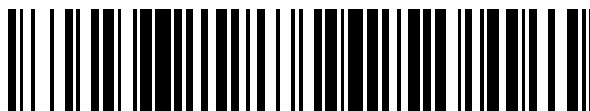


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 444**

51 Int. Cl.:

C07D 403/04 (2006.01)

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2014 PCT/US2014/065114**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15073476**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2014 E 14802787 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 3068776**

54 Título: **Inhibidores de la replicación de virus de la gripe**

30 Prioridad:

13.11.2013 US 201361903572 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2020

73 Titular/es:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED
(100.0%)**

**50 Northern Avenue
Boston, MA 02210, US**

72 Inventor/es:

**NTI-ADDAE, KWAME, W.;
WALDO, MICHAEL;
O'NEIL, SIMON, ADAM;
VAN ALSTEN, JOHN, GREGG;
MACIKENAS, DAINIUS;
MUDUNURI, PRAVEEN;
SHI, YI;
LEDEBOER, MARK, WILLEM;
JURKAUSKAS, VALDAS;
MEDEK, ALES;
JONES, STEVEN;
BYRN, RANDAL;
ASMAL, MOHAMMED;
ROBERTSON, SARAH, MARIE y
 TSAI, WANJUNG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 741 444 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

Inhibidores de la replicación de virus de la gripe

5 **Referencia cruzada a solicitud relacionada**

La presente solicitud PCT reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/903.572, presentada el 13 de noviembre de 2013. Este documento se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

10

Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos y formas sólidas de compuestos que son útiles para inhibir la replicación del virus de la gripe, tratar o reducir la gravedad de las infecciones de gripe en pacientes y prevenir o reducir de manera profiláctica la incidencia de las infecciones de gripe en los pacientes.

15

Antecedentes

20

La gripe se extiende por todo el mundo en epidemias estacionales, causando la muerte de cientos de miles anualmente y en años pandémicos, de millones. Por ejemplo, en el siglo XX se produjeron tres pandemias de gripe y mataron a decenas de millones de personas, estando cada una de estas pandemias causada por la aparición de una nueva cepa del virus en seres humanos. Normalmente, estas nuevas cepas son el resultado de la dispersión de un virus de la gripe conocido de otra especie animal a seres humanos.

25

La gripe se transmite principalmente de persona a persona mediante microgotas grandes cargadas de virus que se generan cuando las personas infectadas tosen o estornudan; estas grandes microgotas pueden asentarse en las superficies mucosas del tracto respiratorio superior de individuos susceptibles que se encuentran cerca de las personas infectadas (por ejemplo, a menos de aproximadamente 1,8 metros (6 pies)). La transmisión también puede producirse por el contacto directo o indirecto con secreciones respiratorias, tal como tocando superficies contaminadas con virus de la gripe y después tocando los ojos, la nariz o la boca. Los adultos pueden transmitir la gripe a otros desde 1 día antes de que comiencen los síntomas hasta aproximadamente 5 días después de que se inicien dichos síntomas. Los niños pequeños y las personas con sistemas inmunitarios debilitados pueden permanecer infecciosos durante 10 o más días después del inicio de los síntomas.

30

35

Los virus de la gripe son virus de ARN de la familia *Orthomyxoviridae*, que comprende cinco géneros: virus Influenza A, virus Influenza B, virus Influenza C, virus ISA y virus Thogoto.

40

El género de virus Influenza A tiene una especie, el virus de la gripe A. Las aves acuáticas salvajes son los hospedadores naturales para una gran variedad de gripe A. Ocasionalmente, los virus se transmiten a otras especies y entonces pueden causar brotes epidémicos devastadores en las aves de corral domésticas u ocasionar pandemias de gripe humana. Los virus de tipo A son los patógenos humanos más virulentos entre los tres tipos de gripe y provocan la enfermedad más grave. El virus de la gripe A puede subdividirse en diferentes serotipos, basándose en la respuesta de anticuerpo frente a estos virus. Los serotipos que se han confirmado en seres humanos, ordenados por el número de muertes pandémicas humanas conocidas son los siguientes: H1N1 (que causó la gripe española en 1918), H2N2 (que causó la gripe asiática en 1957), H3N2 (que causó la gripe de Hong Kong en 1968), H5N1 (una amenaza pandémica en la estación de gripe de 2007-08), H7N7 (que tiene un potencial zoonótico infrecuente), H1N2 (endémico en seres humanos y cerdos), H9N2, H7N2, H7N3 y H10N7.

45

50

El género de virus Influenza B tiene una especie, el virus de la gripe B. La gripe B infecta de manera prácticamente exclusiva a seres humanos y es menos común que la gripe A. El otro único animal que se sabe que es susceptible a la infección por gripe B es la foca. Este tipo de gripe muta con una frecuencia 2-3 veces menor que el tipo A y por consiguiente, tiene menos diversidad genética, con un único serotipo de gripe B. A consecuencia de esta ausencia de diversidad antigénica, normalmente se adquiere a una edad temprana un grado de inmunidad frente a la gripe B. Sin embargo, la gripe B muta lo suficiente como para imposibilitar una inmunidad de larga duración. Esta reducida tasa de cambio antigénico, combinada con su intervalo de hospedadores limitado (deriva antigénica inhibidora entre especies cruzadas), asegura que no se produzcan pandemias de gripe B.

55

60

El género de virus Influenza C tiene una especie, el virus de la gripe C, que infecta a seres humanos y cerdos y puede provocar una enfermedad grave y epidemias locales. Sin embargo, la gripe B es menos común que los otros tipos y parece que normalmente causa una enfermedad leve en niños.

65

Los virus de la gripe A, B y C tienen una estructura muy similar. La partícula vírica tiene un diámetro de 80-120 nanómetros y normalmente es vagamente esférica, aunque pueden producirse formas filamentosas. Inusual para un virus, su genoma no es un solo trozo de ácido nucleico; en cambio, contiene siete u ocho trozos de ARN de sentido negativo segmentado. El genoma de Influenza A codifica 11 proteínas: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), M1, M2, NS1, NS2(NEP), PA, PB1, PB1-F2 y PB2.

5 HA y NA son glucoproteínas grandes en la parte externa de las partículas víricas. La HA es una lectina que media la unión del virus a células diana y la entrada del genoma vírico en la célula diana, mientras que la NA está implicada en la liberación de la progenie de virus de las células infectadas, escindiendo azúcares que se unen a las partículas víricas maduras. Por tanto, estas proteínas han sido las dianas para fármacos antivíricos. Además, son antígenos contra lo que pueden generarse anticuerpos. Los virus de la gripe A se clasifican en subtipos basándose en la respuesta de anticuerpos a HA y NA, formando la base de las distinciones H y N (véase lo anterior) en, por ejemplo, H5N1.

10 La gripe produce costes directos a causa de la falta de productividad y el tratamiento médico asociado, así como costes indirectos de las medidas preventivas. En los Estados Unidos, la gripe es responsable de un coste total de más de 10 mil millones de dólares al año, aunque se ha estimado que una futura pandemia podría provocar costes directos e indirectos de cientos de miles de millones de dólares. Los costes preventivos también son elevados. Los gobiernos en todo el mundo han gastado miles de millones de dólares estadounidenses preparándose y elaborando
15 plantas para una pandemia de gripe aviar H5N1, con costes asociados con la compra de fármacos y vacunas, así como desarrollando simulacros de desastres y estrategias para controles fronterizos mejorados.

20 Las opciones actuales para el tratamiento de la gripe incluyen vacunación y quimioterapia o quimioprofilaxis con medicaciones antivíricas. Normalmente se recomienda la vacunación con una vacuna contra la gripe para los grupos de alto riesgo, tales como niños y ancianos o en personas que tienen asma, diabetes o enfermedad cardíaca. Sin embargo, es posible contraer la gripe aun estando vacunado. La vacuna se reformula en cada estación para unas cuantas cepas específicas de la gripe pero no es posible que incluya todas las cepas que infectan de manera activa a personas en el mundo para dicha estación. Los fabricantes pueden tardar seis meses en formular y producir los millones de dosis necesarias para lidiar con las epidemias estacionales; ocasionalmente, una cepa nueva o pasada
25 por alto se vuelve prominente durante ese tiempo e infecta a personas aunque se hayan vacunado (como por la gripe de Fuji H3N2 en la estación de gripe de 2003-2004). También es posible infectarse justo antes de la vacunación y enfermar con la misma cepa que se supone que previene la vacuna, ya que puede requerir varias semanas que la vacuna sea eficaz.

30 Además, la eficacia de estas vacunas de la gripe es variable. Debido a la alta tasa de mutación del virus, una vacuna concreta para la gripe normalmente confiere protección durante poco más de unos años. Una vacuna formulada para un año puede ser ineficaz al año siguiente, ya que el virus de la gripe cambia rápidamente con el paso del tiempo y adquieren dominancia diferentes cepas.

35 Asimismo, debido a la ausencia de enzimas de corrección de fallos en el ARN, la ARN polimerasa dependiente de ARN del ARNv de la gripe produce un solo error de inserción de nucleótidos aproximadamente cada 10 mil nucleótidos, que es la longitud aproximada del ARNv de la gripe. Por lo tanto, prácticamente cada virus de la gripe recién producido es un mutante por deriva antigénica. La separación del genoma en ocho segmentos de ARNv permite el mezclado o la reorganización de los ARNv en caso de que una sola célula se haya infectado por más de
40 una estirpe vírica. El rápido cambio en la genética del virus produce cambios antigénicos y permite al virus infectar nuevas especies hospedadoras y superar rápidamente la inmunidad protectora.

45 También se han usado fármacos antivíricos para tratar la gripe, siendo particularmente eficaces los inhibidores de neuraminidasa, pero los virus pueden desarrollar resistencia a los fármacos antivíricos convencionales. Dichos agentes pueden prepararse de modo que tienen varias formas químicas diferentes que incluyen derivados químicos o sales, o que tienen formas físicas diferentes. Por ejemplo, pueden ser amorfos, pueden tener diferentes polimorfos cristalinos o pueden existir en estados de hidratación o solvatación diferentes. Variando las formas puede ser posible variar las propiedades físicas de los mismos. Dichas formas diferentes pueden tener propiedades diferentes, en particular en forma de formulaciones orales. De forma específica, puede ser deseable identificar formas mejoradas
50 que muestran propiedades mejoradas, tales como solubilidad y estabilidad en agua mejoradas, mejor procesabilidad o preparación de formulaciones farmacéuticas e incremento de la biodisponibilidad para las composiciones administradas de forma oral. Dichas propiedades mejoradas analizadas anteriormente pueden alterarse de modo que sean beneficiosas para un efecto terapéutico específico.

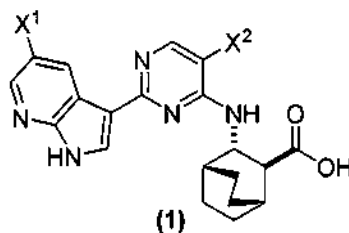
55 La variación de las formas de un agente antivírico puede ser uno de los muchos modos en los que modular las propiedades físicas de dicho agente antivírico puede ser útil para tratar la gripe.

Sumario de la invención

60 La presente invención se refiere en general a formas polimórficas del compuesto (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a formulaciones farmacéuticamente aceptables del mismo, métodos de preparación de dichas formas polimórficas del compuesto (1) y a los usos de dichas formas polimórficas para inhibir la replicación de los virus de la gripe, para reducir la cantidad de virus de la gripe y para tratar la gripe.

65 En una realización, la presente invención se dirige a una forma polimórfica del compuesto (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto (1) se representa por la fórmula estructural

siguiente:



y en donde la forma polimórfica es una sal cristalina de HCl del hemihidrato del compuesto (1), estando dicha forma polimórfica además caracterizada por uno o más picos que corresponden a valores 2 theta medidos en los grados de 10,5 ± 0,2, 5,2 ± 0,2, 7,4 ± 0,2 y 18,9 ± 0,2 en un patrón de difracción de rayos X en polvo.

En otra realización, la presente invención se dirige a una formulación farmacéuticamente aceptable que comprende una forma polimórfica de los compuestos (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo divulgada en el presente documento y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización más, la presente invención se dirige a un método para inhibir la replicación de los virus de la gripe en una muestra biológica *in vitro* o en un paciente. El método comprende administrar a la muestra una cantidad eficaz de una forma polimórfica del compuesto (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo divulgada en el presente documento.

En otra realización más, la presente invención se dirige a un método para reducir la cantidad de los virus de la gripe en una muestra biológica *in vitro* o en un paciente. El método comprende administrar a la muestra una cantidad eficaz de una forma polimórfica del compuesto (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo divulgada en el presente documento.

En otra realización más, la presente invención se dirige a un método para tratar la gripe en un paciente. El método comprende administrar a la muestra una cantidad eficaz de una forma polimórfica del compuesto (1) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo divulgada en el presente documento.

En otra realización más, la presente invención se dirige a un método para preparar una sal cristalina de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O caracterizada además por uno o más picos que corresponden a valores 2 theta medidos en los grados de 10,5 ± 0,2, 5,2 ± 0,2, 7,4 ± 0,2 y 18,9 ± 0,2 en un patrón de difracción de rayos X en polvo. El método comprende mezclas HCl con el compuesto (1) en un sistema disolvente que incluye agua y uno o más disolventes orgánicos, en donde el sistema disolvente tiene una actividad de agua de 0,05 a 0,85. El compuesto (1) puede ser solvatado o no solvatado y/o amorfo o cristalino.

También se describe en el presente documento un método para preparar la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3 H₂O. El método comprende: mezclar HCl y el compuesto (1) en un sistema disolvente que incluye agua o que incluye agua y uno o más disolventes orgánicos, en donde el sistema disolvente tiene una actividad de agua igual a o mayor de 0,9, tal como 0,9-1,0 o agitar la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*2H₂O en un sistema disolvente que incluye agua o que incluye agua y uno o más disolventes orgánicos en donde el sistema disolvente tiene una actividad de agua igual a, o mayor de 0,9, tal como 0,9-1,0. El compuesto (1) puede ser solvatado o no solvatado y/o amorfo o cristalino.

También se describe en el presente documento un método para preparar la forma D de la sal de HCl del compuesto (1). El método comprende deshidratar la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O

En otra realización más, la presente invención se dirige a un método para preparar la forma A del compuesto (1). El método comprende agitar un compuesto (1) amorfo o un solvato del compuesto (1) en un sistema disolvente que incluye agua y etanol.

También se describe en el presente documento un método para preparar la forma A de sal de tosilato del compuesto (1). El método comprende agitar una mezcla de un compuesto (1) amorfo o un solvato del compuesto (1), ácido p-toluenosulfónico y un sistema disolvente que incluye acetonitrilo.

También está incluido en la invención un solvato del compuesto (1) en 2-metilTHF.

En otra realización más, la invención se dirige a un método para reducir la cantidad de virus de la gripe en una muestra biológica *in vitro* o en un sujeto, que comprende administrar a la muestra una cantidad eficaz de una forma polimórfica del compuesto (1) divulgado en el presente documento.

En otra realización más, la invención se dirige a un método para inhibir la replicación de los virus de la gripe en una muestra biológica *in vitro* o en un sujeto, que comprende administrar a la muestra una cantidad eficaz de una forma polimórfica del compuesto (1) divulgado en el presente documento.

- 5 En otra realización más, la invención se dirige a un método para tratar la gripe en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una forma polimórfica del compuesto (1) divulgado en el presente documento.

10 La invención también incluye usos de las formas polimórficas del compuesto (1) divulgado en el presente documento para inhibir la replicación de los virus de la gripe, para reducir la cantidad de virus de la gripe o para tratar la gripe en un sujeto. La invención también incluye usos de una forma polimórfica del compuesto (1) divulgado en el presente documento para la fabricación de un medicamento para inhibir la replicación de los virus de la gripe, para reducir la cantidad de virus de la gripe o para tratar la gripe, en un sujeto.

- 15 En otro aspecto más, la presente invención se dirige a un régimen de dosificación del compuesto (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en un intervalo de 100 mg a 1.600 mg.

Breve descripción de los dibujos

20 Las figuras 1 y 2 son un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) y un espectro por espectroscopía magnética nuclear de estado sólido C^{13} (SSNMR C^{13}) de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O, respectivamente.

Las figuras 3 y 4 son un patrón de XRPD y un espectro de RMN de estado sólido C^{13} de la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O, respectivamente.

25 Las figuras 5 y 6 son un patrón de XRPD y un espectro de RMN de estado sólido C^{13} de la forma D de la sal de HCl del compuesto (1), respectivamente.

Las figuras 7 y 8 son un patrón de XRPD y un espectro de RMN de estado sólido C^{13} de la forma A del compuesto (1), respectivamente.

La figura 9 es un patrón de XRPD de la forma A de la sal de tosilato del compuesto (1).

30 La figura 10 es un patrón de XRPD de un solvato en 2-metil tetrahydrofurano (2-MeTHF) del compuesto (1).

La figura 11 es un patrón de XRPD de una forma amorfa del compuesto (1).

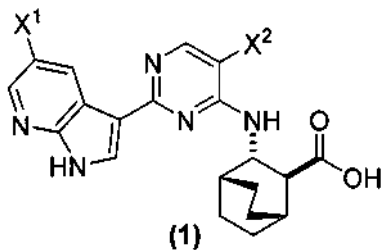
La figura 12 es un diagrama de fases de la temperatura frente a la actividad de agua para la transición entre los diferentes polimorfos de una sal de HCl del compuesto (1).

35 La FIG. 13 es una gráfica que muestra la ABC de dispersión vírica para el grupo de dosis de 1200 mg/600 mg de la forma A de sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O en un modelo de exposición a virus de la gripe vivo atenuado en seres humanos.

Descripción detallada de la invención

40 I. FORMAS SÓLIDAS

El compuesto (1), representado por la fórmula estructural siguiente:



- 45 y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden inhibir la replicación de los virus de la gripe y también se describe en el documento WO 2010/148197.

El compuesto (1) puede existir en o formar diferentes formas polimórficas. Como se conoce en la técnica, el polimorfismo es una capacidad de un compuesto para cristalizar en forma de más de especie "polimórfica" o cristalina distinta. Un polimorfo es una fase cristalina sólida de un compuesto con al menos dos disposiciones o formas polimórficas diferentes de esa molécula de compuesto en estado sólido. Las formas polimórficas de cualquier compuesto se definen mediante la misma fórmula química o composición y son tan distintas en estructura química como las estructuras químicas de dos compuestos químicos diferentes. En general, los diferentes polimorfos pueden caracterizarse mediante métodos analíticos tales como patrón de difracción de rayos X de polvo (XRPD), análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) o mediante su punto de fusión u otras técnicas conocidas en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, el término "forma polimórfica" incluye solvatos y

forma polimórfica pura que no tiene ningún solvato.

Como se usa en el presente documento, "compuesto (1)" significa la forma de base libre del compuesto (1). En consecuencia, "sal de HCl del compuesto (1)" significa una sal de HCl de la base libre del compuesto y "sal de tosilato del compuesto (1)" significa sal de tosilato de la forma libre del compuesto. Se observa que el compuesto (1) y las sales del compuesto (1) pueden ser solvatadas o no solvatadas a menos que se especifique de otro modo. Asimismo, se observa que el compuesto (1) y las sales del compuesto (1) pueden ser cristalinas o amorfas a menos que se especifique de otro modo.

En una realización, la presente invención se dirige a la forma polimórfica A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O. Esta forma es una forma polimórfica de la sal de HCl del compuesto (1) que incluye agua como solvato en medio equivalente por compuesto (1). En una realización específica, la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O se caracteriza por uno o más picos que corresponden a valores 2-theta medidos en grados de 10,5, 5,2, 7,4 y 18,9 (± 0,2 grados) en un patrón de difracción de rayos X en polvo. En otra realización específica, la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O se caracteriza también por uno o más picos que corresponden a valores 2-theta medidos en grados de 25,2 ± 0,2, 16,5 ± 0,2, 18,1 ± 0,2 y 23,0 ± 0,2 en un patrón de difracción de rayos X en polvo. En otra realización específica la forma A de la sal de HCl del compuesto 1*1/2H₂O se caracteriza porque tiene un patrón de XRPD con picos característicos expresados en 2-theta ± 0,2 en las siguientes posiciones enumeradas en la tabla 2. En otra realización específica más, la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O se caracteriza por tiene un patrón XRPD sustancialmente igual al mostrado en la figura 1. Los patrones de XRPD se obtienen a temperatura ambiente usando radiación K alfa de Cu. En otra realización específica más, la forma polimórfica A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O se caracteriza porque tiene uno o más picos característicos a 29,2, 107,0, 114,0 y 150,7 (± 0,3 ppm) en un espectro de RMN de estado sólido C¹³. En otra realización específica más, la forma A polimórfica de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O se caracteriza además porque tiene uno o más picos característicos a 22,1, 24,6, 47,7 y 54,8 (± 0,3 ppm) en un espectro de RMN de estado sólido C¹³. En otra realización específica más, la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O se caracteriza porque tiene picos de RMN de estado sólido C¹³ enumerados en la tabla 3. En otra realización específica más, la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O se caracteriza porque tiene un espectro de RMN de estado sólido C¹³ sustancialmente igual al que se muestra en la figura 2.

También se describe en el presente documento la forma polimórfica F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O. Esta forma es una forma polimórfica de la sal de HCl del compuesto (1) que incluye agua como solvato en tres equivalentes por compuesto (1). En un aspecto específico, la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O se caracteriza por uno o más picos que corresponden a valores 2-theta medidos en grados de 7,1, 11,9 y 12,4 (± 0,2) en un patrón de difracción de rayos X en polvo. En otro aspecto específico, la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O se caracteriza además por uno o más picos que corresponden a valores 2-theta medidos en grados de 16,4, 21,8 y 23,9 (± 0,2) en un patrón de difracción de rayos X en polvo. En otro aspecto específico, la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O se caracteriza porque tienen un patrón de XRPD con picos característicos expresados en 2-theta ± 0,2 en las siguientes posiciones enumeradas en la tabla 5. En otro aspecto específico más, la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O se caracteriza porque tiene un patrón de XRPD sustancialmente igual al que se muestra en la figura 3. Los patrones de XRPD se obtienen a temperatura ambiente usando radiación K alfa de Cu. En otro aspecto específico más, la forma polimórfica F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O se caracteriza por picos a 20,7, 27,4, 104,8, 142,5, 178,6 (± 0,3 ppm) en un espectro de RMN de estado sólido C¹³. En otra realización específica más, la forma polimórfica F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O se caracteriza además por uno o más picos que corresponden a 154,3, 20,3, 132,3 y 21,1 (± 0,3 ppm) en un espectro de RMN de estado sólido C¹³. En otro aspecto específico más, la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O se caracteriza porque tiene picos de RMN de estado sólido C¹³ enumerados en la tabla 6. En otro aspecto específico más la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O se caracteriza porque tiene un espectro de RMN de estado sólido C¹³ sustancialmente igual al que se muestra en la figura 4.

También se describe en el presente documento la forma polimórfica D de la sal de HCl del compuesto (1). Esta forma es una forma no solvatada de la sal de HCl del compuesto (1). En un aspecto específico, la forma D de la sal de HCl del compuesto (1) se caracteriza por uno o más picos que corresponden a valores 2-theta medidos en grados de 5,8, 17,1 y 19,5 (± 0,2) en un patrón de difracción de rayos X en polvo. En otro aspecto específico, la forma D de la sal de HCl del compuesto (1) se caracteriza por uno o más picos que corresponden a valores 2-theta medidos en grados de 5,3, 10,5 y 15,9 (± 0,2) en un patrón de difracción de rayos X en polvo. En otro aspecto específico, la forma D de la sal de HCl del compuesto (1) se caracteriza porque tiene un patrón XRPD con picos característicos expresados en 2-theta ± 0,2 en las posiciones enumeradas en la tabla 7. En otro aspecto específico más, la forma D de la sal de HCl del compuesto (1) se caracteriza porque tiene un patrón de XRPD sustancialmente igual al que se muestra en la figura 5. Los patrones de XRPD se obtienen a temperatura ambiente usando radiación K alfa de Cu. En otro aspecto específico más, la forma D de la sal de HCl del compuesto (1) se caracteriza porque tiene picos a 29,4, 53,4, 113,3, 135,4, 177,8 (± 0,3 ppm) en un espectro de RMN de estado sólido C¹³. En otro aspecto específico más, la forma D de la sal de HCl del compuesto (1) se caracteriza también porque por uno o más picos que corresponden a 22,9, 23,9, 26,0 y 31,6 (± 0,3 ppm) en un espectro de RMN de estado sólido C¹³. En otro aspecto específico más, la forma D de la sal de HCl del compuesto (1) se caracteriza porque tiene picos de SSNMR C¹³ enumerados en la tabla 8. En otro aspecto específico más, la forma D de la sal de HCl del compuesto (1) se

caracteriza porque tiene un espectro de RMN de estado sólido C^{13} sustancialmente igual al que se muestra en la figura 6.

En una realización, la presente invención se dirige a la forma polimórfica A del compuesto (1). Esta forma es una forma no solvatada, de base libre del compuesto (1). En una realización específica, la forma A del compuesto (1) se caracteriza por uno o más picos que corresponden a valores 2-theta medidos en grados de 15,5, 18,9 y 22,0 ($\pm 0,2$) en un patrón de difracción de rayos X en polvo. En otra realización específica, la forma A del compuesto (1) se caracteriza también por uno o más picos que corresponden a valores 2-theta medidos en grados de 11,8, 16,9, 25,5 y 9,1 ($\pm 0,2$) en un patrón de difracción de rayos X en polvo. En otra realización específica, la forma A del compuesto (1) se caracteriza porque tiene un patrón de XRPD con picos característicos expresados en 2-theta $\pm 0,2$ en la posición enumerada en la tabla 10. En otra realización específica más, la forma A del compuesto (1) se caracteriza porque tiene un patrón de XRPD sustancialmente igual al que se muestra en la FIG. 7. Los patrones XRPD se obtienen a temperatura ambiente usando radiación K alfa de Cu. En otra realización específica más, la forma A del compuesto (1) se caracteriza porque tiene picos a 21,0, 28,5, 50,4, 120,8, 138,5 y 176,2 ($\pm 0,3$ ppm) en un espectro de RMN de estado sólido C^{13} . En otra realización específica más, la forma A del compuesto (1) se caracteriza porque tiene picos a 30,1, 25,9, 22,8 y 25,0 ($\pm 0,3$ ppm) en un espectro SSNMR C^{13} . En otra realización específica más, la forma A del compuesto (1) se caracteriza porque tiene picos de SSNMR C^{13} enumerados en la tabla 11. En otra realización específica más, la forma A del compuesto (1) se caracteriza porque tiene un espectro de RMN de estado sólido C^{13} sustancialmente igual al que se muestra en la figura 8.

En una realización, la presente invención se dirige a la forma polimórfica A de la sal de tosilato del compuesto (1). Esta forma es una forma no solvatada de la sal de tosilato del compuesto (1). En una realización específica, la forma A de la sal de tosilato del compuesto (1) se caracteriza por uno o más picos que corresponden a valores 2-theta medidos en grados de 7,2, 9,3, 13,7, 16,9, 18,7, 26,3 y 26,9 ($\pm 0,2$) en un patrón de difracción de rayos X en polvo. En otra realización específica, la forma A de la sal de tosilato del compuesto (1) se caracteriza además por uno o más picos que corresponden a valores 2-theta medidos en grados de 6,0, 28,0 y 27,5 ($\pm 0,2$) en un patrón de rayos X en polvo. En otra realización específica, la forma A de la sal de tosilato del compuesto (1) se caracteriza porque tiene un patrón de XRPD con picos característicos expresados en 2-theta $\pm 0,2$ en las posiciones enumeradas en la tabla 14. En otra realización específica más, la forma A de la sal de tosilato del compuesto (1) se caracteriza porque tiene un patrón de XRPD sustancialmente igual al que se muestra en la figura 9. Los patrones de XRPD se obtienen a temperatura ambiente usando radiación K alfa de Cu.

También se describen en el presente documento métodos para preparar la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)* $1/2H_2O$, la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)* $3H_2O$, la forma D de la sal de HCl del compuesto (1), la forma A del compuesto (1) y la forma A de la sal de tosilato del compuesto (1).

La forma A de la sal de HCl del compuesto (1)* $1/2H_2O$ puede prepararse empleando el mezclado (por ejemplo, agitación) de cloruro de hidrógeno (HCl) con el compuesto (1). El compuesto (1) puede ser solvatado, no solvatado, amorfo o cristalino. Una solución, compuesto acuoso o suspensión del compuesto (1) puede mezclarse con HCl en un sistema disolvente que incluye agua y uno o más disolventes orgánicos, donde el sistema disolvente tiene una actividad de agua igual a, o mayor de 0,05 e igual a o menor de 0,85, es decir, 0,05 - 0,85. El término "actividad de agua" (a_w) se usa en el presente documento como se conoce en la técnica y significa una medida del estado de energía del agua en un sistema disolvente. Se define como la presión del vapor de un líquido dividido por la del agua pura a la misma temperatura. Específicamente, se define como $a_w = \frac{p}{p_0}$, donde p es la presión del vapor de agua en la sustancia y p_0 es la presión del vapor de agua pura a la misma temperatura o como $a_w = I_w \times x_w$, donde I_w es el cociente de actividad del agua y x_w es la fracción molar del agua en la fracción acuosa. Por ejemplo, el agua pura tiene un valor de actividad de agua de 1,0. Los valores de actividad de agua normalmente pueden obtenerse tanto por un higrómetro de capacitancia como por un hidrómetro de punto de rocío. También están disponibles en el mercado diversos tipos de instrumentos de medida de la actividad de agua. Como alternativa, los valores de actividad de agua de mezclas de dos o más disolventes pueden calcularse basado en las cantidades de los disolventes y los valores de actividad de agua conocidos de los disolventes.

Un ejemplo del compuesto (1) cristalino incluye la forma A del compuesto (1). Los ejemplos de solvatos del compuesto (1) incluyen solvatos de 2-MeTHF, *N,N*-dimetilacetamida, *N,N*-dimetilformamida, metanol, xileno, acetona, 2-butanol, acetato de metilo, 1-pentanol, 2-propanol, tetrahidrofurano, metil tetrahidrofurano, dimetilacetamida *N,N*-dimetilformamida 1,4-dioxano, 1-pentanol, 2-metil-1-propanol, metil etil cetona, 3-metil-1-butanol, heptano, formiato de etilo, 1-butanol, ácido acético y etilenglicol. En una realización específica, se emplean solvatos de 2-MeTHF (por ejemplo, compuesto (1)* $1(2\text{-MeTHF})$).

Los sistemas disolventes adecuados para la preparación de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)* $1/2H_2O$ pueden comprender una gran variedad de combinaciones de agua y disolventes orgánicos donde la actividad de agua de los sistemas disolventes es igual a o mayor de 0,05 e igual a o menor de 0,85 (0,05-0,85). En una realización específica, el valor de la actividad de agua es 0,4 - 0,6. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen disolventes orgánicos de clase II o clase III enumerados en la International Conference on Harmonization Guidelines. Los ejemplos específicos de disolventes orgánicos de clase II incluyen clorobenceno, ciclohexano, 1,2-dicloroetano,

diclorometano, 1,2-dimetoxietano, N,N-dimetilacetamida, N,N-dimetilformamida, 1,4-dioxano, 2-etoxietanol, formamida, hexano, 2-metoxietanol, metil butil cetona, metilciclohexano, N-metilpirrolidona, nitrometano, piridina, sulfolano, tetrahidrofurano (THF), tetralina, tolueno, 1,1,2-tricloroetano y xileno. Los ejemplos específicos de disolventes orgánicos adecuados de clase III incluyen: ácido acético, acetona, anisol, 1-butanol, 2-butanol, acetato de butilo, éter de *terc*-butilmetilo, cumeno, heptano, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de metilo, 3-metil-1-butanol, metil etil cetona, metil isobutil cetona, 2-metil-1-propanol, acetato de etilo, éter etílico, formiato de etilo, pentano, 1-pentanol, 1-propanol, 2-propanol y acetato de propilo. En una realización específica, los disolventes orgánicos del sistema disolvente se seleccionan entre el grupo que consiste en clorobenceno, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, diclorometano, 1,2-dimetoxietano, hexano, 2-metoxietanol, metil butil cetona, metilciclohexano, nitrometano, tetralina, xileno, tolueno, 1,1,2-tricloroetano, acetona, anisol, 1-butanol, 2-butanol, acetato de butilo, *terc*-butilmetiléter, cumeno, etanol, acetato de etilo, éter etílico, formiato de etilo, heptano, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de metilo, 3-metil-1-butanol, metil etil cetona, 2-metil-1-propanol, pentano, 1-propanol, 1-pentanol, 2-propanol, acetato de propilo, tetrahidrofurano y tetrahidrofurano de metilo. En otra realización específica, los disolventes orgánicos del sistema disolvente se seleccionan entre el grupo que consiste en 2-etoxietanol, etilenglicol, metanol, 2-metoxietanol, 1-butanol, 2-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, etanol, 1-pentanol, 1-propanol, 2-propanol, metil butil cetona, acetona, metil etil cetona, metil isobutil cetona, acetato de butilo, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, piridina, tolueno y xileno. En otra realización más, los disolventes orgánicos se seleccionan entre el grupo que consiste en acetona, n-propanol, isopropanol, iso-butilacetato y ácido acético. En otra realización más, los disolventes orgánicos se seleccionan entre el grupo que consiste en acetona e isopropanol. En otra realización específica más, el sistema disolvente incluye agua y acetona. En otra realización específica más, el sistema disolvente incluye agua e isopropanol.

La preparación de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)·1/2H₂O puede realizarse a cualquier temperatura adecuada. Normalmente, se realiza a una temperatura de 5 °C - 75 °C. En una realización específica, se realiza a una temperatura de 15 °C - 75 °C. En otra realización específica, se realiza a una temperatura de 15 °C - 60 °C. En otra realización específica más, se realiza a una temperatura de 15 °C - 35 °C. En otra realización específica más, la preparación se realiza a 5 °C - 75 °C en un sistema disolvente que tiene un valor de actividad de agua de 0,4-0,6. En otra realización específica más, la preparación se realiza a una temperatura de 15 °C - 75 °C en un sistema disolvente que tiene un valor de actividad de agua de 0,4-0,6. En otra realización específica más, la preparación se realiza a una temperatura de 15 °C - 60 °C en un sistema disolvente que tiene un valor de actividad de agua de 0,4-0,6. En otra realización específica más, la preparación se realiza a 15 °C -35 °C en un sistema disolvente que tiene un valor de actividad de agua de 0,4-0,6.

Puede introducirse cloruro de hidrógeno (HCl) en forma de una solución o de gas. Un ejemplo, una fuente de cloruro de hidrógeno adecuada es una solución acuosa de cloruro de hidrógeno que comprende el 30-40 % en peso (por ejemplo, el 34 % en peso -38 % en peso) de HCl en peso de la solución acuosa.

La forma F de la sal de HCl del compuesto (1)·3H₂O puede prepararse mezclando HCl y el compuesto (1) en un sistema disolvente que incluye agua o que incluye agua y uno o más disolventes orgánicos, donde el sistema disolvente tiene una actividad de agua igual a o mayor de 0,9 ($\geq 0,9$). La mezcla puede ser una solución, una composición acuosa o una suspensión. El compuesto (1) puede ser solvatado, no solvatado, amorfo o cristalino. Como alternativa, puede prepararse por agitación de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)·1/2H₂O en un sistema disolvente que incluye agua o que incluye agua y uno o más disolventes orgánicos, donde el sistema disolvente tiene una actividad de agua igual a o mayor de 0,9. Normalmente, el agua pura tiene un valor de actividad de agua de 1,0. Por consiguiente, un sistema disolvente que tiene una actividad de agua de 0,9-1,0 puede ser adecuado para la preparación de la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)·3H₂O. En una realización específica, el mezclado o agitación se realiza a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C). En otra realización específica, el mezclado o agitación se realiza a una temperatura de 15 °C - 30 °C. En otra realización específica, el mezclado o agitación se realiza a una temperatura de 20 °C - 28 °C (por ejemplo, 25 °C). Los disolventes orgánicos adecuados, incluyendo los ejemplos específicos, para la formación de la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)·3H₂O son como se han descrito anteriormente para la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)·1/2H₂O. En otra realización específica más, el sistema disolvente incluye agua y acetona. En otra realización específica más, el sistema disolvente incluye agua e isopropanol.

La forma D de la sal de HCl del compuesto (1) puede prepararse deshidratando la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)·1/2H₂O. La deshidratación puede realizarse por cualquier medio adecuado, tal como calentamiento o purgado con nitrógeno seco o ambos.

La forma A del compuesto (1) puede prepararse mediante (a) agitar una mezcla del compuesto amorfo (1) o un solvato del compuesto (1) (tal como un solvato 2-MeTHF del compuesto (1)) en un sistema disolvente que incluye agua y etanol. La mezcla puede ser una solución o una suspensión. En una realización específica, la etapa de agitación se realiza a una temperatura en un intervalo de 18 °C a 90 °C. En otra realización específica, la etapa de agitación (a) se realiza a temperatura de reflujo del sistema disolvente. En otra realización específica, el sistema disolvente incluye del 5 % en peso al 15 % en peso de agua por peso del sistema disolvente. Los ejemplos de solvatos del compuesto (1) son como se han descrito anteriormente. En una realización específica, se emplean los

solvatos de 2-MeTHF (por ejemplo, compuesto (1) 1(2-MeTHF)).

En otra realización, los métodos de preparación de la forma A del compuesto (1) comprenden además: (b) agitar la forma amorfa del compuesto (1) en nitrometano para formar la semilla cristalina de la forma A del compuesto (1); y (c) añadir la semilla cristalina de la forma A del compuesto (1) a la mezcla resultante de la etapa de mezclado (a). En una realización específica, los métodos también comprenden: (b) agitar la forma amorfa del compuesto (1) en nitrometano para formar la semilla cristalina de la forma A del compuesto (1); (c) enfriar la mezcla resultante de la etapa de mezclado (a) a una temperatura en el intervalo de 18 °C a 60 °C (por ejemplo, 50-55 °C o 55 °C); y (d) añadir la semilla cristalina de la forma A del compuesto (1) a la mezcla resultante etapa (c). En otra realización específica, los métodos también comprenden añadir agua, antes de la adición de la semilla cristalina de la forma A del compuesto (1), a la mezcla resultante que ha pasado a través de la etapa de reflujo, en una cantidad para tener el sistema disolvente resultante, incluido el agua, en un 15-25 % en peso después de la adición del agua. En otra realización específica más, los métodos también comprenden añadir agua a la mezcla que incluye la semilla cristalina de la forma A del compuesto (1) en una cantidad para tener el sistema disolvente resultante, incluido el agua, en un 35-45 % en peso después de la adición del agua. En otra realización específica más, los métodos también comprenden enfriar la mezcla que incluye la semilla cristalina de la forma A del compuesto (1), tras la adición del agua, a una temperatura de 0 °C - 10 °C.

