

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 305 301**

(51) Int. Cl.:

C07D 407/12 (2006.01)**A61K 31/351** (2006.01)**A61P 31/12** (2006.01)**A61P 31/16** (2006.01)**C07D 309/28** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02774169 .3**(86) Fecha de presentación : **08.11.2002**(87) Número de publicación de la solicitud: **1451184**(87) Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2004**(54) Título: **Compuestos diméricos y su utilización como agentes antivíricos.**(30) Prioridad: **09.11.2001 AU PR8795**

(73) Titular/es:

BIOTA SCIENTIFIC MANAGEMENT Pty. Ltd.
Level 4, 616 St Kilda Road
Melbourne, VIC 3004, AU(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008(72) Inventor/es: **Demaine, Derek A.;
Inglis, Graham G. A.;
MacDonald, Simon J. F.;
Shanahan, Stephen E.;
Tucker, Simon, P.;
Watson, Keith, G. y
Wu, Wen-Yang**(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008(74) Agente: **Trullols Durán, María del Carmen**

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

Compuestos diméricos y su utilización como agentes antivíricos.

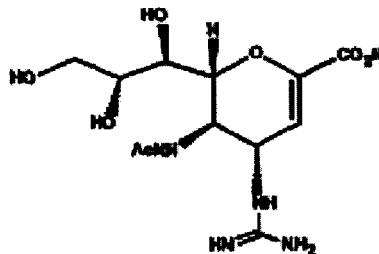
5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos químicos que resultan útiles en medicina. En particular la presente invención se refiere a nuevos compuestos diméricos, procedimientos de su preparación, formulaciones farmacéuticas de los mismos y dichos compuestos para su utilización como agentes antivíricos.

10 Antecedentes de la invención

Los enzimas con la capacidad para escindir el ácido N-acetilneuramínico (NANA), conocido asimismo como ácido siálico, de otros hidratos de carbono se encuentran presentes en muchos microorganismos. Éstos comprenden bacterias tales como *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pneumoniae* y *Arthrobacter sialophilus*, y otros virus tales como el virus de la gripe, el virus paragripal, el virus de la parotiditis, el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus de Sendai. La mayor parte de los virus son del grupo de los ortomixovirus o paramixovirus, y transportan la actividad exo- α -sialidasa en la superficie de las partículas víricas. Muchos de dichos organismos que presentan la exo- α -sialidasa constituyen patógenos importantes del ser humano y/o de animales, y algunos, tales como el virus de la gripe y el virus de la enfermedad de Newcastle, provocan enfermedades de gran importancia.

20 Se ha considerado durante mucho tiempo que los inhibidores de la exo- α -sialidasa pueden prevenir la infección por parte de los virus que transportan exo- α -sialidasa. La mayor parte de los inhibidores de la exo- α -sialidasa son análogos del ácido neuramínico, tales como el ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-N-acetilneuramínico (DANA) y algunos de sus derivados (Meindl *et al.*, *Virology*, 1974 58 457). Nuestra publicación de patente internacional n.º WO 91/16320 25 describe un cierto número de análogos del DANA que son activos contra la exo- α -sialidasa vírica, y se ha demostrado en particular que el ácido 4-guanidino-2-desoxi-2,3-deshidro-N-acetilneuramínico (compuesto (A), número de código GG167) resulta útil en el tratamiento de la gripe A y B (*N. Engl. J. Med.*, 1997 337 874-880). Otras solicitudes de patente describen diversos derivados muy relacionados con el ácido siálico (por ejemplo, las publicaciones de PCT n.º WO 95/18800, n.º WO 95/20583 y n.º WO 98/06712), y se han descrito asimismo conjugados macromoleculares del 30 GG167 (solicitud internacional de patente n.º PCT/AU97/00771).

35



40

Compuesto (A)
Ac representa acetilo

45

La publicación internacional de patente n.º WO 00/55149 describe compuestos diméricos que comprenden dos moléculas de enlace con la exo- α -sialidasa, tales como el compuesto (A), unidas a un espaciador común o grupo de unión de hasta 100 átomos de longitud.

50

55 Ahora hemos descubierto una nueva clase de compuestos que cae dentro del alcance genérico de la publicación internacional de patente n.º WO 00/55149, pero que no se describen específicamente en la misma, y que presentan un perfil de actividad antigripal sorprendentemente ventajosa que comprende un largo período de residencia en los pulmones y una elevada potencia.

