

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 542**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

A61K 31/551 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2011** **E 15195216 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018** **EP 3012258**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende un derivado de pirazolo[1,5-A]pirimidina como un agente antiviral**

30 Prioridad:

24.06.2010 US 358122 P

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

18.02.2019

73 Titular/es:

GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)
333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

BABA OGLU, KERIM;
BOOJAMRA, CONSTANTINE, G;
EISENBERG, EUGENE, J;
HUI, HON CHUNG;
MACKMAN, RICHARD, L;
PARRISH, JAY, P;
SANGI, MICHAEL;
SAUNDERS, OLIVER, L.;
SIEGEL, DUSTIN;
SPERANDIO, DAVID y
YANG, HAI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 700 542 T3

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

Composición farmacéutica que comprende un derivado de pirazolo[1,5-A]pirimidina como un agente antiviral

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere en general a composiciones farmacéuticas que se utilizan para el tratamiento de infecciones por el virus *Pneumovirinae*, en particular para el tratamiento de infecciones del virus sincitial respiratorio.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los virus de *Pneumovirinae* son virus de ARN de cadena negativa, de sentido negativo, que son responsables de muchas enfermedades humanas y animales previas. La subfamilia de virus *Pneumovirinae* es parte de la familia *Paramyxoviridae* e incluye el virus sincitial respiratorio humano (HRSV). Casi todos los niños habrán tenido una infección por HRSV en su segundo cumpleaños. El HRSV es la causa principal de infecciones del tracto respiratorio inferior en la infancia y la niñez, con un 0,5% a un 2% de las personas infectadas que requieren hospitalización. Los adultos mayores y adultos con enfermedades crónicas del corazón, pulmón o inmunosuprimidos también tienen un alto riesgo de desarrollar una enfermedad grave por HRSV (<http://www.cdc.gov/rsv/index.html>). No hay vacuna disponible para prevenir la infección por HRSV actualmente disponible. El anticuerpo monoclonal palivizumab está disponible para inmunoprofilaxis, pero su uso está restringido a bebés de alto riesgo, por ejemplo, bebés prematuros o aquellos con enfermedad cardíaca o pulmonar congénita, y el costo para el uso general es a menudo prohibitivo. Además, el análogo de nucleósido ribavirina ha sido aprobado como el único agente antiviral para tratar infecciones por HRSV, pero tiene una eficacia limitada. Por lo tanto, existe una necesidad de agentes terapéuticos anti-*Pneumovirinae*.

[0003] Ciertos compuestos de fenilo(2-(pirazolo[1,5-a]pirimidina-2-ilo)piperidina-1-ilo)metanona racémicos se ofrecen a la venta por Asinex Corporation (101 N. Chestnut St., Winston-Salem, NC 27101) pero no se ha descrito la utilidad de estos compuestos para tratar infecciones por el virus de *Pneumovirinae*.

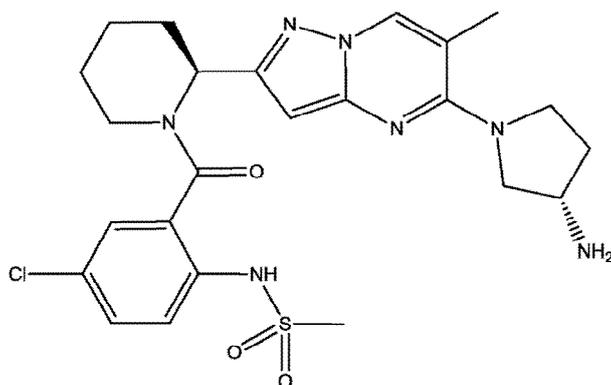
30 SUMARIO DE LA INVENCION

[0004] La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la fórmula:

35

40

45



50

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un portador farmacéuticamente aceptable, y al menos otro agente terapéutico.

55

[0005] En una realización, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de ácido trifluoroacético.

[0006] En una realización, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal formada con un ácido inorgánico seleccionado de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácidos sulfámicos, ácido fosfórico o ácido nítrico.

60

[0007] En una realización, la composición es adecuada para administración oral.

[0008] En una realización, la composición es una solución o suspensión acuosa.

65

[0009] La presente invención también proporciona una composición de la invención para su uso en un método para tratar una infección por virus *Pneumovirinae* en un humano, en particular una infección por virus sincitial respiratorio. La composición farmacéutica se puede administrar por vía oral. La composición farmacéutica se puede administrar

como una dosis diaria de 1 mg a 1.000 mg administrada en una dosis única o dosis múltiples, preferiblemente en una dosis diaria de 5 mg a 500 mg administrada en una sola dosis o dosis múltiples.

5 **[0010]** El agente terapéutico adicional en las composiciones de la invención y composiciones para su uso de acuerdo con la invención se puede seleccionar de entre el grupo de ribavirina, palivizumab, motavizumab, RSV-IGIV, MEDI-557, A-60444, MDT-637, BMS-433771, ALN-RSVO, y ALX-0171, o mezclas de los mismos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES EJEMPLARES

10 DEFINICIONES

[0011] A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases, como se usan en este documento, tienen los siguientes significados:

15 Cuando los nombres comerciales se usan en el presente documento, los solicitantes pretenden incluir de forma independiente el producto de nombre comercial y los ingredientes farmacéuticos activos del producto de nombre comercial.

20 **[0012]** Como se usa en este documento, "un compuesto de la invención" significa un compuesto dado a conocer en las reivindicaciones o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. De manera similar, con respecto a los intermedios aislables, la frase "un compuesto de Fórmula (número)" significa un compuesto de esa fórmula y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

25 **[0013]** El término "profármaco" tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier compuesto que cuando se administra a un sistema biológico genera la sustancia farmacológica, es decir, ingrediente activo, como resultado de una reacción(es) química(s) espontánea(s), reacción(es) química(s) de enzima catalizada, fotólisis y/o reacciones químicas metabólicas. Un profármaco es, por lo tanto, una forma análoga o latente modificada covalentemente de un compuesto terapéuticamente activo.

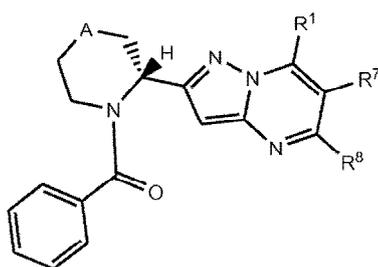
30 **[0014]** Un experto en la técnica reconocerá que los sustituyentes y otros restos de los compuestos de las composiciones de la invención deben seleccionarse a fin de proporcionar un compuesto que es suficientemente estable para proporcionar un compuesto farmacéuticamente útil que se puede formular en una composición farmacéutica aceptablemente estable. Se contempla que tales compuestos que tienen tal estabilidad están dentro del alcance de la presente invención.

35 **[0015]** A menos que se especifique lo contrario, los átomos de carbono de los compuestos descritos aquí tienen la intención de tener una valencia de cuatro. En algunas representaciones de estructuras químicas donde los átomos de carbono no tienen un número suficiente de variables unidas para producir una valencia de cuatro, se debe asumir que los sustituyentes de carbono restantes necesarios para proporcionar una valencia de cuatro son hidrógeno. Por ejemplo,

40

45

50

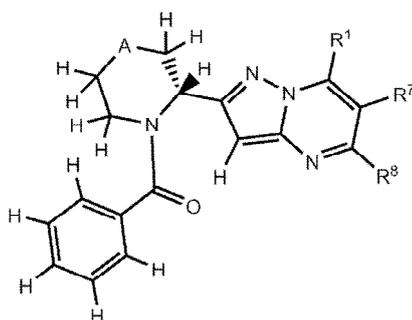


tiene el mismo significado que

55

60

65



5 [0016] "Grupo protector" se refiere a un resto de un compuesto que enmascara o altera las propiedades de un grupo funcional o las propiedades del compuesto en su totalidad. La subestructura química de un grupo protector varía ampliamente. Una función de un grupo protector consiste en servir como intermediario en la síntesis de la sustancia farmacológica parental. Los grupos de protección química y las estrategias para la protección/desprotección son bien conocidos en la técnica. Consulte: "Protective Groups in Organic Chemistry", Theodora W. Greene (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1991). Los grupos de protección a menudo se utilizan para enmascarar la reactividad de ciertos grupos funcionales, para ayudar en la eficiencia de reacciones químicas deseadas), por ejemplo, hacer y romper enlaces químicos de forma ordenada y planificada. La protección de los grupos funcionales de un compuesto altera otras propiedades físicas además de la reactividad del grupo funcional protegido, como la polaridad, la lipofilia (hidrofobicidad) y otras propiedades que pueden medirse con herramientas analíticas comunes. Los intermedios protegidos químicamente pueden ser biológicamente activos o inactivos.

15 [0017] Compuestos protegidos pueden también exhibir propiedades alteradas, y en algunos casos optimizadas *in vitro* e *in vivo*, tales como el paso a través de las membranas celulares y la resistencia a la degradación enzimática o secuestro optimizado. En esta función, los compuestos protegidos con los efectos terapéuticos previstos pueden denominarse profármacos. Otra función de un grupo protector consiste en convertir el fármaco parental en un profármaco, por lo que el fármaco parental se libera tras la conversión del profármaco *in vivo*. Debido a que los profármacos activos pueden absorberse más efectivamente que el fármaco parental, los profármacos pueden poseer una mayor potencia *in vivo* que el fármaco parental. Los grupos protectores se eliminan ya sea *in vitro*, en el caso de intermediarios químicos, o *in vivo*, en el caso de profármacos. Con los productos químicos intermedios, no es particularmente importante que los productos resultantes después de la desprotección, por ejemplo, los alcoholes, sean fisiológicamente aceptables, aunque en general es más deseable si los productos son farmacológicamente inocuos.

25 [0018] El "resto profármaco" significa un grupo funcional lábil que se separa del compuesto inhibidor activo durante el metabolismo, sistémicamente, dentro de una célula, por hidrólisis, escisión enzimática o por algún otro proceso (Bundgaard, Hans, "Design and Application of Prodrugs" en Textbook of Drug Design and Development (1991), P. Krogsgaard-Larsen y H. Bundgaard, Eds. Harwood Academic Publishers, pp. 113-191). Las enzimas que son capaces de un mecanismo de activación enzimática con, por ejemplo, cualquier compuesto profármaco de fosfato o fosfonato de la invención, incluyen pero no se limitan a, amidasas, esterases, enzimas microbianas, fosfolipasas, colinesterasas y fosfasas. Las tecnologías de profármacos pueden servir para mejorar la solubilidad, la absorción y la lipofilia para optimizar la administración de fármacos, la biodisponibilidad y la eficacia. Un resto profármaco puede incluir un metabolito activo o un fármaco en sí mismo.

35 [0019] Es de señalar que todos los enantiómeros, diastereómeros y mezclas racémicas, tautómeros, atropisómeros, polimorfos, pseudopolimorfos de compuestos dentro del alcance de los compuestos de las composiciones de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables se abarcan por la presente invención. Todas las mezclas de dichos enantiómeros y diastereómeros están dentro del alcance de la presente invención.

40 [0020] Un compuesto descrito en este documento y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden existir como diferentes polimorfos o pseudopolimorfos. Como se usa en este documento, polimorfismo cristalino significa la capacidad de un compuesto cristalino para existir en diferentes estructuras cristalinas. El polimorfismo cristalino puede resultar de diferencias en el empaquetamiento de cristales (polimorfismo de empaquetamiento) o diferencias en el empaquetamiento entre diferentes conformadores de la misma molécula (polimorfismo conformacional). Como se usa en este documento, pseudopolimorfismo cristalino significa la capacidad de un hidrato o solvato de un compuesto para existir en diferentes estructuras cristalinas. Los pseudopolimorfos de la presente invención pueden existir debido a diferencias en el empaquetamiento de cristales (pseudopolimorfismo de empaquetamiento) o debido a diferencias en el empaquetamiento entre diferentes conformadores de la misma molécula (pseudopolimorfismo conformacional). La presente invención comprende composiciones que comprenden todos los polimorfos y pseudopolimorfos de los compuestos descritos en las reivindicaciones, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

55 [0021] Un compuesto divulgado en el presente documento y sus sales farmacéuticamente aceptables también pueden existir como un sólido amorfo. Tal como se usa en este documento, un sólido amorfo es un sólido en el que no hay un orden de largo alcance de las posiciones de los átomos en el sólido. Esta definición se aplica también cuando el tamaño del cristal es de dos nanómetros o menos. Se pueden usar aditivos, incluyendo disolventes, para crear las formas amorfas de la presente invención. La presente invención comprende composiciones que comprenden todas las formas amorfas de los compuestos descritos en las reivindicaciones, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

60 [0022] El modificador "aproximadamente" usado en relación con una cantidad incluye el valor indicado y tiene el significado dictado por el contexto (por ejemplo, incluye el grado de error asociado con la medición de la cantidad particular).

65 [0023] El término "tratar", como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso, o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección. El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere al

acto de tratar, ya que "tratar" se define inmediatamente anteriormente.