En una realización específica, la semilla cristalina de la forma A del compuesto (1) puede prepararse por el solvato 2-MeTHF del compuesto (1) en nitrometano. En una realización, el sistema disolvente para la etapa de reflujo incluye el 5-15 % en peso (por ejemplo 8 % en peso, 10 % en peso o 12 % en peso) de agua por peso del sistema disolvente.

La forma A de la sal de tosilato del compuesto (1) puede prepararse agitando una mezcla del compuesto amorfo (1) o un solvato del compuesto (1) ((tal como un solvato 2-MeTHF del compuesto (1)), ácido *p*-toluenosulfónico y un sistema disolvente que incluye acetonitrilo. En una realización específica, la etapa de mezclado o agitación se realiza a temperatura ambiente. En otra realización específica, la etapa de mezclado o agitación se realiza a una temperatura de 15-30 °C. En otra etapa específica, la etapa de mezclado o agitación se realiza a una temperatura de 20-30 °C (por ejemplo, 25 °C). Los ejemplos adecuados de solvatos del compuesto (1), incluyendo los ejemplos específicos, son como se han descrito anteriormente para la preparación de la forma A del compuesto (1).

En otra realización más, la invención se dirige a solvatos en 2-MeTHF del compuesto (1). En una realización específica, los solvatos incluyen 0,5 – 1,5 equivalentes de 2-MeTHF por compuesto (1), tal como 1 equivalente de 2-MeTHF por compuesto (1). En una realización específica, los solvatos incluyen 1 equivalente de 2-MeTHF y se caracterizan porque tienen un patrón de XRPD con picos característicos expresados en 2-theta ± 0.2 en las posiciones siguientes a 8,4, 9,7, 16,7, 16,9, 17,4, 21,0, 22,3 y 25,7. En otra realización específica, los solvatos incluyen 1 equivalente de 2-MeTHF y se caracterizan porque tienen ciertos picos de XRPD enumerados en la tabla 12 o porque tienen patrones de XRPD como los que se muestran en la figura 10.

También se describen en el presente documento formas amorfas del compuesto (1) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, tal como sal de HCl del compuesto amorfo (1) y el compuesto amorfo (1). También se describe en el presente documento la forma B del compuesto (1) hidrato. La forma B del compuesto (1) hidrato es isomórfico con la forma A del compuesto (1), mostrando los mismos picos de XRPD que los de la forma A del compuesto (1), pero formado en presencia de agua, por ejemplo, en un sistema que tiene una actividad de agua mayor de 0,6, tal como 0,6-1,0, a temperatura ambiente.

La presente invención abarca las formas polimórficas del compuesto (1) descrito anteriormente, en forma pura, aislada o en una mezcla en forma de una composición sólida cuando se mezcla con otros materiales, por ejemplo las otras formas (es decir forma amorfa, forma A del compuesto (1), etc.) del compuesto (1) o cualquier otro material.

También se describen en el presente documento formas polimórficas, tales como la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2 H₂O, la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)-3 H₂O, la forma D de la sal de HCl del compuesto (1), la forma A del compuesto (1), la forma B del compuesto (1) hidrato y la forma A de la sal de tosilato del compuesto (1), en forma de sólido aislado. También se describen en el presente documento la forma amorfa del compuesto (1) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, tal como la sal de HCl del compuesto amorfo (1) y el compuesto amorfo (1), en forma de sólido aislado.

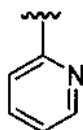
En un aspecto adicional, la presente invención proporciona formas polimórficas en forma pura. La forma pura significa que la forma polimórfica particular comprende más del 95 % (p/p), por ejemplo, más del 98 % (p/p), más del 99 % (p/p %), más del 99,5 % (p/p) o más del 99,9 % (p/p). En otro aspecto más, se proporcionan formas amorfas del compuesto (1) o sales farmacéuticamente aceptables del mismo en forma pura. La forma pura significa que la forma amorfa es más del 95 % (p/p), por ejemplo, más del 98 % (p/p), más del 99 % (p/p %), más del 99,5 % (p/p) o más del 99,9 % (p/p).

Más específicamente, la presente invención proporciona cada una de las formas polimórficas en forma de una composición o una mezcla de la forma polimórfica con una o más formas cristalina, solvato, amorfa u otras formas

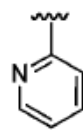
polimórficas o sus combinaciones. Por ejemplo, en una realización, la composición comprende la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)·1/2 H₂O junto con una o más formas polimórficas distintas del compuesto (1), tal como forma amorfa, solvatos, la forma D de la sal de HCl del compuesto (1), la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)·3 H₂O, la forma A del compuesto (1) y/o otras formas o sus combinaciones. De manera similar, en otra realización, la composición comprende la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)·3H₂O junto con una o más formas polimórficas distintas del compuesto (1), tal como la forma amorfa, solvatos, la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O, la forma D de la sal de HCl del compuesto (1), la forma A del compuesto (1) y/o otras formas o sus combinaciones. De manera similar, en otra realización, la composición comprende la forma D de la sal de HCl del compuesto (1) junto con una o más formas polimórficas distintas del compuesto (1), tal como forma amorfa, solvatos, la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O, la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O, la forma A del compuesto (1) y/o otras formas o sus combinaciones. En otra realización más, la composición comprende la forma A del compuesto (1) junto con una o más formas polimórficas distintas del compuesto (1), tal como forma amorfa, hidratos, solvatos y/u otras formas o sus combinaciones. En otra realización más, la composición comprende la forma A de la sal de tosilato del compuesto (1) junto con una o más formas polimórficas distintas del compuesto (1), tal como forma amorfa, hidratos, solvatos y/u otras formas o sus combinaciones. Más específicamente, la composición puede comprender cantidades desde trazas hasta el 100 % de la forma polimórfica específica o cualquier cantidad, por ejemplo, en un intervalo de 0,1 % - 0,5 %, 0,1 %, -1 %, 0,1 % - 2 %, 0,1 % - 5 %, 0,1 %, -10 %, 0,1 % - 20 %, 0,1 % - 30 %, 0,1 % - 40 % o 0,1 % - 50 % en peso basado en la cantidad total del compuesto (1) en la composición. Como alternativa, la composición puede comprender al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o el 99,9 % en peso de forma polimórfica específica basado en la cantidad total de compuesto (1) en la composición.

Para los fines de la presente invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª ed. Además, los principios generales de la química orgánica se describen en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999 y "March's Advanced Organic Chemistry", 5ª ed., Ed.: Smith, M.B. y March, J., John Wiley & Sons, Nueva York: 2001, cuyos contenidos al completo se incorporan en el presente documento por referencia.

A menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en el presente documento también están destinadas a incluir todas las formas isoméricas (por ejemplo, enantiomérica, diastereomérica, cis-trans, conformacional y rotacional) de la estructura. Por ejemplo, las configuraciones R y S de cada centro asimétrico, los isómeros de doble enlace (**Z**) y (**E**) y los isómeros conformacionales (**Z**) y (**E**) están incluidos dentro de la presente invención, a menos que de manera específica se dibuje solamente uno de los isómeros. Como entenderá un experto en la técnica, un sustituyente puede rotar libremente alrededor de cualquier enlace giratorio. Por ejemplo, un sustituyente dibujado como



también representa



Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas, cis/trans, conformacionales y rotacionales de los presentes compuestos están dentro del alcance de la presente invención.

A menos que se indique otra cosa, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la presente invención están dentro del alcance de la presente invención.

Además, salvo que se indique de otro modo, las estructuras representadas en el presente documento también pretenden incluir compuestos que difieren solamente en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras, excepto por la sustitución de hidrógeno por deuterio o tritio o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido ¹³C o ¹⁴C, están comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Dichos compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas o sondas analíticas en ensayos biológicos. Dichos compuestos, especialmente los análogos de deuterio (D), también pueden ser útiles terapéuticamente.

Los compuestos descritos en el presente documento se definen en el presente documento por sus estructuras

químicas y/o nombres químicos. Donde se menciona un compuesto tanto por un estructura química como por un nombre químico y la estructura química y el nombre químico entran en conflicto, la estructura química es determinativa de la identidad del compuesto.

5 Los expertos en la materia apreciarán que los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden contener un centro quiral. Los compuestos de la fórmula pueden existir por tanto en la forma de dos isómeros ópticos diferentes (es decir enantiómeros (+) o (-)). Todos estos enantiómeros y sus mezclas, incluyendo mezclas racémicas, están incluidos dentro del alcance de la invención. El isómero óptico individual o enantiómero puede obtenerse por un método bien conocido en la técnica, tal como HPLC quiral, resolución enzimática y auxiliar quiral.

10 En una realización, los compuestos de acuerdo con la presente invención se proporcionan en forma de un enantiómero individual al menos un 95 %, al menos un 97 % y al menos un 99 % libre del correspondiente enantiómero.

15 En una realización adicional, los compuestos de acuerdo con la presente invención están en forma del enantiómero (+) al menos un 95 % libre del correspondiente enantiómero (-).

20 En una realización adicional, los compuestos de acuerdo con la presente invención están en forma del enantiómero (+) al menos un 97 % libre del correspondiente enantiómero (-).

En una realización adicional, los compuestos de acuerdo con la presente invención están en forma del enantiómero (+) al menos un 99 % libre del correspondiente enantiómero (-).

25 En una realización adicional, los compuestos de acuerdo con la presente invención están en forma del enantiómero (-) al menos un 95 % libre del correspondiente enantiómero (+).

En una realización adicional, los compuestos de acuerdo con la presente invención están en forma del enantiómero (-) al menos un 97 % libre del correspondiente enantiómero (+).

30 En una realización más los compuestos de acuerdo con la presente invención están en forma del enantiómero (-) al menos un 99 % libre del correspondiente enantiómero (+).

II. USOS DEL COMPUESTO (1) Y SUS SALES FARMACÉUTICAMENTE ACEPTABLES

35 Un aspecto de la presente invención se refiere generalmente al uso del compuesto (1) y sus sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo las diversas formas sólidas descritas anteriormente, para inhibir la replicación de los virus de la gripe en una muestra biológica o en un paciente, para reducir la cantidad de virus de la gripe (reducir el título vírico) en una muestra biológica o en un paciente y para tratar la gripe en un paciente. De ahora en adelante en el presente documento, a menos que se indique específicamente de otro modo, el compuesto (1) y sus sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo las diversas formas sólidas descritas anteriormente, se refieren a compuestos en general.

45 En una realización, la presente invención se refiere en general al uso de los compuestos divulgados en el presente documento (por ejemplo, en composiciones farmacéuticamente aceptables) para cualquiera de los usos especificados anteriormente.

50 En otra realización más, los compuestos divulgados en el presente documento pueden usarse para reducir el título vírico en una muestra biológica (por ejemplo, un cultivo de células infectadas) o en seres humanos (por ejemplo, título vírico pulmonar en un paciente).

Las expresiones "afección mediada por el virus de la gripe", "infección por gripe" o "gripe", tal como se usa en el presente documento, se usan de manera intercambiable para hacer referencia a la enfermedad causada por una infección por un virus de la gripe.

55 La gripe es una enfermedad infecciosa que afecta a aves y mamíferos provocada por virus de la gripe. Los virus de la gripe son virus de ARN de la familia *Orthomyxoviridae*, que comprende cinco géneros: virus Influenza A, virus Influenza B, virus Influenza C, virus ISA y virus Thogoto. El género de virus Influenza A tiene una especie, el virus de la gripe A, que puede subdividirse en diferentes serotipos, basándose en la respuesta de anticuerpo frente a estos virus: H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 y H10N7. Algunos ejemplos adicionales de virus de la gripe A incluyen H3N8 y H7N9. El género de virus Influenza B tiene una especie, el virus de la gripe B. La gripe B infecta de manera prácticamente exclusiva a seres humanos y es menos común que la gripe A. El género del virus influenza C tiene una especie, el virus de la gripe C, que infecta a seres humanos y cerdos y puede provocar una enfermedad grave y epidemias locales. Sin embargo, el virus de la gripe C es menos común que los otros tipos y parece que normalmente causa una enfermedad leve en niños.

65 En algunas realizaciones de la invención, la gripe o los virus de la gripe se asocian con el virus Influenza A o B. En

algunas realizaciones de la invención, la gripe o los virus de la gripe se asocian con el virus Influenza A. En algunas realizaciones específicas de la invención, el virus Influenza A es H1N1, H2N2, H3N2 o H5N1. En algunas realizaciones específicas de la invención, el virus Influenza A es H1N1, H3N2, H3N8, H5N1 y H7N9. En algunas realizaciones específicas de la invención, el virus Influenza A es H1N1, H3N2, H3N8 y H5N1.

5 En seres humanos, los síntomas comunes de la gripe son escalofríos, fiebre, faringitis, dolores musculares, cefalea grave, tos, debilidad y malestar general. En los casos más serios, la gripe causa neumonía, que puede ser letal, en particular en niños pequeños y ancianos. Aunque normalmente se confunde con el resfriado común, la gripe es una enfermedad mucho más grave y está provocada por un tipo de virus distinto. La gripe puede producir náuseas y
10 vómitos, especialmente en niños, pero estos síntomas son más característicos de la gastroenteritis no relacionada, que en ocasiones se denomina "gripe estomacal" o "gripe de 24 horas".

15 Los síntomas de la gripe pueden iniciarse de manera bastante repentina uno o dos días después de la infección. Normalmente, los primeros síntomas son escalofríos o una sensación de frío, pero la fiebre suele ser frecuente de manera temprana en la infección, con temperaturas corporales en el intervalo de 38 °C a 39 °C (aproximadamente 100 °F a 103 °F). Muchas personas se encuentran tan enfermas que permanecen encamadas durante varios días, con molestias y dolores por todo el cuerpo, que son peores en la espalda y las piernas. Los síntomas de la gripe pueden incluir: molestias corporales, especialmente en articulaciones y garganta, frío extremo y fiebre, cansancio, cefalea, ojos llorosos e irritados, ojos, piel (especialmente facial), boca, garganta y nariz enrojecidos, dolor
20 abdominal (en niños con gripe B). Los síntomas de la gripe son inespecíficos, que se solapan con muchos patógenos ("enfermedades gripales"). Normalmente, se necesitan datos de laboratorio para confirmar el diagnóstico.

25 Los términos "enfermedad", "trastorno" y "afección" pueden usarse de manera indistinta en el presente documento para referirse a una afección médica o patológica mediada por el virus de la gripe.

30 Tal como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera indistinta. Los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a un animal (por ejemplo, un ave, tal como un pollo, codorniz o pavo o a un mamífero), específicamente, un "mamífero", incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, oveja, conejo, cobaya, rata, gato, perro y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, chimpancé y un ser humano) y más específicamente, un ser humano. En una realización, el sujeto es un animal no humano, tal como un animal de granja (por ejemplo, un caballo, vaca, cerdo u oveja) o una mascota (por ejemplo, un perro, gato, cobaya o conejo). En una realización preferida, el sujeto es un "ser humano".

35 La expresión "muestra biológica", tal como se usa en el presente documento, incluye, sin limitación, cultivos celulares o extractos de los mismos; material de biopsia obtenido de un mamífero o extractos del mismo; sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas u otros fluidos corporales o extractos de los mismos.

40 Tal como se usa en el presente documento, "multiplicidad de infección" o "MDF" es la relación de agentes infecciosos (por ejemplo, fago o virus) a dianas de la infección (por ejemplo, células). Por ejemplo, cuando se hace referencia a un grupo de células inoculadas con partículas víricas infecciosas, la multiplicidad de la infección o MDF es la relación definida por el número de partículas de virus infecciosas depositadas en un pocillo dividido entre el número de células diana presentes en ese pocillo.

45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "inhibición de la replicación de virus de la gripe" incluye tanto la reducción en la cantidad de replicación del virus (por ejemplo, la reducción de al menos un 10 %) y la detención completa de la replicación del virus (es decir, una reducción del 100 % de la cantidad de replicación del virus). En algunas realizaciones, la replicación de los virus de la gripe se inhibe en al menos un 50 %, al menos un 65 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %.

50 La replicación del virus de la gripe puede medirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, puede medirse el título vírico de la gripe en una muestra biológica (por ejemplo, un cultivo de células infectadas) o en seres humanos (por ejemplo, título vírico pulmonar en un paciente). Más específicamente, para ensayos basados en células, en cada caso las células se cultivan *in vitro*, se añade virus al cultivo en presencia o ausencia de un agente de ensayo y después de un tiempo adecuado, se evalúa un criterio de valoración dependiente del virus. Para los ensayos típicos, pueden usarse células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y la cepa de gripe adaptada a cultivo tisular, A/Puerto Rico/8/34. Un primer tipo de ensayo celular que puede usarse en la invención depende de la muerte de las células diana infectadas, un proceso denominado efecto citopático (CPE), donde la infección del virus provoca el agotamiento de los recursos de la célula y en última instancia, la lisis de la célula. En el primer tipo de ensayo celular, se infecta una pequeña proporción de las células en los pocillos de una placa de microtitulación (normalmente, de 1/10 a 1/1000), se deja que el virus pase por varias rondas de replicación a lo largo de 48-72 horas, después se mide la cantidad de muerte celular usando una reducción en el contenido de ATP celular en comparación con los controles no infectados. Un segundo tipo de ensayo celular que puede emplearse en la invención depende de la multiplicación de moléculas de ARN específicas del virus en las células infectadas, midiéndose los niveles de ARN directamente usando el método de hibridación de ADN de cadena ramificada (ADNr). En el segundo tipo de ensayo celular, se infecta inicialmente un bajo número de células en los pocillos de una placa de microtitulación, se deja que se replique el virus en las células infectadas y se disperse a
65

ciclos de células adicionales, después, se lisan las células y se mide el contenido de ARN. Este ensayo se detiene de manera temprana, normalmente tras 18-36 horas, mientras que todas las células diana siguen siendo viables. El ARN vírico se cuantifica por hibridación con sondas de oligonucleótidos específicas fijadas a los pocillos de una placa de ensayo, seguido de amplificación de la señal por hibridación con sondas adicionales unidas a una enzima indicadora.

Tal como se usa en el presente documento el "título vírico" es la medida de la concentración de virus. Las pruebas de titulación pueden emplear dilución seriada para obtener información cuantitativa aproximada mediante un procedimiento analítico que de manera inherente solo evalúa respecto de positivo o negativo. El título corresponde al máximo factor de dilución que sigue proporcionando una lectura positiva; por ejemplo, las lecturas positivas en las primeras 8 diluciones seriadas de factor dos se traducen en un título de 1:256. Un ejemplo específico es el título vírico. Para determinar el título, se prepararán varias diluciones, tal como 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} . El título vírico es la menor concentración del virus que siga infectando a células.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a tratamientos tanto terapéuticos como profilácticos. Por ejemplo, los tratamientos terapéuticos incluyen la reducción o la mejora de la progresión, la gravedad y/o la duración de afecciones mediadas por el virus de la gripe o la mejora de uno o más síntomas (específicamente, uno o más síntomas discernibles) de afecciones mediadas por virus de la gripe, que sea el resultado de la administración de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos, tales como un compuesto o composición de la invención). En realizaciones específicas, el tratamiento terapéutico incluye la mejora de al menos un parámetro físico medible de una afección mediada por el virus de la gripe. En otras realizaciones, el tratamiento terapéutico incluye la inhibición de la progresión de una afección mediada por el virus de la gripe, ya sea físicamente, por ejemplo, estabilizando un síntoma discernible, fisiológicamente, por ejemplo, estabilizando un parámetro físico, o ambos. En otras realizaciones, el tratamiento terapéutico incluye la reducción o la estabilización de infecciones mediadas por virus de la gripe. Pueden usarse fármacos antivíricos en el ambiente comunitario para tratar a personas que ya tienen gripe para reducir la gravedad de los síntomas y reducir el número de días que están enfermos.

El término "quimioterapia" se refiere al uso de medicaciones, por ejemplo, fármacos de molécula pequeña (en lugar de "vacunas") para tratar un trastorno o enfermedad.

El término "profilaxis" o las expresiones "uso profiláctico" y "tratamiento profiláctico", tal como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier procedimiento médico o de salud pública cuyo fin sea prevenir, en lugar de tratar o curar una enfermedad. Tal como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "prevención" y "previniendo" se refieren a la reducción del riesgo de adquirir o desarrollar una afección dada o a la reducción o la inhibición de la aparición de dicha afección en un sujeto que no está enfermo, pero que ha estado o pueda estar próximo a una persona con la enfermedad. El término "quimioprofilaxis" se refiere al uso de medicaciones, por ejemplo, fármacos de molécula pequeña (en lugar de "vacunas") para la prevención de un trastorno o enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, el uso profiláctico incluye el uso en situaciones en las que se ha detectado un brote epidémico, para prevenir el contagio o la dispersión de la infección en sitios donde viven próximas unas de otras personas grandes cantidades de personas que se encuentran en riesgo de complicaciones graves a causa de la gripe (por ejemplo, en una instalación hospitalaria, centro de cuidados de día, prisión, geriátricos o similares). También incluye el uso entre poblaciones que requieren protección frente a la gripe pero que no obtienen protección después de la vacunación (por ejemplo, a causa de un sistema inmunitario débil) o cuando no tienen la vacuna a su disposición o cuando no se les puede administrar la vacuna debido a sus efectos secundarios. También incluye el uso durante las dos semanas posteriores a la vacunación, ya que durante ese tiempo, la vacuna aún no es eficaz. El uso profiláctico también puede incluir tratar a una persona que no ha contraído la gripe o que no se considera en alto riesgo de complicaciones, para reducir las probabilidades de que se infecte por gripe y que pueda transmitirla a una persona de alto riesgo en contacto estrecho con la misma (por ejemplo, trabajadores sanitarios, empleados de geriátricos o similares).

Según el CDC de los EE. UU., un "brote epidémico" de gripe se define como un aumento repentino de enfermedad respiratoria febril aguda (AFRI) que se produce en un periodo de 48 a 72 horas, en un grupo de personas que están muy próximas entre sí (por ejemplo, en el mismo área de una instalación de vivienda asistida, en el mismo hogar, etc.) por encima de la tasa de fondo normal o cuando cualquier sujeto en la población que se esté analizando de positivo en pruebas de gripe. Un caso de gripe confirmado mediante cualquier método de prueba se considera un brote epidémico.

Un "brote" se define como un grupo de tres o más casos de AFRI que se producen en un periodo de 48 a 72 horas, en un grupo de personas que están muy próximas entre sí (por ejemplo, en el mismo área de una instalación de vivienda asistida, en el mismo hogar, etc.).

Tal como se usa en el presente documento, el "caso inicial", "caso primario" o "paciente cero" es el paciente inicial en la muestra de población de una investigación epidemiológica. Cuando se usa en general para referirse a dichos pacientes en investigaciones epidemiológicas, no se emplean mayúsculas en este término. Cuando el término se

usa para referirse a una persona específica en lugar del nombre de esa persona en un informe acerca de una investigación específica, se emplean mayúsculas, indicándolo como Paciente cero. Normalmente, los científicos buscan el caso inicial para determinar cómo se ha dispersado la enfermedad y qué reservorio conserva la enfermedad entre brotes epidémicos. Obsérvese que el caso inicial es el primer paciente que indica la existencia de un brote epidémico. Pueden encontrarse casos más tempranos y se denominan primarios, secundarios, terciarios y similares.

En una realización, los métodos de la invención son una medida preventiva o "presintomática" para un paciente, específicamente un ser humano, que tiene predisposición a complicaciones causadas por la infección por un virus de la gripe. El término "presintomático" o "presintomáticamente", tal como se usa en el presente documento, por ejemplo, en uso "presintomático", es el uso profiláctico en situaciones en las que se ha confirmado un "caso inicial" o un "brote epidémico", para prevenir la dispersión de la infección en el resto de la comunidad o grupo de población.

En otra realización, los métodos de la invención se aplican como una medida "presintomática" a miembros de una comunidad o grupo de población, específicamente seres humanos, para prevenir la dispersión de la infección.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para desencadenar la respuesta biológica deseada. En la presente invención, la respuesta biológica deseada es inhibir la replicación del virus de la gripe, reducir la cantidad de virus de la gripe o reducir o mejorar la gravedad, duración, progresión o inicio de una infección por virus de la gripe, prevenir el avance de una infección por virus de la gripe, prevenir la recidiva, el desarrollo, el inicio o la progresión de un síntoma asociado con una infección por el virus de la gripe o potenciar o mejorar los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia usada contra las infecciones por gripe. La cantidad precisa de compuesto administrada a un sujeto dependerá del modo de administración, del tipo y la gravedad de la infección y de las características del sujeto, tales como el estado de salud general, la edad, el sexo, el peso corporal y la tolerancia a fármacos. El experto en la materia será capaz de determinar dosis adecuadas dependiendo de estos y otros factores. Cuando se administran junto con otros agentes antivíricos, por ejemplo, cuando se administran junto con una medicación antigripal, una "cantidad eficaz" del segundo agente dependerá del tipo de fármaco usado. Se conocen dosis adecuadas para agentes aprobados y pueden ajustarse por el experto en la materia según el estado del sujeto, el tipo de afecciones que se estén tratando y la cantidad de un compuesto descrito en el presente documento que se esté usando. En los casos donde no se indica expresamente una cantidad, debe inferirse una cantidad eficaz. Por ejemplo, los compuestos divulgados en el presente documento pueden administrarse a un sujeto en un intervalo de dosis de entre aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal/día para el tratamiento terapéutico o profiláctico.

En general, pueden seleccionarse las pautas posológicas de acuerdo con una serie de factores que incluyen el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el género y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la función renal y hepática del sujeto; y el compuesto particular o una sal del mismo empleada, la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o casuales con el compuesto específico empleado y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. El experto en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de los compuestos descritos en el presente documento necesaria para tratar, prevenir, inhibir (total o parcialmente) o detener el progreso de la enfermedad.

Las dosis de los compuestos descritos en el presente documento pueden variar de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal/día, de 0,01 a 50 mg/kg de peso corporal/día, de 0,1 a 50 mg/kg de peso corporal/día o de 1 a 25 mg/kg de peso corporal/día. Se entiende que la cantidad diaria total puede administrarse en una sola dosis o puede administrarse en múltiples dosis, tal como dos veces al día (por ejemplo, cada 12 horas), tres veces al día (por ejemplo, cada 8 horas) o cuatro veces al día (por ejemplo, cada 6 horas).

En algunas realizaciones, las dosis de los compuestos descritos en el presente documento se encuentran en el intervalo de 100 mg a 1.600 mg, tal como de 400 mg a 1.600 mg o de 400 mg a 1.200 mg. Cada dosis puede tomarse una vez al día (QD), dos veces al día (por ejemplo, cada 12 horas (BID)) o tres veces al día (por ejemplo, cada 8 horas (TID)). Cabe destacar que puede emplearse cualquier combinación de QD, BID y TID, según se desee, tal como BID en el día 1, seguido de QD posteriormente.

En algunas realizaciones, las dosis de los compuestos descritos en el presente documento están en un intervalo de 100 mg a 1.600 mg, tal como de 400 mg a 1.600 mg o de 400 mg a 1.200 mg. Cada dosis puede tomarse una vez al día (QD), dos veces al día (por ejemplo, cada 12 horas (BID)) o tres veces al día (por ejemplo cada 8 h (TID)). Cabe destacar que puede emplearse cualquier combinación de QD, BID y TID según se desee, tal como BID en el día 1, seguido de QD posteriormente o cuando se emplea una dosis de carga en el día 1, BID en el día 2, seguido de QD posteriormente.

En una realización específica, las dosis de los compuestos descritos en el presente documento son 400 mg a 1.600 mg, 400 mg a 1.200 mg o 600 mg a 1.200 mg una vez al día. En otra específica a 1.600 mg o 400 mg a 1.200 mg. Cada dosis puede tomarse una vez al día (QD), dos veces al día (por ejemplo, cada 12 horas (BID)) o tres veces al

día (por ejemplo, cada 8 horas (TID)). Cabe destacar que puede emplearse cualquier combinación de QD, BID y TID, según se desee, tal como BID en el día 1, seguido de QD posteriormente o, cuando se emplea una dosis de carga en el día 1, BID en el día 2, seguido de QD posteriormente.

5 En una realización específica, las dosis de los compuestos descritos en el presente documento son 400 mg a 1.600 mg, 400 mg a 1.200 mg o 600 mg a 1.200 mg una vez al día. En otra realización específica, las dosis de los compuestos descritos en el presente documento son 400 mg a 1.600 mg, 400 mg a 1.200 mg o 300 mg a 900 mg dos veces al día. En otra realización específica más, las dosis de los compuestos descritos en el presente documento son 400 mg a 1.000 mg una vez al día. En otra realización específica más, las dosis de los compuestos descritos en el presente documento son 600 mg a 1.000 mg una vez al día. En otra realización específica más, las dosis de los compuestos descritos en el presente documento son 600 mg a 800 mg una vez al día. En otra realización específica más, las dosis de los compuestos descritos en el presente documento son 400 mg a 800 mg dos veces al día (por ejemplo, 400 mg a 800 mg cada 12 horas). En otra realización específica más, las dosis de los compuestos descritos en el presente documento de 400 mg a 600 mg dos veces al día.

10
15 En algunas realizaciones, se emplea un régimen de dosis de carga. En una realización específica, se emplea una dosis de carga 400 mg a 1.600 mg en el día 1 de tratamiento. En otra realización específica, se emplea una dosis de carga 600 mg a 1.600 mg en el día 1 de tratamiento. En otra realización específica, se emplea una dosis de carga 800 mg a 1.600 mg en el día 1 de tratamiento. En otra realización específica más, se emplea una dosis de carga 900 mg a 1.600 mg en el día 1 de tratamiento. En otra realización específica más, se emplea una dosis de carga 900 mg a 1.200 mg en el día 1 de tratamiento. En otra realización específica más, se emplea una dosis de carga de 900 mg en el día 1 de tratamiento. En otra realización específica más, se emplea una dosis de carga de 1.000 mg en el día 1 de tratamiento. En otra realización específica más, se emplea una dosis de carga de 1.200 mg en el día 1 de tratamiento.

20
25 En una realización específica, la pauta de dosificación de los compuestos descritos en el presente documento emplea una dosis de carga de 600 mg a 1.600 mg en el día 1 y con una dosis regular de 300 mg a 1.200 mg durante el resto de la duración del tratamiento. Cada dosis regular puede tomarse una vez al día, dos veces al día o tres veces al día o cualquier combinación de las mismas. En una realización específica adicional, se emplea una dosis de carga de 900 mg a 1.600 mg, tal como de 900 mg, 1.200 mg o 1.600 mg. En otra realización específica adicional, se emplea una dosis de carga de 900 mg a 1.200 mg, tal como de 900 mg o 1.200 mg. En otra realización específica adicional más, se emplea una dosis regular de 400 mg a 1.200 mg, tal como de 400 mg, 600 mg u 800 mg durante el resto de la duración del tratamiento. En otra realización específica adicional más, se emplea una dosis regular de 400 mg a 1.000 mg durante el resto de la duración del tratamiento. En otra realización específica adicional más, se emplea una dosis regular de 400 mg a 800 mg durante el resto de la duración del tratamiento. En otra realización específica adicional más, se emplea una dosis regular de 300 mg a 900 mg dos veces al día. En otra realización específica adicional más, se emplea una dosis regular de 600 mg a 1.200 mg una vez al día. En otra realización específica adicional más, se usa una dosis regular de 600 mg dos veces al día en el día 2, seguida de una dosis de 600 mg una vez al día durante el resto de la duración del tratamiento.

30
35
40 Para el tratamiento terapéutico, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse a un paciente en, por ejemplo, las 48 horas posteriores (o las 40 horas posteriores o en menos de 2 días o en menos de 1,5 días o en menos de 24 horas) tras la aparición de los síntomas (por ejemplo, congestión nasal, irritación de garganta, tos, molestias, cansancio, cefaleas y escalofríos/sudores). Como alternativa, para el tratamiento terapéutico, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse a un paciente en, por ejemplo, las 96 horas posteriores a la aparición de los síntomas. El tratamiento terapéutico puede tener cualquier duración adecuada, por ejemplo, durante 3 días, 4 días, 5 días, 7 días, 10 días, 14 días, etc. Para el tratamiento terapéutico durante un brote epidémico comunitario, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse a un paciente, por ejemplo, en los 2 días posteriores a la aparición de los síntomas en el caso inicial y puede continuarse durante cualquier duración adecuada, por ejemplo, durante 7 días, 10 días, 14 días, 20 días, 28 días, 35 días, 42 días, etc., hasta durante toda la estación de gripe. Una estación de gripe es un periodo de tiempo anual recurrente caracterizado por la prevalencia de brotes epidémicos de gripe. En ocasiones, puede predecirse la actividad de la gripe e incluso puede rastrearse geográficamente. Aunque el inicio de una actividad de gripe importante en cada estación varía según la localización, en cualquier localización específica estas epidemias menores tardan normalmente entre 3-4 semanas en alcanzar un máximo y otras 3-4 semanas en reducirse significativamente. Normalmente, el Centro de Control de Enfermedades (CDC) recoge, compila y analiza información acerca de la actividad de la gripe durante todo el año en los Estados Unidos y elabora un informe semanal desde octubre hasta mediados de mayo.

45
50
55
60 En una realización, el tratamiento terapéutico dura desde 1 día hasta la estación de gripe completa. En una realización específica, el tratamiento terapéutico dura desde 3 días hasta 14 días. En otra realización específica, el tratamiento terapéutico dura desde 5 días hasta 14 días. En otra realización específica, el tratamiento terapéutico dura desde 3 días hasta 10 días. En otra realización específica más, el tratamiento terapéutico dura desde 4 días hasta 10 días. En otra realización específica más, el tratamiento terapéutico dura desde 5 días hasta 10 días. En otra realización específica más, el tratamiento terapéutico dura desde 4 días hasta 7 días (por ejemplo, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días). En otra realización específica más, el tratamiento terapéutico dura desde 5 días hasta 7 días (por

65

ejemplo, 5 días, 6 días o 7 días). En una realización específica, el tratamiento profiláctico dura hasta la estación de gripe completa.

5 En una realización específica, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un paciente durante de 3 días a 14 días (por ejemplo, de 5 días a 14 días) con una dosis de carga de 900 mg a 1.600 mg en el día 1 y con una dosis regular de 300 mg a 1.200 mg durante el resto de la duración del tratamiento. En otra realización específica, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un paciente durante de 3 días a 14 días (por ejemplo, de 5 días a 14 días) con una dosis de carga de 900 mg a 1.200 mg en el día 1 y con una dosis regular de 400 mg a 1.000 mg durante el resto de la duración del tratamiento. En otra realización específica más, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un paciente durante de 3 días a 14 días (por ejemplo, de 5 días a 14 días) con una dosis de carga de 900 mg a 1.200 mg en el día 1 y con una dosis regular de 400 mg a 800 mg durante el resto de la duración del tratamiento. En otra realización específica más, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un paciente durante de 3 días a 14 días (por ejemplo, de 5 días a 14 días) con una dosis de carga de 900 mg en el día 1 y con una dosis regular de 400 mg a 800 mg durante el resto de la duración del tratamiento. Cada dosis puede tomarse una vez al día, dos veces al día o tres veces al día o cualquier combinación de las mismas.

20 En una realización específica, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un paciente durante de 3 días a 14 días con una dosis de carga de 900 mg a 1.600 mg en el día 1 y con una dosis regular de 600 mg a 1.000 mg una vez al día durante el resto de la duración del tratamiento. En otra realización específica, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un paciente durante de 3 días a 14 días con una dosis de carga de 900 mg a 1.200 mg en el día 1 y con una dosis regular de 600 mg a 800 mg (por ejemplo, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg u 800 mg) una vez al día durante el resto de la duración del tratamiento. En algunas realizaciones, la duración del tratamiento es durante de 4 días a 10 días, de 5 días a 10 días o de 5 días a 7 días.

25 En una realización específica, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un paciente durante de 3 días a 14 días con una dosis de carga de 900 mg a 1.600 mg en el día 1 y con una dosis regular de 400 mg a 800 mg dos veces al día durante el resto de la duración del tratamiento. En otra realización específica, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un paciente durante de 3 días a 14 días con una dosis de carga de 900 mg a 1.200 mg en el día 1 y con una dosis regular de 400 mg a 600 mg (por ejemplo, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg o 600 mg) dos veces al día durante el resto de la duración del tratamiento. En algunas realizaciones, la duración es durante de 4 días a 10 días, de 5 días a 10 días o de 5 días a 7 días.

35 En una realización específica, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un paciente durante de 4 días o 5 días con una dosis de carga de 900 mg a 1.200 mg (por ejemplo, 900 mg o 1.200 mg) en el día 1 y con una dosis regular de 400 mg a 600 mg (por ejemplo, 400 mg o 600 mg) dos veces al día durante el resto de la duración del tratamiento (por ejemplo, los días 2 a 4 o los días 2 a 5). En otra realización específica, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un paciente durante de 4 días o 5 días con una dosis de carga de 900 mg a 1.200 mg (por ejemplo, 900 mg o 1.200 mg) en el día 1 y con una dosis regular de 600 mg a 800 mg (por ejemplo, 600 mg u 800 mg) una vez al día durante el resto de la duración del tratamiento.

Pueden emplearse varios tipos de métodos de administración en la invención y se describen en detalle a continuación en la sección titulada "Métodos de administración".

45 Pueden emplearse varios tipos de métodos de administración en la invención y se describen en detalle a continuación en la sección titulada "Métodos de administración".

III. TERAPIA DE COMBINACIÓN

50 Puede lograrse una cantidad adecuada en el método o la composición farmacéutica de la invención empleando un compuesto de la invención (incluyendo una sal o solvato (por ejemplo, hidrato) farmacéuticamente aceptable) solo o en combinación con un agente terapéutico adicional adecuado, por ejemplo, un agente antivírico o una vacuna. Cuando se emplea una "terapia de combinación", puede lograrse una cantidad eficaz usando una primera cantidad de un compuesto de la invención y una segunda cantidad de un agente terapéutico adecuado adicional (por ejemplo, un agente antivírico o una vacuna).