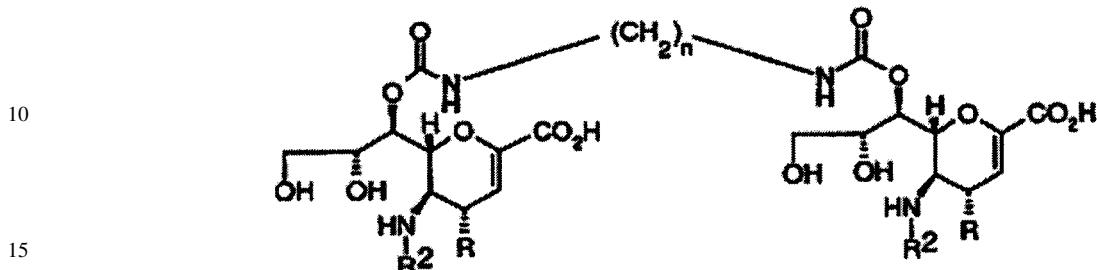
60

65 Sin pretender ceñirse exclusivamente a la teoría, se considera que la base del largo período de residencia en los pulmones radica en el tamaño y el peso molecular de los compuestos que evitan la entrada a través de las uniones intercelulares herméticas del epitelio respiratorio y en la polaridad de los compuestos que son de tal modo que el paso a través de las membranas celulares se produce de un modo muy ineficiente. Una teoría alternativa consiste en que los propios compuestos interactúan con los fosfolípidos de la membrana celular u otros compuestos del epitelio respiratorio e incrementan el período de residencia en los pulmones.

Sumario de la invención

En un primer aspecto la presente invención proporciona un compuesto de fórmula general (I):

5



(I)

20

en la que

R es un grupo amino o guanidino;

25

R² es acetilo o trifluoroacetilo; y

n es un número entero comprendido entre 10 y 18;

30

o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

Preferentemente R es un grupo guanidino.

35

Preferentemente R² es un grupo acetilo.

Preferentemente n se encuentra comprendido entre 10 y 14, más preferentemente entre 12 y 14.

40

Los expertos en la materia podrán apreciar que los compuestos de fórmula (I) se pueden modificar para proporcionar unos derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos en uno o más de los grupos funcionales de los compuestos de fórmula (I). Resultan de particular interés como derivados los compuestos modificados en el grupo funcional carboxilo, los grupos funcionales hidroxilo o en los grupos amino. De este modo, los grupos de interés comprenden ésteres alquílicos, tales como los ésteres metílico, etílico, propílico o isopropílico, ésteres arfílicos, tales como los ésteres fenílico, benzoílico, y ésteres acetílicos de los compuestos de fórmula (I).

45

El término "derivado farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal, éter, éster o sal de dicho éster farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula (I) o cualquier otro compuesto que, que al administrarlo al receptor, puede proporcionar un compuesto de fórmula (I) o un metabolito activo desde el punto de vista antivírico o residuo del mismo. Resultan de particular interés como derivados los compuestos modificados en los grupos carboxi o glicerol hidroxi del ácido siálico, o el los grupos amino y guanidina.

50

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) comprenden aquellas obtenidas a partir de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de ácidos adecuados comprenden los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, fórmico, benzoíco, malónico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. Otros ácidos tales como el ácido oxálico, aun que no son por sí mismos farmacéuticamente aceptables, pueden resultar útiles en la preparación de sales útiles como productos intermedios en la obtención de compuestos de la presente invención y sus sales de adición en ácidos farmacéuticamente aceptables.

60

Las sales obtenidas a partir de bases apropiadas comprenden sales de metales alcalinos (por ejemplo sodio), de metales alcalinotérreos (por ejemplo magnesio), de amonio y de NR₄⁺ (en la que R es un grupo alquilo C₁₋₄).

65

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante los procedimientos descritos en la misma. Resultará evidente para los expertos en la materia que es necesario utilizar grupos protectores para proteger uno o más grupos funcionales de la molécula de enlace con la exo- α -sialidasa durante el proceso de unión de los monómeros al grupo espaciador alquilo. Véase por ejemplo *Protective Groups in Organic Synthesis* "Grupos protectores en la síntesis orgánica" por T. W. Green y P. G. M. Nuts (John Wiley & Sons, 1991). Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmico (I) se pueden preparar según procedimientos conocidos.

ES 2 305 301 T3

Por consiguiente, la presente invención proporciona asimismo un procedimiento de preparación del compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, que comprende la etapa de desproteger un compuesto de fórmula (II).

5

10

15

20

(II)

25

en la que n se define como anteriormente, P_1 es un grupo protector del ácido carboxílico y P_2 es un grupo protector de la amina.

30

La presente invención proporciona además un procedimiento de preparación del compuesto de fórmula (I), que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (III)

35

40

45

(III)

50

en la que P_1 y P_2 son tal como se ha definido anteriormente, con un compuesto de fórmula (IV):

55



(IV)

60

en el que n es tal como se ha definido anteriormente para formar el compuesto de fórmula (II) tal como se ha definido anteriormente y;

(b) desproteger el compuesto de fórmula (II).