[0024] El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa aquí, es la cantidad de un compuesto descrito en las reivindicaciones presentes en una composición descrita en la presente memoria que se necesita para proporcionar un nivel deseado de fármaco en las secreciones y los tejidos de las vías respiratorias y los pulmones, o alternativamente, en el torrente sanguíneo de un sujeto a tratar para proporcionar una respuesta fisiológica anticipada o un efecto biológico deseado cuando dicha composición se administra por la vía de administración elegida. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, por ejemplo, el compuesto particular, la actividad específica de la composición, el dispositivo de administración empleado, las características físicas de la composición, su uso previsto, así como las consideraciones del paciente, como la gravedad del estado de la enfermedad, la cooperación del paciente, etc., y se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica y en referencia a la información proporcionada en este documento.

[0025] El término "solución salina normal" significa una solución acuosa que contiene NaCl al 0,9% (p/v).

[0026] El término "solución salina hipertónica" significa una solución acuosa que contiene más de 0,9% (p/v) de NaCl. Por ejemplo, el 3% de solución salina hipertónica contendría un 3% (p/v) de NaCl.

[0027] Cualquier referencia a los compuestos de la invención descritos en este documento también incluye una referencia a una sal fisiológicamente aceptable de los mismos. Ejemplos de sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen sales derivadas de una base apropiada, tal como un metal alcalino o un alcalinotérreo (por ejemplo, Na⁺, Li⁺, K⁺, Ca⁺² y Mg⁺²), amonio y NR₄⁺ (en donde R se define aquí). Las sales fisiológicamente aceptables de un átomo de nitrógeno o un grupo amino incluyen (a) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácidos sulfámicos, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (b) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido isetiónico, ácido lactobiónico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido alginico, ácido poliglutamico, ácido naftalensulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico, ácido malónico, ácido sulfosalicílico, ácido glicólico, 2-hidroxi-3-naftoato, pamoato, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido ftálico, ácido mandélico, ácido láctico, ácido etanosulfónico, lisina, arginina, ácido glutámico, glicina, serina, treonina, alanina, isoleucina, leucina y similares; y (c) sales formadas a partir de aniones elementales, por ejemplo, cloro, bromo y yodo. Las sales fisiológicamente aceptables de un compuesto de un grupo hidroxilo incluyen el anión de dicho compuesto en combinación con un catión adecuado tal como Na⁺ y NR₄⁺.

[0028] Para uso terapéutico, las sales de los ingredientes activos de los compuestos de la invención serán fisiológicamente aceptables, es decir, serán sales derivadas de un ácido o base fisiológicamente aceptable. Sin embargo, las sales de ácidos o bases que no son fisiológicamente aceptables también pueden ser útiles, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto fisiológicamente aceptable. Todas las sales, derivadas o no de un ácido o base fisiológicamente aceptable, están dentro del alcance de la presente invención.

[0029] Se ha de entender que las composiciones en el presente documento comprenden compuestos de la invención en su forma no ionizada, así como zwitteriónica, y combinaciones con cantidades estequiométricas de agua como en hidratos.

[0030] Los compuestos comprendidos en las composiciones de la invención pueden tener centros quirales, por ejemplo, de carbono quiral o átomos de fósforo. Los compuestos de la invención incluyen, por lo tanto, mezclas racémicas de todos los estereoisómeros, incluidos los enantiómeros, diastereómeros y atropisómeros. Además, los compuestos de la invención incluyen isómeros ópticos enriquecidos o resueltos en cualquiera o todos los átomos quirales asimétricos. En otras palabras, los centros quirales que se desprenden de las representaciones se proporcionan como isómeros quirales o mezclas racémicas. Las mezclas racémicas y diastereoméricas, así como los isómeros ópticos individuales aislados o sintetizados, sustancialmente libres de sus pares enantioméricos o diastereoméricos, están todos dentro del alcance de la invención. Las mezclas racémicas se separan en sus isómeros individuales, sustancialmente ópticamente puros, mediante técnicas bien conocidas como, por ejemplo, la separación de sales diastereoméricas formadas con adyuvantes ópticamente activos, por ejemplo, ácidos o bases seguidos por la conversión de nuevo a las sustancias ópticamente activas. En la mayoría de los casos, el isómero óptico deseado se sintetiza por medio de reacciones estereoespecíficas, comenzando con el estereoisómero apropiado del material de partida deseado.

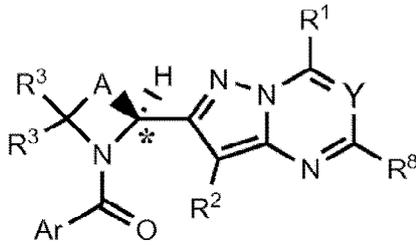
[0031] El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponerse sobre su imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles sobre su imagen especular.

[0032] El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero que difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

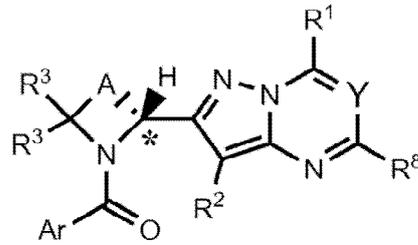
[0033] "Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse bajo procedimientos analíticos de alta resolución como la electroforesis y la cromatografía.

5

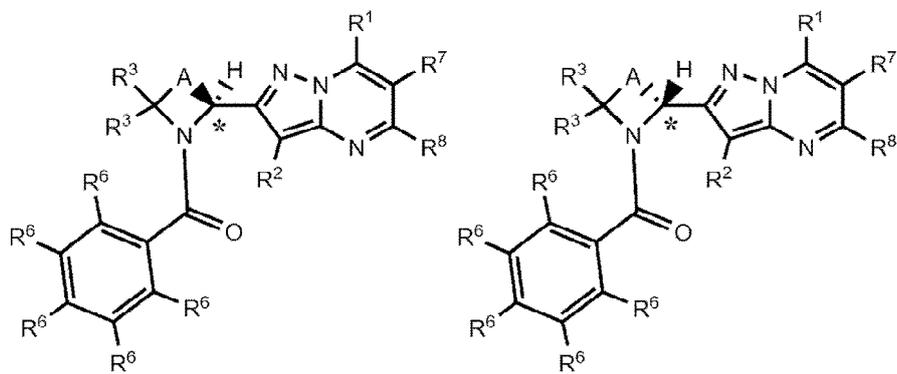
[0034] Los "enantiómeros" se refieren a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Los ejemplos no limitantes de enantiómeros se representan en la Fórmula I-VI que se muestra a continuación, en la que una posición de quiralidad se marca con un asterisco.



Formula I

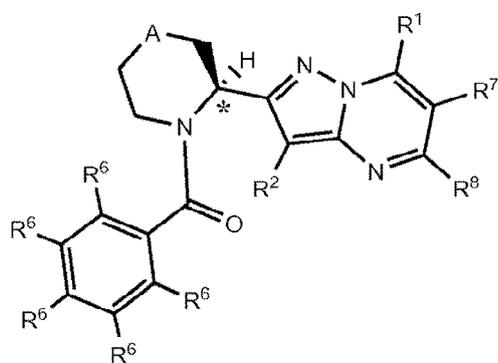


Formula II

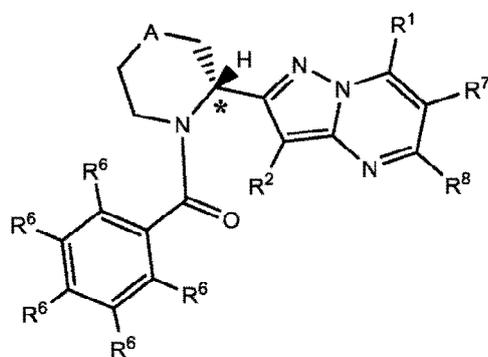


Formula III

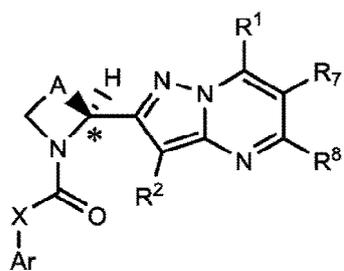
Formula IV



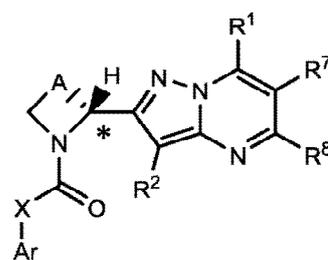
Formula V



Formula VI



Formula VII



Formula VIII

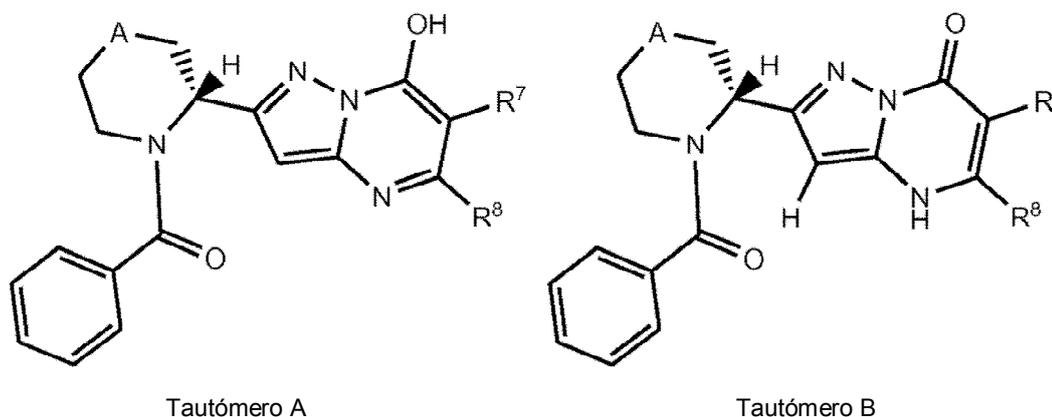
[0035] La quiralidad en la posición asterisco es una característica de los compuestos presentes en las composiciones de la invención. En una realización, los compuestos de las composiciones de la invención son al menos 60% de un solo enantiómero en la posición de asterisco. Preferiblemente, los compuestos de las composiciones de la invención son al menos 70% de un solo enantiómero en la posición de asterisco, más preferiblemente al menos 80% de un solo enantiómero, más preferiblemente al menos 90% de un solo enantiómero y lo más preferiblemente al menos 95% de enantiómero único. En una realización, la estereoquímica preferida en el carbono marcado con un asterisco como se muestra anteriormente para la Fórmula I-VIII es la estereoquímica (S). En otra realización, la estereoquímica en el carbono marcado con un asterisco como se muestra anteriormente para la Fórmula I-VIII es la estereoquímica (R).

[0036] Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en este documento generalmente siguen a SP Parker, Ed., McGraw-Hill Diccionarios of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada en el plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L o R y S se usan para denotar la configuración absoluta de la molécula sobre su(s) centro(s) quiral(es). Los prefijos d y l, D y L, o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación de la luz polarizada plana por el compuesto, con S, (-) o l, lo que significa que el compuesto es levorotatorio mientras que un compuesto prefijado con R, (+), o d es dextrorotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, excepto que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también puede denominarse un enantiómero, y una mezcla de tales isómeros a menudo se denomina una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina una mezcla racémica o un racemato, que puede ocurrir donde no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovistas de actividad óptica.

[0037] Los compuestos de las composiciones de la invención también incluyen moléculas que incorporan isótopos de los átomos que se especifican en las moléculas particulares. Los ejemplos no limitantes de estos isótopos incluyen D, T, ^{14}C , ^{13}C y ^{15}N .

[0038] Siempre que un compuesto descrito en este documento está sustituido con más de uno del mismo grupo designado, por ejemplo, "R" o "R¹", entonces se entenderá que los grupos pueden ser iguales o diferentes, es decir, cada grupo se selecciona independientemente. Las líneas onduladas, ~~~~~, indican el sitio de las uniones de enlaces covalentes a las subestructuras, grupos, restos, o átomos.

[0039] Los compuestos de las composiciones de la invención también pueden existir como isómeros tautomeros en ciertos casos. Aunque solo se puede representar una estructura de resonancia deslocalizada, todas estas formas se contemplan dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, los tautómeros de enoamina pueden existir para los sistemas de purina, pirimidina, imidazol, guanidina, amidina y tetrazol y todas sus formas tautoméricas posibles están dentro del alcance de la invención. Un ejemplo no limitativo de tautomería se muestra a continuación como tautómero A y tautómero B.



Formulaciones farmacéuticas

[0040] Los compuestos de esta invención se formulan con vehículos y excipientes convencionales, que se seleccionarán de acuerdo con la práctica ordinaria. Las tabletas contendrán excipientes, deslizantes, rellenos, aglutinantes y similares. Las formulaciones acuosas se preparan en forma estéril y, cuando están destinadas a ser administradas por una administración diferente a la oral, generalmente serán isotónicas. Todas las formulaciones contendrán opcionalmente excipientes como los que se describen en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (1986). Los excipientes incluyen ácido ascórbico y otros antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA,

carbohidratos tales como dextrano, hidroxialquilcelulosa, hidroxialquilmetilcelulosa, ácido esteárico y similares. El pH de las formulaciones varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 11, pero generalmente es de aproximadamente 7 a 10.