60 En otra realización de esta invención, se administran un compuesto de la invención y el agente terapéutico adicional, cada uno, en una cantidad eficaz (es decir, cada uno en una cantidad que sería terapéuticamente eficaz en caso de administrarse sola). En otra realización, se administran un compuesto de la invención y el agente terapéutico adicional, cada uno, en una cantidad que sola no proporciona un efecto terapéutico (una dosis subterapéutica). En otra realización más, puede administrarse un compuesto de la invención en una cantidad eficaz, mientras que el agente terapéutico adicional se administra en una dosis subterapéutica. En otra realización más, puede administrarse un compuesto de la invención en una dosis subterapéutica, mientras que el agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente terapéutico para el cáncer adecuado se administra en una cantidad eficaz.

65 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "en combinación" o "administración conjunta" pueden

usarse de manera indistinta para hacer referencia al uso de más de un tratamiento (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos y/o terapéuticos). El uso del término no restringe el orden en que se administran las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos) a un sujeto.

5 La administración conjunta abarca la administración de las cantidades primera y segunda de los compuestos de la administración conjunta de una manera esencialmente simultánea, tal como en una sola composición farmacéutica, por ejemplo, una cápsula o comprimido que tiene una proporción fija de las cantidades primera y segunda o en múltiples cápsulas o comprimidos individuales para cada una. Además, dicha administración conjunta también abarca el uso de cada compuesto de un modo secuencial en cualquier orden.

10 En una realización, la presente invención se refiere a métodos de terapia de combinación para inhibir la replicación de virus de la gripe en muestras biológicas o en pacientes o para tratar o prevenir infecciones por el virus de la gripe en pacientes que usan los compuestos descritos en el presente documento. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la invención también incluyen aquellas que comprenden un inhibidor de la replicación del virus de la gripe de la presente invención en combinación con un compuesto antivírico que muestra una actividad contra el virus de la gripe.

15 Los métodos de uso de los compuestos descritos en el presente documento y las composiciones de la invención también incluyen la combinación de quimioterapia con un compuesto o una composición de la invención o con una combinación de un compuesto o composición de la presente invención con otro agente antivírico y vacunación con una vacuna contra la gripe.

20 Cuando la administración conjunta implica la administración por separado de la primera cantidad de un compuesto de la invención y una segunda cantidad de un agente terapéutico adicional, los compuestos se administran lo suficientemente próximos en el tiempo para que tengan el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, el periodo de tiempo entre cada administración que puede dar como resultado el efecto terapéutico deseado, puede variar desde minutos hasta horas y puede determinarse teniendo en cuenta las propiedades de cada compuesto, tales como la potencia, solubilidad, biodisponibilidad, semivida en plasma y perfil cinético. Por ejemplo, pueden administrarse un compuesto de la invención y el segundo agente terapéutico en cualquier orden separados por menos de 24 horas entre sí, por menos de 16 horas entre sí, por menos de 8 horas entre sí, por menos de 4 horas entre sí, por menos de 1 hora entre sí o por menos de 30 minutos entre sí.

25 Además, específicamente, puede administrarse una primera terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico, tal como un compuesto de la invención) antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), de manera concomitante o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un agente terapéutico o profiláctico, tal como un agente anticanceroso) a un sujeto.

30 Se entiende que el método de administración conjunta de una primera cantidad de un compuesto de la invención y una segunda cantidad de un agente terapéutico adicional puede dar como resultado un efecto terapéutico mejorado o sinérgico, en donde el efecto combinado es mayor que el efecto aditivo que resultaría de la administración por separado de la primera cantidad de un compuesto de la invención y la segunda cantidad de un agente terapéutico adicional.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "sinérgico" se refiere a una combinación de un compuesto de la invención y otra terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), que es más eficaz que los efectos aditivos de las terapias. Un efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos) puede permitir el uso de dosis menores de una o más de las terapias y/o una administración menos frecuente de dichas terapias a un sujeto. La capacidad para utilizar dosis menores de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) y/o para administrar dichas terapias con menos frecuencia puede reducir la toxicidad asociada con la administración de dicha terapia a un sujeto sin reducir la eficacia de dicha terapia en la prevención, la gestión o el tratamiento de un trastorno. Además, un efecto sinérgico puede dar como resultado una eficacia mejorada de los agentes en la prevención, la gestión o el tratamiento de un trastorno. Finalmente, un efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos) puede evitar o reducir los efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquiera de las terapias de manera individual.

40 Cuando la terapia de combinación usando los compuestos de la presente invención es en combinación con una vacuna para la gripe, pueden administrarse ambos agentes terapéuticos de tal forma que el periodo de tiempo entre cada administración puede ser más largo (por ejemplo, días, semanas o meses).

45 Puede determinarse la presencia de un efecto sinérgico usando métodos adecuados para evaluar interacción de los fármacos. Los métodos adecuados incluyen, por ejemplo, la ecuación Sigmoide-Emax (Holford, N.H.G. y Scheiner,

L.B., Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453 (1981)), la ecuación de aditividad de Loewe (Loewe, S. y Muischnek, H., Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326 (1926)) y la ecuación de mediana de efecto (Chou, T.C. y Talalay, P., Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55 (1984)). Puede aplicarse cada una de las ecuaciones citadas anteriormente con datos experimentales para generar una gráfica correspondiente para ayudar a evaluar los efectos de la combinación de fármacos. Las gráficas correspondientes asociadas con las ecuaciones citadas anteriormente son la curva de concentración-efecto, la curva de isoblograma y la curva de índice de combinación, respectivamente.

Los ejemplos específicos que pueden administrarse conjuntamente con compuesto descrito en el presente documento incluyen inhibidores de neuraminidasa, tales como oseltamivir (Tamiflu®) y Zanamivir (Rlenza®), bloqueadores de canales de iones víricos (proteína M2), tales como amantadina (Symmetrel®) y rimantadina (Flumadine®) y los fármacos antivíricos descritos en el documento WO 2003/015798, incluyendo T-705, que se encuentra en desarrollo por Toyama Chemical of Japan. (Véase también Ruruta et al., Antiviral Research, 82: 95-102 (2009), "T-705 (flavipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections"). En algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse junto con una vacuna para la gripe tradicional.

En algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse junto con zanamivir. En algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse junto con flavipiravir (T-705). En algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse junto con oseltamivir. En algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse junto con amantadina o rimantadina. El oseltamivir puede administrarse con una pauta posológica indicada en su prospecto. En algunas realizaciones específicas, se administran 75 mg dos veces al día o 150 mg una vez al día.

25 *Composiciones farmacéuticas*

Los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas que además comprenden un portador, diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención descrito anteriormente y un portador, diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la presente invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un portador, diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, diluyentes, excipientes o portadores farmacéuticos seleccionados de manera adecuada con respecto a la forma prevista de administración y de una manera coherente con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Una "cantidad eficaz" incluye una "cantidad terapéuticamente eficaz" y una "cantidad profilácticamente eficaz". La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para tratar y/o mejorar una infección por el virus de la gripe en un paciente infectado por gripe. La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para prevenir y/o reducir sustancialmente las probabilidades o el tamaño de un brote pandémico de infección por el virus de la gripe. En la sección titulada "Usos de los compuestos divulgados" se describen ejemplos específicos de cantidades eficaces.

Un portador farmacéuticamente aceptable puede contener ingredientes inertes que no inhiben de manera indebida la actividad biológica de los compuestos. Los portadores farmacéuticamente aceptables han de ser biocompatibles, por ejemplo, no tóxicos, no inflamatorios, no inmunogénicos o estar desprovistos de otras reacciones o efectos secundarios no deseados tras su administración a un sujeto. Pueden emplearse técnicas de formulación farmacéutica convencionales.

El portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como se usa en el presente documento, incluye todos y cada uno de los disolventes, diluyentes u otro vehículo líquido, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma farmacéutica particular deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences, Decimosexta edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) divulga diversos portadores usados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Excepto en la medida en que cualquier medio portador convencional sea incompatible con los compuestos divulgados en el presente documento, tal como mediante la producción de cualquier efecto biológico no deseado o la interacción de otro modo perjudicial con cualquier otro componente o componentes de la composición farmacéuticamente aceptable, su uso se contempla dentro del alcance de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "efectos secundarios" abarca efectos no deseados y adversos de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico). Los efectos secundarios siempre son no deseados, pero los efectos no deseados no siempre son necesariamente adversos. Un efecto adverso de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) puede ser dañino o inconfortable o arriesgado. Los efectos secundarios incluyen, pero sin limitación, fiebre, escalofríos, letargia, toxicidad gastrointestinal (incluyendo úlceras y erosiones gástricas e intestinales), náuseas, vómitos, neurotoxicidad, nefrotoxicidad, toxicidad renal (incluyendo afecciones tales como necrosis papilar y nefritis intersticial crónica),

toxicidad hepática (incluyendo niveles de enzimas hepáticas elevados en suero), mielotoxicidad (incluyendo leucopenia, mielosupresión, trombocitopenia y anemia), boca seca, gusto metálico, prolongación de la gestación, debilidad, somnolencia, dolor (incluyendo dolor muscular, dolor óseo y cefalea), caída del cabello, astenia, mareos, síntomas extrapiramidales, acatisia, alteraciones cardiovasculares y disfunción sexual.

5 Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas (tales como seroalbúmina humana), sustancias tamponadoras (tales como Tween 80, fosfatos, glicina, ácido sórbico o sorbato de potasio), mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos (tales como sulfato de protamina, dihidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio o sales de cinc), sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, lanolina, azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; 10 excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como propilenglicol o polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua apirógena; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes 20 compatibles no tóxicos, tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes pueden estar también presentes en la composición, según el criterio del experto en formulación.

IV. MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

25 Los compuestos y las composiciones farmacéuticamente aceptables descritas anteriormente pueden administrarse a seres humanos y a otros animales por vía oral, por vía rectal, por vía parenteral, por vía intracisternal, por vía intravaginal, por vía intraperitoneal, por vía tópica (mediante polvos, pomadas o gotas), por vía bucal, como un pulverizador oral o nasal o similares, dependiendo de la gravedad de la infección que se está tratando.

30 Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen, pero sin limitación, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los principios activos, la forma farmacéutica líquida puede contener diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también 35 pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, agentes aromatizantes y perfumantes.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión 45 inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, solución de Ringer, solución de cloruro sódico U. S. P. e isotónica. Además, normalmente se usan aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación 50 de los inyectables.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

55 Para prolongar el efecto de un compuesto descrito en el presente documento, a menudo es deseable ralentizar la absorción del compuesto mediante inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del compuesto depende por tanto de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retardada de una forma de compuesto administrada parenteralmente se logra disolviendo o suspendiendo el compuesto en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del compuesto en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de compuesto a polímero y de la naturaleza del polímero concreto empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del compuesto. Los ejemplos de otros 60 polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones de depósito inyectable también se preparan atrapando al compuesto en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos 65

corporales.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son específicamente supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos descritos en este documento con excipientes o vehículos no irritantes adecuados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera para supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se derretirán en el recto o en la cavidad vaginal y liberarán el compuesto activo.

Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o a) cargas o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, determinados silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de la solución, tales como parafina, f) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita e i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma farmacéutica puede comprender agentes tamponadores.

También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden tener una composición que libera el principio o los principios activos únicamente, o preferentemente, en una parte específica del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones inclusoras que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Los principios activos pueden estar también en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se ha señalado anteriormente. Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas, tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte, tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas farmacéuticas también pueden comprender, como es habitual, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes para compresión y otros adyuvantes de compresión, tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas farmacéuticas pueden comprender agentes tamponadores. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden tener una composición que libera el principio o los principios activos únicamente, o preferentemente, en una parte específica del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones inclusoras que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Las formas farmacéuticas para administración tópica o transdérmica de un compuesto descrito en este documento incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes o parches. El principio activo se mezcla en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario, según se requiera. Las formulaciones oftálmicas, gotas óticas y colirios también se contemplan dentro del alcance de la presente invención. Además, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar un suministro controlado de un compuesto al organismo. Dichas formas farmacéuticas pueden prepararse disolviendo o dispensando el compuesto en un medio adecuado. También se pueden usar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por vía oral, por vía parenteral, mediante aerosol para inhalación, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal o mediante un depósito implantado. El término "parenteral" como se usa en el presente documento incluye, pero sin limitación, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, inyección intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión. Específicamente, las composiciones se administran por vía oral, intraperitoneal o intravenosa.

Las formas inyectables estériles de las composiciones descritas en el presente documento pueden ser una suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la materia usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación

- inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, normalmente se usan aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, así como los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tal como aceite de oliva o aceite ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes de dispersión similares que normalmente se usan en la formulación de formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables, incluyendo emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos usados habitualmente, tales como los Tween, Span y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables también pueden usarse con fines de formulación.
- Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse por vía oral en cualquier forma farmacéutica oralmente aceptable, incluyendo, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos, suspensiones acuosas o soluciones. En el caso de los comprimidos para uso oral, los portadores comúnmente usados incluyen, pero sin limitación, lactosa y almidón de maíz. También se añaden normalmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz deshidratado. Cuando se necesitan suspensiones acuosas para uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también pueden añadirse determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.
- Como alternativa, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse en forma de supositorios para administración rectal. Estos pueden prepararse mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura rectal y, por lo tanto, se derretirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales incluyen, pero sin limitación, manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.
- Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden administrarse por vía tópica, especialmente cuando la diana de tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles mediante aplicación tópica, incluyendo enfermedades de los ojos, la piel o el tracto intestinal inferior. Se preparan fácilmente formulaciones tópicas adecuadas para cada una de estas áreas u órganos.
- La administración tópica para el tracto intestinal inferior puede efectuarse en una formulación de supositorio rectal (véase lo anterior) o en una formulación en enema adecuada. También pueden usarse parches transdérmicos por vía tópica.
- Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una pomada adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos. Los portadores para administración tópica de los compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuestos de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una loción o crema adecuada que contiene los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, ésteres cetílicos de cera, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.
- Para uso oftálmico, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de suspensiones micronizadas en suero salino isotónico, estéril con el pH ajustado o, específicamente, en forma de soluciones en solución salina estéril isotónica, con el pH ajustado, ya sea con o sin un conservante, tal como cloruro de benzalconio. Como alternativa, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una pomada, tal como vaselina.
- Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse mediante aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica y pueden prepararse en forma de soluciones en suero salino, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.
- Los compuestos para su uso en los métodos de la invención pueden formularse en una forma farmacéutica unitaria. La expresión "forma farmacéutica unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas en forma de dosis unitarias para sujetos que se someten a tratamiento, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, opcionalmente en asociación con un portador farmacéutico adecuado. La forma farmacéutica unitaria puede ser para una sola dosis diaria o para múltiples dosis diarias (por ejemplo, 1 a 4 o más veces al día). Cuando se usan múltiples dosis diarias, la forma farmacéutica

unitaria puede ser igual o diferente para cada dosis.

V. EJEMPLOS Y EJEMPLOS COMPARATIVOS

- 5 El ejemplo 3A es un ejemplo de acuerdo con la invención. Los ejemplos 3B, 3C, 3F, 4A, 4B, 4C, 4D, 4F y 5 son ejemplos comparativos.

Ejemplo 1: Métodos generales de mediciones de XRPD, RMN en estado sólido de C¹³, DSC

10 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) se realiza en el instrumento de TGA modelo Q500 Asset Tag V014840 de TA. La muestra sólida se coloca en una bandeja de muestras de platino y se calienta a 10 °C/min hasta 300 °C desde temperatura ambiente.

15

Mediciones de DSC

Se realizó calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un instrumento DSC Q200 Asset Tag V015553 de TA. Se colocan aproximadamente 1-2 mg de muestra sólida en una bandeja de DSC de aluminio hermética con una tapa sellada con un pequeño agujero. La celda de muestra generalmente se calienta en una purga de nitrógeno.

20

SSNMR experimental

Los espectros de la espectroscopía magnética nuclear de estado sólido se recogieron en un espectrómetro de amplio campo Biospin 400 MHz Advance III de Bruker equipado con una sonda Biospin 4mm HFX de Bruker. Las muestras se empaquetaron en rotores de 4 mm de ZrCh (aproximadamente 70 mg o menos dependiendo de la disponibilidad de la muestra). Se aplicó una velocidad de giro en ángulo mágico (MAS) de normalmente 12,5 kHz. La temperatura de la cabeza de la sonda se ajustó a 275 K para minimizar el efecto de calentamiento de fricción durante el giro. El tiempo de relajación del protón se midió usando el experimento de relajación de recuperación de la saturación de ¹H MAS T₁ para establecer el retraso de reciclado apropiado del experimento MAS de polarización cruzada ¹³C (CP). El retraso de reciclado del experimento CPMAS de ¹³C se ajustó para ser al menos 1,2 veces más largo que el medido en el tiempo de relajación ¹H T₁ para maximizar la relación señal/ruido del espectro de carbono. El tiempo de contacto CP del experimento CPMAS ¹³C se ajustó a 2 ms. Se empleó un pulso de protones CP con una rampa lineal (del 50 % al 100 %). La coincidencia de Hartmann-Hahn se optimizó en una muestra de referencia externa (glicina). Los espectros de flúor se recogieron usando la configuración de MAS desacoplada con un retardo de reciclado ajustado a aproximadamente 5 veces del tiempo de relajación T₁ de ¹⁹F medido. El tiempo de relajación del flúor se midió usando un experimento de relajación de recuperación de la saturación de ¹⁹F MAS T₁ desacoplado con protones. Tanto los espectros del carbono como los del flúor se recogieron con un desacoplados SPINAL 64 usado con la intensidad de campo de aproximadamente 100 kHz. El desplazamiento químico se referenció frente al patrón externo de adamantano con su campo superior de resonancia ajustado a 29,5 ppm.

25

30

35

40

Detalles experimentales de XRPD con Bruker D8 Discover

Los patrones de la difracción de rayos X en polvo (XRPD) se recogieron a temperatura ambiente en modo de reflexión usando un difractómetro Bruker D8 Discover (etiqueta de propiedad V012842) equipado con una fuente de tubo sellado y un detector de área Hi-Star (Bruker AXS, Madison, WI). El generador de rayos X se operó a un voltaje de 40 kV y una corriente de 35 mA. La muestra en polvo se colocó en un soporte de aluminio. Se registraron dos marcos con una exposición de tiempo de 120 s cada una. Los datos se integraron posteriormente en el rango de 4,5°-39° 2θ con un tamaño de paso de 0,02° y se unieron en un patrón continuo.

45

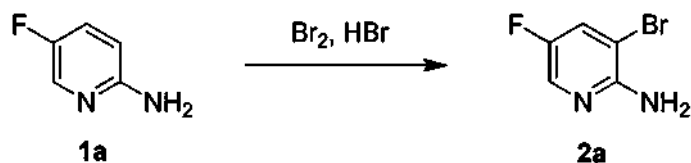
50

Ejemplo 2: Preparación del compuesto (1) y el solvato en 2-MeTHF del compuesto (1)

El compuesto (1) puede prepararse como se describe en el documento WO 2010/148197. Por ejemplo, se preparó un compuesto (1) de base libre amorfa de acuerdo con el documento WO 2010/148197, seguido de separación quiral y purificación: cromatografía de SCF quiral con un modificador que incluye Et₂NH (que genera la sal de Et₂NH del compuesto (1)) y después tratamiento con resina de intercambio iónico. Sus datos de XRPD se muestran en la figura 11. Como alternativa, el compuesto (1) puede fabricarse mediante los procedimientos siguientes como un solvato en 2-MeTHF:

55

60 Preparación del compuesto 2a (2-amino-3-bromo-5-fluoropiridina)

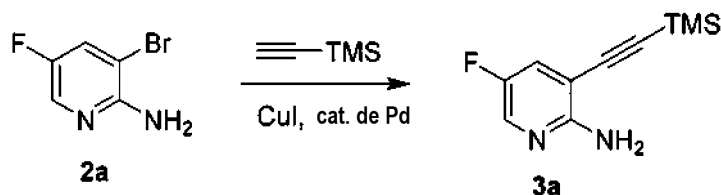


5 A una suspensión de 2-amino-5-fluoropiridina (6 kg, 53,6 mol) en agua (24 l) a 14 °C se le añadió durante 10 minutos ácido bromhídrico al 48 % (18,5 kg, 110 mol). La reacción era exotérmica y la temperatura se elevó hasta los 24 °C. La mezcla se enfrió de nuevo a 12 °C, después se añadió bromo (9 kg, 56,3 mol) en nueve porciones durante 50 minutos (exotérmica, se mantuvo a 20 °C). La mezcla se agitó a 22 °C durante una noche y se controló por RMN ¹H de una alícuota inactivada (se inactivan 5 gotas en una mezcla de 1 ml de K₂CO₃ al 20 %, 0,3 ml de Na₂S₂O₃ al 10 % y 0,7 ml de DCM. La capa orgánica se evaporó y se analizó). La mezcla se enfrió a 10 °C, después se inactivó mediante la adición de bisulfito sódico (560 g, 5,4 mol) en agua (2 l) y se volvió a enfriar a 0 °C. Esta mezcla se añadió a una mezcla fría (-4 °C) de DCM (18 l) e hidróxido sódico 5,4 M (35 l, 189 mol). El fondo, ~35 l, se filtró a través de un lecho de Celite y después se separaron las fases. La capa acuosa se extrajo de nuevo con DCM (10 l). Los extractos orgánicos se filtraron a través de un lecho de 3 kg magnesol, lavando con DCM (8 l). El filtrado se evaporó, se trituró con hexano y se filtró.

15 A pesar del ensayo en proceso que indica el 97 % de completación, este producto inicial de las cuatro series contiene normalmente ~10 % de SM. Estos se combinaron y se trituraron en hexano (2 l por kg de material) a 50 °C, después se enfriaron a 15 °C y se filtraron para proporcionar el compuesto **2a** (30,0 kg, ~95 % de pureza, 149 mol, 67 %). Los licores madre de la trituración inicial y la repurificación se cromatografiaron (20 kg de sílice, eluyente EtOAc al 25-50 % en hexano) para proporcionar más compuesto **2a** (4,7 kg, ~99 % de pureza, 24,4 mol, 11 %).

20

Preparación del compuesto 3a

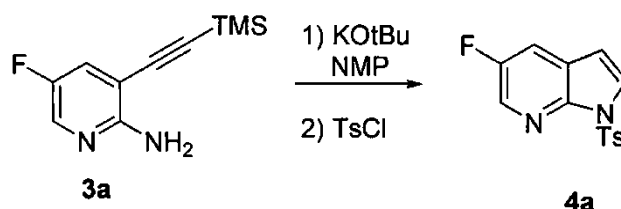


25

30 *Procedimiento A:* A un reactor de 400 l inerte se le cargó **2a** (27,5 kg, 96 % de pureza, 138 mol), Pd(PPh₃)₄ (1044 g, 0,90 mol) y CuI (165 g, 0,87 mol), seguido de tolueno (90 kg). La mezcla se desoxigenó con tres ciclos de vacío-nitrógeno, después se añadió trietilamina (19,0 kg, 188 mol). La mezcla se desoxigenó con uno o más ciclos de vacío-nitrógeno, después se añadió TMS-acetileno (16,5 kg, 168 mol). La mezcla se calentó a 48 °C durante 23 horas (la exotermia inicial elevó la temperatura hasta 53 °C máximo), después se enfrió a 18 °C. La suspensión se filtró a través de un lecho de Celite y se lavó con tolueno (80 kg). El filtrado se lavó con Na₂HPO₄ al 12 % (75 l), después se filtró a través de un lecho de sílice (25 kg), lavando con 1:1 de hexano:MTBE (120 l). Este filtrado se evaporó hasta un aceite de color pardo y después se disolvió en NMP para la etapa siguiente. Peso de una solución del compuesto **3a** - 58 kg, ~50 % en peso, 138 mol, 100 %. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 7,90 (s, 1H); 7,33-7,27 (m, 1H); 4,92 (s, NH₂), 0,28 (s, 9H) ppm.

35

Preparación del compuesto 4a

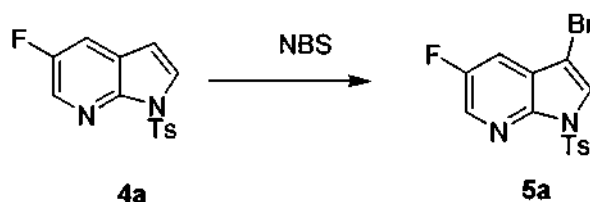


40

45 A un reactor inerte de 400 l se le cargó *terc*-butóxido potásico (17,5 kg, 156 mol) y NMP (45 kg). La mezcla se calentó a 54 °C, después se añadió una solución del compuesto **3a** (29 kg, 138 mol) en NMP (38 kg) durante 2,75 horas y se enjuagó con NMP (6 kg) (exotérmica, mantenida a 70 °C - 77 °C). La reacción se agitó a 74 °C durante 2 horas, después se enfrió a 30 °C y se añadió una solución de cloruro de tosilo (28,5 kg, 150 mol) en NMP (30 kg) durante 1,5 horas y se enjuagó con NMP (4 kg). La reacción era exotérmica y se mantuvo a 30 °C - 43 °C. La reacción se agitó durante 1 hora mientras se enfriaba a 20 °C, después se añadió agua (220 l) durante 35 minutos

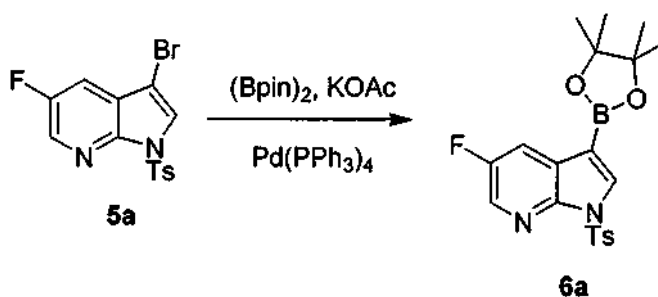
(exotérmica, mantenida a 18 °C - 23 °C). La mezcla se agitó a 20 °C durante 30 minutos, después se filtró y se lavó con agua (100 l). Los sólidos se disolvieron del filtro con DCM (250 kg), se separaron del agua residual y los extractos orgánicos se filtraron a través de un lecho de magnesol (15 kg, parte superior) y sílice (15 kg, parte inferior), se lavaron con extra de DCM (280 kg). El filtrado se concentró hasta una suspensión espesa (~50 l volumen), después se añadió MTBE (30 kg) mientras continuaba la destilación a volumen constante (temperatura final del destilado de 51 °C). Se añadió más MTBE (10 kg) y la suspensión se enfrió a 15 °C, se filtró y se lavó con MTBE (40 l) para proporcionar el compuesto **4a** (19,13 kg, 95 % de pureza, 62,6 mol, 45 %). La concentración parcial del filtrado proporcionó un segundo cultivo (2,55 kg, 91 % de pureza, 8,0 mol, 6 %). RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 8,28-8,27 (m, 1H); 8,06-8,02 (m, 2H); 7,77 (d, J= 4,0 Hz, 1H); 7,54-7,50 (m, 1H); 7,28-7,26 (m, 2H); 6,56 (d, J= 4,0 Hz, 1H); 2,37 (s, 3H) ppm.

Preparación del compuesto 5a

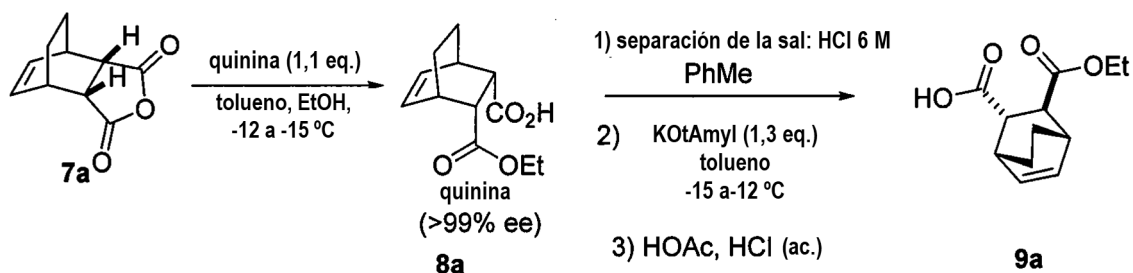


Procedimiento A: A una suspensión de N-bromosuccinimida (14,16 kg, 79,6 mol) en DCM (30 kg) a 15 °C se le cargó una solución del compuesto **4a** (19,13 kg, 95 % de pureza y 2,86 kg, 91 % de pureza, 71,6 mol) en DCM (115 kg), enjuagando con DCM (20 kg). La mezcla se agitó a 25 °C durante 18 horas y después se enfrió a 9 °C y se inactivó mediante la adición de una solución de tiosulfato sódico (400 g) e hidróxido sódico al 50 % (9,1 kg) en agua (130 l). La mezcla se calentó a 20 °C y las capas se separaron y los extractos orgánicos se lavaron con salmuera al 12 % (40 l). Las capas acuosas se volvieron a extraer secuencialmente con DCM (4 x 50 kg). Los extractos orgánicos se combinaron y se destilaron 40 l para formar un azeótropo con agua, después se filtró la solución se filtró a través de un lecho de sílice (15 kg, parte inferior) y magnesol (15 kg, parte superior), lavando con DCM (180 kg). El filtrado se concentró hasta una suspensión espesa (~32 l de volumen), después se añadió hexano (15 kg). Se añadió más hexano (15 kg) mientras continuaba la destilación a volumen constante (temperatura final de destilación 52 °C). La suspensión se enfrió a 16 °C, se filtró y se lavó con hexano (25 kg) para proporcionar el compuesto **5a** (25,6 kg, 69,3 mol, 97 %). RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 8,34-8,33 (m, 1H); 8,07 (d, J= 8,2 Hz, 2H); 7,85 (s, 1H); 7,52-7,49 (m, 1H); 7,32-7,28 (m, 2H); 2,40 (s, 3H) ppm.

Preparación del compuesto 6a: Reacción BEFTA



A un reactor inerte de 400 l se le cargó el compuesto **5a** (25,6 kg, 69,3 mol), bis(pinacolato)diboro (19 kg, 74,8 mol), acetato potásico (19 kg, 194 mol), acetato de paladio (156 g, 0,69 mol) y trifetilfosfina (564 g, 2,15 mol), seguido de dioxano (172 kg), que se había desoxigenado por separado usando ciclos de vacío-nitrógeno (x 3). La mezcla se agitó y se desoxigenó usando ciclos de vacío-nitrógeno (x 2), después se calentó a 100 °C durante 15 horas. La mezcla se enfrió a 35 °C, después se filtró, lavando con THF a 30 °C (75 kg). El filtrado se evaporó y el residuo se disolvió en DCM (~90 l). La solución se agitó con 1 kg de carbono y 2 kg de magnesol durante 45 minutos, después se filtró a través de un lecho de sílice (22 kg, parte inferior) y magnesol (10 kg, parte superior), lavando con DCM (160 kg). El filtrado se concentró hasta una suspensión espesa (~40 l de volumen), después se trituro a 35 °C y se añadió hexano (26 kg). La suspensión se enfrió a 20 °C, se filtró y se lavó con una mezcla de DCM (5,3 kg) y hexano (15 kg), después hexano (15 kg) y se secó en atmósfera de nitrógeno sobre el filtro para proporcionar el compuesto **6a** (23,31 kg, 56,0 mol, 81 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H consistente con el producto deseado, HPLC 99,5 %, ensayo de paladio 2 ppm. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 8,25 (s, 1H); 8,18 (s, 1H); 8,09-8,02 (m, 2H); 7,91-7,83 (m, 1H); 7,30-7,23 (m, 2H); 2,39 (s, 3H); 1,38 (s, 12H) ppm.

Preparación de los compuestos 8a y 9a

Compuesto 8a: Se añadieron anhídrido **7a** (24,6 kg, Apex) y quinina (49,2 kg, Buchler) a un reactor seguido de la adición de PhMe anhidro (795,1 kg). Después se enfrió el reactor a -16 °C y se añadió EtOH (anhidro, 41,4 kg) a un caudal tal que mantuviera la temperatura interna del reactor a menos de -12 °C. La temperatura máxima de reacción registrada para este experimento fue de -16 °C. Después, la mezcla de reacción se agitó durante 16 h a -16 °C. Se retiró una muestra y se filtró. El sólido se secó y se evaluó por RMN ¹H que mostró que no quedaba anhídrido. Los contenidos del reactor se filtraron. El reactor y la posterior torta húmeda se lavaron con PhMe (anhidro, 20 kg). El sólido resultante se puso en un secador de bandeja a menos de 45 °C con un barrido con N₂ durante al menos 48 h. En este experimento, la temperatura real fue de 44 °C y el vacío fue de -30 inHg (101,59 kPa). El material se muestreó después de un secado de 2,5 días y mostró un 3 % de PhMe por RMN. Después de 8 h más, la cantidad de PhMe analizada mostró el mismo 3 % de PhMe presente y el secado se detuvo. El peso del sólido de color blanco fue de 57,7 kg, rendimiento del 76 %. La RMN ¹H mostró consistencia con la estructura y el análisis quiral por SFC mostró e.e. del material >99 %.

Compuesto 9a: El reactor se cargó con sal de quinina **8a** (57,7 kg) y PhMe (250,5 kg, Aldrich ACS grade, >99,5 %) y se puso en marcha el agitador. Los contenidos se enfriaron a menos de 15 °C y se trataron con HCl 6 N (se trataron 18 kg de H₂O con 21,4 kg de HCl conc.) mientras se mantuvo la temperatura a menos de 25 °C. La mezcla se agitó durante 40 min. y se inspeccionó de manera visual para verificar que no hubiera sólidos presentes. Se detuvo la agitación y se dejó que se sedimentaran las fases y se separaron las fases. Las fases acuosas se extrajeron de nuevo con PhMe (160 kg); la cantidad normalmente usada era mucho menos de, calc. 43 kg. Sin embargo, para una agitación eficiente debido al mínimo volumen, se añadió más PhMe. Las fases orgánicas se combinaron. Se muestra la fase orgánica y se lleva a cabo análisis de HPLC para asegurar que el producto está presente; ensayo solo a título informativo.

Las fases orgánicas se enfriaron a menos de 5 °C (por ejemplo, 0 °C a 5 °C) y se añadió sulfato sódico (anhidro, 53,1 kg) con agitación durante 8 h (en este caso 12 h). Los contenidos del reactor que contenían la fase orgánica se pasaron a través de un filtro que contenía sulfato sódico (31 kg, anhidro) y dentro de un reactor limpio y seco. El reactor se aclaró con PhMe (57,4 kg), que se pasó a través del filtro dentro del reactor 201. Se puso en marcha el agitador y se añadió una cantidad adicional de PhMe (44 kg) y la mezcla de reacción se enfrió a -20 °C. A esta temperatura se añadió una solución en PhMe de *terc*-pentóxido de potasio durante 2 h mientras se mantenía la temperatura entre -15 y -22 °C. La mezcla de reacción se mantuvo a aproximadamente -20 °C durante otros 30 min antes de ser muestreada.

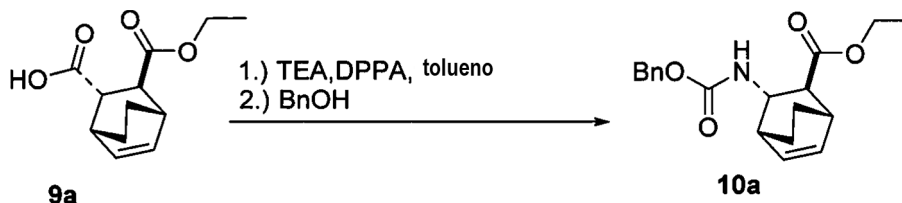
El muestreo se realizó eliminando una alícuota con enfriamiento inmediato en HCl 6 N. La relación diana aquí es 96:4 (trans:cis).

Habiendo conseguido la proporción diana, se cargó el reactor con ácido acético (2,8 kg) durante 6 min. La temperatura se mantuvo a -20 °C. La temperatura se ajustó después a -5 °C y se añadió HCl acuoso 2 N (65,7 kg de agua tratada con 15,4 kg de HCl conc.). Los contenidos se calentaron a 5 °C +/- 5 °C, se agitaron durante 45 min antes de calentar a 20 °C +/- 5 °C con agitación durante 15 min. Se detuvo el agitador y se dejaron sedimentar las fases. La capa acuosa se eliminó (retención temporal). La fase orgánica se lavó con agua (48 kg, potable), se agitó durante 15 min y se dejaron sedimentar las fases (al menos 15 min) y la capa acuosa se eliminó y se añadió a la capa acuosa. 1/3 de una solución tampón (aproximadamente 50 l) que se preparó (7,9 kg de NaH₂PO₄, 1,3 kg de Na₂HPO₄ y 143,6 kg de agua) se añadió a la fase orgánica y se agitó durante al menos 15 min. Se detuvo la agitación y se dejaron separar las fases durante al menos 15 min. La capa inferior se descartó. Otra porción de la solución tamponada (aproximadamente 50 l) se usó para lavar la capa orgánica como se ha descrito anteriormente. El lavado se realizó una tercera vez tal como se ha descrito anteriormente.

Se inició la destilación al vacío de la fase de PhMe (150 l) a 42 °C/-13,9 psig (95,84 kPa) y se destiló hasta un aceite de aproximadamente 20 l de volumen. Después de una reducción sustancial en volumen la mezcla se transfirió a un recipiente inferior para completar la destilación. Se añadieron heptanos (13,7 kg) y la mezcla se calentó a 40 +/- 5 °C durante 30 min, después los contenidos se enfriaron a 0 °C a 5 °C durante 1,5 h. Los sólidos se filtraron y el reactor se lavó con aproximadamente 14 kg de heptanos enfriados (0-5 °C). Los sólidos se dejaron secar al vacío antes de colocarlos en el horno a menos de 40 °C al vacío hasta que el LOD fue de <1 %. 15,3 kg, 64 %, 96 % de pureza por HPLC. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 11,45 (s a, 1H), 6,41 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 6,25 (t, J = 12 Hz, 1H), 4,18 (m, 2H),

3,27 (m, 1H), 3,03 (m, 1H), 2,95 (m, 1H), 2,77 (m, 1H), 1,68 (m, 1H), 1,49 (m, 1H), 1,25 (t, $J=7,2$ Hz), 1,12 (m, 1H).

