionados en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

Aplicabilidad Industrial

- 25 Los compuestos que se reivindican en la reivindicación 1 son extremadamente útiles como productos terapéuticos o profilácticos contra la gripe H5N1. Los compuestos también son útiles como productos terapéuticos o profilácticos para la gripe provocada por virus de la gripe H5N1 resistentes al oseltamivir.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo constituido por:

- ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-hexanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- 5 ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-octanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-decanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- 10 ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-dodecanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico, y
- ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-tetradecanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico, y
- para su uso en el tratamiento o la prevención de la gripe H5N1.

2. Uso de un compuesto seleccionado del grupo constituido por:

- 15 ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-hexanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-octanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- 20 ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-decanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-dodecanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico, y
- ácido 5-acetamido-4-guanidino-9-O-tetradecanoil-2,3,4,5-tetradeso-7-O-metil-D-glicero-D-galacto-non-2-enopiranosico,
- 25 para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de la gripe H5N1.