5 **[0041]** Aunque es posible que los ingredientes activos para ser administrados solos, puede ser preferible presentarlos como formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones, tanto para uso veterinario como para uso humano, de la invención comprenden al menos un ingrediente activo, como se definió anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables y al menos otro ingrediente terapéutico, particularmente aquellos ingredientes terapéuticos adicionales como se describe en el presente documento. El (los) portador(es) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatible(s) con los otros ingredientes de la formulación y ser fisiológicamente inocuo(s) para el receptor de la misma.

15 **[0042]** Las formulaciones incluyen las adecuadas para las vías de administración anteriores. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Las técnicas y formulaciones generalmente se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Tales métodos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el ingrediente activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

20 **[0043]** Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo también puede administrarse como un bolo, electuario o pasta.

30 **[0044]** Un comprimido se fabrica mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos comprimidos pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma de flujo libre, como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente de superficie activo o dispersante. Las tabletas moldeadas pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del ingrediente activo en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden opcionalmente recubrirse o marcarse y opcionalmente se formulan para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo de los mismos.

35 **[0045]** Para las infecciones del ojo u otros tejidos externos, por ejemplo boca y piel, las formulaciones se aplican preferiblemente como una pomada o crema tópica que contiene el (los) ingrediente(s) activo(s) en una cantidad de, por ejemplo, 0,075 a 20% p/p (incluyendo ingrediente(s) activo(s) en un rango entre 0,1% y 20% en incrementos de 0,1% p/p, tal como 0,6% p/p, 0,7% p/p, etc.), preferiblemente 0,2 a 15% p/p y lo más preferiblemente de 0,5 a 10% p/p. Cuando se formulan en una pomada, los ingredientes activos pueden emplearse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Alternativamente, el ingrediente activo se puede formular en una crema con una base de crema de aceite en agua.

45 **[0046]** Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos 30% p/p de un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tales como propilenglicol, butano 1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG 400) y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir deseablemente un compuesto que mejore la absorción o penetración del ingrediente activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Los ejemplos de dichos potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

50 **[0047]** La fase oleosa de las emulsiones de esta invención puede estar constituida por ingredientes conocidos de una manera conocida. Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante (también conocido como un agente emulgente), deseablemente comprende una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o con una grasa y un aceite. Preferiblemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como un estabilizante. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. Juntos, el (los) emulsionante(s) con o sin estabilizador(es) forman la llamada cera emulsionante, y la cera, junto con el aceite y la grasa, forman la llamada base de ungüento emulsionante que forma la fase oleosa dispersada de las formulaciones de crema.

60 **[0048]** Los emulgentes y estabilizantes de emulsión adecuados para uso en la formulación de la invención incluyen Tween® 60, Span® 80, alcohol cetosteárico, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio.

65 **[0049]** La elección de aceites o grasas para la formulación adecuados se basa en conseguir las propiedades cosméticas deseadas. La crema debe ser preferiblemente un producto no graso, que no manche y lavable con una consistencia adecuada para evitar fugas de los tubos u otros recipientes. Éster alquílico mono o dibásico de cadena lineal o ramificada, como di-isoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco,

miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de cadena ramificada se pueden usar ésteres conocidos como Crodamol CAP, los tres últimos son ésteres preferidos. Estos se pueden usar solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Alternativamente, se utilizan lípidos de alto punto de fusión como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

[0050] Las formulaciones farmacéuticas según la presente invención comprenden una combinación de acuerdo con la invención junto con vehículos o excipientes aceptables uno o más vehículos farmacéuticamente y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Las formulaciones farmacéuticas que contienen el ingrediente activo pueden estar en cualquier forma adecuada para el método de administración deseado. Cuando se usan para uso oral, por ejemplo, pueden prepararse tabletas, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas o de aceite, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes que incluyen agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, con el fin de proporcionar una preparación de sabor agradable. Las tabletas que contienen el ingrediente activo en mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable no tóxico que son adecuadas para la fabricación de tabletas son aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como calcio o carbonato de sodio, lactosa, calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegración, tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o acacia; y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas, incluida la microencapsulación para retrasar la desintegración y la adsorción en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera.

[0051] Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un aceite. medio, como el aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva.

[0052] Las suspensiones acuosas de la invención contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia, y agentes dispersantes o humectantes tales como una fosfátida natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (p. ej., estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (p. ej., heptadecaetilenoxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (p. ej., monooleato de polioxietileno sorbitano). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

[0053] Las suspensiones de aceite se pueden formular suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal, tal como aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones orales pueden contener un agente espesante, como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Los agentes edulcorantes, tales como los expuestos anteriormente, y los agentes aromatizantes se pueden agregar para proporcionar una preparación oral sabrosa. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante como el ácido ascórbico.

[0054] Los polvos y gránulos dispersables de la invención adecuados para preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión, y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión se ejemplifican por los descritos anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes.

[0055] Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite-en-agua. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, como el aceite de oliva o el aceite de arachis, un aceite mineral, como la parafina líquida, o una mezcla de estos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas de origen natural, como goma de acacia y goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural, como lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, como monooleato de sorbitán y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, como el monooleato de polioxietileno sorbitán. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y aromatizantes. Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, como glicerol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante, un saborizante o un agente colorante.

[0056] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de

acuerdo con la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, como una solución en 1,3-butano-diol o preparada como un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles pueden emplearse convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico se pueden usar igualmente en la preparación de inyectables.

[0057] La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con el material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una formulación de liberación prolongada destinada a la administración oral a humanos puede contener aproximadamente de 1 a 1.000 mg de material activo compuesto con una cantidad apropiada y conveniente de material portador que puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 95% del total de composiciones (peso:peso). La composición farmacéutica se puede preparar para proporcionar cantidades fácilmente medibles para administración. Por ejemplo, una solución acuosa destinada a infusión intravenosa puede contener de aproximadamente 3 a 500 µg del ingrediente activo por mililitro de solución para que pueda producirse la infusión de un volumen adecuado a una velocidad de aproximadamente 30 mL/h.

[0058] Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en el ojo también incluyen gotas oculares en las que el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el ingrediente activo. El ingrediente activo está presente preferiblemente en tales formulaciones en una concentración de 0,5 a 20%, ventajosamente de 0,5 a 10%, y particularmente de aproximadamente 1,5% p/p.

[0059] Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base con sabor, usualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

[0060] Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

[0061] Las formulaciones adecuadas para administración intrapulmonar o nasal tienen un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 500 micras, tal como 0,5, 1, 30, 35, etc., que se administra por inhalación rápida a través del conducto nasal o por inhalación. A través de la boca para llegar a los sacos alveolares. Las formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para la administración de aerosol o polvo seco pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales y pueden administrarse con otros agentes terapéuticos, tales como los compuestos utilizados hasta ahora en el tratamiento o profilaxis de infecciones por *Pneumovirinae* como se describe a continuación.

[0062] En otro aspecto, la invención es una composición inhalable nueva, eficaz, segura, no irritante y fisiológicamente compatible que comprende un compuesto divulgado en las reivindicaciones, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos otro agente terapéutico, adecuado para tratamiento de infecciones por *Pneumovirinae* y bronquiolitis potencialmente asociadas. Las sales farmacéuticamente aceptables preferidas son sales de ácidos inorgánicos que incluyen sales de clorhidrato, bromhidrato, sulfato o fosfato, ya que pueden causar menos irritación pulmonar. Preferiblemente, la formulación inhalable se administra al espacio endobronquial en un aerosol que comprende partículas con un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 µm. Preferiblemente, el compuesto de las composiciones de la invención se formula para el suministro de aerosol usando un nebulizador, un inhalador de dosis medida presurizado (pMDI) o un inhalador de polvo seco (DPI).

[0063] Ejemplos no limitantes de nebulizadores incluyen atomización, jet, ultrasónica, presión, vibración placa porosa, o nebulizadores equivalentes incluyendo aquellos nebulizadores que utilizan la tecnología de suministro de aerosol adaptativo (Denyer, J. Aerosol Medicine Pulmonary Drug Delivery 2010, 23 Supl 1, S1-S10). Un nebulizador a chorro utiliza presión de aire para romper una solución líquida en gotas de aerosol. Un nebulizador ultrasónico funciona con un cristal piezoeléctrico que corta un líquido en pequeñas gotas de aerosol. Un sistema de nebulización presurizado fuerza la solución bajo presión a través de pequeños poros para generar gotitas de aerosol. Un dispositivo de placa porosa vibrante utiliza una vibración rápida para cortar una corriente de líquido en tamaños de gota apropiados.

[0064] En una realización preferida, la formulación para la nebulización es suministrada al espacio endobronquial en un aerosol que comprende partículas con un MMAD predominantemente entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 5 µm usando un nebulizador capaz de aerosolizar la formulación en partículas de la requerida MMAD. Para ser óptimamente terapéuticamente eficaz y evitar efectos secundarios respiratorios superiores y sistémicos, la mayoría de partículas aerosolizadas no debe tener un MMAD mayor de aproximadamente 5 µm. Si un aerosol contiene una gran cantidad de partículas con un MMAD mayor de 5 µm, las partículas se depositan en las

vías respiratorias superiores, lo que reduce la cantidad de fármaco administrado en el sitio de la inflamación y la broncoconstricción en el tracto respiratorio inferior. Si el MMAD del aerosol es más pequeño que aproximadamente 1 μm , entonces las partículas tienen una tendencia a permanecer suspendidas en el aire inhalado y posteriormente se exhalan durante la espiración.

5
10
15
[0065] Cuando se formula y se administra de acuerdo con el método de la invención, la formulación de aerosol para la nebulización suministra una dosis terapéuticamente eficaz del compuesto de las composiciones de la invención al sitio de la infección *Pneumovirinae* suficiente para tratar la infección *Pneumovirinae*. La cantidad de fármaco administrado debe ajustarse para reflejar la eficacia de la administración de una dosis terapéuticamente eficaz del compuesto. En una realización preferida, una combinación de la formulación acuosa de aerosol con el atomizador, chorro, placa porosa presurizada, vibrante o nebulizador ultrasónico permite, dependiendo del nebulizador, aproximadamente, al menos, 20, aproximadamente 90%, típicamente aproximadamente 70%. administración de la dosis administrada del compuesto en las vías respiratorias. En una realización preferida, se administra al menos aproximadamente 30 a aproximadamente 50% del compuesto activo. Más preferiblemente, se administra aproximadamente 70 a aproximadamente 90% del compuesto activo.

20
25
[0066] En otra realización de la presente invención, un compuesto de las composiciones de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra como un polvo inhalable seco. Los compuestos de la invención se administran endobronquialmente como una formulación de polvo seco para administrar eficazmente partículas finas de compuesto en el espacio endobronquial usando polvo seco o inhaladores de dosis medidas. Para la administración por DPI, el compuesto se procesa en partículas con, predominantemente, MMAD entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 5 μm por molienda de secado por pulverización, procesamiento del fluido crítico, o precipitación de la solución. Molienda de medios, molienda de chorro y dispositivos de secado por pulverización y procedimientos capaces de producir los tamaños de partícula con un MMAD entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 5 μm son bien conocidos en la técnica. En una realización, los excipientes se agregan al compuesto antes del procesamiento en partículas de los tamaños requeridos. En otra realización, los excipientes se mezclan con las partículas del tamaño requerido para ayudar en la dispersión de las partículas de fármaco, por ejemplo, utilizando lactosa como excipiente.

30
[0067] Determinaciones del tamaño de partícula se realizan mediante dispositivos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un impactador en cascada de Anderson de varias etapas u otro método adecuado, como los citados específicamente en el Capítulo 601 de la Farmacopea de los EE.UU.