Preparación del compuesto 10a



5

Un matraz de tres bocas equipado con un agitador mecánico, sonda de temperatura, condensador de reflujo, embudo de adición y entrada de nitrógeno se cargó con el compuesto 9a (145,0 g, 1 equiv.) y tolueno anhidro (Aldrich, n.º de catálogo 244511) (1408 g, 1655 ml) en atmósfera de nitrógeno. Después se añadió trietilamina (Aldrich, n.º de catálogo 471283) (140 g, 193 ml, 2,14 equiv.) en porciones durante 5 minutos a la solución en agitación durante lo cual se observó una exotermia hasta una temperatura máxima de 27 °C. Comenzó la adquisición de datos por ReactIR. Después, la mezcla de reacción se calentó a 95 °C durante 70 minutos. Después se añadió difenilfosforil azida (Aldrich, n.º de catálogo 178756) (176,2 g; 138,0 ml, 0,99 equiv.) mediante un embudo de adición en porciones durante un tiempo total de 2,25 horas.

10

15

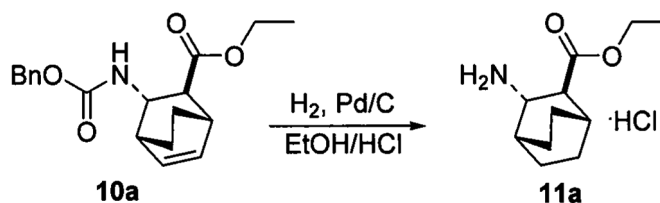
Después de completar la adición de difenilfosforil azida (el embudo de adición se enjuagó con una pequeña cantidad de tolueno), la mezcla resultante se calentó a 96 °C durante otros 50 minutos. Una muestra de la mezcla de reacción diluida en tolueno se analizó por GC/MS lo que indicó que la difenilfosforil azida se había consumido. Después se añadió alcohol bencílico (Aldrich, n.º de catálogo 108006) (69,9 g, 67,0 ml, 1,0 equiv.) mediante el embudo de adición durante 5-10 minutos. Después se calentó la mezcla resultante a 97 °C durante una noche (durante aproximadamente 19 horas). Una muestra de la mezcla de reacción se diluyó en tolueno, por GC/MS se indicó la formación de producto ($m/e = 330$). Después la mezcla de reacción se enfrió a 21 °C, tras lo cual se añadió agua (870 g, 870 ml) en porciones (se observó una ligera exotermia hasta una temperatura máxima de 22 °C). La mezcla de reacción se inactivó primero mediante la adición de 500 g de agua y se agitó mecánicamente durante 10 minutos. Después se transfirió la mezcla al embudo de decantación que contenía los restantes 370 g de agua y después se agitó manualmente. Después de la agitación y la separación de fases, las capas orgánica y acuosa se separaron (corte acuosa a pH de ~10). Después se lavó la capa orgánica con una porción adicional de agua (870 g; 1 x 870 ml). Las capas orgánica y acuosa se separaron (corte acuoso a pH de ~10). La fase orgánica recogida se concentró después a sequedad a presión reducida (baño de agua a 45 °C a 50 °C) proporcionando 215 g del compuesto en bruto **10a** (volumen aproximadamente de 190 ml). La RMN ¹H y la GC/MS fueron conformes al compuesto **10a** (con tolueno residual y alcohol bencílico).

20

25

30

Preparación del compuesto 11a



35

Preparación de HCl en etanol: Un matraz de tres bocas equipado con una sonda de temperatura, entrada de nitrógeno y agitador magnético se cargó con etanol (1000 ml, 773 g) en atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó y se enfrió en un baño de hielo seco/acetona hasta que se alcanzó una temperatura interna de -12 °C. Después se burbujeó lentamente HCl anhidro (~ 80 g, 2,19 moles) en la solución enfriada (temperatura observada de -24 °C a -6 °C durante la adición) durante 2 horas. Después de la adición, la solución se transfirió a una botella de cristal y se dejó calentar a temperatura ambiente. Una muestra de la solución se sometió a valoración dando una concentración de 2,6 M. La solución se almacenó después en la sala de frío (aproximadamente 5 °C) durante una noche.

40

45

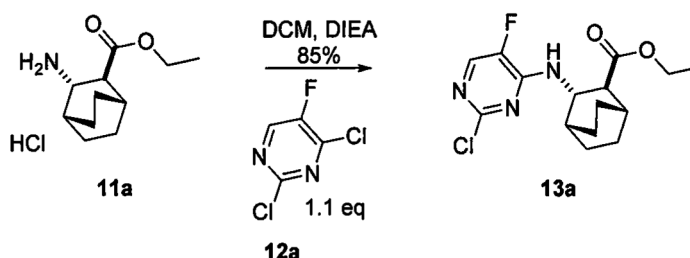
Hidrogenación/formación de sal de HCl: Un inserto de vidrio en un autoclave Parr de 2 galones se cargó con paladio sobre carbono (Pd/C (Aldrich, n.º de catálogo 330108), 10 % base seca; (50 % de humedad), 13,11 g, 0,01 equiv sobre la base del compuesto **10a**) en atmósfera de nitrógeno y después se humedeció con etanol (93 g; 120 ml). Después se añadió una solución del compuesto en bruto **10a** (212 g, 1 equiv.) en etanol (1246 g; 1600 ml) al inserto de cristal (enjuague pequeño con etanol para ayudar con la transferencia). El inserto de cristal se colocó en el autoclave tras lo cual se añadió HCl en etanol (preparado como se ha descrito anteriormente; 2,6 M; 1,04 equiv basado en el compuesto **10a**; 223 g; 259 ml). El autoclave se cerró herméticamente y después se purgó con

50

hidrógeno (3 * a 20 psi (137,9 kPa)). La hidrogenación empezó después bajo una presión aplicada de gas hidrógeno (15 psi (103,42 kPa)) durante 3 horas, en cuyo tiempo la presión de hidrógeno parecía constante. El análisis de una alícuota de la mezcla de reacción por RMN ¹H y GC/MS indicó la consumición del material de partida y la formación de producto. La mezcla resultante se filtró después sobre un lecho de Celite (192 g) tras lo cual el lecho de Celite se lavó con más etanol (3 x; un total de 1176 g de etanol se usó durante los lavados). El filtrado (verde en color) se concentró después a presión reducida (baño de agua a 45 °C) hasta ~382 g (~435 ml); 2,9 volúmenes basado en un rendimiento teórico del compuesto **11a**. Después se añadió al resto acetato de isopropilo (1539 g; 1813 ml (12 volúmenes basado en un rendimiento teórico del compuesto **11a**). La solución resultante se destiló al vacío con incremento gradual de la temperatura.

La destilación se detuvo tras lo cual la solución restante (370 g, ~365 ml volumen total; parda en color) se dejó en reposo a temperatura ambiente durante el fin de semana. La mezcla se filtró (se usó acetato de isopropilo para ayudar con la filtración) y los sólidos recogidos se lavaron con más acetato de isopropilo (2x116 ml; cada lavado fue de aproximadamente 100 g). El sólido después se secó al vacío a 40 °C (temperatura máxima observada de 42 °C) durante una noche para proporcionar 118 g (78,1 % en dos etapas) del compuesto **11a**. La RMN ¹H del material conforme a la estructura del compuesto **11a** y la GC/MS indicaron un 99 % de pureza.

Preparación del compuesto 13a



Procedimiento A: Una mezcla de 5-fluoro-2,4-dicloropirimidina (**12a**, 39,3 g, 235 mmol, 1,1 equiv.) y sal de HCl amina (**11a**, 50 g, 214 mmol) se trató con CH₂Cl₂ (169 ml) y la mezcla se calentó a 30 °C. La mezcla se trató después lentamente con DIEA (60,8 g, 82 ml, 471 mmol, 2,2 equiv.) mediante una bomba de jeringa durante 3 h. La temperatura máxima llegó hasta 32 °C. La reacción se agitó durante 20 h, se consideró que la mezcla de reacción se había completado por HPLC y se enfrió a ta. La mezcla de reacción resultante se lavó secuencialmente con agua (211 ml, pH = 8 - 9), NaHSO₄ al 5 % (211 ml, pH = 1 - 2), después NaCl ac. al 5 % (211 ml, pH = 5 - 6).

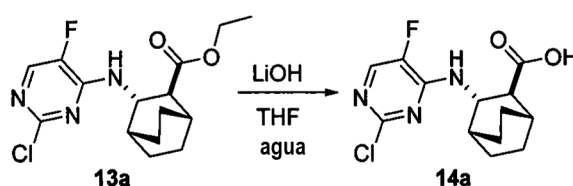
Después se destiló la fase orgánica a presión reducida hasta 190 ml. Se cargó PhMe (422 ml) y se ajustó la temperatura a 70 °C - 80 °C y la temperatura interna a 60 °C - 65 °C hasta que el volumen volvió a 190 ml. La mezcla se dejó enfriar a 37 °C con agitación, después de aproximadamente 10 min, comenzó a aparecer cristalización y se observó que la temperatura aumentó a 41 °C. Después de equilibrarla a 37 °C, la suspensión se cargó con n-heptano (421 ml) durante 3,5 h seguido de enfriamiento a 22 °C durante 1 h. La mezcla se dejó en agitación durante una noche a esa temperatura antes de filtrarla. El sólido resultante sobre el filtro se lavó con una solución de PhMe al 10 % en n-heptano (2 x 210 ml). El sólido se secó después en el horno al vacío con una purga de N₂ a 50 °C durante una noche. El sólido resultante pesó 62 g (88 % de rendimiento).

Procedimiento B: Un matraz de tres bocas equipado con un agitador mecánico, sonda de temperatura, condensador de reflujo, entrada de nitrógeno y embudo de adición se cargó con el compuesto **11a** (51,2 g) y el compuesto **12a** (40,2 g) en atmósfera de nitrógeno. Se añadió diclorometano (173 ml, 230 g) y la mezcla resultante se agitó mientras se calentaba a una temperatura interna de 30 °C. Después se añadió N,N-diisopropiletilamina (85 ml, 63,09 g) lentamente mediante el embudo de adición durante 2,5-3 horas, tiempo durante el cual se observó una exotermia hasta una temperatura máxima observada de 33,5 °C. Después de que se completara la adición, la solución resultante se agitó a 30 °C - 31 °C durante una noche en atmósfera de nitrógeno (durante aproximadamente 19 horas).

Una muestra de 100 µl de la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano hasta un volumen total de 10 ml y la solución se mezcló bien. Una muestra de la alícuota diluida se analizó por GC/MS lo que indicó que la reacción se había completado por GC/MS; se observó formación del producto (m/e = 328). La mezcla de reacción se enfrió a 26 °C y se transfirió a un embudo de decantación (ayudada con diclorometano). Después se lavó la mezcla secuencialmente con agua (211 ml, 211 g; el pH del corte acuoso fue ~8; se transfirió una pequeña capa de emulsión con el corte acuoso), NaHSO₄ acuoso al 5 % ((preparado usando 50 g de bisulfato sódico monohidrato (Aldrich n.º de catálogo 233714) y 950 g agua) 211 ml, 216 g; el pH del corte acuoso fue ~2) y después NaCl acuoso al 5 % ((preparado usando 50 g de cloruro sódico (Aldrich n.º de catálogo S9888) y 950 g agua) 211 ml, 215 g; el pH del corte acuoso fue ~4-5). La fase orgánica recogida se concentró después a presión reducida (baño de agua a 35 °C) hasta ~190 ml (2,7 volúmenes basado en un rendimiento teórico del compuesto **13a**, tras lo cual se añadió tolueno (Aldrich n.º de catálogo 179418, 422 ml, 361 g). La mezcla resultante se concentró a presión reducida (baño

de agua a 55 °C - 65 °C) hasta ~190 ml (2,7 volúmenes basado en un rendimiento teórico del compuesto **13a**. El análisis de una muestra de la solución en esta etapa por RMN ¹H indicó la ausencia de diclorometano. La mezcla restante se dejó enfriar a 37 °C (usando un baño de agua a 37 °C en un rotovap con agitación). Durante este tiempo se observó una cristalización pronunciada. Después la mezcla se agitó mecánicamente y se calentó a aproximadamente 37 °C (fuente externa de calor ajustada a 38 °C), tras lo cual se añadió lentamente n-heptano (430 ml, 288 g; Aldrich n.º de catálogo H2198) mediante un embudo de adición durante 3 horas. Después de la adición, se detuvo el calentamiento y la suspensión resultante se agitó mecánicamente mientras se enfriaba a temperatura ambiente durante una noche. Después la mezcla resultante se filtró y los sólidos recogidos se lavaron con tolueno al 10 % en n-heptano (2 x 210 ml; cada lavado se preparó mezclando 21 ml (16 g) de tolueno y 189 ml (132 g) de n-heptano). Se aplicó vacío hasta que se observó un filtrado muy pequeño. Después los sólidos volvieron a secarse al vacío a 50 °C en una purga de nitrógeno hasta un peso constante (3,5 horas) dando 64,7 g (90 %) del compuesto **13a**. El análisis de una muestra del sólido por RMN ¹H mostró que el material se ajustaba a la estructura y el análisis LC indicó un 99,8 % de pureza usando el método de LC suministrado.

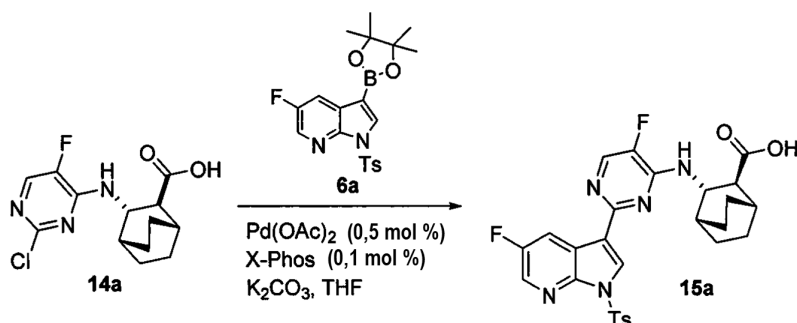
15 Preparación del compuesto 14a



El éster etílico **13a** (85 g, 259 mmol) se disolvió en THF (340 ml) y se trató con una solución de LiOH (2 M, 389 ml, 778 mmol) durante 10 min (temperatura de 21 a 24 °C). La mezcla se calentó a 45 °C con agitación durante 17 h, tiempo al cual se consideró que la reacción se había completado por HPLC (no se observó SM). La mezcla de reacción se enfrió a ta y se añadió CH₂Cl₂ (425 ml). Después se añadió una solución de ácido cítrico (2 M, 400 ml) lentamente durante 45 min (la temperatura se elevó a 26 °C). Se observó que durante la carga se formaron algunos sólidos de color blanco pero se disolvieron rápidamente con la agitación. La mezcla de reacción se agitó durante otros 15 min antes de dejar que las fases se separaran. Después de que las fases se separaran, el pH de la fase acuosa se midió pH = 4,0. La fase orgánica se lavó (15 min en agitación) con agua (255 ml) - se dejó que las fases se separaran. La capa inferior (orgánica) que contenía el producto deseado se guardó en el frigorífico durante una noche.

La fase orgánica se concentró a presión reducida (recipiente ajustado a 65 °C) hasta aproximadamente 150 ml (est. 1,76 vol. respecto de SM). Se cargó IPA (510 ml) y se destiló a presión reducida (ajuste de temperatura del enfriador a 85 °C) hasta 255 ml (3 vol). El nivel de disolvente se llevó hasta aproximadamente 553 ml (6,5 vol) mediante la adición de IPA (298 ml). Después se añadió agua (16 ml) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo (77 °C) con buena agitación que disolvió los sólidos precipitados en las paredes del recipiente. La mezcla de reacción se enfrió después lentamente hasta 65 °C (durante 60 min) y se mantuvo ahí- todo el material permanecía en la solución (una muestra se extrajo para el análisis de disolvente residual). La reacción se volvió a enfriar a 60 °C y la mezcla de reacción parecía ligeramente opaca. Después de agitar durante 15 min se volvió a enfriar a 55 °C. Mientras precipita más producto, la mezcla es aún ligera y se agita con facilidad. Se añadió agua (808 ml) muy lentamente (2,5-3 h) mientras se mantenía la temperatura alrededor de 55 °C. Después, la mezcla se enfrió a 22 °C durante 2 h y se dejó en agitación durante una noche. Después se filtró el material y se lavó con una mezcla de agua: IPA (75:25, 2 x 255 ml). El ácido se secó en un horno de vacío a 55 °C durante una noche. Se obtuvieron 69 g del ácido **14a**, 88 % de rendimiento de un sólido de color blanco. El material analizado tenía >99 % de pureza según HPLC.

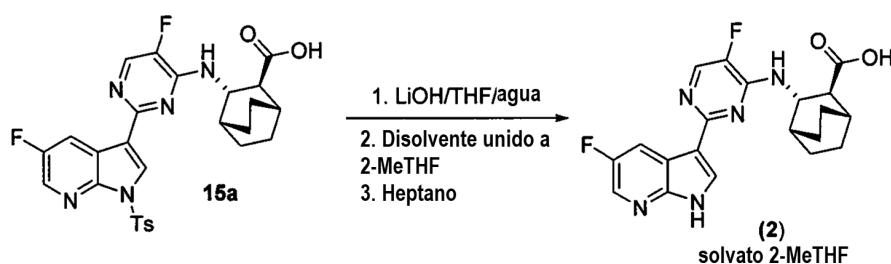
45 Preparación del compuesto 15a: Acoplamiento de Suzuki



A **14a** (91,4 g, 305 mmol), **6a** (158,6 g, 381 mmol, 1,25 equiv.), Pd(OAc)₂ (0,34 g, 1,5 mmol, 0,5 mol %), X-Phos

(1,45 g, 3,0 mmol, 1,0 mol %) y K_2CO_3 (168,6 g, 1220 mmol, 4 equiv.) se le añadió THF (731 ml, 8 volúmenes) y agua (29 ml, 0,32 vol). La mezcla de reacción se roció con N_2 durante 30 min, después se calentó a 65 °C - 70 °C y se agitó durante 5 h. El análisis HPLC de la mezcla de reacción mostró un 99,3 % de conversión. La mezcla de reacción se enfrió a 22 °C - 25 °C y se añadió agua. La mezcla se agitó, se dejaron separar las fases y la fase acuosa se decantó. Se añadió una solución de NaCl en agua al 18 % en peso (NaCl acuoso semisaturado) a la fase orgánica y el pH de la mezcla se ajustó a 6,0 - 6,5 usando HCl 2 N. Se dejaron separar las fases y la fase acuosa se decantó. La fase orgánica se concentró a un volumen mínimo y se añadió acetonitrilo. El proceso se repitió una vez más y se añadió acetonitrilo se añadió para alcanzar el volumen final de 910 ml (10 vol). La suspensión se calentó a 80 °C - 85 °C durante 6 h, después se enfrió a 20 °C - 25 °C. La suspensión se agitó durante 2 h, después se filtró. Los sólidos se enjuagaron con acetonitrilo para dar **15a** (161 g, 89 % de rendimiento).

Preparación del compuesto (1): Etapa de detosilación



A **15a** (25 g, 45,2 mmol) se le añadió THF (125 ml, 5 vol), después resina de MP-TMT (6,25 g, 25 % en peso). La mezcla se agitó a 20 °C - 25 °C durante 16 h y se filtró, aclarando con 1 vol. de THF. El proceso de tratamiento con resina y la filtración se repitieron. La solución de THF se concentró a 5 vol. A la mezcla a 22 °C - 25 °C se le añadió una solución acuosa de LiOH 2 M (90,3 ml, 4 equiv.). La mezcla de reacción se calentó a 40 °C - 45 °C y se agitó durante 5 h. El análisis por HPLC mostró un 99,7 % de conversión. La mezcla de reacción se enfrió a 22 °C - 25 °C y se añadió MTBE (50 ml, 2 vol). Se produjo la fase de separación. La fase acuosa inferior se recogió. La fase acuosa se extrajo con MTBE. La fase acuosa inferior se recogió. A la fase acuosa se le añadió 2-MeTHF y la mezcla se agitó. El pH de la mezcla se ajustó a 6,0 - 6,5 y la fase ac. inferior se decantó. La fase orgánica se lavó con tampón de pH 6,5. La fase orgánica se concentró a 85 ml, se diluyó con 2-MeTHF (150 ml) y se concentró a un volumen final de 180 ml. La suspensión resultante se calentó a 70 °C - 75 °C y se agitó hasta su completa disolución, después se enfrió a 45 °C - 50 °C para dar una suspensión. La suspensión se agitó durante 1 h, después se añadió heptano (180 ml). La suspensión se enfrió a 20 °C - 25 °C durante 1 h y se agitó durante 16 h. El lote se filtró, aclarando los sólidos con heptano. Los sólidos se secaron para dar el solvato del compuesto (1)·2-MeTHF en bruto, rendimiento del 79 %.

Ejemplo 3: formación de polimorfos de la sal de HCl del compuesto (1)

3A: preparación de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O

La forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O se preparó mezclando solvato 2-metil tetrahidrofurano (2-MeTHF) (1 equivalente) del compuesto 1 (compuesto (1)- 1*(2-MeTHF) con cloruro de hidrógeno en una mezcla de agua y un disolvente o disolventes orgánicos, en donde la mezcla de agua y disolvente o disolventes orgánicos tiene una actividad de agua del 0,05-0,85. Las condiciones de reacción particulares se resumen en la tabla 1 siguiente:

Tabla 1: condiciones de reacción empleadas para la preparación de la forma A de la sal del compuesto (1)*1/2H₂O

Comp. (1) (mg) 1 (2-MeTHF)	Disolvente	Disolvente (ml)	Agua (ml)	HCl acuoso 6 N (m)	T (°C)	Eq (HCl: compuesto (1))	Agua (% en peso)
40	Acetona	640	40	15,70	35	1,1332	8,84 %
25	Acetona	400	25	9,80	46	1,1318	8,84 %
10,09	Acetona	160	64	3,98	35	1,1389	32,71 %
5	n-propanol	186	10	1,29	20	0,7449	6,87 %
6,01	iso-propanol	88	2	2,31	35	1,1097	5,10 %
6,6	iPrOH/ácido acético =>Acetona*	100/1,0	4	3,10	45	1,3561	7,25 %
18	Acetona	180	6	3,60	30	0,5774	5,33 %
18	Acetona	180	8	6,40	35	1,0266	7,73 %
6	Acetona	66	11	2,82	30	1,3561	18,57 %
0,101	iBuOAc	5	0,1	0,10	~20	2,8586	4,36 %
6	Ácido acético	50	8,7	2,18	35	1,0499	15,37 %

* dos etapas: iPrOH/AcOH y después resuspensión en acetona/agua

Como alternativa, la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)•1/2H₂O también se preparó por los procedimientos siguientes: Procedimiento A: El compuesto (1)•2-MeTHF (953 g, 2,39 mol) se puso en un reactor de 30 l con camisa y se trató con IPA (15 l) y agua (0,57 l). Se puso en funcionamiento el agitador y la mezcla de reacción se calentó a 73 °C para convertir todo en una solución, después se enfrió a 50 °C - 55 °C. A 50 °C - 55 °C la mezcla de reacción se trató con HCl en IPA recién preparado (0,83 M, 4,34 l) mediante adición lenta durante 4 h. Debe señalarse que a aproximadamente a la mitad del proceso, la mezcla se espesa. La reacción se muestreó, para verificar la forma correcta por XRPD. Después de la adición, el enfriador se programó para descender a 0 °C durante 480 min con agitación. Después de la confirmación de la forma por análisis XRPD, la suspensión se filtró en dos filtros. El reactor se lavó con 3 l de IPA y cada torta de filtró se lavó con ~1,5 l de IPA del producto de enjuague IPA del reactor. Las tortas se dejaron secar al aire con succión durante una noche. Las tortas se colocaron después en un secador de bandeja sin calentamiento al vacío con purga de N₂ (22 inHg(74,5 kPa) durante 24 h. El análisis del agua y el disolvente residual mostraron 505 ppm de IPA, 8 ppm de 2-Me-THF y aproximadamente H₂O al 2,15 %. El material se sacó del horno y se molió conjuntamente para desaglomerarlo proporcionando 805 g de la sal de HCl del compuesto (1)•1/2 H₂O. Procedimiento B: Como alternativa, se usó acetona en lugar de IPA, pero de una manera similar a como se ha descrito anteriormente en el procedimiento A para formar la sal de HCl del compuesto (1) 1/2 H₂O.

Los datos de XRPD y SSNMR C¹³ de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)•1/2H₂O se muestran en las figuras 1 y 2, respectivamente. Ciertos picos de XRPD y picos de SSNMR C¹³ observados se resumen en las tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2: Picos de XRPD de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1) 1/2H₂O.

Picos de XRPD	Ángulo (2-theta ± 0,2)	% de intensidad
1	10,5	100,0
2	5,2	71,6
3	7,4	46,8
4	18,9	42,0
5	25,2	41,7
6	16,5	39,5
7	18,1	28,1
8	23,0	27,5
9	24,1	25,3
10	20,2	21,6
11	26,4	21,3
12	15,8	19,8
13	21,8	18,3
14	13,8	17,6
15	27,4	17,3
16	29,0	16,7
17	14,8	15,0
18	32,0	15,0
19	25,7	13,8
20	28,6	13,4
21	33,8	13,0
22	12,8	12,0
23	30,8	11,7
24	32,4	11,6
25	24,5	11,5
26	23,4	11,1
27	21,0	10,4

Tabla 3: Picos de SSNMR C¹³ de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1) 1/2H₂O.

N.º de pico	Desplazamiento químico [± 3 ppm]	Intensidad [rel]
1	180,1	50,4
2	157,9	9,1
3	154,6	26,4
4	150,7	25,3
5	144,9	31,0
6	140,1	6,7
7	132,4	36,3
8	131,2	30,0
9	129,0	21,0
10	117,5	33,6
11	114,0	38,0
12	107,0	34,4
13	54,8	42,0
14	47,7	52,7
15	29,2	100,0
16	24,6	74,0
17	22,1	83,6

Se encontró que la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)·1/2H₂O preparada era estable en los siguientes sistemas disolventes (pero sin limitación): clorobenceno, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, diclorometano, 1,2-dimetoxietano, hexano, 2-metoxietanol, metil butil cetona, metilciclohexano, nitrometano, tetralina, xileno, tolueno, 1,1,2-tricloroetano, acetona, anisol, 1-butanol, 2-butanol, acetato de butilo, t-butilmetiléter, cumeno, etanol, acetato de etilo, éter etílico, formiato de etilo, heptano, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de metilo, 3-metil-1-butanol, metil etil cetona, 2-metil-propanol, pentano, 1-propanol, 1-pentanol, 2-propanol, acetato de propilo, tetrahidrofurano, tetrahidrofurano de metilo.

5 Específicamente, para los ensayos de solubilidad y estabilidad de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)·1/2 H₂O, se cargaron muestras del compuesto en viales de HPLC de 2 ml con 500 µl de disolvente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 semanas y se filtró por centrifugación. Los sólidos resultantes se analizaron por XRPD, las soluciones se analizaron para solubilidad mediante RMN cuantitativa frente a patrones de hidroquinona. Los resultados se resumen en la tabla 4.

15

Tabla 4: Resumen de los datos de forma y solubilidad de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1).

Disolvente	Sol. (mg/ ml)	Formas resultantes
Acetonitrilo	0,5	Solvato
Clorobenceno	<0,1	A
Cloroformo	<0,1	Solvato
Ciclohexano	<0,1	A
1,2-Dicloroetano	1,7	A
Diclorometano	0,1	A
1,2-Dimetoxietano	0,5	A
1,4-Dioxano	0,4	A
Etilenglicol	108,1	Solvato
Hexano	<0,1	A
Metanol	46,4	Solvato
2-Metoxietanol	34,1	A
Metil butil cetona	0,4	A
Metilciclohexano	<0,1	A
Nitrometano	<0,1	A
Tetralina	<0,1	A
Tolueno	<0,1	A

(continuación)

Disolvente	Sol. (mg/ ml)	Formas resultantes
1,1,2-tricloroetano	<0,1	A
xileno	<0,1	A
Acetona	1,5	A
Anisol	<0,1	A
1-Butanol	2,9	A
2-Butanol	2,9	A
Acetato de butilo	0,2	A
t-butilmetiléter	0,4	A
Cumeno	<0,1	A
Dimetilsulfóxido	346,5	Solvato
Etanol	19,9	A
Acetato de etilo	0,2	A
Éter etílico	0,1	A
Formiato de etilo	0,4	A
Ácido fórmico	214,0	Solvato
Heptano	<0,1	A
Acetato de isobutilo	0,2	A
Acetato de isopropilo	0,4	A
Acetato de metilo	0,6	A
3-metil-1-butanol	3,2	A
Metil etil cetona	0,5	A
2-metil-1-propanol	3,5	A
Pentano	<0,1	A
1-pentanol	3,3	A
1-propanol	10,7	A
2-propanol	3,3	A
Acetato de propilo	0,8	A
Tetrahidrofurano	0,7	A
Tetrahidrofurano de metilo	0,7	A
Agua	0,6	F

5 Se obtuvieron los datos del termograma (los datos no se muestran) colocando la muestra en una bandeja de muestras de platino y calentando a 10 °C/min hasta 300 °C desde temperatura ambiente. Los datos del termograma demostraron una pérdida de peso del 2,1 % de 30 ° a 170 °C, lo que concordaba con el hemihidrato teórico (2,0 %).

10 Los datos del termograma por DSC se obtuvieron (los datos no se muestran) calentando la muestra a 10 °C/min hasta 300 °C desde la temperatura ambiente. El termograma por DSC mostraron una temperatura de inicio de la deshidratación de 50 °C - 100 °C seguido de una temperatura de inicio de la fusión/descomposición de 200 °C - 260 °C.

*3B: Preparación de la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3 H₂O*

15 La forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3 H₂O puede prepararse suspendiendo la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2 H₂O en iso-propanol y agua o acetona y agua o agua (con un valor de actividad de agua igual a, o mayor de 0,9).

20 Por ejemplo, suspensión de 100 mg de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2 H₂O en 5 ml de iso-propanol/agua o acetona/agua a una actividad de agua de 0,9 se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La decantación del sobrenadante y el secado lento al aire del material sólido resultante proporcionó la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3 H₂O.

Los datos de XRPD y SSNMR C¹³ de la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O se muestran en las figuras 3 y 4, respectivamente. Los distintos picos observados en la XRPD y picos en la RMN de estado sólido C¹³ se

resumen en las tablas 5 y 6, respectivamente.

Tabla 5: picos en la XRPD de la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O.

Picos XRPD	Ángulo (2-Theta ± 0,2)	Intensidad %
1	7,1	100,0
2	9,6	83,0
3	11,9	88,8
4	12,4	84,6
5	16,4	83,5
6	17,1	83,0
7	17,5	82,8
8	19,2	86,9
9	21,1	82,2
10	21,8	83,7
11	23,9	83,8
12	28,7	83,4

5 Tabla 6: Picos de la RMN de estado sólido C¹³ de la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)3 H₂O.

Pico n.º	Cambio químico [± 3 ppm]	Intensidad [rel]
1	178,6	67,6
2	156,8	21,5
3	154,3	49,3
4	152,1	12,6
5	151,2	21,3
6	142,5	37,0
7	132,3	85,7
8	127,9	15,4
9	118,0	38,6
10	117,5	43,7
11	115,2	36,3
12	114,5	35,2
13	106,1	15,4
14	104,8	31,6
15	52,7	43,1
16	52,3	37,2
17	48,8	44,8
18	48,4	46,4
19	30,3	100,0
20	27,4	35,4
21	25,5	37,4
22	24,5	44,5
23	23,8	40,9
24	22,0	46,4
25	21,1	47,0
26	20,7	50,5
27	20,3	47,7

Se obtuvo un termograma por MDSC (los datos no se muestran) calentando la muestra a 2 °C/min hasta 350 °C desde -20 °C y modulado a ± 1 °C cada 60 s. El termograma por MDSC mostró una deshidratación por debajo de 150 °C, fusión y recristalización entre 150 °C y 200 °C y degradación por encima de 250 °C.

10

También se realizó análisis termogravimétrico (TGA) de la forma. El termograma mostró una pérdida de peso del 12

% hasta 125 °C que estaba cercano al trihidrato teórico (11 %). La TGA-MS indicó que la pérdida de peso del segundo paso por debajo de 200 °C era la pérdida de HCl. El inicio de la fusión/descomposición estaba alrededor de los 270-290 °C.

5 **3C: Preparación de la forma D de la sal de HCl del compuesto (1)**

10 El anhídrido de la forma D de la sal de HCl del compuesto (1) normalmente puede fabricarse deshidratando la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O. La deshidratación puede hacerse mediante calentamiento o purgado con nitrógeno seco o la combinación de ambos. Por ejemplo, se calentaron 2 mg de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O en una placa caliente, generando el anhídrido de la forma D deseado a aproximadamente 85 °C.

15 Los datos de XRPD y SSNMR C¹³ de la forma anhidra de D de la sal de HCl del compuesto (1) se muestran en las figuras 5 y 6, respectivamente. Los distintos picos observados en la XRPD y picos en la RMN de estado sólido C¹³ se resumen en las tablas 7 y 8, respectivamente.

Tabla 7: Picos de la XRPD de la forma D de la sal de HCl anhidro del compuesto (1).

Picos XRPD	Ángulo (2-Theta ± 0,2)	Intensidad %
1	5,3	100,0
2	10,5	56,0
3	15,9	49,2
4	25,9	30,5
5	21,0	24,6
6	26,5	24,1
7	5,8	22,6
8	7,4	21,7
9	19,0	17,4
10	16,6	17,2
11	25,3	16,1
12	24,7	16,0
13	29,4	15,5
14	13,8	14,6
15	20,3	14,5
16	32,0	14,4
17	19,5	12,4
18	28,6	12,4
19	17,1	11,5
20	30,3	11,4
21	27,5	11,0
22	27,0	10,7
23	23,7	10,4
24	28,0	10,2
25	21,6	10,1

Tabla 8: Picos de la RMN de estado sólido C¹³ de la forma D de la sal de HCl anhidro del compuesto (1).

Pico n.º	Cambio químico [± 3 ppm]	Intensidad [rel]
1	179,7	43
2	177,8	44,85
3	157,5	16,88
4	154,9	43,14
5	151,1	25,79
6	149,8	21,51
7	145,0	26,82
8	143,9	35,41

(continuación)

Pico n.º	Cambio químico [\pm 3 ppm]	Intensidad [rel]
9	141,6	14,85
10	139,7	12,9
11	135,4	29,94
12	132,5	43,37
13	130,1	23,65
14	128,9	27,35
15	127,3	25,35
16	118,1	27,24
17	116,6	28,25
18	113,3	52,71
19	107,5	29,33
20	106,1	30,73
21	54,4	39,43
22	53,4	42,25
23	48,2	54,53
24	47,2	47,8
25	31,6	52,54
26	29,4	100
27	26,0	50,37
28	24,8	47,38
29	23,9	63,88
30	22,9	98,06
31	20,2	45,7

3D: Ensayos de actividad de agua

- 5 Un estudio de competición de la suspensión de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O sembrado con la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O, con actividades de agua de 0,0 a 0,8 de alcohol isopropílico/agua mostró que la forma A fue la más estable entre la forma D de la sal de HCl anhidro del compuesto (1), la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O y la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O, después de aproximadamente 2 semanas de agitación en condiciones ambiente. En una actividad de IPA/agua de 0,9, la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O se convirtió en la forma F de la sal de HCl del compuesto (1)*3H₂O. Los resultados de estos estudios se resumen en la tabla 9 siguiente.

Tabla 9: Ensayos de actividad de agua en la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O en mezclas de IPA/agua.

Formas de partida	Actividad de agua (a_w)	Agua % en peso	Forma final	Descripción
A+F	0 + >80 °C		D	Anhidrato
A+F	0		A	Hemihidrato
A+F	0,1	0,1	A	Hemihidrato
A+F	0,2	0,25	A	Hemihidrato
A+F	0,3	0,35	A	Hemihidrato
A+F	0,4	0,55	A	Hemihidrato
A+F	0,5	0,75	A	Hemihidrato
A+F	0,6	1,00	A	Hemihidrato
A+F	0,7	1,35	A	Hemihidrato
A+F	0,8	1,85	A	Hemihidrato
A+F	0,9	2,80	F	Trihidrato
A+F	1	100	F	Trihidrato

- 15 En la figura 12 se muestra un diagrama de fases de la temperatura frente a la actividad de agua para la transición entre la forma D de la sal anhidra de HCl del compuesto (1) ("forma D"), forma F de la sal de HCl del compuesto

(1)*3H₂O ("forma F) y forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2H₂O ("forma A").

3F: Sal de HCl amorfa del compuesto (1)

5 La sal de HCl del compuesto amorfo (1) puede formarse tratando sal de Me₂NEt del compuesto (1) (1,985 g) en agua y 2-MeTHF con 1,05 equiv. de NaOH, seguido de tratamiento con HCl para eliminar la amina y precipitar la sal de la capa acuosa (pH 2-3). La suspensión resultante se concentró para eliminar los orgánicos y después se filtró. El sólido resultante se aclaró con porciones pequeñas de agua y se secó. Se preparó la sal de Me₂NEt del compuesto (1) de acuerdo con el documento WO 2010/148197, seguido de la separación quiral y purificación habituales: la cromatografía quiral SCF con un modificador que incluye Me₂NEt (que generó sal de Me₂NEt del compuesto (1)).

Ejemplo 4: Formación de polimorfos del compuesto de base libre (1)

4A: Preparación de la forma A del compuesto de base libre (1)

15 La forma A del compuesto de base libre (1) se produjo mediante el siguiente procedimiento: La base libre amorfa en bruto del compuesto (1) (aproximadamente 135 g) se transfirió a un reactor de 4 l con camisa y el reactor se cargó con etanol (2,67 l) y agua (0,325 l) (solución de agua al 10 %). La mezcla se calentó a temperatura de reflujo. Se añadió agua (300 ml) a la mezcla resultante de la etapa 2) para fabricar una solución en agua al 20 %. La mezcla resultante se lavó después a 55 °C (velocidad = -1 °C/min) y posteriormente se mantuvo durante 30 minutos. Después se añadió la semilla cristalina de la base libre de la forma A del compuesto (1) (1,5 g, 3,756 mmol) en la mezcla enfriada y la mezcla resultante se mantuvo durante 30 minutos mientras el producto se precipitaba. La semilla de la base libre cristalina de la forma A del compuesto (1) se produjo suspendiendo la del compuesto de base libre amorfo (1) (20 mg) en nitrometano (0,5 ml). Se produjeron materiales de siembra adicionales de base libre cristalina de la forma A del compuesto (1) suspendiendo del compuesto de base libre amorfo (1) (900 mg) en acetoneitrilo (10 ml) con la semilla obtenida usando nitrometano. En la mezcla que contenía la semilla de base libre cristalina de la forma A del compuesto (1) se añadió lentamente agua (795,0 ml) para fabricar una solución en agua al 40 %. La mezcla resultante se enfrió lentamente a 0 °C (~ -10 °C/hora) y posteriormente se mantuvo durante 2 horas. Los materiales sólidos se filtraron después y se secaron al aire y después de volvieron a secar en horno a 60 °C durante 18 horas.