35
40
45
50
[0068] En otra realización preferida, un compuesto de las composiciones de la invención se suministra como un polvo seco usando un dispositivo tal como un inhalador de polvo seco u otros dispositivos de dispersión de polvo seco. Los ejemplos no limitantes de inhaladores y dispositivos de polvo seco incluyen los descritos en el documento US5.458.135; US5.740.794; US5.775.320; US 5.785.049; US3.906.950; US 4.013.075; US 4.069.819; US 4.995.385; US 5.522.385; US 4.668.218; US 4.667.668; US 4.805.811 y US 5.388.572. Hay dos diseños principales de inhaladores de polvo seco. Un diseño es un dispositivo de medición en el que se coloca un depósito para el medicamento dentro del dispositivo y el paciente agrega una dosis del medicamento en la cámara de inhalación. El segundo diseño es un dispositivo medido de fábrica en el que cada dosis individual se ha fabricado en un recipiente separado. Ambos sistemas dependen de la formulación del fármaco en partículas pequeñas de MMAD de 1 μm y aproximadamente 5 μm , y a menudo implican la formulación de cooperación con partículas de excipiente más grandes, tales como, pero no limitados a, lactosa. El polvo del medicamento se coloca en la cámara de inhalación (ya sea por medición del dispositivo o por ruptura de una dosis medida en fábrica) y el flujo inspiratorio del paciente acelera la salida del polvo del dispositivo hacia la cavidad bucal. Las características de flujo no laminar de la ruta del polvo hacen que se descompongan los agregados de excipiente y fármaco, y la masa de las grandes partículas de excipiente provoca su impactación en la parte posterior de la garganta, mientras que las partículas más pequeñas del fármaco se depositan profundamente en los pulmones. En realizaciones preferidas, el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra como un polvo seco utilizando cualquiera de los dos tipos de inhaladores de polvo seco como se describe aquí, en donde el MMAD del polvo seco, exclusivo de cualquier excipiente, está predominantemente en el rango de 1 μm a aproximadamente 5 μm .

55
60
[0069] En otra realización preferida, un compuesto de las composiciones de la invención se suministra como un polvo seco usando un inhalador de dosis medida. Los ejemplos no limitantes de inhaladores y dispositivos de dosis medidas incluyen los descritos en el documento US 5.261.538; US 5.544.647; US5.622.163; US 4.955.371; US3.565.070; US3.361.306 y US 6.116.234. En realizaciones preferidas, un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra como un polvo seco usando un inhalador de dosis medida en el que el MMAD del polvo seco, excluyendo cualquier excipiente, está predominantemente en el rango de aproximadamente 1-5 μm .

65
[0070] Las formulaciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol que contienen además del ingrediente activo, los vehículos que se conocen en la técnica como apropiados.

[0071] Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles

acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

5 **[0072]** Las formulaciones se presentan en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas se preparan a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo descrito anteriormente. Las formulaciones de dosis unitarias preferidas son aquellas que contienen una dosis diaria o una dosis diaria unitaria, como se menciona anteriormente, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo.

15 **[0073]** Debe entenderse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo aquellas adecuadas para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

20 **[0074]** La invención proporciona además composiciones veterinarias que comprenden al menos un ingrediente activo como se definió anteriormente junto con un vehículo veterinario para el mismo.

25 **[0075]** Los vehículos veterinarios son materiales útiles para el propósito de administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que son de otro modo inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el ingrediente activo. Estas composiciones veterinarias pueden administrarse por vía oral, parenteral o por cualquier otra vía deseada.

30 **[0076]** Los compuestos de la invención se utilizan para proporcionar formulaciones farmacéuticas de liberación controlada que contienen como ingrediente activo uno o más compuestos de la invención ("formulaciones de liberación controlada") en las que la liberación del ingrediente activo se controla y regula para permitir menos frecuencia de dosificación o para mejorar el perfil farmacocinético o de toxicidad de un ingrediente activo dado.

35 **[0077]** La dosis efectiva de ingrediente activo depende al menos de la naturaleza de la afección a tratar, la toxicidad, si el compuesto se está utilizando profilácticamente (dosis más bajas) o contra una infección viral activa, el método de administración, y la formulación farmacéutica, y se determinará por el médico mediante estudios de aumento de dosis convencionales. Se puede esperar que sea de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día; típicamente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día; más típicamente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por día; más típicamente, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal por día. Por ejemplo, la dosis candidata diaria para un humano adulto de aproximadamente 70 kg de peso corporal oscilará entre 1 mg y 1.000 mg, preferiblemente entre 5 mg y 500 mg, y puede tomar la forma de dosis únicas o múltiples.

40 Vías de administración

45 **[0078]** Uno o más compuestos de la invención (en adelante referidos como los ingredientes activos) se administran por cualquier vía apropiada para la afección a tratar. Las vías adecuadas incluyen oral, rectal, nasal, pulmonar, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratérmica y epidural), y similares. Se apreciará que la vía preferida puede variar, por ejemplo, con la condición del destinatario. Una ventaja de los compuestos de esta invención es que son biodisponibles por vía oral y pueden dosificarse por vía oral.

50 Terapia de combinación

55 **[0079]** Las composiciones de la invención se usan en combinación con otros ingredientes activos. Para el tratamiento de las infecciones por el virus de *Pneumovirinae*, preferiblemente, el otro agente terapéutico activo es activo contra las infecciones por el virus de *Pneumovirinae*, particularmente las infecciones por el virus sincitial respiratorio. Ejemplos no limitantes de estos otros agentes terapéuticos activos son ribavirina, palivizumab, motavizumab, RSV-IGIV (RespiGam®), MEDI-557, A-60444 (también conocido como RSV604), MDT-637, BMS-433771, ALN-RSV0, ALX-0171 y mezclas de los mismos.

60 **[0080]** Muchas de las infecciones de los *Pneumovirinae* virus son las infecciones respiratorias. Por lo tanto, las terapias activas adicionales utilizadas para tratar los síntomas respiratorios y las secuelas de la infección pueden usarse en combinación con las composiciones de la invención. Los agentes adicionales se administran preferiblemente por vía oral o por inhalación directa. Por ejemplo, otros agentes terapéuticos adicionales preferidos en combinación con las composiciones de la invención para el tratamiento de infecciones respiratorias virales incluyen, pero no se limitan a, broncodilatadores y corticosteroides.

65 **[0081]** Los glucocorticoides, que se introdujeron por primera vez como una terapia de asma en 1950 (Carrier,

Journal of Allergy, 21, 282-287, 1950), siendo el tratamiento más potente y consistentemente eficaz para esta enfermedad, aunque su mecanismo de acción todavía no se entiende completamente (Morris, J. Allergy Clin. Immunol., 75 (1 Pt) 1-13, 1985). Desafortunadamente, las terapias con glucocorticoides orales se asocian con profundos efectos secundarios indeseables, como obesidad troncal, hipertensión, glaucoma, intolerancia a la glucosa, aceleración de la formación de cataratas, pérdida de minerales óseos y efectos psicológicos, todo lo cual limita su uso como agentes de tratamiento terapéutico a largo plazo. (Goodman y Gilman, 10ª edición, 2001). Una solución a los efectos secundarios sistémicos es administrar medicamentos esteroideos directamente al sitio de la inflamación. Los corticosteroides inhalados (ICS) se han desarrollado para mitigar los efectos adversos graves de los esteroideos orales. Algunos de los tipos de corticoesteroides que pueden usarse son dexametasona, dexametasona fosfato de sodio, fluorometolona, acetato de fluorometolona, loteprednol etabonato, hidrocortisona, o cualquier adicción, o cualquier tipo de parásito. acetonida, flunisolida, fluocortina-21-butilato, flumetasona, pivalato de flumetasona, budesonida, propionato de halobetasol, furoato de mometasona, propionato de fluticasona, ciclesonida; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

[0082] Otros agentes anti-inflamatorios de trabajo a través de mecanismos de cascada anti-inflamatorios son también útiles como agentes terapéuticos adicionales en combinación con las composiciones de la invención para el tratamiento de infecciones respiratorias virales. Aplicación de "moduladores de transducción de señales antiinflamatorias" (referidos en este texto como AISTM), como inhibidores de la fosfodiesterasa (por ejemplo, PDE-4, PDE-5 o PDE-7), inhibidores del factor de transcripción (por ejemplo, bloqueo de NF κ B a través de la inhibición de IKK), o inhibidores de la quinasa (por ejemplo, el bloqueo de P38 MAP, JNK, PI3K, EGFR o Syk) es un enfoque lógico para desactivar la inflamación, ya que estas pequeñas moléculas se dirigen a un número limitado de vías intracelulares comunes, aquellas vías de transducción de señales que son puntos críticos por la intervención terapéutica antiinflamatoria (véase revisión de PJ Barnes, 2006). Estos agentes terapéuticos adicionales no limitantes incluyen: (2-dimetilamino-etilo)-amida del ácido 5-(2,4-difluoro-fenoxi)-1-isobutilo-1H-indazol-6-carboxílico (inhibidor de la quinasa Map P38 ARRY-797); 3-ciclopropilmetoxi-N-(3,5-dicloro-piridin-4-ilo)-4-difluorometoxi-benzamida (inhibidor de PDE-4 Roflumilast); 4-[2-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenilo)-2-fenilo-etilo]-piridina (inhibidor de PDE-4 CDP-840); N-(3,5-dicloro-4-piridinilo)-4-(difluorometoxi)-8-[(metilsulfonilo)amino]-1-dibenzofurancarboxamida (inhibidor de PDE-4 Oglemilast); N-(3,5-Dicloro-piridina-4-ilo)-2-[1-(4-fluorobencilo)-5-hidroxi-1H-indol-3-ilo]-2-oxoacetamida (inhibidor de PDE-4 AWD 12-281); ácido 8-metoxi-2-trifluor-metilo-quinolina-5-carboxílico (3,5-dicloro-1-oxi-piridina-4-ilo)-amida (inhibidor de PDE-4 Sch 351591); 4-[5-(4-fluorofenilo)-2-(4-metansulfonil-fenilo)-1H-imidazol-4-ilo]-piridina (inhibidor de la P38 SB-203850); 4-[4-(4-Fluoro-fenilo)-1-(3-fenilo-propilo)-5-piridina-4-ilo-1H-imidazol-2-ilo]-but-3-yn-1-ol (Inhibidor de P38 RWJ-67657); 2-dietilamino-etilo éster del ácido 4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxi-fenilo)-ciclohexanocarboxílico (profármaco del éster 2-dietilo-etílico de Cilomilast, inhibidor de la PDE-4); (3-cloro-4-fluorofenilo)-[7-metoxi-6-(3-morfolin-4-ilo-propoxi)-quinazolina-4-ilo]-amina (Gefit-inib, inhibidor de EGFR); y 4-(4-metilo-piperazin-1-ilmetilo)-N-[4-metilo-3-(4-piridina-3-ilo-pirimidina-2-ilamino)-finilo]-benzamida (Imatinib, EGFR inhibidor).

[0083] Las combinaciones que comprenden broncodilatadores agonistas β 2-adrenorreceptores inhalados, tales como formoterol, albuterol o salmeterol, también son combinaciones adecuadas, pero no limitativas, útiles para el tratamiento de infecciones virales respiratorias. Las combinaciones de broncodilatadores agonistas β 2-adrenorreceptores inhalados, tales como formoterol o salmeterol con ICS, también se usan para tratar tanto la broncoconstricción como la inflamación (Symbicort® y Advair®, respectivamente). Las combinaciones que comprenden estos ICS y combinaciones β 2-adrenoreceptor agonistas junto con los compuestos descritos en las reivindicaciones son también adecuados, pero no limitativos, las combinaciones útiles para el tratamiento de infecciones virales respiratorias.

[0085] Para el tratamiento o la profilaxis de bronco-constricción pulmonar, anticolinérgicos son de uso potencial y, por lo tanto, útil como agentes terapéuticos adicionales en combinación con los compuestos descritos en las reivindicaciones para el tratamiento de infecciones respiratorias virales. Estos anticolinérgicos incluyen, pero no se limitan a, antagonistas del receptor muscarínico (en particular del subtipo M3) que han demostrado eficacia terapéutica en el hombre para el control del tono colinérgico en la EPOC (Witek, 1999); ácido 1-(4-Hidroxi-1-[3,3,3-tris-(4-fluoro-fenilo)-propionilo]-pirrolidina-2-carbonilo)-pirrolidina-2-carboxílico (1-metilo-piperidina-4-ilmetilo)-amida; 3-[3-(2-dietilamino-acetoxi)-2-fenilo-propioniloxi]-8-isopropilo-8-metilo-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano (Ipratropio-N,N-dietilglicinato); ácido 1-ciclohexilo-3,4-dihidro-1H-isoquinolina-2-carboxílico éster del 1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-ilo; éster 1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-ilo (solifenacina); ácido 2-hidroximetilo-4-metansulfonilo-2-fenilo-butírico (Revatopato); 2-[1-[2-(2,3-Dihidro-benzofurano-5-ilo)-etilo]-pirrolidina-3-ilo]-2,2-difenilacetamida (darifenacina); 4-Azepano-1-ilo-2,2-difenil-butiramida (Buzepide); 7-[3-(2-dietilamino-acetoxi)-2-fenilo-propioniloxi]-9-etilo-9-metilo-3-oxa-9-azonia-triciclo[3.3.1.0^{2,4}]nonano (Oxitropio-N,N-dietilglicinato); 7-[2-(2-dietilamino-acetoxi)-2,2-di-tiofen-2-ilo-acetoxi]-9,9-dimetilo-3-oxa-9-azonia-triciclo[3.3.1.0^{2,4}]nonano (Tiotropio-N,N-dietilglicinato); ácido dimetilaminoacético 2-(3-diisopropilamino-1-fenilo-propilo)-4-metilo-fenilo éster (Tolterodina-N,N-dietilglicinato); 3-[4,4-Bis-(4-fluoro-fenilo)-2-oxo-imidazolidina-1-ilo]-1-metilo-1-(2-oxo-2-piridina-2-ilo-etilo)pirrolidinio; 1-[1-(3-Fluorobencilo)-piperidina-4-ilo]-4,4-bis-(4-fluoro-fenilo)-imidazolidina-2-ona; 1-cicloalocilo-3-(3-metoxi-1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-ilo)-1-fenilo-prop-2-yn-1-ol; 3-[2-(2-dietilamino-acetoxi)-2,2-di-tiofen-2-ilo-acetoxi]-1-(3-fenoxi-propilo)-1-azonia-biciclo[2.2.2]octano (Aclidinio-N,N-dietilglicinato); o el ácido (2-di-etilamino-acetoxi)-ditiofen-2-ilo-acético 1-metilo-1-(2-fenoxi-etilo)-piperidina-4-ilo.