Como alternativa, se usó solvato de 2-metil THF del compuesto de base libre (1) en lugar del compuesto de base libre amorfo (1) y también se obtuvo la forma A del compuesto de base libre (1) de una manera similar a como se ha descrito anteriormente.

35 Se encontró que la forma A del compuesto (1) preparada era estable en los siguientes sistemas disolventes (pero sin limitación): acetoneitrilo, clorobenceno, cloroformo, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, diclorometano, 1,2-dimetoxietano, etilenglicol, formamida, hexano, metil butil cetona, metilciclohexano, N-metilpirrolidinona, nitrometano, tetralina, tolueno, 1,1,2-tricloroetano, ácido acético, anisol, 1-butanol, acetato de butilo, cumeno, acetato de etilo, éter etílico, formiato de etilo, heptano, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, pentano, acetato de propilo, agua, agua-iso-propanol (1:3 vol/vol) y agua-acetoneitrilo (1:1 vol/vol; 1:3 vol/vol).

45 Los datos de XRPD y SSNMR C¹³ de la forma A del compuesto (1) se muestran en las figuras 7 y 8, respectivamente. Los distintos picos observados en la XRPD y picos en la RMN de estado sólido C¹³ se resumen en las tablas 10 y 11, respectivamente.

Tabla 10: Picos de la XRPD de la forma A del compuesto (1).

Picos XRPD	Ángulo (2-Theta ± 0,2)	Intensidad %
1	11,8	100,0
2	18,9	100,0
3	16,9	99,8
4	15,5	99,7
5	22,0	99,7
6	25,5	99,7
7	9,1	99,4
8	23,6	98,6
9	27,6	98,5
10	17,5	98,3
11	23,0	98,3
12	24,0	98,3
13	13,7	98,2

(continuación)

Picos XRPD	Ángulo (2-Theta \pm 0,2)	Intensidad %
14	20,2	98,2
15	12,5	97,8
16	10,6	97,7
17	15,8	97,5
18	20,6	97,5
19	12,9	97,4
20	24,7	97,4
21	26,2	97,4
22	6,2	97,3
23	21,1	97,3

Tabla 11: Picos de la RMN de estado sólido C¹³ de la forma A del compuesto (1).

Pico #	Cambio químico [\pm 3 ppm]	Intensidad [rel]
1	180,0	60,1
2	176,2	68,7
3	175,9	62,4
4	160,2	28,8
5	158,6	18,4
6	157,9	28,1
7	157,3	47,2
8	156,0	34,3
9	155,4	49,7
10	152,3	32,5
11	151,4	49,5
12	146,5	18,6
13	144,4	61,1
14	143,8	56,4
15	142,9	19,2
16	140,2	21,2
17	138,5	55,6
18	133,6	29,4
19	132,3	61,4
20	131,0	52,1
21	126,2	23,0
22	121,5	35,8
23	120,8	39,3
24	119,7	90,9
25	116,2	59,3
26	115,3	44,3
27	112,7	35,0
28	52,5	39,0
29	51,6	75,9
30	50,4	94,8
31	49,8	74,6
32	31,8	80,4
33	31,2	53,0
34	30,5	86,0

(continuación)

Pico #	Cambio químico [± 3 ppm]	Intensidad [rel]
35	30,1	95,1
36	28,5	100,0
37	26,3	81,0
38	25,9	96,1
39	25,0	82,2
40	22,8	66,97
41	22,2	55,41
42	21,6	64,44
43	21,0	82,87
44	20,4	57,45
45	19,8	52,2

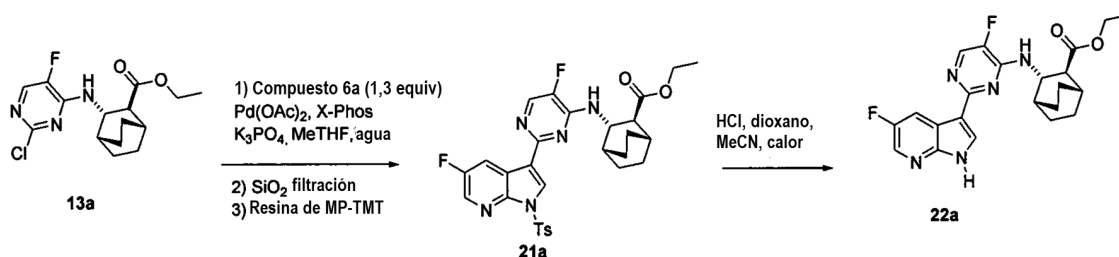
Se realizó análisis termogravimétrico del producto, forma A del compuesto (1), se realizó (los datos no se muestran) en los instrumentos para TGA de TA modelo Q500 colocando una muestra del mismo en una bandeja de muestras de platino y calentando posteriormente la bandeja a 10 °C/min hasta 300 °C desde la temperatura ambiente. El termograma demostró que el inicio de descomposición estaba alrededor de los 293 °C.

También se obtuvo un termograma por DSC de la forma A del compuesto (1) usando instrumentos TA DSC Q200. Una muestra de la forma se calentó a 10 °C/min hasta 350 °C. El termograma por DSC mostró que la temperatura de fusión estaba alrededor de los 278 °C.

4B: Preparación de la forma B de hidratos del compuesto de base libre (1)

Una forma hidratada del compuesto de base libre (1) era isomórfica con la forma A del compuesto de base libre (1) - la forma A del compuesto de base libre (1) podía convertirse libremente a la forma hidratada B cuando se exponía a humedad alta y se revertía cuando la humedad descendía. De acuerdo con los cambios de fase determinados usando experimentos de DSC (datos no mostrados), la temperatura de transición era cercana a la temperatura ambiente y variaba con la actividad de agua. Por ejemplo, a temperatura ambiente, la forma hidrato se observó donde la actividad de agua era superior a 0,6, tal como 0,6-1,0.

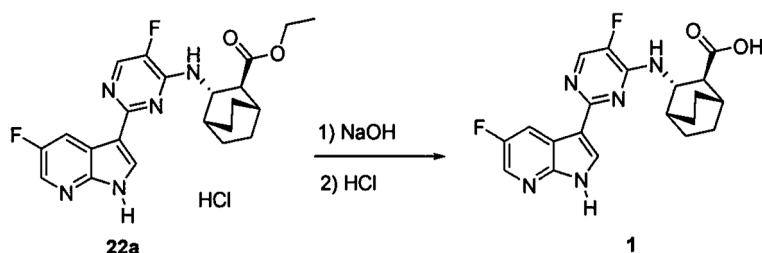
4C: Preparación de compuesto de base libre amorfo (1)



Se realizó acoplamiento de Suzuki tomando la cloropirimidina, el compuesto **13a**, éster borónico del compuesto **6a**, catalizador Pd(OAc)₂ y ligando (X-Phos) en 10 vol de 2-MeTHF. Esta mezcla se calentó a 65 °C y se añadieron 2 vol de una solución acuosa al 50 % de K₃PO₄ a una velocidad que mantuvo la mezcla de reacción a 65 °C. Ambas reacciones se completaron, después se enfriaron a 20 °C y se filtraron a través de celite. Las capas acuosas se separaron como desperdicio, las capas orgánicas se lavaron con NaCl acuoso al 5 % y después se concentraron a sequedad para dar aproximadamente 3,5 kg de una pasta de color verde oscuro para cada una. El aceite en bruto se dividió en 4 partes iguales, se suspendieron con 400 g de SiO₂ y 500 g de florisilo y se eluyeron a través de una columna de 2,3 kg de SiO₂ con heptano/EtOAc (5:1 a 3:1, fracciones de 2 l) combinando todos los productos que contenían fracciones. Estas fracciones se concentraron a sequedad para dar aproximadamente 2,9 kg del compuesto **21a**.

El compuesto **21a** se disolvió en 10 vol (25 l) de CH₃CN y se trataron con 4 equiv. de HCl (4,31 l de HCl 4 N en 1,4-dioxano) a 70 °C durante 15 h. La reacción se consideró 100 % completa por HPLC y la suspensión fina se enfrió a 20 °C en 1 h. Se añadió TBME (28 l, 11 vol) a 0,5 l/min llegando la suspensión a hacerse muy espesa (gelatinosa) al final de la adición. Después de 4 - 5 h agitando, la suspensión se disolvió mucho. Los sólidos resultantes se recogieron mediante filtración por succión y se lavaron con 3 x 5 l TBME proporcionando una torta de baja densidad y se secaron en una corriente de N₂ durante 3 días para dar 1,71 kg (86 % de rendimiento, 98,9 % de pureza en la

ABC) del HCl del compuesto **22a**.



- 5 Se añadió una solución de NaOH (55,60 ml de 2M, 111,2 mmol) a una suspensión del compuesto **22a**·HCl (10 g, 22,23 mmol) en 2-MeTHF (100,00 ml) a 20 °C. La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 5 h y después adicionalmente a 67 °C. Después de aproximadamente 22 horas de agitación, se añadieron 100 ml (10 vol) de 2-MeTHF a la mezcla resultante. El lote se enfrió después a 0 °C. Se añadió HCl a la mezcla resultante para ajustar el pH a pH 6,6 para producir el compuesto de base libre en bruto (**1**). El material en bruto en 60 ml (6 vol) of 2-Me-THF
- 10 se calentó a 50 °C. Se añadieron 50 ml (5 vol) de n-heptano en la mezcla resultante durante 1 hora. El lote se enfrió después a 20 °C. El producto sólido se filtró y el producto sólido se purificó adicionalmente por cromatografía en columna (EtOAc/heptano 2:1 a 4:1). Sus datos de XRPD indicaron compuesto de base libre amorfo (**1**).

- 15 Como alternativa, se observó compuesto de base libre amorfo (**1**) a partir de una mezcla de la forma A del compuesto de base libre (**1**) y un disolvente seleccionado entre 2-etoxietanol, 2-metoxietanol, t-butilmetiléter, ácido fórmico o metiltil cetona (por ejemplo, véase la tabla 13 siguiente), que se agitó a temperatura ambiente.

4D: Preparación de solvato 2-MeTHF del compuesto de base libre (1)

- 20 El compuesto (**1**)·(2-MeTHF) se preparó como se describe en el ejemplo 2 anterior. Sus datos de XRPD se muestran en la figura 10. Los distintos picos observados en la XRPD se resumen en la tabla 12.

Tabla 12: Picos de la XRPD del compuesto (**1**)·1(2-MeTHF).

Picos XRPD	Ángulo (2-Theta ± 0,2)	Intensidad %
1	6,4	9,78
2	8,4	38,07
3	9,7	43,96
4	12,9	15,57
5	16,7	100
6	16,9	46,55
7	17,4	18,67
8	19,4	16,54
9	20,0	14,62
10	21,0	20,4
11	21,3	13,58
12	22,3	37,59
13	24,3	15,36
14	25,7	16,34
15	25,9	10,06

- 25 *4F: Datos de solubilidad y estabilidad de la forma A del compuesto de base libre (1) y el compuesto amorfo (1) en distintos sistemas disolventes*

- 30 La solubilidad y estabilidad de la forma A del compuesto de base libre (**1**) ("forma A") y el compuesto amorfo (**1**) ("amorfo") en distintos sistemas disolventes se ensayó a temperatura ambiente de una manera similar a como se ha descrito anteriormente para las de la forma A de la sal de HCl del compuesto (**1**). Los datos resultantes se resumieron en la tabla 13.

ES 2 741 444 T3

Tabla 13: Datos de solubilidad y estabilidad de la forma A del compuesto de base libre (1) ("Forma A") y el compuesto amorfo (1) ("Amorfo").

Disolvente	Forma de partida A		Amorfo de partida
	Sol. (mg/ ml)	Forma resultante	Forma resultante
Acetonitrilo	1,0	A	Amorfo
Clorobenceno	0,4	A	Amorfo
Cloroformo	3,8	A	Amorfo
Ciclohexano	<0,1	A	Amorfo
1,2-Dicloroetano	0,4	A	Amorfo
Diclorometano	0,9	A	Amorfo
1,2-Dimetoxietano	114,0	A	Amorfo
N,N-dimetilacetamida	>150	Solvato	Solvato
N,N-dimetilformamida	39,2	Solvato	Sin señal
1,4-Dioxano	21,3	Solvato (1:1)	Solvato (1:1)
2-etoxietanol	>113	Amorfo	Sin señal
Etilenglicol	10,4	A	Solvato
Formamida	7,0	A	Amorfo
Hexano	<0,1	A	Amorfo
Metanol	25,5	Solvato	Solvato
2-Metoxietanol	>114	Amorfo	Sin señal
Metil butil cetona	20,0	A	Amorfo
Metilciclohexano	<0,1	A	Amorfo
N-metilpirrolidinona	>149	A	Sin señal
Nitrometano	0,3	A	Amorfo
Tetralina	<0,1	A	Amorfo
Tolueno	0,3	A	Amorfo
1,1,2-tricloroetano	1,0	A	Amorfo
xileno	0,3	Solvato	Amorfo
ácido acético	42,8	A	Solvato
Acetona	16,3	Solvato	Solvato
Anisol	0,7	A	Amorfo
1-Butanol	21,0	A	Solvato (1:1)
2-Butanol	14,0	Solvato (1:1)	Solvato (1:1)
Acetato de butilo	8,1	A	Amorfo
t-butilmetiléter	10,4	Amorfo	Amorfo
Cumeno	0,3	A	Amorfo
Dimetilsulfóxido	>113	Sin señal	Sin señal
Etanol	35,5	Sin señal	A
Acetato de etilo	11,6	A	Amorfo
Éter etílico	3,5	A	Amorfo
Formiato de etilo	8,1	A	Solvato (1:1)
Ácido fórmico	>89,4	Amorfo	Sin señal
Heptano	<1,5	A	Solvato
Acetato de isobutilo	4,4	A	Amorfo
Acetato de isopropilo	6,2	A	Amorfo
Acetato de metilo	9,4	Solvato	Solvato
3-metil-1-butanol	9,7	A	Solvato
Metil etil cetona	27,3	Amorfo	Solvato (1:1)
2-metil-1-propanol	12,2	A	Solvato (1:1)
Pentano	<0,3	A	Amorfo
1-pentanol	14,5	Sin señal	Solvato (1:1)

(continuación)

Disolvente	Forma de partida A		Amorfo de partida
	Sol. (mg/ ml)	Forma resultante	Forma resultante
1-propanol	15,9	Solvato	Sin señal
2-propanol	12,9	Solvato (1:1)	Solvato (1:1)
Acetato de propilo	7,5	A	Amorfo
Tetrahidrofurano	61,2	Solvato (1:1)	Solvato (1:1)
Tetrahidrofurano de metilo	34,8	Solvato (1:1)	Solvato (1:1)
Agua	<0,1	A	Amorfo
Agua-IPA 1:1	-	Solvato	-
Agua-IPA 1:3	-	A	-
Agua-ACN 1:1	-	A	-
Agua-ACN 1:3	-	A	-
Agua-MeOH 1:1	-	Solvato	-
Agua-MeOH 1:3	-	Solvato	-

Ejemplo 5: Preparación de la forma A de la sal de tosilato del compuesto (1)

- 5 La forma A de la sal de tosilato del compuesto (1) se preparó suspendiendo la del compuesto de base libre amorfo (1) (500 mg) y ácido p-toluenosulfónico en acetonitrilo (20 ml). Las muestras se agitaron durante una noche. Los datos de XRPD se muestran en la figura 9. Los distintos picos observados en la XRPD se resumen en la tabla 14.
- 10 Como alternativa, podía usarse solvato de 2-metil THF del compuesto de base libre (1) en lugar del compuesto de base libre amorfo (1) para preparar la forma A del tosilato del compuesto (1) de una manera similar a como se ha descrito anteriormente.

Tabla 14: Picos de la XRPD de la forma A de la sal de tosilato del compuesto (1).

Picos XRPD	Ángulo (2-Theta \pm 0,2)	Intensidad %
1	6,0	30,21
2	7,2	100
3	9,3	37,8
4	12,9	13,96
5	13,7	39,23
6	14,3	50,25
7	14,7	42,94
8	16,4	9,99
9	16,9	89,79
10	18,7	59,65
11	19,3	19,62
12	19,6	33,34
13	20,3	11,38
14	20,8	11,98
15	21,9	41,6
16	23,0	33,45
17	24,2	14,97
18	25,4	23,83
19	26,3	44,54
20	26,9	51,79
21	27,5	34,02
22	28,0	36,07
23	29,1	13,36
24	29,7	8,92

(continuación)

Picos XRPD	Ángulo (2-Theta ± 0,2)	Intensidad %
25	32,2	9,25
26	33,1	4,75

Ejemplo 6: Formulaciones del compuesto (1)

5 A. Comprimidos de compuesto (1)

Composiciones

10 Para la formación de comprimidos, se usó la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2 H₂O (en lo sucesivo, sencillamente compuesto (1) para el ejemplo 6). Todos los excipientes satisfacían las monografías actuales de la Farmacopea Europea y la USP/NF y se adquirieron de proveedores aprobados.

15 En la tabla 15A se proporciona la composición de la formulación y el tamaño del lote para la mezcla de previa a la granulación y la solución aglutinante de granulación. El tamaño del lote de la solución aglutinante incluyó un exceso del 100 % para la calibración de la bomba y el cebado de las líneas de solución. En la tabla 15A también se proporciona la composición teórica de la mezcla de compresión. Las cantidades reales para el lote se calcularon basándose en el rendimiento de los gránulos secos. La composición y el tamaño aproximado del lote de la suspensión de recubrimiento de película se proporciona en la tabla 15B e incluyó un exceso del 100 % para la calibración de la bomba y el cebado de las líneas de suspensión. La cantidad diaria del recubrimiento de película fue del 3,0 % p/p del peso del comprimido.

20

Tabla 15A: Composiciones de comprimidos del compuesto (1).

		% en la mezcla de pregranulación	% en el gránulo seco	% en el núcleo del comprimido	mg en el comprimido (300 mg)
Intragranular	Semihidrato cristalino del compuesto (1), sal de HCl (forma A)	76,13	74,99	50,00	333,00
	Avicel PH-101, NF, PhEur	10,03	9,88	6,59	43,89
	Monohidrato de lactosa, n.º 316, NF, PhEur	10,03	9,88	6,59	43,89
	Ac-Di-Sol, NF, PhEur, JP	3,81	3,75	2,50	16,65
	mezcla de pregranulación total:	100,00	98,50	65,68	437,43
En solución aglutinante	Povidona K30, USP		1,50	1,0	6,66
	Agua, USP		na	na	na
	gránulos totales:		100,00	66,68	444,09
Extragranular	Prosolv 50, NF			28,82	191,94
	Ac-Di-Sol, NF, PhEur, JP			2,50	16,65
	SSF, NF			2,00	13,32
	Total núcleo del comprimido			100	666,00
En suspensión de recubrimiento de película	Opadry II, 85F18422			(3,2 respecto del núcleo)	21,31
	Agua, USP				na
	Total comprimido recubierto final				687,31

Tabla 15B: Composición de la suspensión de recubrimiento de película y tamaño aproximado del lote.

25

Componente	% P/P	Tamaño del lote (g)
Opadry II Blanco, 33G	15,00	210,00
Agua, USP	85,00	1190,00

(continuación)

Componente	% P/P	Tamaño del lote (g)
Total	100,00	1400,00

Preparación de solución aglutinante

- 5 La solución aglutinante consistía en povidona y agua. La solución se preparó basándose en un contenido de agua del 40 % en la granulación final. Por tanto, la cantidad total de sólidos en solución (povidona) era del 3,6 % (p/p). Se preparó una cantidad en exceso del 100 % para cebar las líneas, etc. Basándose en la inspección visual del inicio del ciclo de granulación, se prepararon soluciones madre adicionales of +/- 2 % (38-42 %) de agua en la granulación final. Normalmente, se pesaron 87,00 g de Povidona K30 y 2320,00 g de agua purificada (DI) y en agitación constante, se añadió la povidona K30 al recipiente que contenía el agua DI. Después de la adición, se selló el recipiente para minimizar la evaporación y se agitó la solución hasta que se disolvieron por completo todos los sólidos presentes.

Flujo del proceso de granulación en húmedo

- 15 La granulación en húmedo se llevó a cabo mediante los procedimientos descritos a continuación: Se pesó una cantidad en exceso (10 %) de compuesto (1), Avicel PH-101, lactosa Fastflo y croscarmelosa de sodio (véase la tabla 15A). Se tamizaron usando un tamiz manual de malla 20 o un molino de cono equipado con un tamiz de malla rallado de 813 µm a 1000 rpm (para un Quadro Co-mill U5). Los materiales tamizados se colocaron en bolsas o recipientes individuales. Después, se transfirieron los materiales a una mezcladora y se mezclaron durante 15 minutos, normalmente a 15 RPM. Los materiales mezclados se molieron usando un molino de conos Quadro U5 equipado con un tamiz de agujeros cuadrados de 4 mm a 1000 rpm. Los materiales molidos se mezclaron de nuevo, repitiendo la etapa de mezclado. Después, se introdujeron los materiales remezclados en un granulador de tornillos gemelos. La granulación en húmedo en bruto se alimentó en un granulador usando un alimentador de pérdida de peso (K-tron o similar). Después, se granularon los materiales resultantes. Se inyectó el fluido aglutinante (véase la tabla 15A) en el granulador de tornillos gemelos usando una bomba peristáltica. La relación de velocidad de alimentación de solución frente a la velocidad de alimentación de polvo fue de 0,4095. Por ejemplo, en caso de que la velocidad de alimentación del polvo fuese de 15,00 g/min, la velocidad de alimentación de la solución fue $0,4095 \times 15,00 = 6,14$ g/min, con un contenido de agua del 40 % (basándose en la masa en seco). Los sublotos de gránulos se recogieron en bandejas de secado previamente taradas. Los materiales recogidos se pulverizaron uniformemente sobre una bandeja y se secó el material en un horno para formar gránulos secados. Los gránulos secados se colocaron en un K-tron para restringir la carga de manera continua en un molino de cono y posteriormente se molieron.

Mezclado extragranular y proceso de compresión

- El proceso de mezclado extragranular y compresión se llevó a cabo mediante los procedimientos descritos a continuación: Se pesó la cantidad de los excipientes extragranulares basándose en la composición de la mezcla de compresión. Los excipientes pesados se tamizaron usando un Comil U5 con un tamiz 32C y un propulsor de barra redonda a 1000 rpm. Los gránulos molidos del compuesto (1) se añadieron en primer lugar a la mezcladora que contenía Avicel PH-102 y Ac-Di-Sol tamizados. Se mezclaron durante 8 minutos a 16 RPM. Se tamizó el estearil sodio (SSF) a través de un tamiz manual de malla 50 en un recipiente adecuado. Se colocó una porción de la mezcla extragranular igual a aproximadamente 10 veces en masa la cantidad de SSF en el recipiente con el SSF y se mezcló en la bolsa durante 30 segundos antes de añadir la mezcla a la cuba de la mezcladora. Después, todos los materiales se mezclaron durante 2 minutos a 16 rpm. Después, se comprimió la mezcla final de acuerdo con los parámetros del proceso de compresión de comprimidos indicados.

Proceso de recubrimiento con película

- 50 Se aplicó un recubrimiento con película a los núcleos de comprimido con un recubridor de bandeja Vector VPC 1355 en forma de una suspensión acuosa al 15 % p/p de Opadry II blanco n.º 33G. La cantidad diana del recubrimiento de película fue del 3,0 % p/p del peso del núcleo del comprimido, con un intervalo aceptable del 2,5 % al 3,5 %. Para lograr esto, se roció una cantidad de suspensión de recubrimiento equivalente a una ganancia de peso del 3,2 %, lo que proporcionó un 3,0 % de recubrimiento, suponiendo una eficacia del recubrimiento del 95 %.

Formulaciones intravenosas (IV) del compuesto (1)

- 60 Se suministró para administración intravenosa (IV) la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2 H₂O (en lo sucesivo, sencillamente compuesto (1) para el ejemplo 6) en forma de una solución de 2 mg/ml. La composición de la solución, junto con la referencia de calidad y la función de cada componente se proporcionan en las tablas 16A y 16B.

Tabla 16A: Composición del vehículo de solución^a.

Componente	Estándar de calidad	Función del componente	Cantidad (mg/50g de solución IV)	Contenido (% p/p)
Fosfato de sodio monobásico, anhidro	USP	Agente tamponador	26	0,052
Fosfato de sodio dibásico, heptahidrato	USP	Agente tamponador	1281	2,562
Dextrosa, anhidra	USP	Modificador de la tonicidad	500	1,000
Agua para inyección	USP	Disolvente	48.193	96,386
Total	--	--	50.000	100 %
Abreviaturas: USP, Farmacopea de los Estados Unidos				
^a Se ajustará el pH de la solución con NaOH o HCl				

Tabla 16B: Composición de solución intravenosa del compuesto (1)^a.

Componente	Función del componente	Cantidad (mg/50 g de solución IV)	Contenido (% p/p)
Compuesto (1) ^b	Sustancia farmacológica	111	0,222
Vehículo de solución (de la tabla 1)	Disolvente	49.889	99,778
Total	--	50.000	100 %
^a Se ajustó el pH de la solución con NaOH o HCl La densidad de la solución es de 1,000 g/cm ³ .			
^b El fármaco fue un semihidrato de la sal de HCl. La cantidad de fármaco se calculó basándose en el equivalente de base libre anhidra activa, donde el factor de conversión de la base libre a la sal de HCl de semihidrato es de 1,11.			

5 Ejemplo 7: Ensayo *in vivo* para la combinación del compuesto (1) con o sin oseltamivir

Se trató a ratones infectados con vehículo o niveles de dosis en aumento de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2 H₂O en combinación con la dosis clínicamente relevante de oseltamivir, comenzando 48 horas después de la exposición a gripe A o 2 horas antes de la exposición a gripe B.

10 *Métodos:* En estos estudios, se formuló la forma A de sal de HCl del semihidrato del compuesto (1) (en lo sucesivo simplemente compuesto (1) para el ejemplo 7) en un vehículo que contenía MC al 0,5 % (p/v) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), proporcionando una suspensión homogénea y la dosis del compuesto se basó en la sal de HCl del semihidrato del compuesto (1). El oseltamivir se formuló en agua destilada desionizada, proporcionando una
15 suspensión homogénea. Se formuló la combinación del compuesto (1) con oseltamivir en un vehículo que contenía MC al 0,5 % (p/v). Las formulaciones de combinación se prepararon al comienzo de cada estudio y se almacenaron a 4 °C durante hasta 10 días, con agitación en la oscuridad. Todas las formulaciones y vehículos se administraron a ratones por sonda oral en un volumen de dosis de 10 ml/kg.

20 Se anestesió a ratones Balb/c macho (5-7 semanas, 17-19 gramos) y se les inoculó una dosis letal de virus de la gripe adaptado para ratones A/PR/8/34 o B/Mass/3/66 mediante instilación intranasal. Se reclutó a ocho ratones por cada grupo de estudio. Los tratamientos se iniciaron +48 horas después de la inoculación para la gripe A o 2 horas antes de la inoculación para la gripe B. Se administraron vehículo (10 ml/kg) y compuesto (1) a dosis de 0,1 -10 mg/kg solo o en combinación con 10 ml/kg de oseltamivir por vía oral (PO) dos veces al día (BID) durante 10 días en
25 el estudio de gripe A. Se administraron vehículo (10 ml/kg) y compuesto (1) a dosis de 1 10 mg/kg solo o en combinación con 10 ml/kg de oseltamivir por vía oral (PO) dos veces al día (BID) durante 10 días en el estudio de gripe B. Se pesó a los ratones y se les observó a diario respecto de signos de morbilidad durante 21 días después de la infección. Además, se monitorizó la función pulmonar mediante WPB sin restricción (Buxco, Troy, NY).

30 Se obtuvieron gripe A/PR/8/34 (VR-1469) y gripe B/Mass/3/66 (VR-523) de la ATCC (Manassas, VA). Se prepararon soluciones madre mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. En resumen, se pasó el virus a una baja multiplicidad de infección en células de riñón canino Madin-Darby (células MDCK, CCL-34, ATCC), se recogió el sobrenadante después de aproximadamente 48 horas y se centrifugó a 650 x g durante 10 minutos. Se congelaron reservas del virus a -80 °C hasta su uso. Se calcularon los títulos de virus (TCID₅₀/ml) mediante el método
35 Spearman-Karger después de diluir en serie la muestra del virus, infectando cultivos de MDCK replicados y midiendo el efecto citopático (CPE) basándose en el contenido de ATP a las 96 horas (CellTiter-Glo, Promega, Madison WI).

Se pesó a los ratones a diario durante 21 días después de la infección. Los datos de peso corporal se analizaron

usando ANOVA de dos vías y prueba posterior de Bonferroni para comparar los grupos. Valores de P menores de 0,05 se consideraron significativos.

5 Se observó a los ratones a diario durante 21 días después de la infección por gripe. Cualquier ratón con una puntuación positiva durante cuatro de las seis observaciones siguientes (pérdida de PC >35 %, pelaje erizado, postura encorvada, dificultad respiratoria, movilidad reducida o hipotermia) se consideró moribundo, después se le sacrificó y se clasificó como muerte de acuerdo con las guías establecidas por el Vertex Institutional Animal Care and Use Committee. Los datos de supervivencia se analizaron usando el método de Kaplan-Meier.

10 Se sometió a los ratones a WBP sin restricción (Buxco, Troy, NY). La función se expresa como pausa mejorada (Penh), un valor adimensional calculado que refleja la resistencia pulmonar. Este valor se obtiene a partir de los cambios en la presión del recipiente contenedor que fluctúa a consecuencia de los cambios en el patrón de respiración del animal. La broncoconstricción de las vías respiratorias del animal afectará al flujo de aire y, por lo tanto, a la presión en el recipiente contenedor. Se efectúa un seguimiento de los cambios en la presión durante la expiración (PEP) y la inspiración (PIP). Los valores de Penh se calcularon de acuerdo con la fórmula $Penh = \text{pausa} \times PEP/PIP$, donde "pausa" refleja el tiempo de la expiración. Se aclimató a los ratones en la cámara de pletismografía durante 15 minutos, después se recogieron datos a intervalos de un minuto, se promediaron a lo largo de 10 minutos y se expresaron como valores de Penh absolutos. Los datos se analizaron usando ANOVA de dos vías y prueba posterior de Bonferroni para comparar los grupos. Valores de P menores de 0,05 se consideraron significativos.

20 **Resultados:** El compuesto (1) se evaluó en combinación con oseltamivir para determinar su capacidad para prevenir la mortalidad y la morbilidad, reducir la pérdida de PC y prevenir y/o restaurar la función pulmonar en un modelo murino de infección pulmonar por gripe frente al tratamiento solo con compuesto (1) u oseltamivir. La combinación no mostró efectos perjudiciales en la eficacia de cada uno de los fármacos en comparación con cada fármaco administrado individualmente. Además, el tratamiento de combinación mostró sinergia en el tratamiento de la gripe A ya que la dosis de fallo para cada compuesto individualmente (0,3 y 10 mg/kg de compuesto (1) y oseltamivir, respectivamente) cuando se combinaron, aumentó la supervivencia de un 0 a un 100 por ciento. El compuesto (1) tiene poca actividad contra la gripe B *in vivo* (tal como se esperaba de los datos *in vitro* disponibles) y no interfiere con la eficacia del oseltamivir.

30 **Modelo de ratón de gripe A:** Todos los controles tratados con vehículo sucumbieron a la enfermedad en los días 9 u 10. El tratamiento con 1, 3 y 10 mg/kg solo de compuesto (1) BID proporcionó protección completa frente a la muerte, menor pérdida de PC y una función pulmonar recuperada cuando se inició la dosis +48 horas después de la infección en comparación con los controles de vehículo (tabla 17). El tratamiento con 0,1 y 0,3 mg/kg de compuesto (1) y 10 mg/kg de oseltamivir administrado solo no protegió frente a la muerte, ni redujo la pérdida de PC ni restauró la función pulmonar cuando se inició el tratamiento +48 horas después de la infección por gripe A. Curiosamente, 0,3 mg/kg de compuesto (1) y oseltamivir administrados conjuntamente +48 horas después de la infección por gripe A proporcionó una protección completa frente a la muerte, menor pérdida de PC y función pulmonar restaurada.

40 Tabla 17: Datos de eficacia *in vivo* del compuesto (1) con o sin oseltamivir administrado + 48 horas después de la infección por gripe A.

Combinación de compuesto (1)/oseltamivir en la gripe A						
Oseltamivir mg/kg	0			10		
Compuesto (1) mg/kg	Supervivencia (21 días) (%)	Pérdida de peso (Día 8) (%)	Penh (Día 3)	Supervivencia (21 días) (%)	Pérdida de peso (Día 8) (%)	Penh (Día 3)
0	0	33,9	2,28	0	32,0	2,36
0,1	0	34,2	2,15	0	31,6	2,09
0,3	0	32,4	1,90	100	29,3	1,80
1	100	28,2	2,11	100	23,4	1,23
3	100	22,2	1,68	100	17,6	1,11
10	100	14,6	0,95	100	8,4	0,79

45 **Modelo de ratón de gripe B:** Todos los controles tratados con vehículo sucumbieron a la enfermedad en los días 7 u 8. La administración de 1, 3 o 10 mg/kg de compuesto (1) solo -2 h antes de la infección por gripe B y continuada BID durante 10 días no proporcionó una protección significativa contra la morbilidad, la pérdida de PC o la pérdida de función pulmonar en comparación con los controles. El oseltamivir administrado a 10 mg/kg solo o junto con 1, 3 o 10 mg/kg de compuesto (1) -2 h antes de la infección por gripe B proporcionó protección completa frente a la muerte, redujo la pérdida de PC y restauró la función pulmonar (tabla 18).

50

Tabla 18: Datos de eficacia *in vivo* del compuesto (1) con o sin oseltamivir administrado + 48 horas después de la infección por gripe B.

Combinación de compuesto (1)/oseltamivir en la gripe B						
Oseltamivir mg/kg	0			10		
Compuesto (1) mg/kg	Supervivencia (21 días) (%)	Pérdida de peso (Día 8) (%)	Penh (Día 6/7)	Supervivencia (21 días) (%)	Pérdida de peso (Día 8) (%)	Penh (Día 6/7)
0	0	ND	2,20	100	12,8	1,08
1	0	33,6	1,90	100	7,7	1,26
3	0	33,9	2,06	100	11,5	1,41
10	0	33	2,04	100	9,7	1,17

Ejemplo 8: Ensayo *in vivo* para la combinación del compuesto (1) con oseltamivir

5 Se trató a ratones infectados con vehículo o niveles de dosis crecientes de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1)*1/2 H₂O (en lo sucesivo, simplemente compuesto (1) para el ejemplo 8) en combinación con
 10 zanamivir comenzando 24 horas antes de la exposición a gripe A con 5x10³ TCID₅₀ de A/PR/8/34. Las suspensiones de exposición a gripe A y de compuesto (1) se prepararon de un modo similar al descrito anteriormente en el ejemplo 7. Se trató a los ratones expuestos una vez por vía IN (intranasal) con zanamivir a 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg 24 horas antes de la exposición IN con 5x10³ TCID₅₀ de A/PR/8/34 y con el compuesto (1) a 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg o 1 mg/kg BID durante 10 días, comenzando -2 horas antes de la exposición con 5x10³ TCID₅₀ de A/PR/8/34.

15 Los resultados se resumen en las tablas 19A y 19B más adelante. Tal como se muestra en la tabla 19A a continuación, la terapia de combinación con compuesto (1) y zanamivir proporcionó un beneficio de supervivencia extra (tabla 19A). El cociente de eficacia, una medida compuesta de supervivencia, pérdida de peso corporal y función pulmonar (% de supervivencia/(% de pérdida de peso corporal en el día 8)*(Penh en el día 6)) se resume en la tabla 19B.

Tabla 19A: Tasa de supervivencia: Terapia de combinación de compuesto (1) con zanamivir.

		1ª dosis de compuesto (1) (mg/kg, BID) 2 h antes de la infección			
		0	0,1	0,3	1
Zanamivir (mg/kg, IN x 1), 1ª dosis 24 h antes de la infección	0	0	12,5	44,4	100
	0,3	37,5	0	100	100
	1	50	75	100	100
	3	62,5	100	100	100

20 Tabla 19B: Cociente de eficacia: Terapia de combinación de compuesto (1) con zanamivir.

		1ª dosis de compuesto (1) (mg/kg, BID) 2 h antes de la infección			
		0	0,1	0,3	1
Zanamivir (mg/kg, IN x 1), 1ª dosis 24 h antes de la infección	0	--	--	0,59	2,32
	0,3	0,44	--	1,35	2,97
	1	0,73	1,00	1,61	2,31
	3	0,73	1,30	1,48	4,28

Ejemplo 9: Eficacia profiláctica y después de la infección del compuesto (1) en el modelo de infección por gripe A de ratón

25 Materiales y métodos

Animales: Se obtuvieron ratones BALB/c hembra de 18-20 g de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) para el experimento antivírico. Se mantuvo a los animales con comida de roedor estándar y agua corriente a voluntad. Se les sometió a cuarentena durante 48 horas antes de su uso.

30 *Virus:* Se obtuvo virus de la gripe A/California/04/2009 (pndH1N1) adaptado para ratones de la Dra. Elena Govorkova (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN). La solución madre del virus se amplificó en células MDCK, seguido de titulación de la letalidad en ratones BALB/c. Se obtuvo virus de la gripe A/Victoria/3/75 (H3N2) de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). El virus se pasó siete veces en ratones para adaptarlo a ratones, seguido de un pase en células MDCK. Posteriormente, se tituló la letalidad del virus en ratones
 35

BALB/c para obtener la dosis de exposición letal adecuada. Se obtuvo virus de la gripe A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) del Dr. Jackie Katz de Centers for Disease Control (Atlanta, GA). Se expuso a los ratones a una dosis letal del virus (5 MLD50, 5 UFP/ratón), que previamente había causado la muerte entre los días 6-13, con una mortalidad del 90-100 % en el día 10 con esta dosis.