5 [0086] Las composiciones de la invención también se pueden combinar con agentes mucolíticos para tratar tanto la infección como los síntomas de las infecciones respiratorias. Un ejemplo no limitante de un agente mucolítico es el ambroxol. De manera similar, las composiciones de la invención se pueden combinar con expectorantes para tratar tanto la infección como los síntomas de infecciones respiratorias. Un ejemplo no limitante de un expectorante es la guaifenesina.

10 [0087] La solución salina hipertónica nebulizada se usa para mejorar la eliminación inmediata y a largo plazo de las pequeñas vías aéreas en pacientes con enfermedades pulmonares (Kuzik, J. Pediatrics 2007, 266). Los compuestos en las composiciones de la invención también se pueden combinar con solución salina hipertónica nebulizada, particularmente cuando la infección por el virus de *Pneumovirinae* se complica con bronquiolitis. La combinación de los compuestos con solución salina hipertónica también puede comprender cualquiera de los agentes adicionales discutidos anteriormente. En un aspecto preferido, se utiliza aproximadamente 3% de solución salina hipertónica nebulizada.

15 [0088] También es posible combinar cualquier compuesto de la invención con uno o más agentes terapéuticos adicionales activos en una forma de dosificación unitaria para la administración simultánea o secuencial a un paciente. La terapia de combinación puede administrarse como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra de forma secuencial, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones.

20 [0089] La administración conjunta de un compuesto de la invención con uno o más agentes terapéuticos activos en general se refiere a la administración simultánea o secuencial de un compuesto de la invención y uno o más otros agentes terapéuticos activos diferentes, tales que cantidades terapéuticamente eficaces del compuesto de la invención y uno o más otros agentes terapéuticos activos están presentes en el cuerpo del paciente.

25 [0090] La coadministración incluye la administración de dosis unitarias de los compuestos de la invención antes o después de la administración de dosis unitarias de uno o más agentes terapéuticos activos, por ejemplo, la administración de los compuestos de la invención en segundos, minutos, u horas de administración de uno o más agentes terapéuticos activos. Por ejemplo, una dosis unitaria de un compuesto de la invención puede administrarse primero, seguida en segundos o minutos por la administración de una dosis unitaria de uno o más de otros agentes terapéuticos activos. Alternativamente, se puede administrar primero una dosis unitaria de uno o más agentes terapéuticos, seguido de la administración de una dosis unitaria de un compuesto de la invención en segundos o minutos. En algunos casos, puede ser deseable administrar una dosis unitaria de un compuesto de la invención primero, seguido, después de un período de horas (por ejemplo, 1-12 horas), mediante la administración de una dosis unitaria de uno o más otros agentes terapéuticos activos. En otros casos, puede ser deseable administrar una dosis unitaria de uno o más agentes terapéuticos activos primero, seguido, después de un período de horas (por ejemplo, 1-12 horas), mediante la administración de una dosis unitaria de un compuesto de la invención.

35 [0091] La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y "sinérgico", es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos utilizados juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan de utilizar los compuestos por separado. Se puede lograr un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos son: (1) formulados conjuntamente y administrados o administrados simultáneamente en una formulación combinada; (2) entregados por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se administra en terapia de alternancia, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o administran secuencialmente, por ejemplo, en tabletas, píldoras o cápsulas separadas, o mediante inyecciones diferentes en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, una dosis efectiva de cada ingrediente activo se administra secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, las dosis efectivas de dos o más ingredientes activos se administran juntas. Un efecto antiviral sinérgico denota un efecto antiviral que es mayor que los efectos puramente aditivos predichos de los compuestos individuales de la combinación.

50 Metabolitos de los compuestos de la invención.

55 [0092] También caen dentro del alcance de esta descripción los productos metabólicos *in vivo* de los compuestos descritos en el presente documento, en la medida en que tales productos son nuevos y no evidentes respecto a la técnica anterior. Tales productos pueden resultar, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación y similares del compuesto administrado, principalmente debido a procesos enzimáticos. Por consiguiente, la divulgación incluye compuestos nuevos y no obvios producidos por un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de esta divulgación con un mamífero durante un período de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo. Dichos productos se identifican típicamente mediante la preparación de un compuesto radiomarcado (por ejemplo, ¹⁴C o ³H) de la divulgación, administrándolo por vía parenteral en una dosis detectable (por ejemplo, más de aproximadamente 0,5 mg/kg) a un animal como rata, ratón, cobayo, mono, o para el hombre, lo que permite el tiempo suficiente para que se produzca el metabolismo (por lo general, entre 30 segundos y 30 horas) y el aislamiento de sus productos de conversión de la orina, sangre u otras muestras biológicas. Estos productos se aíslan fácilmente ya que están marcados (otros se aíslan mediante el uso de anticuerpos capaces de unirse a epítomos que sobreviven en el metabolito). Las estructuras de los metabolitos se determinan de manera convencional, por ejemplo, mediante análisis de MS o RMN. En general, el análisis de los metabolitos se realiza de la misma manera que los estudios de metabolismo de fármacos convencionales bien

conocidos por los expertos en la técnica. Los productos de conversión, siempre y cuando no se encuentren de otra manera *in vivo*, son útiles en ensayos de diagnóstico para la dosificación terapéutica de los compuestos de la divulgación, incluso si no poseen actividad antiviral de HSV propia. Se conocen recetas y métodos para determinar la estabilidad de compuestos en secreciones gastrointestinales sustitutas. Los compuestos se definen aquí como estables en el tracto gastrointestinal, donde menos de aproximadamente 50 por ciento en moles de los grupos protegidos se desprotegen en jugo intestinal o gástrico sustituto tras la incubación durante 1 hora a 37°C. El simple hecho de que los compuestos sean estables para el tracto gastrointestinal no significa que no puedan hidrolizarse *in vivo*. Los profármacos de la divulgación típicamente serán estables en el sistema digestivo, pero pueden hidrolizarse sustancialmente al fármaco parental en el lumen digestivo, hígado, pulmón u otro órgano metabólico, o dentro de las células en general.

Distribución de tejidos

[0094] También se ha descubierto que ciertos compuestos de la invención muestran una alta pulmón a las relaciones de plasma que pueden ser beneficiosas para la terapia. Un grupo particular de compuestos de la invención que demuestran esta propiedad son compuestos que incluyen un grupo funcional amina.

Ejemplos

[0095] Se utilizan ciertas abreviaturas y acrónimos para describir los detalles experimentales. Aunque la mayoría de éstos serían entendibles para un experto en la técnica, la Tabla 1 contiene una lista de muchas de estas abreviaturas y acrónimos.

Tabla 1. Lista de abreviaturas y acrónimos.

Abreviatura	Sentido
AC ₂ O	anhídrido acético
AIBN	2,2'-azobis (2-metilpropionitrilo)
Bn	bencilo
BnBr	bromilbromuro
BSA	bis(trimetilsililo)acetamida
BzCl	cloruro de benzoilo
CDI	diimidazol de carbonilo
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DBN	1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DBU	1,5-diazabicyclo[5.4.0]undec-5-eno
DCA	dicloroacetamida
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DME	1,2-dimetoxietano
DMTCI	cloruro de dimetoxitritilo
DMSO	dimetilsulfóxido
DMTr	4,4'-dimetoxitritilo
DMF	dimetilformamida
EtOAc	acetato de etilo
ESI	ionización por electropulverización
HMDS	hexametildisilazano

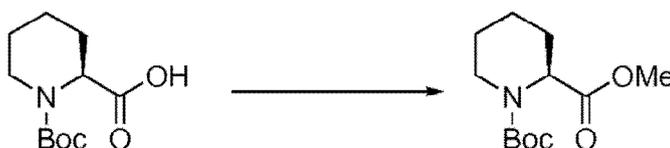
Abreviatura	Sentido
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión.
LDA	diisopropilamida de litio
LRMS	espectro de masas de baja resolución
MCPBA	ácido meta-cloroperbenzoico
MeCN	acetonitrilo
MeOH	metanol
MMTC	cloruro de mono metoxitritilo
m/z o m/e	relación masa a carga
MH ⁺	masa más 1
MH ⁻	masa menos 1
MsOH	ácido metanosulfónico
MS o ms	espectro de masas
NBS	N-bromosuccinimida
Ph	fenilo
ta o t.a.	temperatura ambiente
TBAF	fluoruro de tetrabutilamonio
TMSCI	clorotrimetilsilano
TMSBr	bromotrimetilsilano
TMSI	yodotrimetilsilano
TMSOTf	(trimetilsililo)trifluorometilsulfonato
TÉ	triethylamina
TBA	tributilamina
TBAP	pirofosfato de tributilamonio
TBSCI	cloruro de t-butildimetilsililo
Teja	bicarbonato de trietilamonio
AFT	ácido trifluoroacético
TLC o tlc	cromatografía de capa fina
Tr	trifenilmetilo
Tol	4-metilbenzoilo
Turbo Grignard	Mezcla 1:1 de cloruro de isopropilmagnesio y cloruro de litio
δ	partes por millón aguas abajo de tetrametilsilano

[0096] La invención ahora será ilustrada por la preparación de los compuestos siguientes no limitativos de la invención. Debe entenderse que ciertos intermedios descritos en el presente documento también pueden ser compuestos de la invención.

Preparación de Compuestos

Intermedio 2 (Referencia)

[0097]

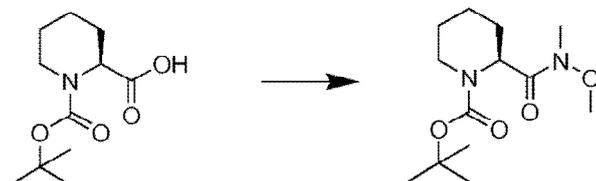


[0098] El ácido N- Boc-(S)-piperidina-2-carboxílico (5,0 g, 22 mmol) en DMF (100 mL) se trató con Cs₂CO₃ (3,5 g, 10,9 mmol) y MeI (1,5 mL, 24 mmol). La mezcla se agitó durante 4 horas y se diluyó con MTBE (250 mL). La mezcla se lavó con agua (2 X 100 mL) y una solución saturada de cloruro de sodio (1 X 100 mL). La solución se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para proporcionar el intermedio de éster **2** (5,1 g en bruto, 96%) como un aceite que se usó sin purificación adicional. ¹H RMN (CDCl₃, 300MHz): δ 4,80 (m, 1H), 3,97 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,93 (m, 1H), 2,18 (app d, J = 13,2 Hz, 1H), 1,67 (m, 2H), 1,45 (br s, 10H), 1,20 (sol. t, J = 13,5 Hz, 1H). R_f = 0,90 (30% de EtOAc-hexanos);

Intermedio 3 (Referencia)**[0099]**

5

10



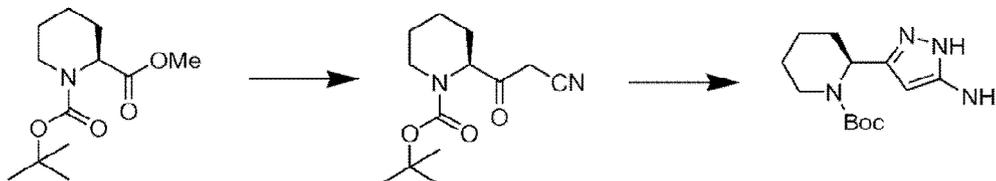
15 **[0100]** El ácido (S)-1-Boc-piperidina-2-carboxílico (25 g, 109 mmol, Sigma-Aldrich) en DMF (500 mL) se trató secuencialmente con MeNHOMe·HCl (11,2 g, 115 mmol), N-metilmorfolina (36 mL, 327 mmol), HOBT (16,2 g, 120 mmol) y EDCI (23 g, 120 mmol) y se agitó durante 18 h. La solución se diluyó con EtOAc (1.000 mL) y se lavó con H₂O (2 X 500 mL) y solución saturada de NaCl (500 mL). La solución se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El residuo se sometió a una columna de 330 g de SiO₂ Combiflash High Performance Gold (gradiente de EtOAc-hexanos al 0-100%) para proporcionar el intermedio de amida de Weinreb 3 (18,4 g, 61%) como un aceite transparente:

20 ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 5,06 (br m, 1H), 3,93 (br m, 1H), 3,77 (br s, 3H), 3,18 (s, 3H), 2,01 (sol. d, J = 13,5 Hz, 1H), 1,71 (m, 4H), 1,45 (s, 9H);
 25 LCMS (ESI) m/z 273 [M+H]⁺, t_R = 2,31 min;
 HPLC (RP: gradiente de MeCN-H₂O al 6-98%, 0,05% de modificador de TFA) t_R = 4,423 min. R_f = 0,60 (50% de EtOAc-hexanos);

Intermedio 4 (Referencia)**[0101]**

35

40



45 **[0102]** A una solución de acetonitrilo (5 mL, 93,8 mmol) en THF seco (50 mL) a -78°C se añadió gota a gota NaN(TMS)₂ (34 mL, 68 mmol, 2M en hexanos). La solución se calentó hasta -40°C y se agitó durante 20 min. Después, la solución se enfrió a -78°C y se añadió gota a gota una solución del éster (Intermedio 2) (7,6 g, 31,1 mmol) en THF (20 mL). La solución se calentó hasta -40°C y se agitó durante 2 h. La solución se enfrió luego a -78°C y se añadió gota a gota una solución de ácido acético (4,8 mL, 80 mmol) en THF (20 mL). A continuación, la solución se calentó a temperatura ambiente y los compuestos volátiles se eliminaron a presión reducida a 40°C. El residuo resultante se disolvió en EtOAc (300 mL) y la fase orgánica se lavó 2 veces cada una con salmuera. Los volátiles se eliminaron a presión reducida a 40°C.