5 *Compuestos:* Se obtuvo oseltamivir (como Tamiflu®) de una farmacia local. Cada cápsula de Tamiflu contiene 75 mg del componente activo, oseltamivir carboxilato, tras el metabolismo en el organismo. La dosis de oseltamivir se basó en esta medida. Se usó la forma A de semihidrato de sal de HCl del compuesto (1) (en lo sucesivo, simplemente compuesto (1) para el ejemplo 9) y la dosis del compuesto se basó en el semihidrato de la sal de HCl del compuesto (1). Tanto el compuesto (1) como el oseltamivir se prepararon en metilcelulosa al 0,5 % (Sigma, St. Louis, MO) para administración por sonda oral (p.o.) a ratones.

15 *Diseño experimental:* Se anestesió a los ratones por inyección intraperitoneal de ketamina/xilazina (50/5 mg/kg) y se infectó a los animales por vía intranasal con una suspensión de 90 µl del virus de la gripe. La exposición al virus fue aproximadamente cuatro dosis infecciosas letales en ratones al 50 %. Los tratamientos se administraron dos veces al día (a intervalos de 12 horas) durante 10 días, comenzando 2 horas antes de la exposición al virus o 48 horas después de la exposición, como se indica. Los parámetros para evaluar la infección fueron supervivencia, día medio de la muerte, cambios de peso corporal y parámetros de infección pulmonar (puntuación de hemorragia, peso y título vírico). Se pesó a los animales de manera individual cada dos días hasta el día 21 de la infección. Se consideró que los ratones que murieron durante los seis primeros días del periodo de tratamiento habían muerto por causas distintas de la infección por virus de la gripe y se excluyeron de los recuentos totales.

25 Para evaluar los parámetros de infección pulmonar, se recogieron los pulmones de los animales sacrificados (inicialmente, 5 animales por gripe separados para este fin). Se evaluó la puntuación de hemorragia pulmonar mediante inspección visual de los cambios de color, de rosa a violáceo. Esto se produce regionalmente en los pulmones, en lugar de mediante un cambio gradual del pulmón al color más oscuro. Las puntuaciones de hemorragia variaron de 0 (normal) a 4 (todo el pulmón mostrando un color violáceo) y por lo tanto, es una medida no paramétrica. Se pesaron los pulmones y después se congelaron a -80 °C. Después, se homogeneizaron los pulmones descongelados en 1 ml de medio de cultivo celular, se centrifugaron los fluidos del sobrenadante para eliminar el material en partículas y se volvieron a congelar las muestras líquidas a -80 °C. Después de preparar placas de 96 pocillos de células MDCK, se descongelaron las muestras, se diluyeron en serie en incrementos de dilución de factor 10 y se titularon mediante el método de dilución de criterio de valoración en las placas (1) usando 4 micropocillos por dilución. Los títulos víricos se calcularon en forma del log10 de las dosis infecciosas de cultivo celular al 50 % por gramo de tejido pulmonar (log10 CCID50/g).

35 *Análisis estadístico:* Se analizaron las comparaciones para múltiples grupos de Kaplan-Meier mediante la prueba de rangos logarítmicos de Mantel-Cox para determinar la significación estadística. Posteriormente, se efectuaron comparaciones emparejadas mediante el método de Gehan-Breslow-Wilcoxon. La significación experimental relativa se ajustó a un umbral de significación corregido de Bonferroni basándose en el número de comparaciones de tratamiento efectuadas. La media del día de la muerte y la media de la puntuación de hemorragia pulmonar se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Los pesos corporales medios, los pesos pulmonares, y el log 10 de los títulos de virus en el pulmón se evaluaron mediante ANOVA suponiendo una varianza igual y una distribución normal. Después de la ANOVA, se compararon los valores de tratamiento individuales mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Los análisis se efectuaron usando el programa Prism® (GraphPad Software, San Diego, CA).

Resultados y discusión

50 Se investigó la respuesta a la dosis profiláctica del compuesto (1) se investigó en el modelo de gripe A de ratón. La dosificación con vehículo o compuesto (1) se inició 2 h antes de la infección y se continuó dos veces al día durante 10 días. Los resultados se resumen en las tablas 20 y 21. Todos los ratones que recibieron solo vehículo sucumbieron a la infección en el día 9 del estudio y habían perdido, de media, ~32 % de su peso corporal (PC). El compuesto (1) administrado a 1, 3 o 10 mg/kg BID proporcionó una supervivencia completa y una reducción dependiente de la dosis en la pérdida de PC. El compuesto (1) administrado a 0,3 mg/kg BID proporcionó cierto beneficio de supervivencia (2/8 ratones) aunque los ratones tuvieron una pérdida de PC significativa. En el mismo experimento, se dosificó a los ratones oseltamivir a 10 mg/kg BID, una dosis clínicamente equivalente a la humana (basándose en la ABC). Todos los ratones a los que se administró oseltamivir sobrevivieron con un perfil de pérdida de peso similar al de los ratones a los que se administró 1 mg/kg BID de compuesto (1).

60 El compuesto (1) aún proporcionó eficacia en este modelo, expuestos a virus de la gripe A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) cuando se administró 48 horas después de la infección, con dosis BID continuada durante 10 días (tabla 22). La dosis de compuesto (1) a 10 mg/kg proporcionó protección completa, tal como se muestra en la tabla 20.

65

Tabla 20: Efectos de la profilaxis con compuesto (1) y Oseltamivir en una infección por virus de la gripe A/California/04/2009 (pndH1N1) en ratones BALB/c (profilaxia).

Compuesto (mg/kg) ^a	Supervivientes /Total	MDD ^b ± DT	Parámetros pulmonares medios (día 6)		
			Puntuación	Peso (mg)	Título vírico ^c
Compuesto 1 (10 mg/kg)	10/10 ^{***}	-	0,2 ± 0,4 ^{**}	132 ± 20 ^{***}	<2 6 ^{d***}
Compuesto 1 (3 mg/kg)	9/9 ^{***}	-	0,0 ± 0,0 ^{***}	123 ± 21 ^{***}	3,1 ± 0,9 ^{***}
Compuesto 1 (1 mg/kg)	10/10 ^{***}	-	0,6 ± 0,9 ^e	246 ± 21 [*]	5,5 ± 1,2 ^{***}
Oseltamivir (10 mg/kg)	10/10 ^{***}	-	1,0 ± 0,0 ^e	178 ± 28 ^{***}	7,9 ± 0,2
Placebo	2/20	9,9 ± 1,3	3,4 ± 0,5	282 ± 26	7,9 ± 0,4

^a Dosis por tratamiento, administrada dos veces al día durante 10 días comenzando 2 horas antes de la exposición al virus.
^b Día medio de la muerte de ratones que murieron en el día 21 o antes.
^c Log₁₀ CCID₅₀/g.
^d Por debajo del límite de detección (2,6 log 10).
^e No significativo, debido a la muy rigurosa prueba de comparación múltiple de Dunn, pero de manera significativa frente al placebo (P<0,01) mediante la prueba de la U de Mann-Whitney de dos colas. * P<0,05, ** P<0,01, *** P0,001, en comparación con placebo.

Tabla 21: Efectos del compuesto (1) y Oseltamivir en una infección por virus de la gripe A/Victoria/3/75 (H3N2) en ratones BALB/c (profilaxia).

Compuesto (mg/kg) ^a	Supervivientes/ Total	MDD ^b ± DT	Parámetros pulmonares medios (día 6)		
			Puntuación	Peso (mg)	Título vírico ^c
Compuesto 1 (10 mg/kg)	10/10 ^{***}	-	0,1 ± 0,2 ^d	164 ± 11 ^{**}	6,1 ± 0,5 ^{***}
Compuesto 1 (3 mg/kg)	10/10 ^{***}	-	3,3 ± 0,6 ^e	260 ± 25	7,2 ± 0,2
Compuesto 1 (1 mg/kg)	4/10	9,8 ± 1,9	3,2 ± 0,3 ^e	274 ± 49	7,3 ± 0,3
Oseltamivir (10mg/kg)	9/10 ^{***}	7,0	1,7 ± 1,1	218 ± 24	7,0 ± 0,3 ^{**}
Placebo	3/20	9,8 ± 2,1	2,2 ± 0,6	264 ± 54	7,8 ± 0,4

^a Dosis por tratamiento, administrada dos veces al día durante 10 días comenzando 2 horas antes de la exposición al virus.
^b Día medio de la muerte de ratones que murieron en el día 21 o antes.
^c Log₁₀ CCID₅₀/g.
^d No significativo, debido a la muy rigurosa prueba de comparación múltiple de Dunn, pero de manera significativa frente al placebo (P<0,01) mediante la prueba de la U de Mann-Whitney de dos colas.
^e Igual que la nota al pie "d", pero significativo respecto a placebo a nivel de P<0,05. ** P<0,01, *** P<0,001, en comparación con placebo.

5 Tabla 22: Efectos del tratamiento (+48h) con compuesto (1) y Oseltamivir en una infección por virus de la gripe A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) en ratones BALB/c.

Compuesto (mg/kg) ^a	Supervivientes/ Total	MDD ^b ± DT	Parámetros pulmonares medios (día 6)	
			Peso (mg)	Título vírico ^c
Compuesto 1 (10mg/kg)	10/10	>21	0,15 ± 0,02	3,75 ± 0,94
Oseltamivir (10mg/kg)	0/10	9,5 ± 1,2	0,17 ± 0,02	5,22 ± 0,38
Placebo	0/20	9,9 ± 0,8	0,16 ± 0,02	4,65 ± 1,23

^a Dosis por tratamiento, administrada dos veces al día durante 10 días comenzando 2 horas antes de la exposición al virus.
^b Día medio de la muerte de ratones que murieron en el día 21 o antes.
^c Log₁₀ CCID₅₀/g.

Ejemplo 10: Eficacia *in vitro* del compuesto (1) contra una serie de cepas de gripe

- 10 **Células y virus.** Se obtuvieron células de riñón canino Madine Darby (MDCK) originariamente de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y se pasaron usando técnicas de laboratorio estándar, antes de su uso en ensayos de infección. Las células se mantuvieron a 37 °C en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), L glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen). El virus de la gripe se obtuvo de la ATCC, la Virus Surveillance and Diagnosis Branch de la Influenza Division del Centers for Disease Control and Prevention (CDC; Atlanta, GA) o la Influenza Reagent Resource, Influenza Division, WHO Collaborating Center for Surveillance, Epidemiology and Control of Influenza, CDC. Para generar las soluciones madre de virus, se
- 15

infectaron células MDCK con una baja multiplicidad de infección (MDI) en DMEM complementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomycin y 1 µg por ml de tripsina tratada con tolisulfonil fenilalanil clorometil cetona (TPCK) (USB Corp.; Santa Clara, CA). Las células se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 48 h, tiempo tras el cual se recogió el sobrenadante por centrifugación a 900 x g durante 10 min con una centrifugadora GS-6R. Se separaron las soluciones madre de virus en alícuotas y se congelaron a -80 °C.

Compuestos. Base libre o sal de HCl del compuesto (1) (por ejemplo, sal de HCl amorfa del compuesto (1), semihidrato de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1), se disolvió la base libre amorfa del compuesto (1)) (en lo sucesivo, simplemente compuesto (1) para el ejemplo 10) en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 % para preparar una solución con una concentración de 10 mM.

Actividad antivírica. Se evaluó la actividad antivírica del compuesto (1) en células MDCK midiendo los niveles de ATP usando CellTiter-Glo (Promega; Madison, WI). Se sembraron células MDCK en placas de 384 pocillos negras de fondo transparente, hasta una densidad de 2x10⁴ células por pocillo en 50 µl de VGM. Las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 %, en saturación de humedad para permitir que se adhieren las células y formasen una monocapa. Tras 5 h, se retiraron 40 µl y se añadieron 15 µl de virus a una MDI de 0,005. El compuesto se añadió en 25 µl de una dilución de factor tres de diez puntos en DMEM con suplementos (concentración final de DMSO del 0,5 %). Los controles internos consistieron en pocillos que contenían solo células y células no tratadas infectadas con el virus. Después de una incubación de 72 horas, se añadieron 20 µl de CellTiter-Glo a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. La luminiscencia se midió usando un lector multimarcador EnVision (PerkinElmer; Waltham, MA). Se calcularon los valores de CE50 (concentración de compuesto que asegura una viabilidad celular del 50 % del control no infectado) ajustando los datos de dosis de compuesto frente a respuesta usando un método de ajuste de curva de 4 parámetros que emplea el algoritmo de Levenburg-Marquardt (programa informático Condoseo; Genedata, Basilea, Suiza). Se llevaron a cabo pruebas *in vitro* de hpaiH5N1 en Southern Research Institute con un nivel de seguridad BSL-3.

Como se muestra en la Tabla 23 a continuación, el compuesto (1) mostró una potente actividad contra todas las cepas de la gripe A ensayadas, incluyendo las cepas de referencia H1N1 y H3N2 de 1934 a 2009, así como las cepas pandémicas de H1N1 de 2009 A/California/07/2009, A/Texas/48/2009 y la cepa H5N1 aviar altamente patógena A/VN/1203/2004. El compuesto (1) fue igualmente eficaz contra todas las cepas, incluyendo aquellas resistentes a la amantadina y a inhibidores de neuraminidasa. Mostró actividad contra el virus de la gripe B.

Tabla 23: Eficacia del compuesto (1) contra un panel de cepas de gripe.

Cepa de gripe	Cepa de Inf. virus	Subtipo	Ensayo de protección celular ^e CE ₅₀ ± DT
			Comp (1) (nM)
A/WS/33 ^a	A	H1N1	3,2 ±4,3
A/NWS/33 ^a	A	H1N1	0,73 ±0,10
A/Puerto Rico/8/34 ^a	A	H1N1	3,2 ± 1,8
A/Weiss/43 ^a	A	H1N1	0,31 ±0,23
A/FM/1/47	A	H1N1	0,57 ±0,036
A/Mal/302/54	A	H1N1	0,57 ±0,055
A/Denver/1/57	A	H1N1	0,42 ±0,19
A/Chelyabinsk/1/2006	A	H1N1	0,70 ± 0,49
A/Florida/3/2006	A	H1N1	0,92 ± 1,5
A/Fukushima/141/2006	A	H1N1	0,18 ±0,20
A/Georgia/17/2006	A	H1N1	0,13 ±0,048
A/Georgia/20/2006 ^b	A	H1N1	2,6 ±3,8
A/Missouri/3/2006	A	H1N1	0,21 ±0,060
A/St. Petersburg/8/2006 ^a	A	H1N1	0,88 ± 0,69
A/Virginia/01/2006 ^a	A	H1N1	0,42 ± 0,24
A/Cambodia/0371/2007 ^{a*}	A	H1N1	0,61 ±0,33
A/South Dakota/6/2007	A	H1N1	0,31 ±0,25
A/California/07/2009 NYMCX-179A ^a	A	H1N1	2,7 ± 1,8
A/Aichi/2/68	A	H3N2	1,4 ± 1,1
A/Hong Kong/8/68	A	H3N2	0,60 ±0,11
A/Port Chalmers/1/73 ^a	A	H3N2	0,54 ±0,11

(continuación)

Cepa de gripe	Cepa de Inf. virus	Subtipo	Ensayo de protección celular ^e CE ₅₀ ± DT
A/Victoria/3/75	A	H3N2	1,3 ± 0,63
A/Wisconsin/67/2005 ^a	A	H3N2	1,8 ± 0,24
A/Hawaii/2/2006	A	H3N2	1,4 ± 0,91
A/Nebraska/1/2006 ^{a*}	A	H3N2	2,1 ± 1,3
A/Texas/12/2007 ^{a*c}	A	H3N2	0,65 ± 0,22
A/Uruguay/716/2007 ^a	A	H3N2	3,5 ± 5,1
A/New Jersey/8/76	B	H1N1	0,20 ± 0,096
A/California/07/2009 ^a	C	H1N1	1,8 ± 1,6
A/Mexico/4108/2009 ^a	C	H1N1	2,7 ± 1,8
A/New York/18/2009	C	H1N1	0,59 ± 0,40
A/Texas/48/2009 ^b	C	H1N1	2,8 ± 3,2
A/Virginia/ATCC2/2009	C	H1N1	1,9 ± 3,0
A/Virginia/ATCC3/2009	C	H1N1	1,9 ± 3,2
A/Swine/Iowa/15/30	C	H1N1	0,65 ± 0,082
A/Swine/1976/31	C	H1N1	0,47 ± 0,11
A/Equine/2/Miami/63	C	H3N8	0,50 ± 0,065
A/Vietnam/1203/2004 ^a	K	H5N1	<1,5 ± ND
B/Lee/40			>10 ± ND
B/Russia/69			>10 ± ND

^a: resistencia a amantadina: mutación M2 3 IN.
^b: resistencia a oseltamivir carboxilato: mutación NA 275Y.
^c: resistencia a oseltamivir carboxilato: mutación NA 119V.
*: resistencia fenotípica validada externamente, datos de secuencia no disponibles.

Ejemplo 11: Experimentos de combinación *in vitro* con compuesto (1) y oseltamivir, zanamivir o favipiravir

- 5 Se probó una solución del compuesto (1) (base libre o sal de HCl del compuesto (1) de manera similar al ejemplo 10) en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 % en un ensayo basado en CPE en células MDCK de tres días, infectadas con A/Puerto Rico/8/34 a una MDI de 0,01, en experimentos de combinación con el inhibidor de neuraminidasa oseltamivir carboxilato y zanamivir o el inhibidor de polimerasa, T-705. Se disolvieron el oseltamivir carboxilato y T-705 en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 %; el zanamivir se disolvió en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)
- 10 a una concentración de 10 mM y se almacenó a -20 °C. El estudio empleó el método de independencia de Bliss (Macsynergy) (por ejemplo, Prichard, M.N. y C. Shipman, Jr., *Antiviral Res*, 1990. 14(4-5): p. 181-205) o el método de aditividad/mediana de efecto de Loewe (por ejemplo, Chou, T.C. y P. Talalay, *Adv Enzyme Regul*, 1984.22: págs. 27-55). El método de independencia de Bliss implica probar diferentes combinaciones de concentración de inhibidores de un modo en damero, mientras que el método de independencia de Loewe implica probar una
- 15 combinación en proporciones fijas de inhibidores, a diferentes diluciones de la proporción fija. También se llevaron a cabo experimentos combinaciones del compuesto (1) consigo como control, confirmando la avidéz. La viabilidad celular se determinó usando CellTiter-Glo.

- El método de independencia de Bliss dio como resultado volúmenes de sinergia de 312 y 268 para oseltamivir
- 20 carboxilato y zanamivir, respectivamente; y se obtuvo un volumen de sinergia de 317 para favipiravir. Los volúmenes de sinergia mayores de 100 se consideran generalmente sinergia fuerte y los volúmenes entre 50 y 100 se consideran sinergia moderada. El método de aditividad de Loewe produjo valores de I.C. (índice de combinación) de 0,58, 0,64 y 0,89 a un nivel de efecto del 50 % para oseltamivir, zanamivir y T-705, respectivamente. Los valores de I.C. menores de 0,8 se consideran una fuerte sinergia, mientras que los valores entre 0,8 y 1,0 se consideran de
- 25 aditivo a levemente sinérgico. Estos datos en conjunto, como se muestra en la tabla 24, sugieren que el compuesto (1) es sinérgico con los inhibidores de neuraminidasa y el inhibidor de polimerasa ensayados.

Tabla 24: Resumen de experimentos de sinergia y antagonismo *in vitro*.

Aditividad de Loewe	Índice de combinación			Resultado
	DE ₅₀	DE ₇₅	DE ₉₀	
Compuesto (1) + oseltamivir	0,60, 0,56	0,57, 0,56	0,59, 0,58	Fuerte sinergia
Compuesto (1) + zanamivir	0,68, 0,61	0,67, 0,66	0,71, 0,77	Fuerte sinergia

(continuación)

Aditividad de Loewe	Índice de combinación			Resultado
	DE₅₀	DE₇₅	DE₉₀	
Compuesto (1) + favipiravir	0,83, 0,96	0,76, 1,0	0,71, 1,1	Aditividad hasta sinergia débil
Independencia de Bliss	Volumen de sinergia, confianza al 95 %			Resultado
Compuesto (1) + oseltamivir	312			Fuerte sinergia
Compuesto (1) + zanamivir	268			Fuerte sinergia
Compuesto (1) + favipiravir	317			Fuerte sinergia
DE ₅₀ , DE ₇₅ , DE ₉₀ : Concentración de compuesto a la cual un 50 %, 75 % o 90 %, respectivamente, de las células están protegidas; Los índices de combinación se calcularon a los niveles de efecto de DE ₅₀ , DE ₇₅ y DE ₉₀ .				

Ejemplo 12: Eficacia en el modelo de infección por gripe A de ratón

5 Se investigó en el modelo de gripe A de ratón la respuesta a una dosis profiláctica de compuesto (1) (como semihidrato de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1) (en lo sucesivo en este ejemplo, compuesto (1)). La dosificación con vehículo o compuesto (1) se inició 2 h antes de la infección y se continuó dos veces al día durante 10 días. Todos los ratones que recibieron solo vehículo sucumbieron a la infección en el día 9 del estudio y habían perdido, de media, 32 % de su peso corporal (PC). El compuesto (1) administrado a 1, 3 o 10 mg/kg BID proporcionó una supervivencia completa y una reducción dependiente de la dosis en la pérdida de PC. El compuesto (1) administrado a 0,3 mg/kg BID proporcionó cierto beneficio de supervivencia (2/8 ratones) aunque los ratones tuvieron una pérdida de PC significativa. En el mismo experimento, se dosificó a los ratones oseltamivir a 10 mg/kg BID, una dosis clínicamente equivalente a la humana (basándose en la ABC). Todos los ratones a los que se administró oseltamivir sobrevivieron con un perfil de pérdida de peso similar al de los ratones a los que se administró 1 mg/kg BID de compuesto (1).

Se investigó el grado hasta el cual podía retrasarse la administración del compuesto (1) y seguir proporcionando eficacia en este modelo exponiendo a los ratones al virus de la gripe A y administrando a los ratones vehículo, oseltamivir o compuesto (1) comenzando 24, 48, 72, 96 o 120 h después de la infección, con dosis BID continuada durante 10 días (tabla 25). Todos los controles de vehículo sucumbieron a la enfermedad en los días 8 o 9 del estudio. El compuesto (1) administrado a 1, 3 o 10 mg/kg BID proporcionó una protección completa frente a la muerte y redujo la pérdida de PC cuando se inició la dosis hasta 72 h después de la infección, en comparación con los controles de vehículo. La dosificación de oseltamivir a 10 mg/kg BID solo proporcionó protección completa cuando se inició la dosificación 24 h o menos, después de la infección. Cuando se retrasó aún más la administración del compuesto, el compuesto (1) a 3 o 10 mg/kg BID proporcionó supervivencia completa a las 96 h después de la infección y protección parcial cuando el inicio de la dosificación se retrasó hasta 120 h después de la infección.

Se investigó la eficacia del compuesto (1) para reducir los títulos víricos pulmonares. Se infectó a ratones con gripe A y 24 horas después, se les administró vehículo, oseltamivir (10 mg/kg BID) o compuesto (1) (3, 10, 30 mg/kg BID) hasta la recogida de los pulmones y la determinación de la carga pulmonar en el día 6 (tabla 26). Todos los grupos a los que se administró compuesto (1) mostraron reducciones robustas y estadísticamente significativas en los títulos víricos pulmonares en comparación con los animales a los que se administró oseltamivir y vehículo.

Para establecer un modelo PK/PD, se infectó a ratones con virus de la gripe durante 24 h y después se les administró compuesto (1) durante 24 h adicionales. Las dosis se fraccionaron en forma de una sola dosis, dos o cuatro dosis administradas cada 12 h o 6 h, respectivamente. Se recogieron los pulmones y plasma para determinar las cargas víricas pulmonares y las concentraciones de compuesto (1). Se representaron los datos de título pulmonar individuales de estas pautas posológicas (q6h, q12h y q24h) frente a los valores de $C_{m\acute{a}x}$, $C_{m\acute{i}n}$ o ABC (datos no mostrados). Aunque había una clara correlación entre la reducción del título vírico y la $C_{m\acute{i}n}$, había poca correlación con la $C_{m\acute{a}x}$ y solo una débil correlación con la ABC. Hubo una fuerte correlación con la $C_{m\acute{i}n}$ cuando las concentraciones medidas del compuesto (1) en plasma se representaron frente a los títulos pulmonares medidos. La reducción semimáxima en los títulos pulmonares (2-3 log) se produce próxima a la CE_{99} desplazada en suero (100 ng/ml). Se observó una correlación similar entre el título vírico y las concentraciones de compuesto (1) medidas en los pulmones (datos no mostrados).

45

Tabla 25: Resumen del porcentaje de supervivencia y porcentaje de pérdida de peso corporal en el modelo de ratón de gripe A.

Tiempo de inicio del tratamiento en relación a la infección (h)	Dosis de compuesto (1) (mg/kg; BID)	Dosis de oseltamivir (mg/kg; BID)	Porcentaje de supervivencia	Porcentaje de pérdida de peso corporal en el día 8 del estudio
-2 ^a	10		100	-2,8
	3		100	-8,7
	1		100	-16,8
	0,3		25	-30,4
	0,1		0	-31,9
			10	100
	0		0	-32,2
+24 ^a	10		100	-6,2
	3		100	-14,2
	1		100	-23,4
		10	100	-28,9
	0		0	-33,8
+48 ^a	10		100	-7,1
	3		100	-10,9
	1		100	-22,5
		10	80	-31,1
	0		0	-34,4
+72 ^a	10		100	-17,4
	3		100	-23,2
	1		100	-29,4
		10	0	-31,3
	0		0	-36,1
+96 ^b	10		100	-25,5
	3		100	-27,3
		10	ND ^c	ND ^c
	0		0	-34,6
+120 ^b	10		37,5	-34,4
	3		12,5	-32,6
		10	ND ^c	ND ^c
	0		0	-34,6

^aLos datos son de experimentos independientes.
^bLos datos son del mismo experimento.
ND^c, no determinado.

Tabla 26: Resumen del título vírico pulmonar y reducción de Log₁₀ en el modelo de ratón de gripe A.

Tratamiento ^a	Estudio 1			Estudio 2		
	Título pulmonar TCID ₅₀ ^b	vírico (Log ₁₀)	Reducción de Log ₁₀ frente a vehículo	Título pulmonar TCID ₅₀ ^b	vírico (Log ₁₀)	Reducción de Log ₁₀ frente a vehículo
10 mg/kg BID de vehículo	6,20			6,28		
10 mg/kg BID de oseltamivir	6,05		-0,15			

(continuación)

Tratamiento ^a	Estudio 1			Estudio 2		
	Título pulmonar TCID ₅₀ ^b	vírico (Log ₁₀)	Reducción de Log ₁₀ frente a vehículo	Título pulmonar TCID ₅₀ ^b	vírico (Log ₁₀)	Reducción de Log ₁₀ frente a vehículo
30 mg/kg BID de compuesto (1)	3,95		-2,25***	4,53***		-1,75
10 mg/kg BID de compuesto (1)				5,20***		-1,08
3 mg/kg BID de compuesto (1)				5,24***		-1,04

^a El tratamiento de los animales se inició 24 horas después de la infección y se continuó durante 5 días.
^b Los títulos víricos pulmonares se determinaron en el día 6 del estudio.
^c ND, no determinado.
ANOVA de 2 vías con prueba posterior de Bonferroni, ***P<0,001.

Ejemplo 13: Prueba de concepto de exposición a gripe

- 5 Anteriormente, se usó un modelo de exposición a gripe vivo atenuado para predecir la eficacia de los antiviricos contra la gripe en la infección natural en seres humanos (Calfee, D.P., Peng, A.W., Hussey, E.K., Lobo, M. y Hayden F.G. Safety and efficacy of once daily intranasal zanamivir in preventing experimental human influenza A infection. *Antivir Ther.* 4, 143-149 (1999); Hayden, F.G. *et al.* Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza. *JAMA* 282, 1240-1246 (1999). Se llevó a cabo un estudio monocéntrico aleatorizado, con doble enmascaramiento y controlado con placebo del semihidrato de la forma A de la sal de HCl del compuesto (1) (en lo sucesivo en este ejemplo, simplemente compuesto (1)) en voluntarios sanos a los que se inoculó la cepa viva del virus de la gripe A/Wisconsin/67/2005 (H3N2). Los sujetos recibieron cinco dosis diarias de placebo (N = 33) o compuesto (1) una vez al día (QD) (en forma de cápsula que consistía en el compuesto (1) puro): 100 mg (N=16), 400 mg (N=19) o 900 mg en el día 1 seguido de 600 mg en los días 2-5 (N=20) o 1200 mg en el día 1 seguido de 600 mg en los días 2-5 (N=18). Los sujetos se sometieron a tres frotis nasales diarios y se les sometió a tres cuestionarios diarios de síntomas clínicos entre los días 1-7 y se les dio el alta de las instalaciones en el día 8, con un seguimiento de seguridad aproximadamente en el día 28. Los frotis nasales se ensayaron respecto de virus de la gripe en cultivo celular (análisis primario) y mediante qRT-PCR (análisis secundario).
- 10
- 15
- 20 Se llevaron a cabo análisis de eficacia en el conjunto de análisis completo (FA), definido como todos los sujetos aleatorizados que recibieron al menos una dosis del fármaco del estudio (compuesto (1) o placebo) y cuyas concentraciones víricas fueron superiores o iguales al límite inferior de cuantificación para el ensayo de cultivo celular de TCID₅₀ en cualquier punto de tiempo entre las 48 h después de la inoculación o cuyo título de inhibición de la hemaglutinación aumentó 4 veces o más respecto de la basal (día 1) en el periodo posterior a la inoculación (N=74). El conjunto de seguridad incluyó todos los sujetos a los que se inoculó la gripe en el día 0 y que recibieron al menos una dosis de placebo o de compuesto (1) (N=104).
- 25

Evaluación de la eficacia

- 30 La medida primaria en este estudio fue demostrar una tendencia de respuesta a la dosis en la ABC de dispersión del virus entre los días del estudio 1 (primer día de administración del fármaco) hasta el 7, medida mediante TCID₅₀ en ensayo de cultivo celular en el grupo FA. Se observó una tendencia de respuesta a la dosis estadísticamente significativa en la ABC de dispersión del virus en los frotis nasales (P = 0,036, prueba de tendencia de Jonckheere-Terpstra). Además, se llevaron a cabo comparaciones por pares entre el grupo de placebo agrupado y cada grupo de dosis de compuesto (1) respecto de la ABC de dispersión del virus, la mediana de la duración de la dispersión y la media de la magnitud de la dispersión vírica máxima (tabla 27). Se observó una reducción estadísticamente significativa de la ABC de dispersión del virus para el grupo de dosis de 1200/600 mg (P=0,010, prueba de la suma de rangos de Wilcoxon) y se observaron reducciones significativas en el máximo de dispersión para el grupo de dosis de 1200/600 mg (FIG. 13), el grupo de dosis de 400 mg y los grupos de dosis de compuesto (1) agrupados. Se llevaron a cabo análisis del grupo FA adicionales (datos no mostrados).
- 35
- 40

La dispersión nasal de la gripe también se cuantificó mediante qRT-PCR y los resultados fueron similares a los observados en cultivo celular. No hubo diferencias en las tasas de seroconversión entre los grupos de dosis de compuesto (1) y placebo, según se definió por un aumento de factor 4 o mayor en el título antigripal respecto del

valor basal antes de la inoculación, lo que sugiere que el compuesto (1) dosificado 24 h después de la inoculación de la gripe no afectó a la velocidad de adquisición de la infección por gripe y no eliminó la posterior respuesta inmunitaria humoral frente a la infección (tabla 28).

- 5 Los sujetos registraron los síntomas clínicos tres veces al día en sus diarios. Se calculó la ABC de las puntuaciones de síntomas clínicos y gripales desde el día 1 hasta el día 7. En comparación con placebo, el grupo de dosis de 1200/600 mg de compuesto (1) mostró una reducción estadísticamente significativa en la mediana de duración de los síntomas clínicos compuestos ($P=0,001$), la mediana de la ABC de síntomas gripales ($P=0,040$) y la mediana de la duración de los síntomas gripales ($P=0,001$) (tabla 28).

10 Tabla 28: Mediana de ABC de dispersión vírica, mediana de la duración de la dispersión y media de la magnitud de la dispersión vírica máxima.

Criterio de valoración [unidades]	Placebo agrupado (N=22)	Compuesto (1)					Agrupado (N=52)
		100 mg (N=12)	400 mg (N=12)	900/600 mg (N=14)	1200/600 mg (N=14)		
Dispersión del virus por cultivo tisular ^a	ABC, mediana (intervalo)	5,85	1,25	0,70	3,20	0,35	0,65
	$[\log_{10} \text{TCID}_{50} \text{ ml}^* \text{ día}]$	(0,0, 17,1)	(0,0, 16,1)	(0,0, 18,0)	(0,0, 16,1)	(0,0, 8,4)	(0,0, 18,0)
	Valor de P^b	NA	0,269	0,206	0,723	0,010	0,057
	Duración, mediana	2,38	0,96	1,60	2,71	0,00	0,71
	(IC del 95 %)[Día]	(0,03, 4,63)	(0,00, 3,39)	(0,00, NA)	(0,00, 4,68)	(0,00, 1,33)	(0,00, 2,43)
	Valor de P^d	NA	0,331	0,831	0,893	0,169	0,487
Dispersión vírica por qRT-PCR ^e	Pico, media (DT)	3,13	2,09	1,73	2,68	1,00	1,87
	$[\log_{10} \text{TCID}_{50} \text{ /ml}]$	(1,878)	(2,209)	(1,976)	(2,201)	(1,365)	(2,002)
	Valor de P^c	NA	0,139	0,049	0,505	0,002	0,015
Dispersión vírica por qRT-PCR ^e	ABC, mediana (intervalo)	18,40	6,05	4,90	10,65	0,45	3,45
	$[\log_{10} \text{ copias/ml}^* \text{ día}]$	(0,0, 42,1)	(0,0, 41,9)	(0,0, 36,9)	(0,0, 37,1)	(0,0, 24,7)	(0,0, 41,9)
	Valor de P^b	NA	0,218	0,306	0,821	0,014	0,075
	Duración, mediana	2,91	0,96	1,36	2,39	0,00	0,71
	(IC del 95 %)[Día]	(0,03, 5,35)	(0,00, 3,39)	(0,00, NA)	(0,00, 5,01)	(0,00, 0,66)	(0,00, 2,394)
	Valor de P^d	NA	0,318	0,753	0,602	0,084	0,238
	Pico, media (DT)	5,36	4,36	3,90	5,08	2,37	3,91
	$[\log_{10} \text{TCID}_{50} \text{ /ml}]$	(3,108)	(3,379)	(3,514)	(3,097)	(2,861)	(3,276)
Valor de P^c	NA	0,380	0,202	0,794	0,007	0,081	
Serología ^f	Seroconversión,	21/32	11/16	9/19	13/19	12/18	45/72
	n/N (%)	(66 %)	(69 %)	(47 %)	(68 %)	(67 %)	(63 %)
	Valor de P	NA	>0,999	0,247	>0,999	>0,999	0,828

ABC: área bajo la curva de valor frente al tiempo; IC: intervalo de confianza; NA: no aplicable; qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa; DT: desviación típica; TCID50: 50 % de la dosis infecciosa en cultivo tisular.

Nota: Los valores de P estadísticamente significativos ($P<0,05$) están en fuente negrita.

^a $P=0,036$ para la tendencia de respuesta a la dosis de la ABC de la prueba de tendencia de Jonckheere-Terpstra.

^b Valor de P calculado a partir de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

^c Valor de P calculado mediante ANOVA.

^d Valor de P calculado a partir de la prueba de rangos logarítmicos.

^e $P=0,031$ para la tendencia de respuesta a la dosis de la ABC de la prueba de tendencia de Jonckheere-Terpstra.

^f Seroconversión definida como aumento ≥ 4 veces en el título de anticuerpo en la visita de seguimiento en comparación con el basal. Valor de P calculado usando la prueba exacta de Fisher.

Tabla 28: Mediana de ABC, mediana de duración y media de la magnitud del pico, de síntomas clínicos compuestos y de síntomas gripales.

Criterio de valoración [unidades]		Placebo agrupado (N=22)	Compuesto (1)				
			100 mg (N=12)	400 mg (N=12)	900/600 mg (N=14)	1200/600 mg (N=14)	Agrupado (N=52)
Síntoma clínico compuesto	ABC, mediana (intervalo)	4,85	1,85	4,70	1,75	1,95	2,15
	[Grado* día]	(0,0, 23,5)	(0,0, 25,3)	(0,0, 16,0)	(0,0, 32,3)	(0,0, 5,5)	(0,0, 32,3)
	Valor de P^b	NA	0,422	0,694	0,595	0,83	0,211
	Duración, mediana	3,69	3,21	3,34	2,69	1,88	2,34
	(IC del 95 %)[Día]	(2,04, 4,73)	(0,03, 5,43)	(1,28, 4,63)	(0,00, 4,61)	(0,00, 2,24)	(1,87, 3,06)
	Valor de P^d	NA	0,946	0,994	0,686	0,001	0,355
	Pico, media (DT)	3,91	3,17	2,83	3,71	1,50	2,79
	[Grado]	(3,637)	(3,881)	(2,167)	(4,232)	(1,286)	(3,158)
	Valor de P^c	NA	0,532	0,366	0,863	0,036	0,187
Síntoma gripal	ABC, mediana (intervalo)	4,05	1,85	3,80	1,75	1,75	2,05
	[Grado*Día]	(0,0, 17,7)	(0,0, 21,3)	(0,0, 14,0)	(0,0, 28,6)	(0,0, 4,4)	(0,0, 28,6)
	Valor de P^b	NA	0,363	0,617	0,595	0,040	0,149
	Duración, mediana	3,69	3,21	3,34	2,69	1,88	2,34
	(IC del 95 %)[Día]	(2,04, 4,73)	(0,00, 5,40)	(1,28, 4,63)	(0,00, 4,61)	(0,00, 2,24)	(1,87, 3,00)
	Valor de P^d	NA	0,957	0,994	0,653	<0,001	0,342
	Pico, media (DT)	3,41	2,75	2,42	3,21	1,36	2,42
	[Grado]	(3,003)	(3,361)	(1,832)	(3,534)	(1,216)	(2,689)
	Valor de P^c	NA	0,511	0,323	0,838	0,034	0,168

ABC: área bajo la curva de valor frente al tiempo; IC: intervalo de confianza; NA: no aplicable.
Nota: Los valores de P estadísticamente significativos ($P<0,05$) están en fuente negrita.
^b Valor de P calculado a partir de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.
^c Valor de P calculado mediante ANOVA.
^d Valor de P calculado a partir de la prueba de rangos logarítmicos.

Evaluación de seguridad

5 El compuesto (1) se toleró bien y no hubo abandonos debido a efectos adversos (AE) relacionado con el compuesto (1) ni tampoco se produjeron eventos adversos graves. Se presenta una lista de los eventos adversos que se producen en >10 % de sujetos en cualquier grupo de tratamiento (tabla 29). La enfermedad gripal fue el acontecimiento adverso comunicado con mayor frecuencia por aproximadamente una proporción igual de sujetos en los grupos de placebo y de compuesto (1). Los eventos adversos que se produjeron con una diferencia ≥ 10 % en su incidencia entre los grupos de compuesto (1) y los receptores de placebo fueron: reducción del nivel de fósforo en sangre (18,1 %, compuesto (1); 0 %, placebo), rinorrea (compuesto (1), 4,2 %; 18,8 %, placebo) y congestión nasal (1,4 %, compuesto (1); 15,6 % placebo). Además, se observaron elevaciones en alanina aminotransferasa (ALT) en los receptores tanto de placebo como de compuesto (1). No se observaron ni anomalías en la función hepática ni reducciones de fosfato sérico en el estudio de escalada de la dosis primero en seres humanos del compuesto (1) en dosis únicas de hasta 1600 mg y múltiples dosis de hasta 800 mg a diario durante 10 días; tanto las elevaciones de ALT como las reducciones de fosfato sérico se han comunicado previamente con infecciones víricas respiratorias superiores.

20

Tabla 29: Una lista de eventos adversos que se producen en $\geq 10\%$ de los sujetos en cualquier grupo de tratamiento.

Término preferido	Placebo agrupado	Compuesto (1)				
		100 mg	400 mg	900/600 mg ^a	1200/600 mg ^b	Agrupado
	N=32 n(%)	N=16 n(%)	N=19 n(%)	N=19 n(%)	N=18 n(%)	N=72 n(%)
Enfermedad gripal ^c	12 (37,5)	8 (50,0)	10 (52,6)	9 (47,4)	7 (38,9)	34 (47,2)
Aumento de alanina aminotransferasa	5 (15,6)	3 (18,8)	1 (5,3)	0	6(33,3)	10 (13,9)
Reducción de fósforo en sangre	0	3 (18,8)	0	6(31,6)	4 (22,2)	13 (18,1)
Espirometría anormal	2 (6,3)	2 (12,5)	4 (21,1)	0	4 (22,2)	10 (13,9)
Rinorrea	6(18,8)	0	2 (10,5)	0	1 (5,6)	3 (4,2)
Cefalea	2 (6,3)	1 (6,3)	4 (21,1)	0	2(11,1)	7 (9,7)
Dermatitis de contacto	3 (9,4)	3 (18,8)	0	0	0	3 (4,2)
Congestión nasal	5(15,6)	0	0	0	1 (5,6)	1 (1,4)
Aumento de aspartato aminotransferasa	1(3,1)	1 (6,3)	1 (5,3)	0	2(11,1)	4 (5,6)
Dolor orofaríngeo	1 (3,1)	2 (12,5)	0	1 (5,3)	0	3 (4,2)
Cefalea tensional	1 (3,1)	0	2 (10,5)	1 (5,3)	0	3 (4,2)
Malestar	1 (3,1)	2 (12,5)	0	0	0	2 (2,8)
Nauseas	0	0	2 (10,5)	1 (5,3)	0	3 (4,2)

Notas: Se contó un sujeto con múltiples eventos una vez en los AE. Los sujetos pueden aparecer en múltiples categorías.
^aUna sola dosis de carga de 900 mg en el día 1 y 600 mg qd en los días 2 hasta 5.
^bUna sola dosis de carga de 1200 mg en el día 1 y 600 mg qd en los días 2 hasta 5.
^cEnfermedad gripal, como se define en el análisis de eficacia, se evaluó basándose en los parámetros listados en el texto. Los AE de la enfermedad gripal se determinaron por un médico.

Discusión

5 En un estudio de exposición a gripe en voluntarios sanos, el compuesto (1) demostró una tendencia de respuesta a la dosis en la ABC del título vírico en los frotis nasales tanto mediante TCID₅₀ de cultivo tisular como por qRT-PCR y la dosis más elevada de compuesto (1) evaluada causó una reducción significativa en la ABC del título vírico así como en la ABC y la duración de los síntomas de gripe. Sin embargo, no se observó una magnitud similar de mejora frente a placebo en el segundo grupo de dosis más alta, 900/600 mg (tabla 27), esta dosis demostró resultados similares a la dosis de 1200/600 mg con respecto a la mediana de ABC para los criterios de valoración de síntoma clínico compuesto y síntoma gripal (tabla 28); no se entienden por completo los motivos de esta discrepancia. Aunque no se observaron tendencias de seguridad definitivas en el ensayo de POC, las reducciones de fosfato y las elevaciones de ALT observadas sugieren que será necesario emplear un control adecuado de ambos parámetros en estudios futuros.

15 En su conjunto, las limitaciones del modelo de exposición a gripe son que el virus de la gripe utilizado en este estudio es una cepa que se ha seleccionado específicamente para no producir los síntomas clínicos más graves de infección por el virus de la gripe. Además, el inóculo vírico administrado es probablemente mayor que el inóculo en la exposición natural a la gripe. El tiempo de dosificación de compuesto (1) 24 h después de la exposición puede no ser un espacio de tiempo realista para iniciar la terapia en una situación comunitaria en la que los pacientes no solicitan un diagnóstico o tratamiento hasta que han desarrollado síntomas sustanciales, probablemente más de 24 h después de la exposición. Sin embargo, dado que los sujetos infectados de manera natural se inoculan inicialmente con un título vírico mucho menor, las escalas de tiempo no pueden compararse directamente.

20 En resumen, el compuesto (1) es un potente inhibidor de PB2 de la gripe A que representa una clase novedosa y distinta de agente antivírico. Las propiedades de este inhibidor, como se describen por los datos tanto preclínicos como clínicos, indican que el compuesto (1) es un candidato prometedor para evaluación futura con varias ventajas potenciales frente a los agentes antivíricos actuales usados para tratar la infección gripal.

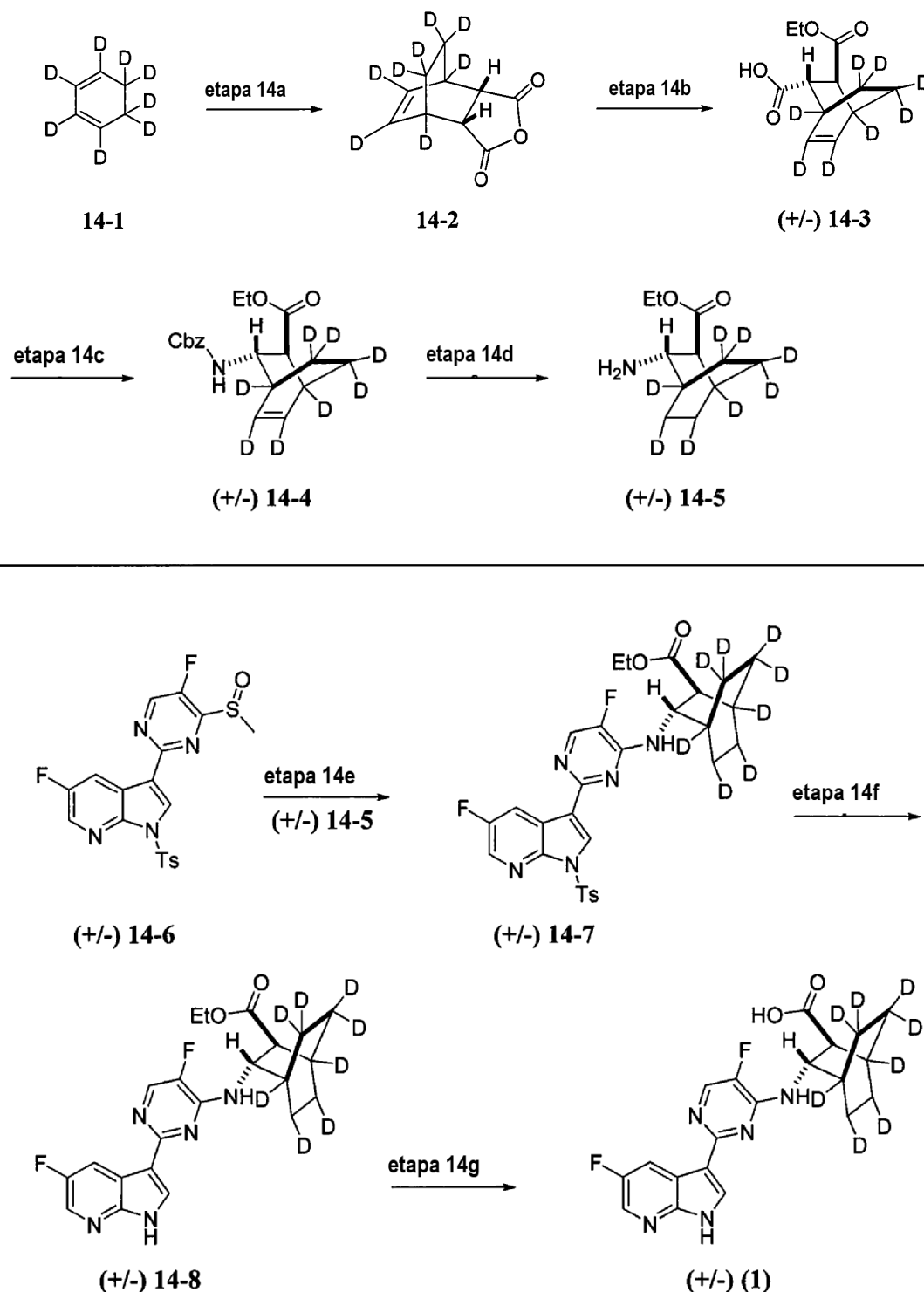
30

Todas las referencias proporcionadas en el presente documento se incorporan en su totalidad por referencia. Tal como se usa en el presente documento, todas las abreviaturas, símbolos y convenciones son coherentes con las usadas en la bibliografía científica contemporánea. Véase, por ejemplo, Janet S. Dodd, ed., *The ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors*, 2ª Ed., Washington, D.C.: American Chemical Society, 1997.

5

Ejemplo 14: Compuesto (1) enriquecido con deuterio.

Se sintetizó el compuesto (1) enriquecido con deuterio de acuerdo con el esquema 1, siguiente:

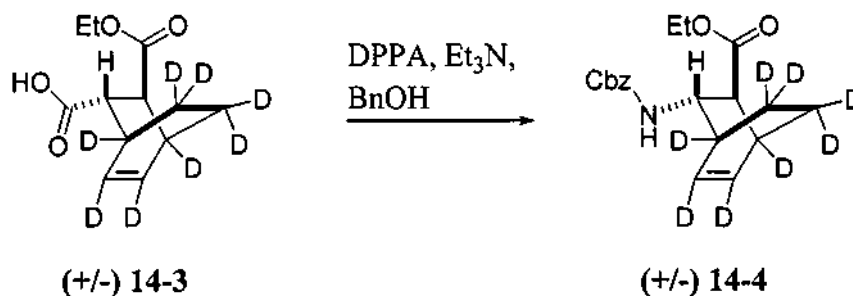
10 Esquema 1:

(2,68 g, 14,39 mmol), beta-quinina (5,24 g, 15,83 mmol) y tolueno anhidro (40 ml). La reacción se agitó magnéticamente y se enfrió a -25 °C (enfriamiento de dedo frío). Se añadió una solución de etanol absoluto anhidro (8,40 ml, 143,90 mmol) en tolueno anhidro (13,4 ml) durante 25 minutos manteniendo la temperatura interna por debajo de -25 °C. La mezcla de reacción se agitó a aproximadamente -20 °C durante una noche. El sólido parecido a gel precipitado se recogió por filtración, se lavó con tolueno (3*30 ml) y después se recogió en HCl/EtOAc 1 N (300 ml de mezcla 1:1). La mezcla bifásica se agitó hasta que el precipitado se disolvió. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua (2 x 100 ml), salmuera (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, se concentraron en el evaporador rotatorio a baja temperatura para proporcionar 800 mg del producto deseado (**14-3**), que se usó sin más purificación.

5

10

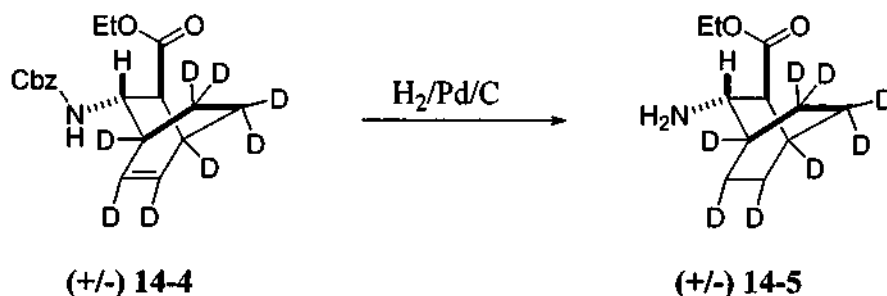
14d: (+/-)-trans-5-etil-3-(((benziloxi)carbonil)amino)biciclo[2.2.2]oct-5-en-2-carboxilato-1,4,5,6,7,7,8,8-d₈ (**14-3**)



15 A una solución de ácido (+/-)-trans-3-(etoxicarbonil)biciclo[2.2.2]oct-5-en-2-carboxílico-1,4,5,6,7,7,8,8-d₈, (**14-3**) (0,60 g, 2,58 mmol) en tolueno (4,5 ml) se le añadió difenilfosforil azida (0,81 g, 0,63 ml, 2,84 mmol) seguido de trietilamina (0,40 ml, 2,84 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 90 °C durante 2 horas. Se añadió alcohol bencílico (0,35 ml, 3,34 mmol) a la mezcla, que se calentó a 90 °C durante una noche. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se repartió entre EtOAc y solución acuosa saturada de NaHCO₃. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con solución acuosa saturada de NH₄Cl, salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (0-35-100 % de EtOAc/Hexanos – teñido con CAMA). La RMN ¹H muestra el producto deseado (**14-4**) junto con impureza de alcohol bencílico todavía presente. El material se llevó adelante sin más purificación.

20

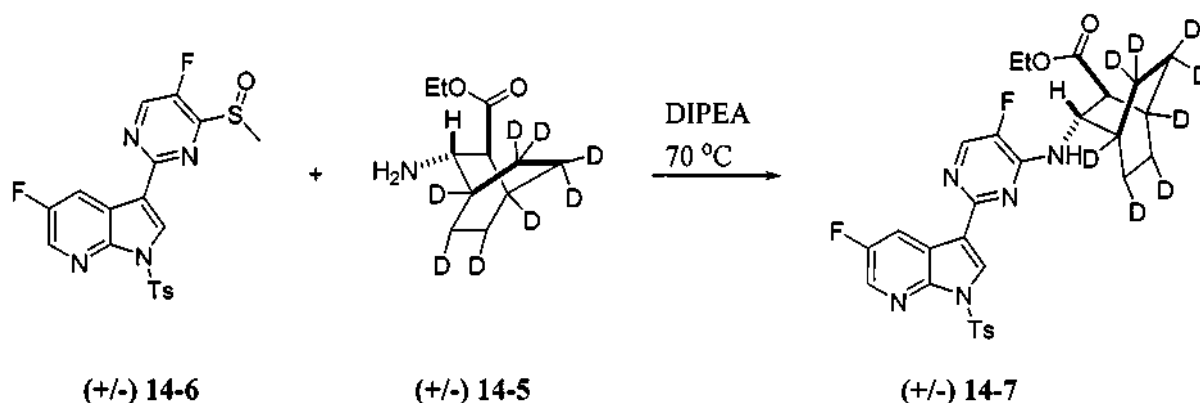
25 **14e:** (+/-)-trans-etil-3-aminobiciclo[2.2.2]octan-2-carboxilato-1,4,5,5,6,6,7,8-d₈ (**14-5**)



30 Se cargó paladio (0,052 g, 0,049 mmol) en un recipiente de hidrogenación (en atmósfera de nitrógeno) y se humedeció con aproximadamente 5 ml de metanol. A la suspensión se le añadió una solución de (+/-)-trans-etil (2S, 3S)-3-(((benziloxi)carbonil)amino)biciclo[2.2.2]oct-5-en-2-carboxilato-1,4,5,6,7,7,8,8-d₈ (**14-4**) (0,521 g, 1,547 mmol) en metanol (20 ml). La mezcla de reacción se sometió a hidrogenación T (44 PSI) durante una noche. Se ventiló la presión y el catalizador se eliminó por filtración. Todos los volátiles se eliminaron al vacío. El producto en bruto (**14-5**) se usó sin más purificación.

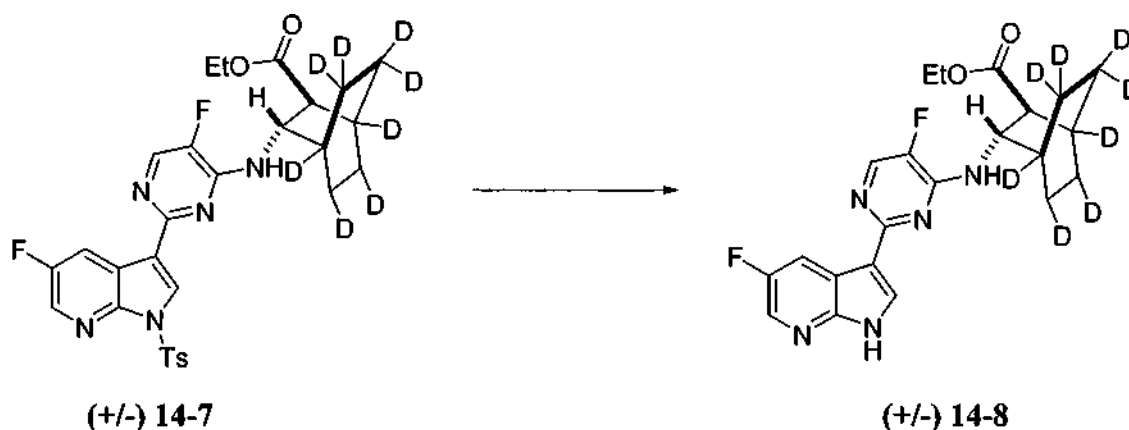
35

14f: (+/-)-trans-etil-3-((5-fluoro-2-(5-fluoro-1-tosil-1H-pirrol-3-il)pirimidin-4-il)amino)biciclo[2.2.2]octan-2-carboxilato-1,4,5,5,6,6,7,8-d₈ (**14-7**)



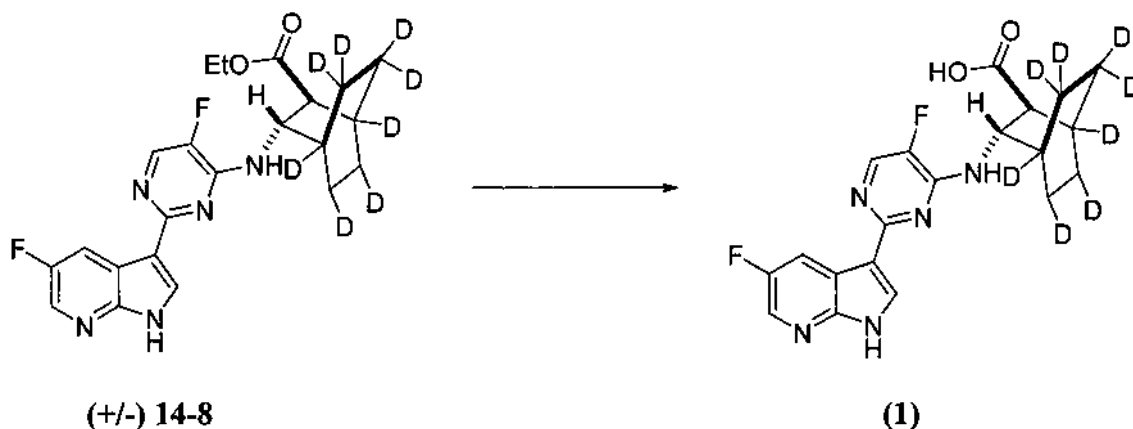
A una suspensión de (+/-)-*trans*-etil (2*S*,3*S*)-3-aminobiciclo[2.2.2]octan-2-carboxilato-1,4,5,5,6,6,7,8-*d*₈ (**14-5**) (0,317 g, 1,547 mmol) y 5-fluoro-3-(5-fluoro-4-metilsulfinil-pirimidin-2-il)-1-(*p*-tolilsulfonyl)pirrolo[2,3-*b*]piridina (**14-6**) (0,694 g, 1,547 mmol) en THF (10 ml) se le añadió *N,N*-diisopropiletil amina (0,808 ml, 4,641 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y agua. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El producto en bruto (**14-7**) se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (0-100 % de EtOAc/Hexanos) para proporcionar el producto deseado.

14g: (+/-)-*trans*-etil-3-((5-fluoro-2-(5-fluoro-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)pirimidin-4-il)amino)biciclo[2.2.2]octan-2-carboxilato-1,4,5,5,6,6,7,8-*d*₈ (**14-8**)



A una solución de (+/-)-*trans*-etil (2*S*,3*S*)-3-((5-fluoro-2-(5-fluoro-1-tosil-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)pirimidin-4-il)amino)biciclo[2.2.2]octan-2-carboxilato-1,4,5,5,6,6,7,8-*d*₈ (**14-7**) (373 mg, 0,6325 mmol) en acetonitrilo (6 ml) se le añadió HCL (800 µl de solución 4 M en dioxano, 3,200 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. la mezcla de reacción se calentó después a 80 °C durante 6 h y después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agitó durante un anoche. El análisis por LC/MS muestra reacción incompleta. Se añadieron 6 ml más de CH₃CN y 800 µl de solución 4 N de HCl/dioxano a la mezcla. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 4 horas. Se eliminaron todos los volátiles a presión reducida y el residuo se diluyó con EtOAc y NaHCO₃ acuoso saturado. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (0-100 % de EtOAc/Hexanos) para proporcionar el producto deseado (**14-8**): RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ 12,28 (s, 1H), 8,50 (dd, *J*= 9,8, 2,8 Hz, 1H), 8,23 (ddd, *J*= 12,6, 6,2, 2,7 Hz, 2H), 7,60 (d, *J*= 6,9 Hz, 1H), 4,73 (t, *J*= 6,5 Hz, 1H), 4,30 - 3,85 (m, 2H), 2,89 (d, *J*= 6,8 Hz, 1H), 1,59 - 0,96 (m, 4H).

14h: ácido (+/-)-*trans*-etil-3-((5-fluoro-2-(5-fluoro-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)pirimidin-4-il)amino)biciclo[2.2.2]octan-2-carboxílico-1,4,5,5,6,6,7,8-*d*₈ (**1**)

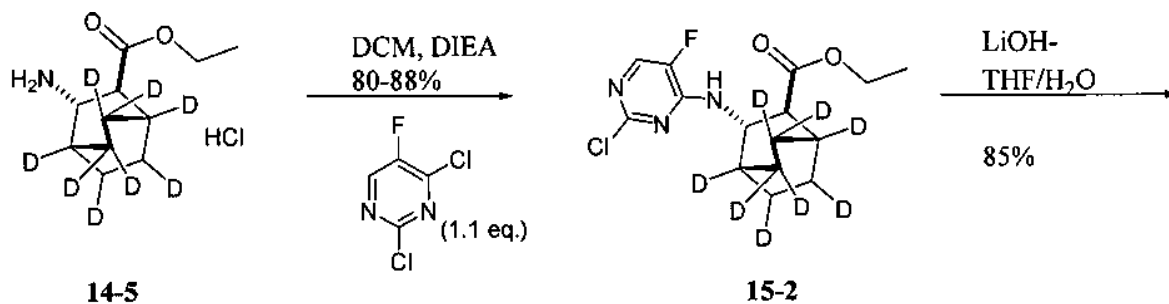


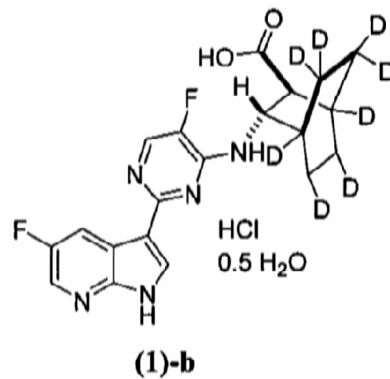
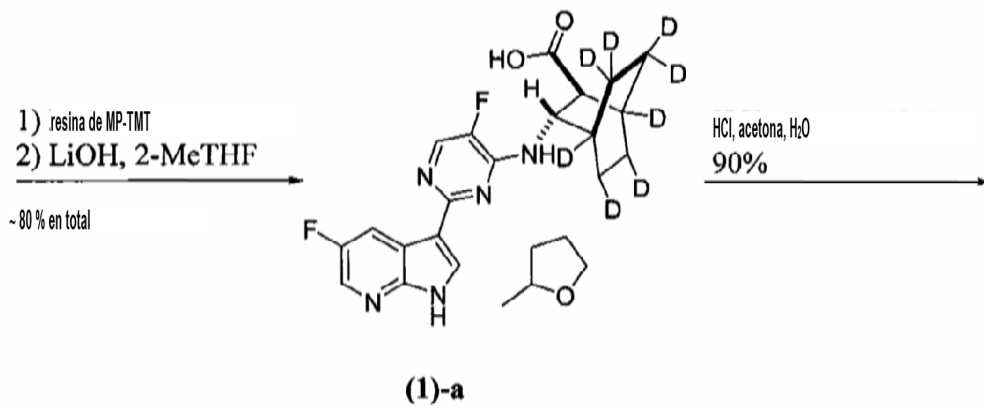
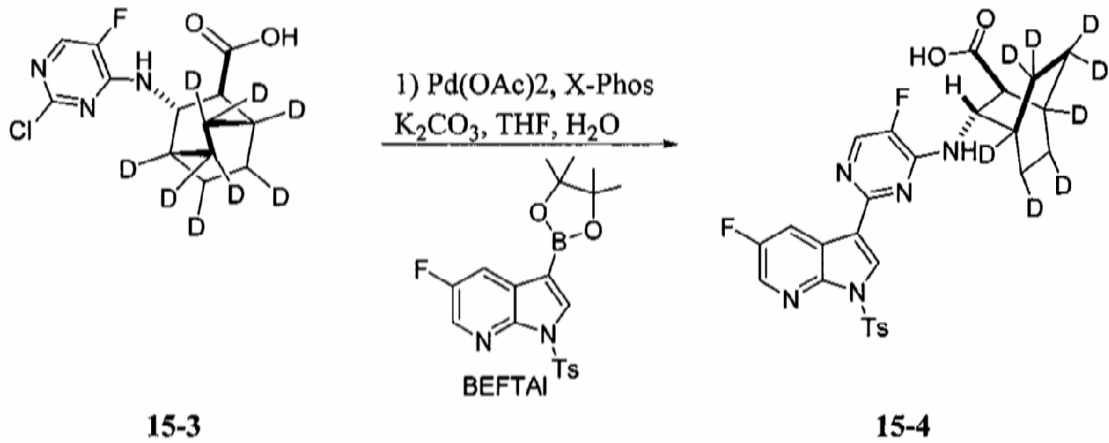
5 A una solución de (+/-)-*trans*-etil-3-((5-fluoro-2-(5-fluoro-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-3-il)pirimidin-4-il)amino)biciclo[2.2.2]octan-2-carboxilato-1,4,5,5,6,6,7,8- d_8 (**14-8**) (0,165 g, 0,379 mmol) disuelto en THF (3,0 ml) y metanol (1 ml) se le añadió NaOH (1 ml de solución 2 M, 2,000 mmol) y la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente 3 horas. El análisis por LC/MS muestra que la reacción es incompleta. La mezcla de reacción se calentó a 45 °C durante 2 horas y después a 55 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se diluyó en solución acuosa saturada de NH_4Cl . Se añadieron varias gotas de HCl 1 N para ajustar el pH a aproximadamente 6,5. El producto se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el producto deseado (**1**) (97,5 % de pureza por RMN, LC/MS y HPLC): RMN 1H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 12,30 (d, $J = 14,2$ Hz, 2H), 8,79 - 7,94 (m, 4H), 7,58 (s, 1H), 4,68 (s, 1H), 2,84 (s, 1H), 1,85 (d, $J = 85,0$ Hz, 1H), 1,58 - 1,05 (m, 2H).

15 **Ejemplo 15: Compuesto (1) enriquecido con deuterio.**

Como alternativa, puede sintetizarse el compuesto (**1**) enriquecido con deuterio de acuerdo con el esquema 2 siguiente:

20 Esquema 2:





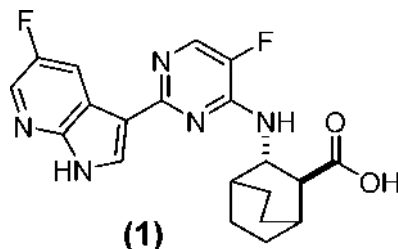
Otras realizaciones

5 Cabe destacar que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones se encuentran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una forma polimórfica del compuesto (1), en donde el compuesto (1) está representado por la siguiente fórmula estructural:

5



y donde la forma polimórfica es una sal cristalina de HCl del semihidrato del compuesto (1), estando dicha forma polimórfica caracterizada además por uno o más picos que corresponden a valores de 2-theta medidos en grados de $10,5 \pm 0,2$, $5,2 \pm 0,2$, $7,4 \pm 0,2$ y $18,9 \pm 0,2$ en un patrón de difracción de rayos X en polvo.

10

2. La forma polimórfica de la reivindicación 1, en donde la forma polimórfica está caracterizada además por uno o más picos que corresponden a valores 2-theta medidos en grados de $25,2 \pm 0,2$, $16,5 \pm 0,2$, $18,1 \pm 0,2$ y $23,0 \pm 0,2$ en un patrón de difracción de rayos X en polvo.

15

3. La forma polimórfica de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la forma polimórfica está caracterizada además por uno o más picos que corresponden a $29,2 \pm 0,3$ ppm, $107,0 \pm 0,3$ ppm, $114,0 \pm 0,3$ ppm y $150,7 \pm 0,3$ ppm en un espectro de RMN de estado sólido C^{13} .

20

4. La forma polimórfica de la reivindicación 3, en donde la forma polimórfica está caracterizada además por uno o más picos que corresponden a $22,1 \pm 0,3$ ppm, $24,6 \pm 0,3$ ppm, $47,7 \pm 0,3$ ppm y $54,8 \pm 0,3$ ppm en un espectro de RMN de estado sólido C^{13} .

25

5. Una composición farmacéutica que comprende una forma polimórfica de acuerdo con la reivindicación 1 y al menos un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

6. Un método para reducir la cantidad o inhibir la replicación de los virus de la gripe en una muestra biológica *in vitro*, que comprende administrar a la muestra una cantidad eficaz de una forma polimórfica del compuesto (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

30

7. El método de la reivindicación 6, que comprende además coadministrar uno o más agentes terapéuticos adicionales.

35

8. El método de la reivindicación 7, en donde los agentes terapéuticos adicionales incluyen un fármaco antivírico.

9. El método de la reivindicación 8, en donde el fármaco antivírico es un inhibidor de neuraminidasa seleccionado entre oseltamivir o zanamivir.

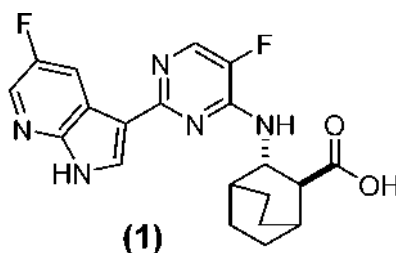
40

10. El método de la reivindicación 8, en donde el fármaco antivírico es un inhibidor de la polimerasa seleccionado entre flaviptiravir.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en donde los virus de la gripe son virus de la gripe A.

45

12. Un método para preparar una sal cristalina de HCl del semihidrato del compuesto (1), estando caracterizada dicha sal además por uno o más picos que corresponden a valores 2-theta medidos en grados de $10,5 \pm 0,2$, $5,2 \pm 0,2$, $7,4 \pm 0,2$ y $18,9 \pm 0,2$ en un patrón de difracción de rayos X en polvo, en donde el compuesto (1) está representado por la fórmula estructural siguiente:



50

que comprende:

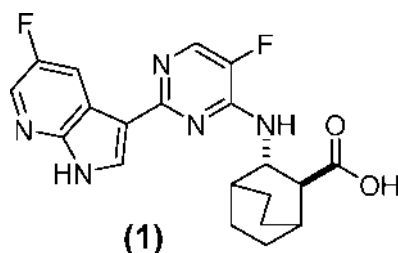
mezclar HCl con el compuesto (1) en un sistema disolvente que comprende agua y uno o más disolventes orgánicos, en donde el sistema disolvente tiene una actividad de agua de 0,05-0,85.

- 5 13. El método de la reivindicación 12, en donde el sistema disolvente comprende uno o más disolventes orgánicos seleccionados entre clorobenceno, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, diclorometano, 1,2-dimetoxietano, N,N-dimetilacetamida, N,N-dimetilformamida, 1,4-dioxano, 2-etoxietanol, formamida, hexano, 2-metoxietanol, metil butil cetona, metilciclohexano, N-metilpirrolidona, nitrometano, piridina, sulfolano, tetrahidrofurano (THF), tetralina, tolueno, 1,1,2-tricloroetano y xileno, ácido acético, acetona, anisol, 1-butanol, 2-butanol, acetato de butilo, éter de *tert*-butilmetilo, cumeno, heptano, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de metilo, 3-metil-1-butanol, metil etil cetona, metil isobutil cetona, 2-metil-1-propanol, acetato de etilo, éter etílico, formiato de etilo, pentano, 1-pentanol, 1-propanol, 2-propanol, acetato de propilo o cualquiera de sus combinaciones o en donde el sistema disolvente comprende uno o más disolventes seleccionados entre 2-etoxietanol, etilenglicol, metanol, 2-metoxietanol, 1-butanol, 2-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, etanol, 1-pentanol, 1-propanol, 2-propanol, metilbutil cetona, acetona, metiletil cetona, metilisobutil cetona, acetato de butilo, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, piridina, tolueno, xileno o cualquiera de sus combinaciones o en donde el sistema disolvente comprende uno o más disolventes orgánicos seleccionados entre acetona, n-propanol, isopropanol, iso-butilacetato, ácido acético o cualquiera de sus combinaciones o en donde el sistema disolvente comprende uno o más disolventes orgánicos seleccionados entre acetona o isopropanol.

- 10 14. El método de la reivindicación 13, en donde el sistema disolvente tiene un valor de actividad de agua de desde 0,4 hasta 0,6.

- 15 15. El método de la reivindicación 13, en donde el HCl se introduce como una solución acuosa que tiene de un 30 % en peso a un 40 % en peso de HCl por peso de la solución acuosa.

20 16. Una forma polimórfica del compuesto (1) de acuerdo con la reivindicación 1, representada por la siguiente fórmula estructural:



- 30 para su uso en el tratamiento de una infección por gripe en donde dicha forma polimórfica se administra a un sujeto en una cantidad de dosis de 100 mg a 1.600 mg y en donde la cantidad de dosis se administra una vez, dos veces o tres veces al día.

- 35 17. La forma polimórfica para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la cantidad de dosis es de 300 mg a 1.600 mg.

- 40 18. La forma polimórfica para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la cantidad de dosis es de 600 mg a 1.200 mg.

19. La forma polimórfica para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la dosis se administra una vez al día.

- 45 20. La forma polimórfica para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la cantidad de dosis es de 300 mg a 900 mg.

21. La forma polimórfica para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la dosis se administra dos veces al día.

- 50 22. La forma polimórfica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-21, en donde la duración del tratamiento es de 3 días a 14 días.

- 55 23. La forma polimórfica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-22, en donde se administra al sujeto una cantidad de dosis de carga de 600 mg a 1.600 mg el día 1 y durante el resto de la duración del tratamiento se administra al sujeto una cantidad de dosis de 400 mg a 1.200 mg.

24. La forma polimórfica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-23, en donde la infección por gripe es infección por gripe A.