50 ¹H RMN (DMSO, 300 MHz) δ 4,63 (br s, 1H), 4,18 a 4,13 (m, 1H), 3,82-3,78 (m, 1H), 3,65 (s, 2H), 2,85-2,63 (m, 1H), 1,65-1,52 (m, 9H), 1,38 (s, 9H).
 LCMS m/z: 153 [M-Boc grupo+H], t_R = 2,50 min.

55 **[0103]** El residuo se disolvió en EtOH (150 mL) y se añadió acetato de hidrazina (4,5 g, 47 mmol). La solución se agitó durante 16 h a TA. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida a 40°C, EtOAc (200 mL) y la fase orgánica se lavó con solución acuosa diluida de NaHCO₃, a continuación, H₂O seguido de salmuera. Los compuestos volátiles se eliminaron a presión reducida a 40°C, el residuo resultante se purificó por columna de gel de sílice (DCM/MeOH, gradiente de 0% a 20%) para proporcionar el producto Intermedio 4 (7,5 g, 90%) como un aceite.

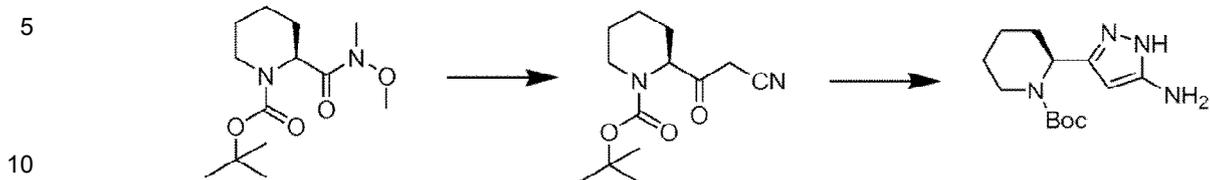
60 LCMS m/z [M+H]⁺ C₁₃H₂₂N₄O₂ requiere: 266,34. Encontrado 266,84 HPLC (min, pureza) t_R = 2,13, 100%

[0104] ¹H RMN (DMSO, 300 MHz) 11,20 (br s, 1 H), 5,09 (m, 1H), 5,07 (s, 1H), 4,67 (br s, 2H), 3,81 (sol. d, J = 12,0 Hz, 1H), 2,72 (sol. br t, J = 12,0 Hz, 1H), 2,08 (sol. d, J = 12,9 Hz, 1H), 1,57 (m, 4H), 1,39 (s, 9H); MS (ESI) m/z 267 [M+H]⁺, t_R = 1,97 min. (Método 3,5min.); HPLC (Quiral: Chiralpak AD-H, n-heptano-isopropanol isocrático 70:30). t_R (deseado) = 22,42 min, t_R (enantiómero del isómero deseado) = 25,67 min; % ee = 93.

65

Intermedio 4 a través de la amida de Weinreb (Referencia)

[0105]



15 **[0106]** MeCN (3,20 mL, 60,7 mmol) en THF (50 mL) se enfrió a -78°C en atmósfera de Ar. Se añadió gota a gota una solución de NaHMDS (1,0 M en THF, 36,8 mL, 36,8 mmol) durante 5 minutos, tiempo durante el cual se formó una suspensión blanquecina. La suspensión se calentó a -20°C y se agitó durante 20 min. La suspensión se enfrió a -78°C y se transfirió mediante una cánula al Intermedio 3 de amida de Weinreb (5,02 g, 18,4 mmol) en THF (50 mL) a -78°C durante 5 min. La suspensión se calienta a -45°C y se agita durante 3 h, tiempo durante el cual la suspensión se convierte en una solución amarilla. La solución se enfrió a -78°C y se añadió gota a gota AcOH (4,2 mL en 10 mL de THF, 73,6 mmol). La solución se calentó a temperatura ambiente y se diluyó con EtOAc (100 mL). La solución se lavó con H_2O (50 mL) y solución saturada de NaCl (50 mL). La solución se secó sobre MgSO_4 y se concentró para proporcionar la cetona de ciano en forma de un aceite amarillo que se usó sin purificación adicional.

25 **[0107]** El producto en cetona bruta de α -ciano se usó en la siguiente reacción con acetato de hidrazina para sintetizar amino deseado pirazol Intermedio 4 como se describe anteriormente.

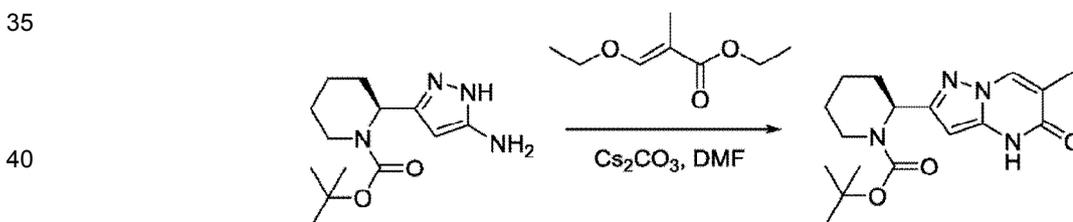
MS (ESI) m/z 267 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 1,81$ min.

HPLC (RP: 6-98% de gradiente de MeCN- H_2O , 0,05% de modificador de TFA) $t_R = 3,212$ min (>95% de pureza @ 254 nM).

HPLC (Quiral: Chiralpak AD-H 250 3 4,6 mm, 5 micrones; n -heptano-isopropanol isocrático 70:30) t_R (un isómero, deseado) = 22.35 min, t_R (isómero b) = 25.78 min; $\alpha = 1,15$; % ee => 90%,

Intermedio 71 (Referencia)

[0108]



45 **[0109]** Se añadió (E)-etilo-3-etoxi-2-metilacrilato (11,8 g, 67,6 mmol) y Cs_2CO_3 (22,0 g, 67,6 mmol) a una solución del Intermedio 4 (12,0 g, 45,1 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se calentó a 130°C . Después de 17 h, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo crudo se diluyó con acetato de etilo (250 mL) y se filtró. El filtrado resultante se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna de SiO_2 (330 g de SiO_2 Combiflash HP Gold Column, 0-100% acetato de etilo/hexanos) para proporcionar el intermedio 71 (8,58 g, 57%) como Sólido amarillo claro.

50 ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 12,01 (br s, 1H), 7,99 (s, 1H), 5,73 (s, 1H), 5,42 (br s, 1H), 4,01 (br d, $J = 12,2$ Hz, 1H), 2,81 (br t, $J = 11,2$ Hz, 1H), 2,29 (d, $J = 13,5$ Hz, 1H), 2,07 (d, $J = 1,1$ Hz, 3H), 1,87 - 1,69 (m, 1H), 1,68 - 1,41 (m, 4H), 1,48 (s, 9H).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz): δ 162,87, 156,34, 155,43, 140,16, 135,00, 113,29, 86,50, 79,75, 28,41, 27,79, 25,27, 21,00, 19,88, 13,38.

LCMS (ESI) m/z 333,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_R = 2,24$ min.

HPLC t_R (min), % de pureza: 3,969, 99%.

R f = 0,50 (EtOAc).

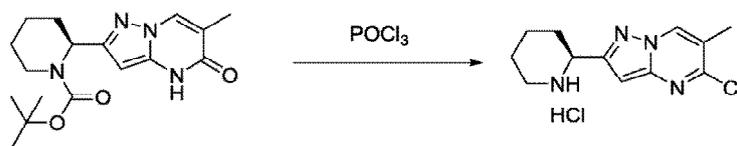
Chiral HPLC, 98% de ee (Chiralpak IC 5 mM, 4,6 X 150 mm, 10-95% de MeCN/ H_2O , 0,05% de modificador de ácido trifluoroacético) isómero(s) $t_R = 22,234$ min, (R) isómero $t_R = 20,875$ min.

Intermedio 72 (Referencia)

[0110]

65

5



10 **[0111]** POCl₃ (5,60 mL, 59,8 mmol) se añadió al compuesto intermedio 71 (993,4 mg, 2,99 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se calentó a 100°C. Después de 2 h, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida para proporcionar el intermedio 72 como un semisólido naranja, que se usó directamente en la siguiente etapa.

15 ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 9,40 (br d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 9,27-9,16 (m, 2H), 6,85 (s, 1H), 4,54 (t, *J* = 112,4 Hz, 1H), 3,32 (d, *J* = 12,8 Hz, 1H), 3,08 (q, *J* = 8,81 Hz, 1H), 2,33 (s, 3H), 2,23-2,14 (m, 1H), 1,92-1,61 (m, 5H).

LCMS (ESI) *m/z* 251,1 [M+H]⁺, *t_R* = 0,21 min.

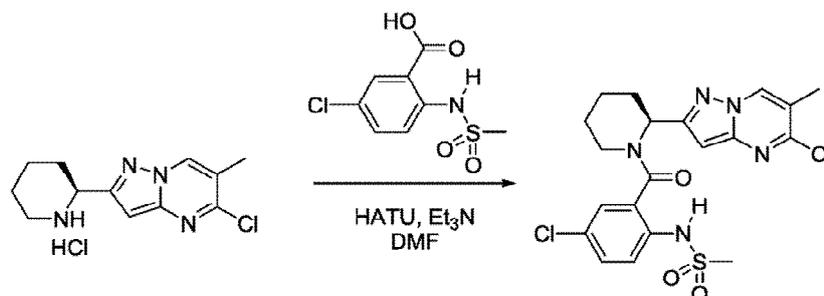
HPLC *t_R* = 2,35 min.

Intermedio 73 (Referencia)

20

[0112]

25



30

35

40 **[0113]** Se añadió HATU (1,37 g, 3,59 mmol) a una solución de ácido 5-cloro-2-(metilsulfonamido)benzoico (823 mg, 3,29 mmol) en DMF (15,0 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 1 h, se añadió una solución de producto intermedio bruto 72 (220 mg, 2,99 mmol) en DMF (1 ml), seguido de la adición de trietilamina (2,00 mL, 14,3 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 19 h. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo (250 mL) y una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (200 mL) y las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (200 mL) y solución saturada de cloruro sódico (200 mL), se secó sobre Na₂SO₄, y se concentró bajo presión reducida. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en columna de SiO₂ (12 g de SiO₂ Combiflash HP Gold Column, 0-100% acetato de etilo/hexanos) para proporcionar el intermedio 73 (736,2 mg, 51% (2 pasos)) como un sólido blanco.

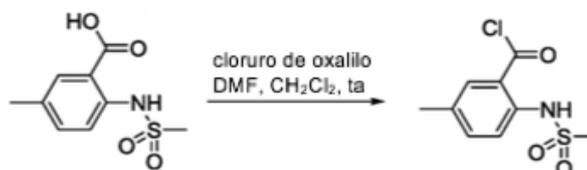
45 ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 10,05 (br s, 0,2H), 9,13 (br s, 1H), 8,95 (br s, 1H), 8,81 (br s, 0,2H), 7,70 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,56 (d, *J* = 8,8 Hz, 0,2H), 7,40 (dd, *J* = 8,8, 2,4 Hz, 1H), 7,33 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,31 (d, *J* = 4,4 Hz, 0,2H), 6,45 (s, 1H), 6,40 (br s, 0,2H), 6,28 (br d, *J* = 4,4 Hz, 1H), 5,01 (br s, 0,2H), 4,54 (br d, *J* = 14,0 Hz, 0,2H), 3,35 (br d, *J* = 13,2 Hz, 1H), 3,15-3,03 (m, 1H), 2,92 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 2,13-1,98 (m, 1H), 1,90-1,59 (m, 2H), 1,59-1,31 (m, 3H).