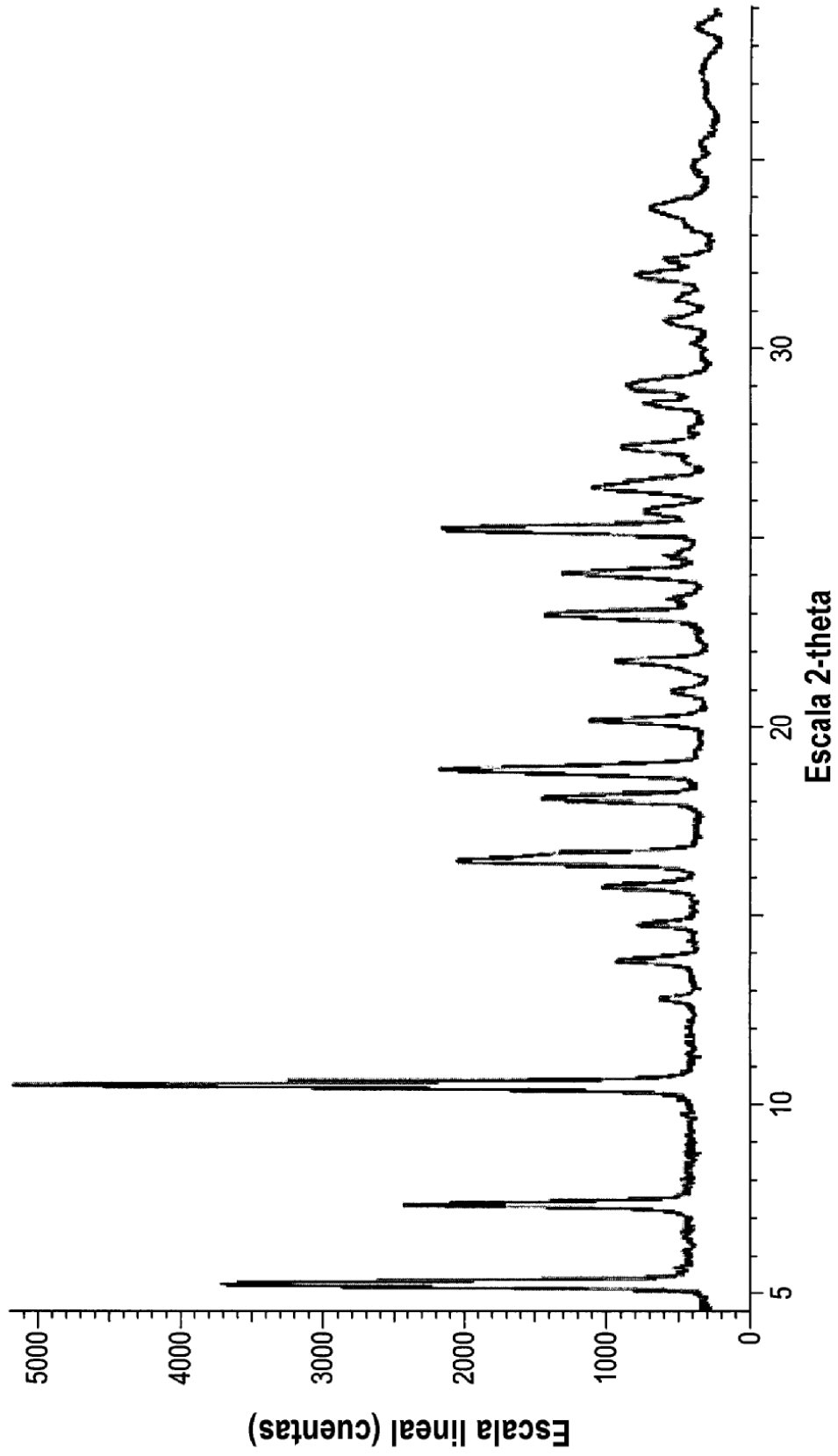


FIG. 1

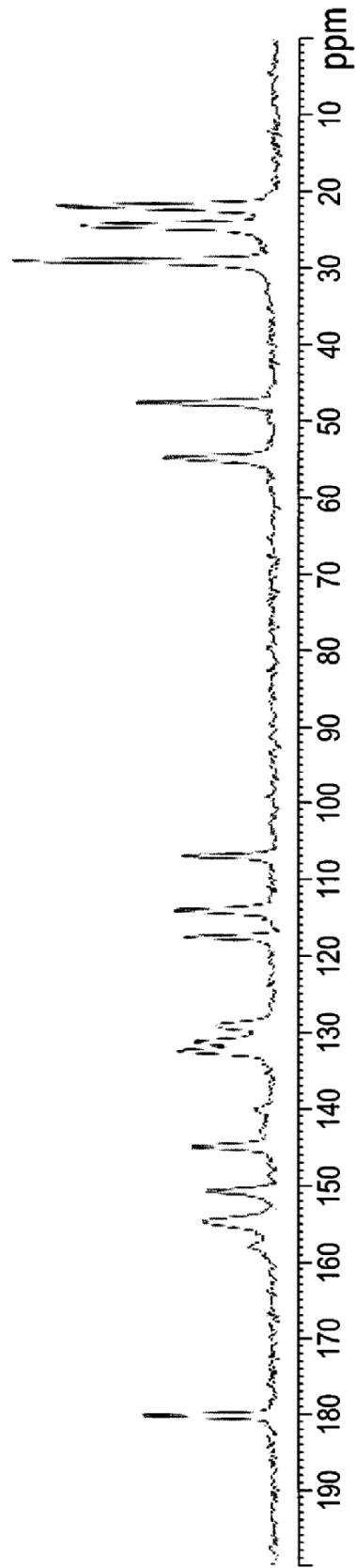


FIG. 2

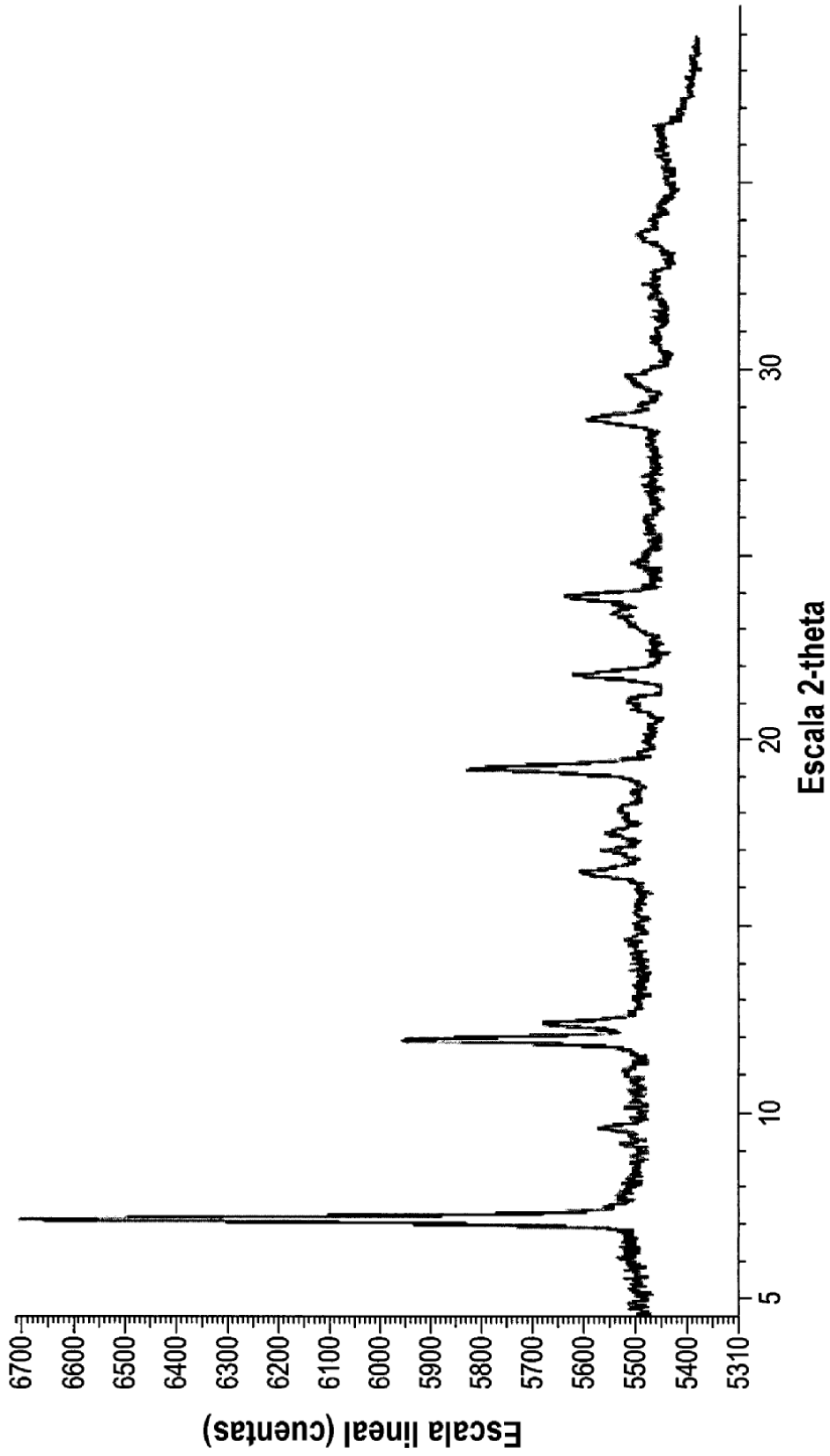


FIG. 3

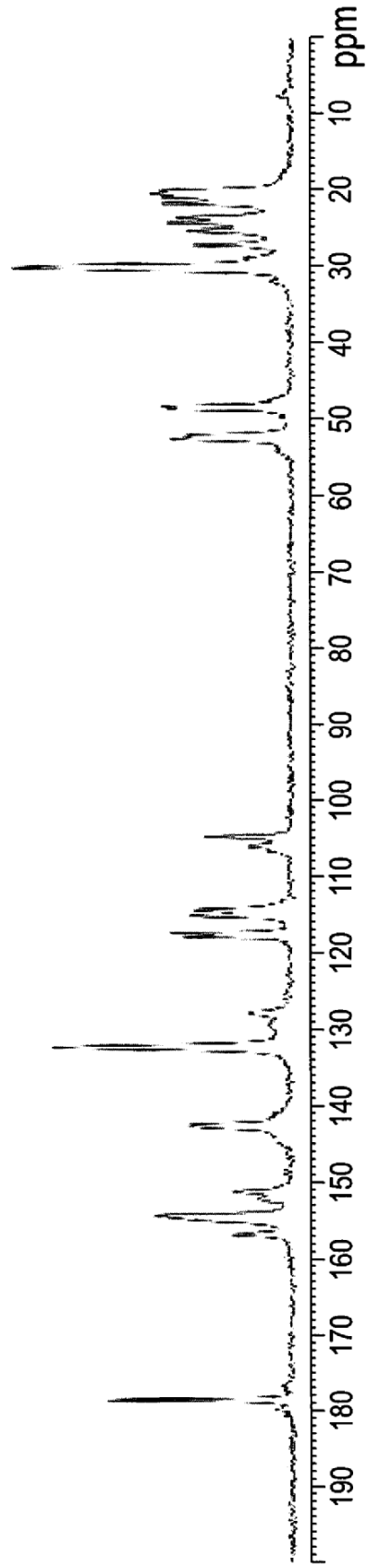


FIG. 4

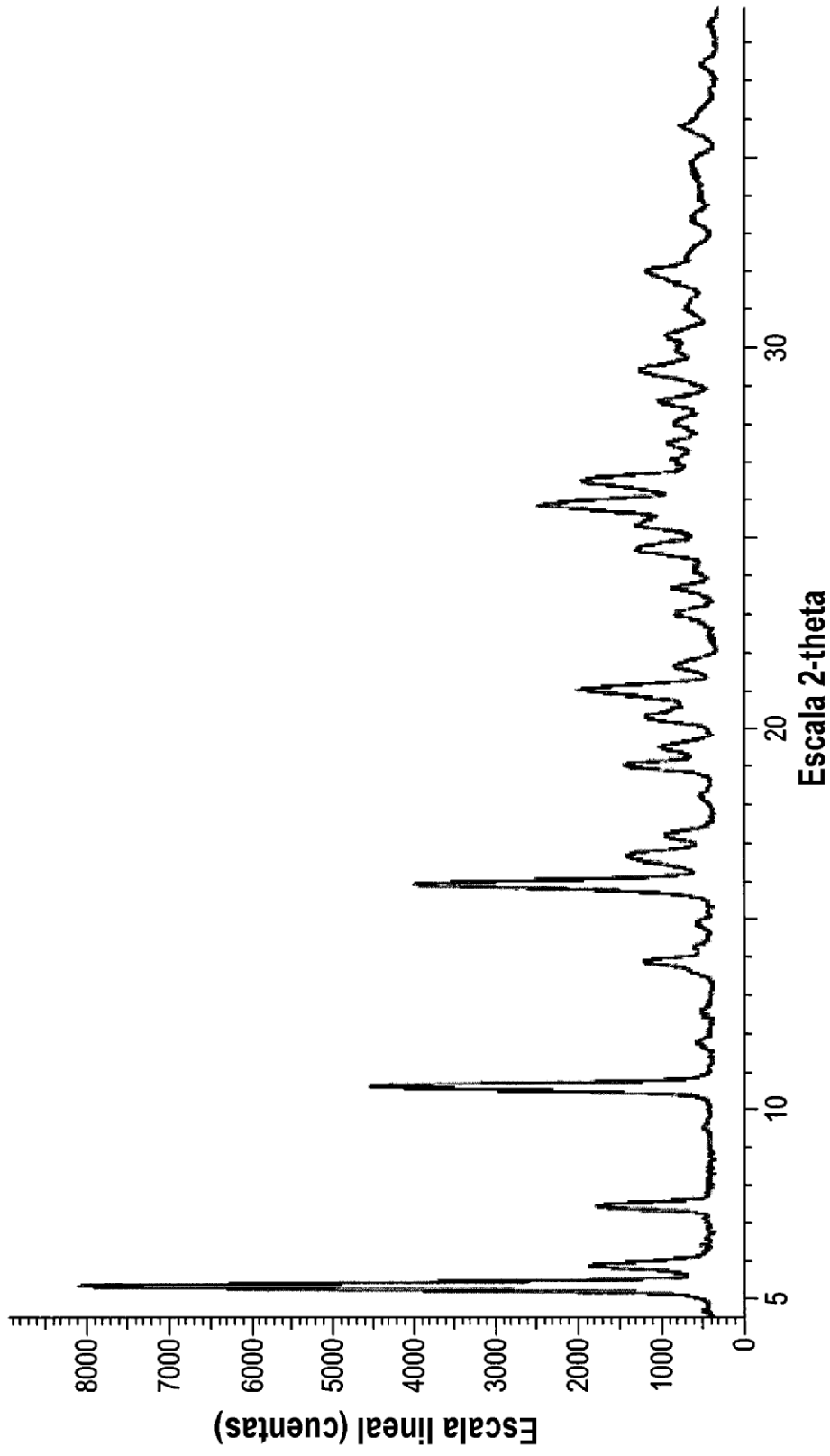


FIG. 5

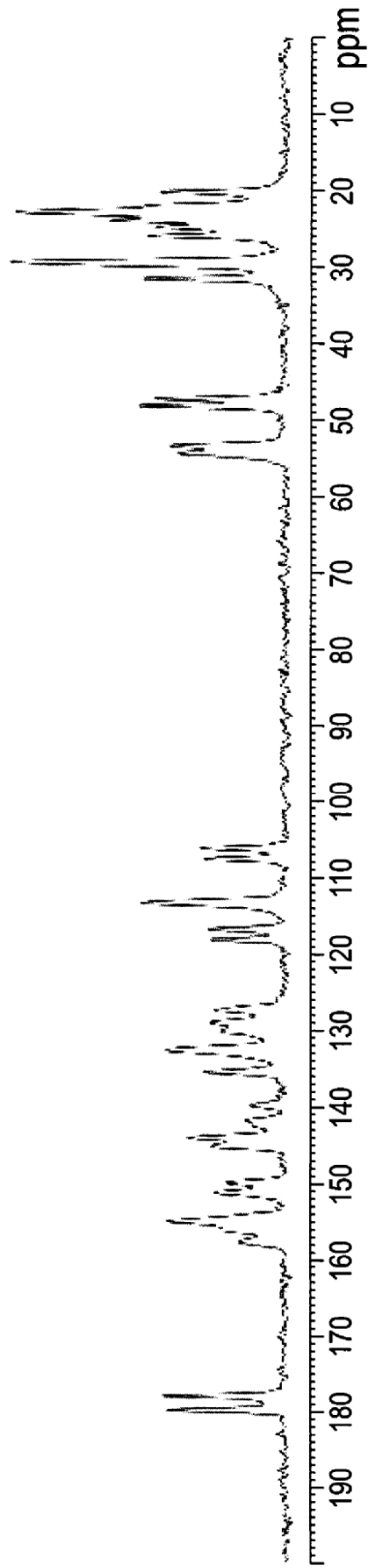


FIG. 6

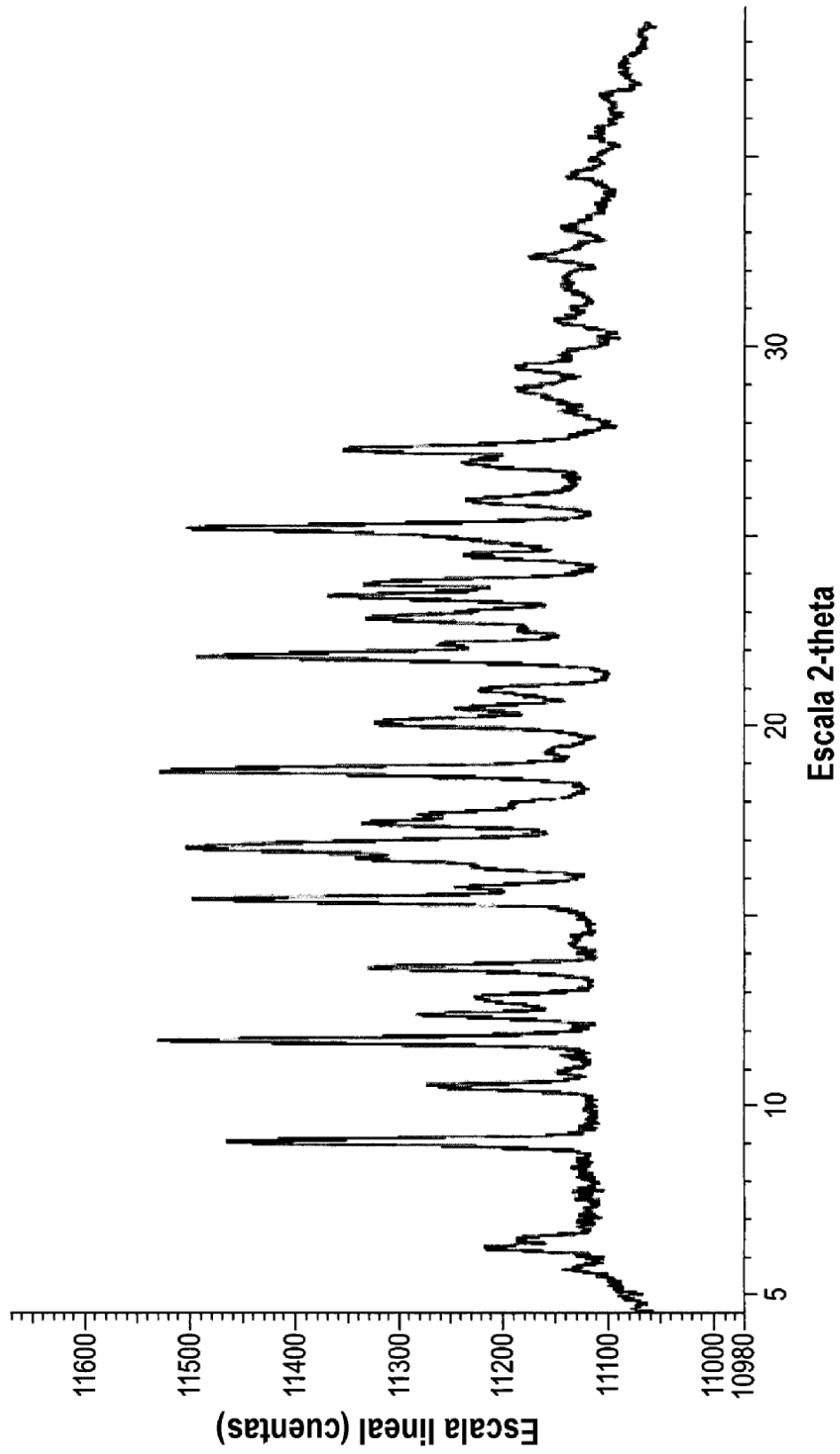


FIG. 7

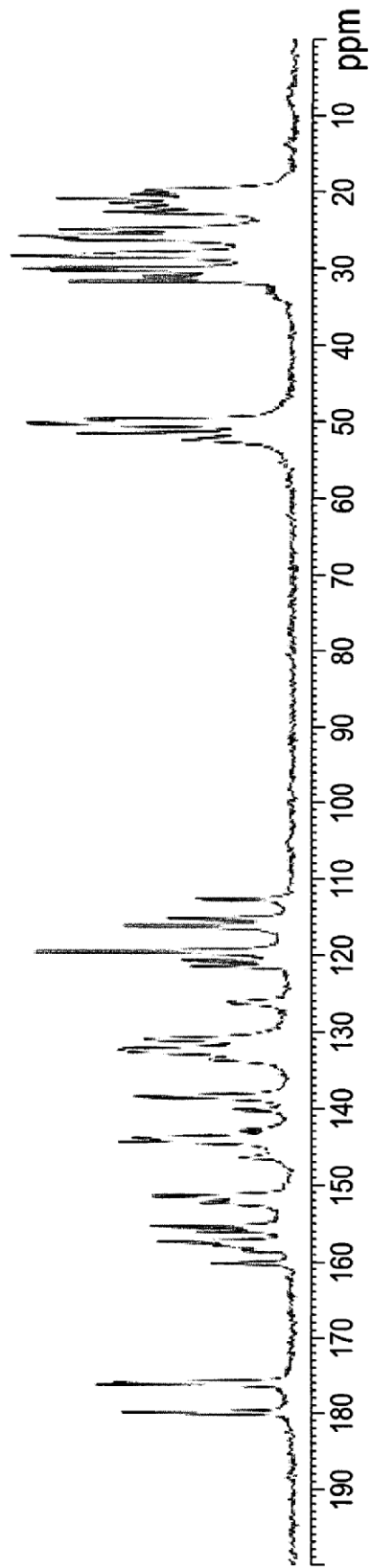


FIG. 8

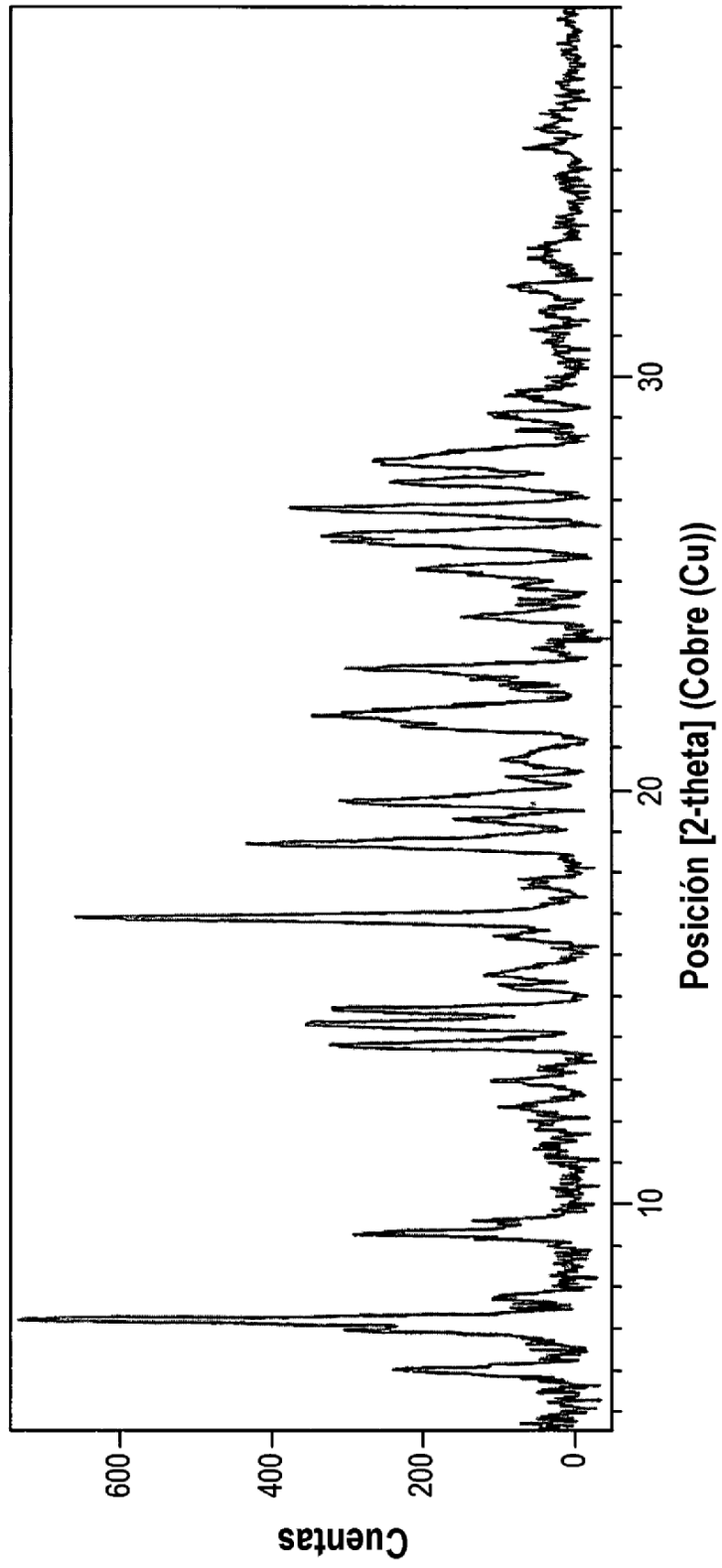


FIG. 9

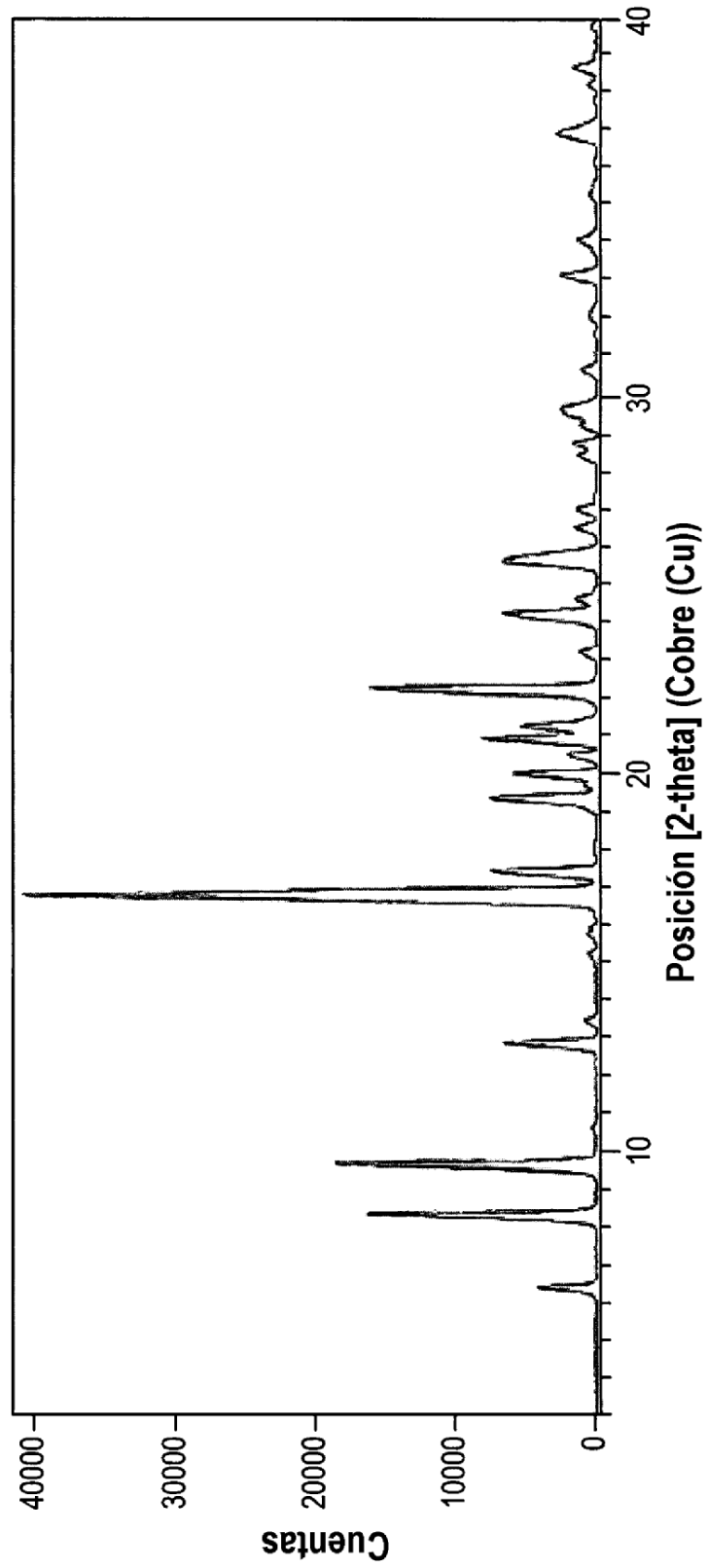


FIG. 10

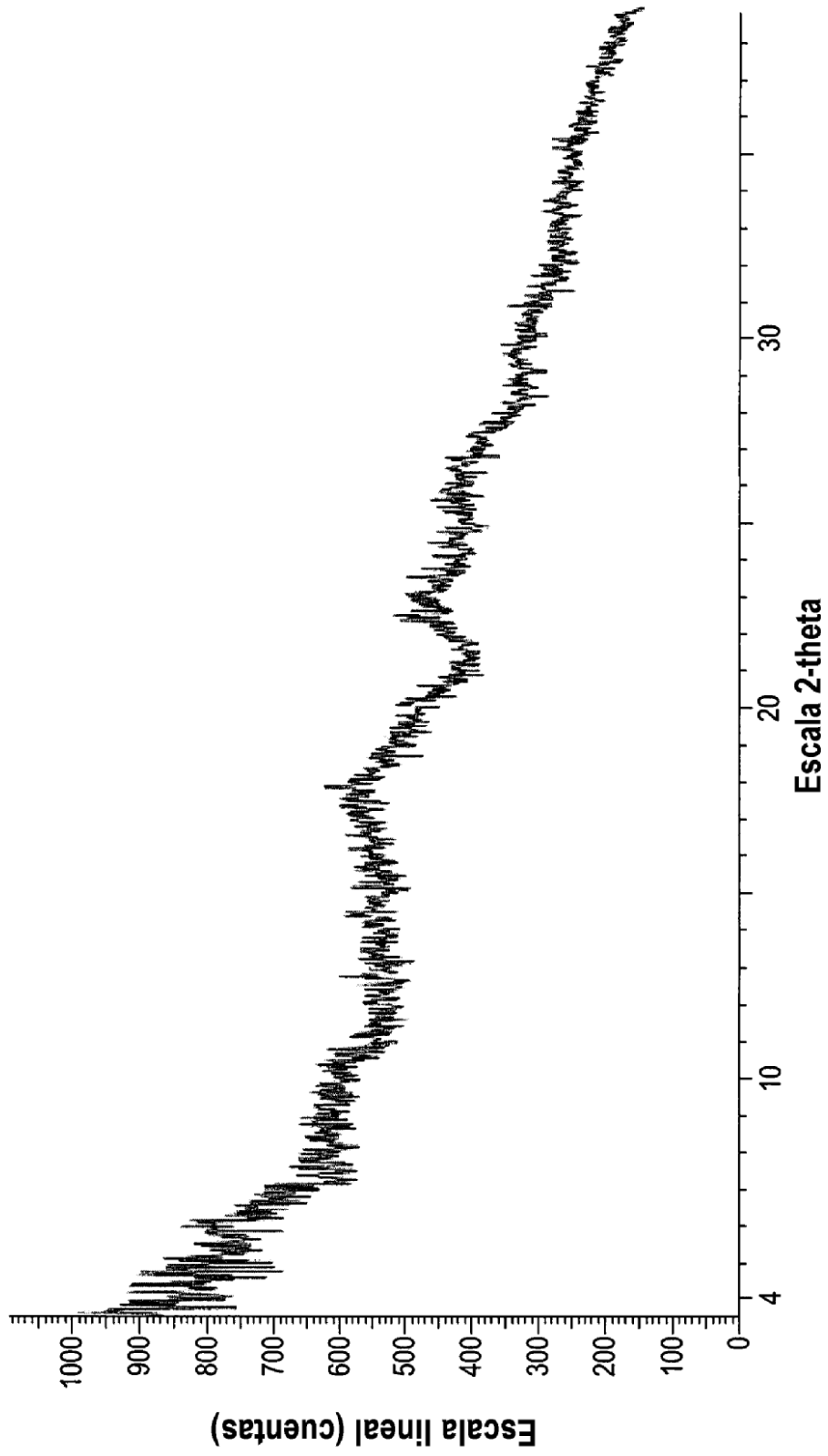


FIG. 11

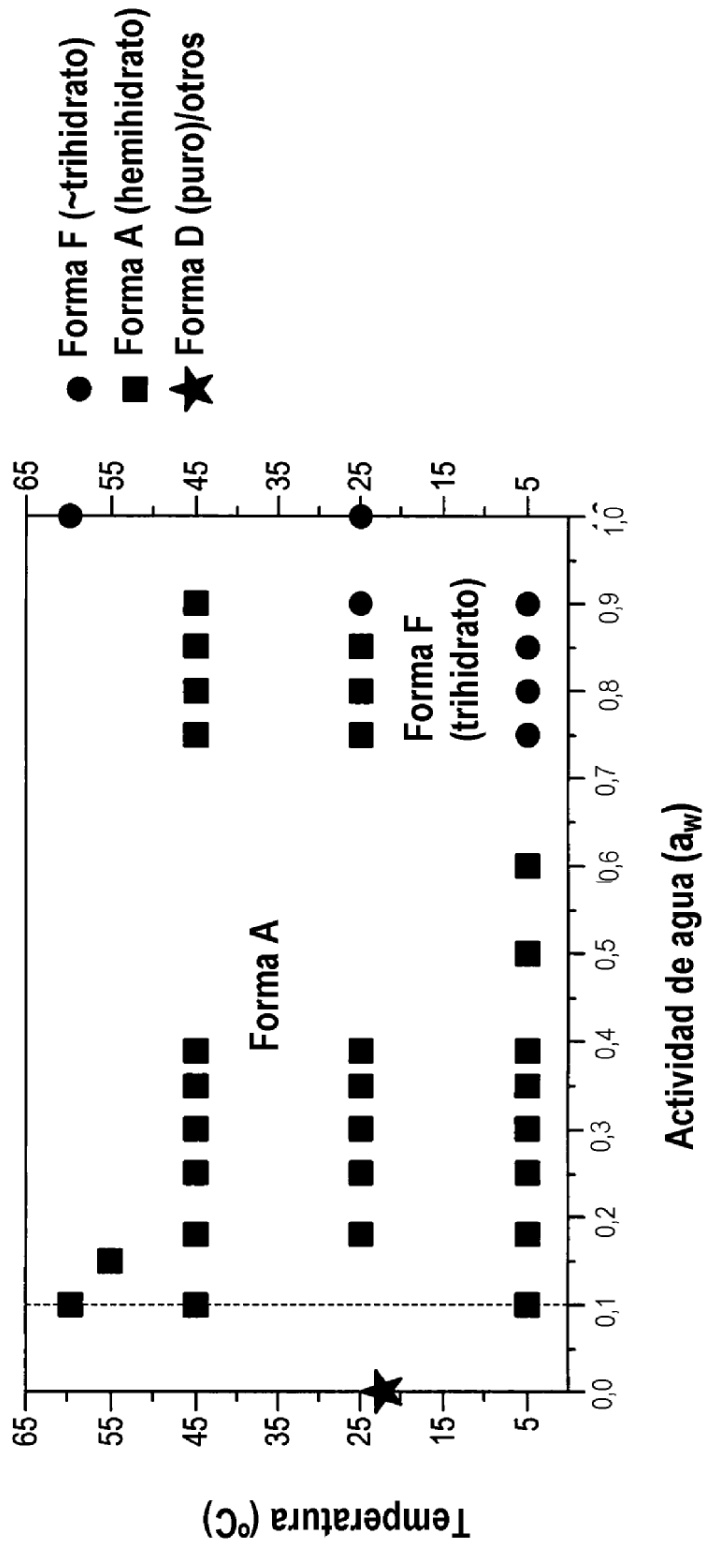


FIG. 12

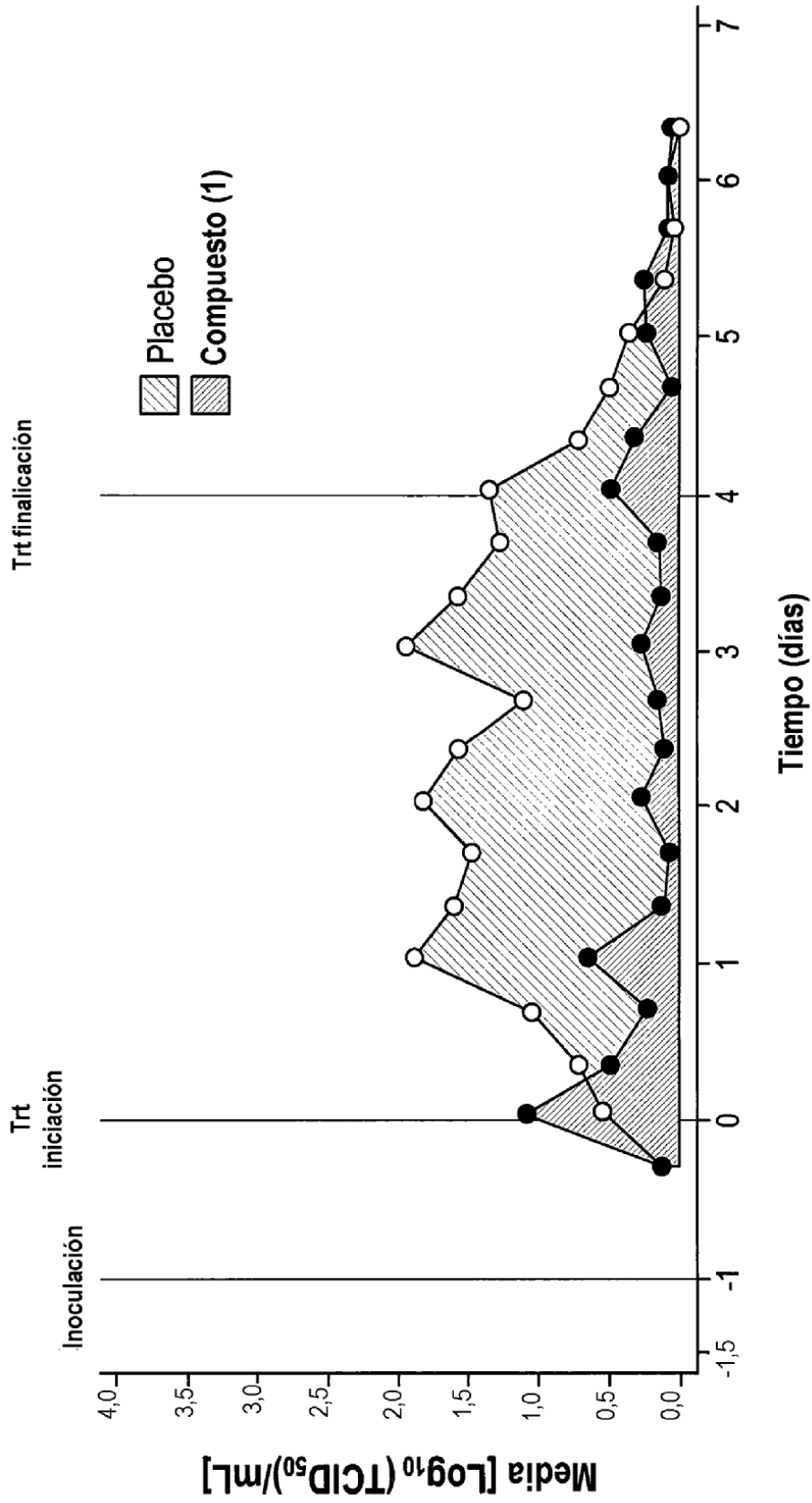


FIG. 13