50 ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 167,09, 156,12, 153,13, 147,86, 135,68, 131,79, 131,66, 131,38, 130,12, 125,91, 125,44, 117,08, 93,74, 47,65, 44,07, 39,81, 27,83, 25,47, 19,78, 16,90. LCMS (ESI) *m/z* 482,1 [M+H]⁺, *t_R* = 2,79 min. HPLC *t_R* (min), % de pureza: 5,438, 99%

R_f = 0,47 (50% de EtOAc/hexanos).

55 Chiral HPLC, 99% de ee (Chiralpak IC 5 mM, 4,6 3 150 mm, 10-95% de MeCN/H₂O, 0,05% de modificador de ácido trifluoroacético) (S) isómero *t_R* = 29,739 min, (R) isómero *t_R* = 29,495 min.

Intermedio 159 (Referencia)

60 **[0114]**

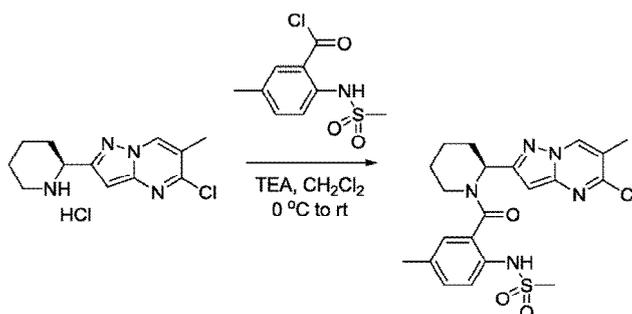
65

[0115] Se añadió DMF (0,070 mL, 0,908 mmol) lentamente a una suspensión de 5-metilo-2-(metilsulfonamido)benzoico (1,01 g, 4,59 mmol) y cloruro de oxalilo (1,6 mL, 18,3 mmol) en 11 mL de diclorometano anhidro. Después de 3 h, la mezcla de reacción se concentró y se secó al vacío para producir el intermedio 159 en forma de un sólido amarillo (987 mg, 90%) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 10,2 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,64 (m, 1H), 7,39 (m, 1H), 3,03 (s, 3H), 2,35 (s, 3H).

Intermedio 160 (Referencia)

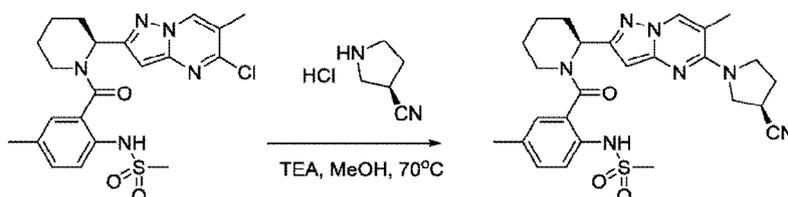
[0116]



[0117] Se añadió trietilamina (0,58 mL, 4,16 mmol) se añadió lentamente a una mezcla de compuesto intermedio 159 (479 mg, 2,01 mmol) y el intermedio 72 (573 mg, 2,00 mmol) en 10 mL de diclorometano bajo argón a 0°C. Después de 3 h, la LC/MS indicó la conversión completa al producto deseado. La mezcla de reacción se concentró y se secó al vacío para producir el intermedio 160 como un sólido amarillo (924 mg, 92%) que se usó en las siguientes etapas sin purificación adicional. LCMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClN}_5\text{O}_3\text{S}$ requiere: 462,13. Encontrado 462,32.

Compuesto 188 (Referencia)

[0118]



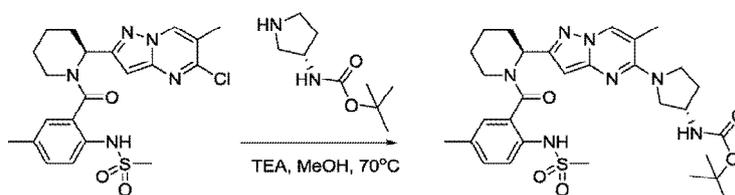
[0119] Se añadió trietilamina (0,367 mL, 2,65 mmol) a una mezcla de compuesto intermedio 160 (70 mg, 0,152 mmol) y (R)-3-pirrolidina-clorhidrato de carbonitrilo (175 mg, 1,32 mmol) en 8 mL de metanol a temperatura ambiente. Después de calentarse a 70°C durante la noche, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo restante se purificó por HPLC prep. (Acetonitrilo al 15-100% (con ácido trifluoroacético al 0,1%) en agua (con 0,1% de ácido trifluoroacético) para producir el compuesto 188 en forma de un sólido blanco, sal de ácido trifluoroacético (58,9 mg, 61%), después de la liofilización. $^1\text{H RMN}$ (DMSO , 400 MHz): δ 9,01 (s, 1H) 8,53 (s, 1H), 7,39 (m, 1H), 7,25 (m, 1H), 7,17 (s, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,97 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 3,84-3,70 (m, 3H), 3,47 (m, 1H), 3,20 (m, 1H), 3,04 (m, 1H), 2,95 (s, 3H), 2,31 (s, 3H), 2,30-2,13 (m, 6H), 1,84 (m, 1H), 1,61 (m, 1H), 1,57-1,22 (m, 3H).

LCMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{ClN}_7\text{O}_3\text{S}$ requiere: 522,22. Encontrado 522,37

HPLC Tr (min), pureza %: 6,77, 99%

Intermedio 161 (Referencia)

[0120]

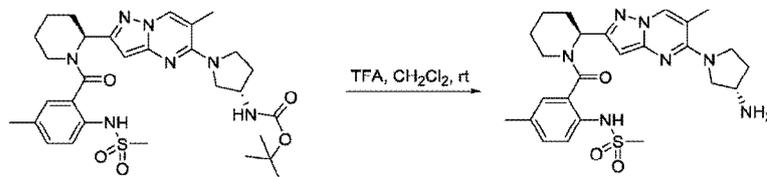


[0121] Siguiendo el procedimiento del compuesto **188**, el intermedio **161** se recuperó como un sólido blanco (81 mg, 82%) después de cromatografía en columna de gel de sílice (10-60% acetato de etilo/hexanos). LCMS m/z $[M+H]^+$ $C_{30}H_{41}ClN_7O_5S$ requiere: 612,29. Encontrado 612,22.

5 Compuesto 190 (Referencia)

[0122]

10



15

[0123] Se añadió ácido trifluoroacético (0,35 mL, 4,58 mmol) a una solución del intermedio **161** (79 mg, 0,129 mmol) en 5 mL de diclorometano. Después de agitarse durante una noche, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se secó a vacío durante 3 h para producir el compuesto **190** en forma de un sólido blanquecino (76,6 mg, 95%), sal de ácido trifluoroacético.

20

1H RMN (DMSO, 400 MHz): δ h 9,02 (s, 1H) 8,53 (s, 1H), 8,01 (s, 3H), 7,39 (m, 1H), 7,25 (m, 1H), 7,19 (m, 1H), 6,11 (s, 1H), 5,97 (m, 1H), 3,85 (m, 4H), 3,24 (m, 1H), 3,03 (m, 1H), 2,95 (s, 3H), 2,33 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 2,29 (m, 3H), 2,05-1,81 (m, 2H), 1,67-1,22 (m, 4H).

25

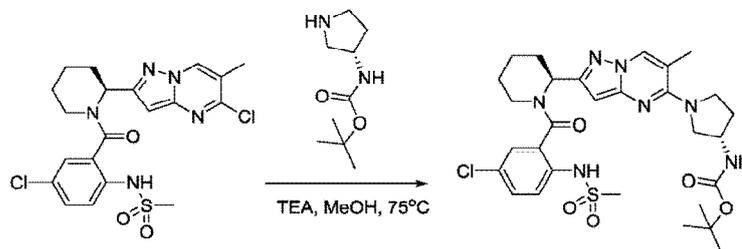
LCMS m/z $[M+H]^+$ $C_{25}H_{33}ClN_7O_3S$ requiere: 512,24. Encontrado 512,20

HPLC Tr (min), pureza%: 5,10, 99%

Intermedio 164 (Referencia)

30 [0124]

35



40

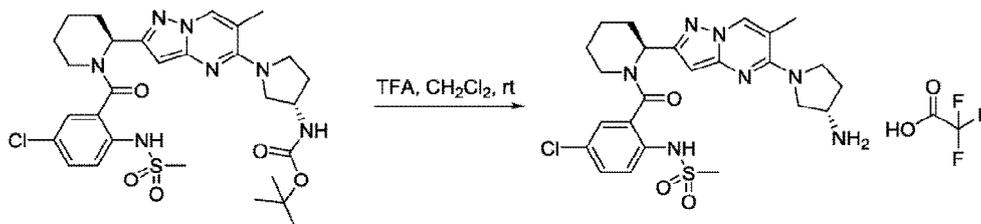
[0125] Siguiendo el procedimiento del compuesto **188**, a partir del intermedio **73**, el intermedio **164** se recuperó como una sal de ácido trifluoroacético sólido blanco (79 mg, 89%) después de la preparación HPLC (15-100% de acetonitrilo (con 0,1% de ácido trifluoroacético) en agua (con 0,1% de ácido trifluoroacético)). LCMS m/z $[M+H]^+$ $C_{29}H_{38}ClN_7O_5S$ requiere: 632,23. Encontrado 632,52.

45

Compuesto 202

50 [0126]

55



60

[0127] Siguiendo el procedimiento del compuesto **190**, utilizando el intermedio **164**, el compuesto **202** se recuperó como un sólido blanco, sal de ácido trifluoroacético (69 mg, 98%) después de secar al vacío. 1H RMN (DMSO, 400 MHz): δ 9,24 (s, 1H) 8,52 (s, 1H), 8,08 (s, 3H), 7,55-7,38 (m, 3H), 6,13 (s, 1H), 5,95 (m, 1H), 3,90 (m, 2H), 3,81-3,60 (m, 2H), 3,21 (m, 1H), 3,04-3,00 (m, 1H), 3,03 (s, 3H), 2,39-2,13 (m, 2H), 2,33 (s, 3H), 2,08-1,80 (m, 2H), 1,69-1,21 (m, 5H). LCMS m/z $[M+H]^+$ $C_{24}H_{30}ClN_7O_3S$ requiere: 532,18. Encontrado 532,42.

65

HPLC Tr (min), % de pureza: 5,28, 98%

Actividad antiviral

5 [0128] Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones para uso en métodos de infecciones virales que inhiben, que comprende la etapa de tratar una muestra o sujeto sospechoso de tener dicha inhibición con una composición de la invención.

10 [0129] En el contexto de la invención, las muestras sospechosas de contener un virus incluyen materiales naturales o artificiales tales como organismos vivos; tejidos o cultivos celulares; muestras biológicas tales como muestras de material biológico (sangre, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, esputo, saliva, muestras de tejidos y similares); muestras de laboratorio; muestras de comida, agua o aire; muestras de bioproductos tales como extractos de células, particularmente células recombinantes que sintetizan una glucoproteína deseada; y similares.
15 Normalmente, se sospechará que la muestra contiene un organismo que induce una infección viral, con frecuencia un organismo patógeno, como un virus tumoral. Las muestras pueden estar contenidas en cualquier medio, incluyendo agua y mezclas de disolventes orgánicos/agua. Las muestras incluyen organismos vivos, como los humanos, y materiales hechos por el hombre, como los cultivos celulares.

20 [0130] Si se desea, la actividad anti-virus de un compuesto de la invención después de la aplicación de la composición se puede observar mediante cualquier método incluyendo métodos directos e indirectos de detección de dicha actividad. Se contemplan métodos cuantitativos, cualitativos y semicuantitativos para determinar dicha actividad. Típicamente, uno de los métodos de selección descritos anteriormente se aplica, sin embargo, cualquier otro método, como la observación de las propiedades fisiológicas de un organismo vivo, también es aplicable.

25 [0131] La actividad antiviral de un compuesto de la invención se puede medir usando protocolos de cribado estándar que son conocidos. Por ejemplo, la actividad antiviral de un compuesto se puede medir utilizando los siguientes protocolos generales.

30 Actividad antiviral del virus sincitial respiratorio (RSV) y ensayos de citotoxicidad

Actividad anti-RSV

35 [0132] La actividad antiviral contra RSV se determinó usando un ensayo de citoprotección *in vitro* en células Hep2. En este ensayo, los compuestos que inhiben la replicación del virus exhiben un efecto citoprotector contra la destrucción celular inducida por el virus y se cuantificaron utilizando un reactivo de viabilidad celular. El método utilizado fue similar a los descritos anteriormente en la literatura publicada (Chapman et al., Antimicrob Agents Chemother. 2007, 51 (9): 3346-53).

40 [0133] Las células Hep2 se obtuvieron de ATCC (Manassas, VI) y se mantuvieron en medio MEM suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina/estreptomycin. Las células se pasaron dos veces por semana y se mantuvieron en la etapa de subconfluencia. Las reservas comerciales de RSV cepa A2 (Advanced Biotechnologies, Columbia, MD) se titularon antes de la prueba del compuesto para determinar la dilución adecuada de las reservas de virus que generó un efecto citopático deseable en las células Hep2.

45 [0134] Para los ensayos antivirales, las células Hep2 fueron sembradas en placas de 96 pocillos 24 horas antes del ensayo a una densidad de 3.000 células/pocillo. En una placa de 96 pocillos separada, los compuestos a ensayar se diluyeron en serie en medios de cultivo celular. Se prepararon ocho concentraciones en incrementos de dilución en serie de 3 veces para cada compuesto analizado y se transfirieron 100 uL/pocillo de cada dilución por duplicado a las placas con células Hep2 sembradas. Posteriormente, se preparó una dilución apropiada de las reservas de virus previamente determinada por titulación en medios de cultivo celular y se agregaron 100 uL/pocillo a las placas de prueba que contenían células y compuestos diluidos en serie. Cada placa incluyó tres pocillos de células no tratadas infectadas y tres pocillos de células no infectadas que sirvieron como control de inhibición de virus del 0% y 100%, respectivamente. Después de la infección con RSV, las placas de prueba se incubaron durante 4 días en una incubadora de cultivo de tejidos. Después de la incubación, se determinó el efecto citopático inducido por RSV utilizando un reactivo Cell TiterGlo (Promega, Madison, WI) seguido de una lectura de luminiscencia. El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración probada en relación con los controles de inhibición del 0% y del 100% y el valor de EC50 para cada compuesto se determinó mediante regresión no lineal como una concentración que inhibe el efecto citopático inducido por RSV en un 50%. Se usó ribavirina (comprada en Sigma, St. Louis, MO) como control positivo para la actividad antiviral.
60

[0135] Los compuestos también se ensayaron para la actividad antiviral contra el RSV en células Hep2 utilizando un formato de 384 pocillos. Los compuestos se diluyeron en DMSO utilizando una dilución en serie de 10 pasos en incrementos de 3 veces a través de la automatización en 4 repeticiones adyacentes cada uno. Se ensayaron ocho compuestos por placa de dilución. Luego se estamparon 0,4 uL de compuestos diluidos a través de Biomek en placas de 384 pocillos (Nunc 142761 o 164730 w/lid 264616) que contenían 20 µL de medio (Mediatech Inc. MEM
65

suplementado con glutamina, FBS al 10% y Pen/Strep). Se usó DMSO y un compuesto de control positivo adecuado, tal como 80 µm GS-329467 o 10 µm 427346 para los controles de destrucción celular al 100% y al 0%, respectivamente.

5 **[0136]** Se prepararon células Hep2 ($1,0 \times 10^5$ células/ml) como anteriormente en un lote de al menos 40 ml de exceso del número de placas de muestra (8 ml de mezcla de células por placa) y se infectaron con la cepa RSV suministrada por el proveedor (ABI) A2 para llegar a un MOI de 1:1.000 (virus: celda #) o 1:3.000 (vol virus: célula vol). Inmediatamente después de la adición del virus, se añadió la suspensión de células Hep2 infectadas por RSV a cada placa de 384 pocillos sellada a 20 µl por pozo utilizando un dispensador uFlow, dando un volumen final de 40 µL/pocillo, cada uno con 2.000 células infectadas. Las placas se incubaron luego durante 5 días a 37°C y 5% de CO₂. Después de la incubación, las placas se equilibraron a temperatura ambiente en una cubierta de gabinete de bioseguridad durante 1,5 horas y se agregaron a cada pocillo 40 µL de reactivo de viabilidad de Cell-Titer Glo (Promega) a través de uFlow. Después de una incubación de 10 a 20 minutos, las placas se leyeron utilizando un lector de placas EnVision o Victor Luminescence (Perkin-Elmer). Luego, los datos se cargaron y analizaron en el portal de Bioinformática bajo los protocolos de infectividad celular RSV y EC50-Hep2-384 de 8 placas u EC50-Hep2-Envision de 8 placas.

20 **[0137]** Los datos de puntos múltiples generados en el ensayo se analizaron mediante Pipeline Pilot (Accelrys, Inc., Versión 7,0) para generar una curva de respuesta a la dosis sobre la base de ajuste de mínimos cuadrados a una curva de 4 parámetros. La fórmula generada para la curva se usó para calcular el % de inhibición a una concentración dada. El % de inhibición reportado en la tabla se ajustó luego en base a la normalización de los valores de inhibición de % de la parte inferior y superior de la curva a 0% y 100% respectivamente. La actividad representativa para el compuesto 202 contra los efectos citopáticos inducidos por RSV se muestra en la siguiente tabla en la que A = CE₅₀ de 0,1-100 nM, B = CE₅₀ de 101-1.000 nM, y C = CE₅₀ de 1001-10.000 nM.

25

Nº de compuesto	%inh@1uM	% inh @ 0,5uM	CE50 / nM
202		100	A

30

Citotoxicidad

35 **[0139]** Se determinó la citotoxicidad de los compuestos ensayados en células Hep2 no infectadas en paralelo con la actividad antiviral usando el reactivo de viabilidad celular de una manera similar a la descrita anteriormente para otros tipos de células (Cihlar et al., Antimicrob Agents Chemother. 2008,52 (2): 655-65.). Se utilizó el mismo protocolo que para la determinación de la actividad antiviral para medir la citotoxicidad del compuesto, excepto que las células no se infectaron con RSV. En su lugar, se agregaron medios de cultivo celular frescos (100 uL/pocillo) sin el virus a las placas analizadas con células y compuestos prediluidos. Las células se incubaron luego durante 4 días, seguidas de una prueba de viabilidad celular utilizando el reactivo CellTiter Glo y una lectura de luminiscencia. Las células no tratadas y las células tratadas con 50 ug/ml de puromicina (Sigma, St. Louis, MO) se utilizaron como control de la viabilidad celular del 100% y 0%, respectivamente. El porcentaje de viabilidad celular se calculó para cada concentración de compuesto analizada en relación con los controles de 0% y 100% y el valor de CC50 se determinó mediante regresión no lineal como una concentración de compuesto que reduce la viabilidad celular en un 50%.

45

50 **[0140]** Para la prueba de citotoxicidad de compuesto en células Hep2 utilizando un formato de 384 pocillos, se diluyeron los compuestos en DMSO usando una dilución en serie de 10 pasos en incrementos de 3 veces a través de la automatización en 4 repeticiones adyacentes cada uno. Se ensayaron ocho compuestos por placa de dilución. Luego se estamparon 0,4 uL de compuestos diluidos a través de Biomek en placas de 384 pocillos (Nunc 142761 o 164730 w/lid 264616) que contenían 20 µL de medio (Mediatech Inc. MEM suplementado con glutamina, FBS al 10% y Pen/Strep). Se utilizaron 50 µg/mL de puromicina y DMSO para los controles de citotoxicidad del 100% y 0%, respectivamente.

55 **[0141]** Se añadieron células Hep2 ($1,0 \times 10^5$ células/ml) a cada placa estampada a 20 ul por pocillo para obtener un total de 2.000 células/pocillo y un volumen final de 40 ml/pocillo. Por lo general, las células se prediluyeron por lotes a $1,0 \times 10^5$ células/ml en exceso del número de placas de muestra y se agregaron a 20 ul por pocillo en cada placa de ensayo usando un dispensador uFlow. Las placas se incubaron luego durante 4 días a 37°C y 5% de CO₂. Después de la incubación, las placas se equilibraron a temperatura ambiente en una cubierta de gabinete de bioseguridad durante 1,5 horas y se agregaron a cada pocillo 40 µL de reactivo de viabilidad de Cell-Titer Glo (Promega) a través de uFlow. Después de una incubación de 10 a 20 minutos, las placas se leyeron utilizando un lector de placas EnVision o Victor Luminescence (Perkin-Elmer). Luego, los datos se cargaron y analizaron en el portal Bioinformatics (Pipeline Pilot) bajo el ensayo de citotoxicidad utilizando los protocolos CC50-Hep2 de 8 placas o CC50-Hep2 de 8 placas.

65

REIVINDICACIONES

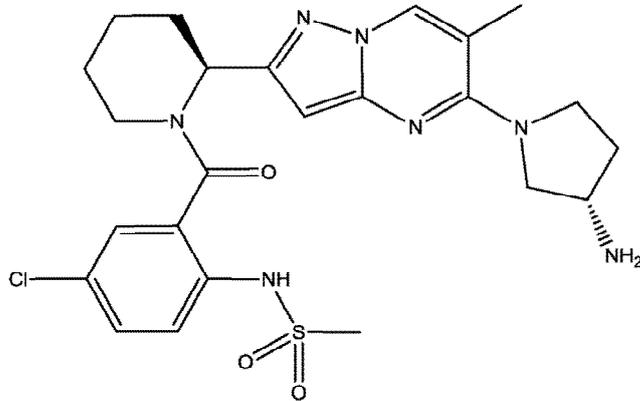
1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la fórmula:

5

10

15

20



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y al menos otro agente terapéutico.

25

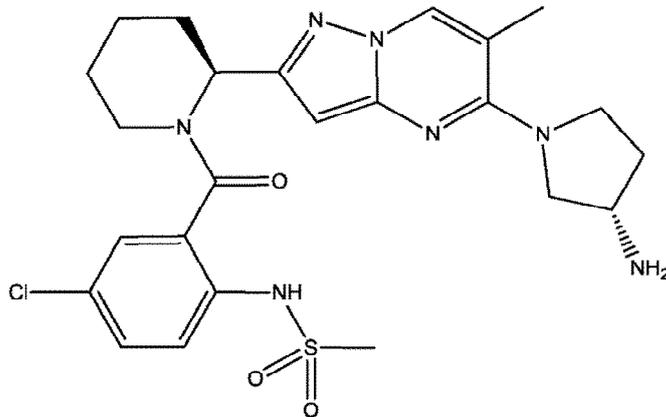
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el compuesto de la fórmula:

30

35

40

45



está presente como una sal del ácido trifluoroacético.

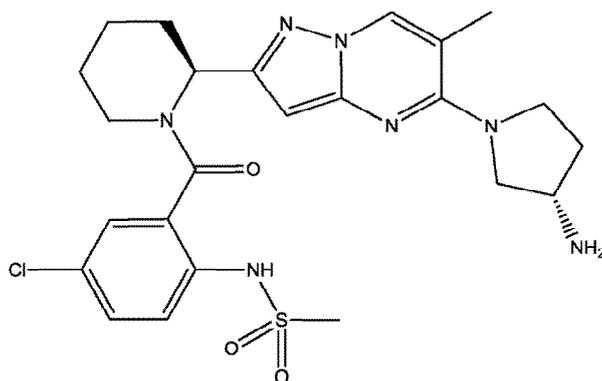
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el compuesto de la fórmula:

50

55

60

65



está presente como una sal formada con un ácido inorgánico seleccionado de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico,

ácido sulfúrico, ácidos sulfámicos, ácido fosfórico o ácido nítrico.

4. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es adecuada para administración oral.

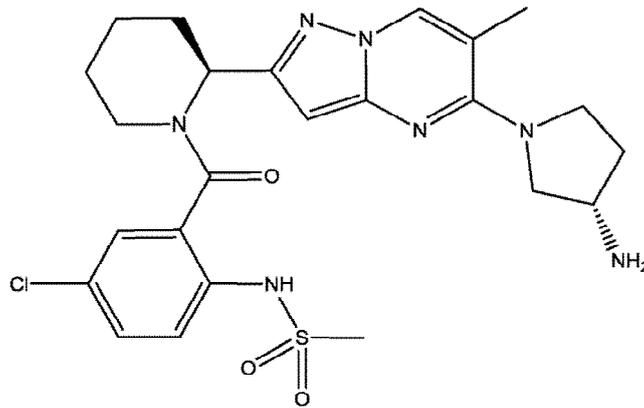
5. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es una solución o suspensión acuosa.

6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en un método para tratar una infección por el virus de *Pneumovirinae* en un ser humano.

7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la infección por el virus *Pneumovirinae* es una infección por virus sincitial respiratorio.

8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en la que la composición farmacéutica se administra oralmente.

9. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que el método para tratar una infección por el virus de *Pneumovirinae* en un ser humano comprende administrar el compuesto de la fórmula:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables como una dosis diaria de 1 mg a 1.000 mg administrada en una dosis única o dosis múltiples.

10. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la dosis diaria es de 5 mg a 500 mg administrada en una dosis única o dosis múltiples.

11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en la que el otro agente terapéutico se selecciona del grupo de ribavirina, palivizumab, motavizumab, RSV-IGIV, MEDI-557, A-60444, MDT-637, BMS-433771, ALN - RSVO, y ALX-0171, o mezclas de los mismos.