65

ES 2 305 301 T3

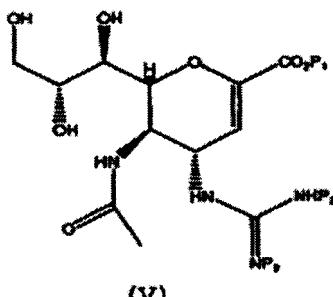
La presente invención proporciona además un procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (I) que comprende las etapas de:

(a) proteger un compuesto de fórmula (V)

5

10

15



(V)

en la que P_1 y P_2 son tal como se ha definido anteriormente, para formar el compuesto de fórmula (III) tal como se ha definido anteriormente;

20

(b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (III) con el compuesto de fórmula (IV) tal como se han definido anteriormente para formar el compuesto de fórmula (II) tal como se ha definido anteriormente; y

25

(c) desproteger el compuesto de fórmula (II).

30

Para utilizar en el tratamiento se prefiere que los compuestos de fórmula (I) se encuentren en forma cristalina. Hemos descubierto que el compuesto de fórmula (I) en el que R es un grupo guanidino, R^2 es un grupo acetilo y n es 13 (Ejemplo 4 posterior) se puede preparar en forma cristalina mediante la cristalización a partir de una disolución acuosa mediante procedimientos descritos en la presente memoria.

35

Los compuestos de fórmula (I) presentan actividad antivírica. En particular dichos compuestos son inhibidores de la exo- α -sialidasa vírica de los ortomixovirus y los paramixovirus, por ejemplo la exo- α -sialidasa vírica de la gripe A y B, la paragripe, la parotiditis y la enfermedad de Newcastle.

40

De este modo, en un segundo aspecto la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o un derivado del mismo farmacéuticamente aceptable, para utilizar como agente terapéutico activo en el tratamiento de una infección vírica, por ejemplo en infecciones producida por ortomixovirus o paramixovirus.

45

Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar en un procedimiento para la prevención o el tratamiento de una infección vírica que comprende la etapa de la administración a un paciente que necesita la misma de una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I), o una sal o derivado del mismo farmacéuticamente aceptable.

50

Preferentemente, la infección vírica es una infección producida por ortomixovirus o paramixovirus. Más preferentemente la infección vírica es una infección de la gripe A o B.

55

Preferentemente el paciente es un animal tal como un mamífero, más preferentemente un ser humano, o un miembro del género *Equus*, por ejemplo un caballo, un asno o un mulo. Más preferentemente el mamífero es un ser humano.

60

En un cuarto aspecto la presente invención proporciona la utilización de un compuesto de la presente invención para fabricar un medicamento destinado al tratamiento de una infección vírica.

65

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad efectiva" significa una cantidad del compuesto de fórmula I efectiva para prevenir o tratar una infección vírica a fin de producir la respuesta terapéutica pretendida. Por ejemplo, para superar o atenuar los efectos de una infección vírica.

70

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad del compuesto de fórmula I para producir la respuesta terapéutica pretendida. Por ejemplo, tratar o prevenir una infección vírica.

75

La "cantidad terapéuticamente efectiva" específica variará, obviamente, con factores tales como la infección vírica particular que se está tratando, el estado físico del paciente, el tipo de animal que se está tratando, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea (si es que se realiza alguna), y la formulación específica utilizada y la estructura del compuesto o de sus derivados.

80

Generalmente, los términos "tratar", "tratamiento" y similares se utilizan en la presente memoria significando que afectan al paciente, tejido o célula para obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico pretendido. El efecto puede ser preventivo desde el punto de vista de prevenir completamente o parcialmente una infección vírica o signo o síntoma

de la misma, y/o puede ser terapéutica desde el punto de vista de curar parcialmente o completamente una infección vírica. "Tratar" tal se utiliza en la presente memoria abarca cualquier tratamiento de, o prevención de, una infección vírica en un vertebrado, un mamífero, particularmente un ser humano, y comprende (a) prevenir que se produzca la infección vírica en un paciente susceptible de la infección vírica, pero que no ha sido diagnosticado aún con la infección vírica, pero que no ha sido diagnosticado aún padeciéndola; (b) inhibir la infección vírica, es decir, detener su desarrollo; o (c), aliviar o atenuar los efectos, es decir, provocar la regresión de los síntomas de la infección vírica.

Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar asimismo en procedimientos de diagnóstico, en particular en procedimientos para la detección del virus de la gripe. Para utilizar dichos procedimientos puede resultar ventajoso unir un compuesto de la invención a un marcador, tal como un marcador radiactivo, fluorescente o quimio-luminiscente.

Los procedimientos de diagnóstico para los que los compuestos de la presente invención resultan apropiados se describen, por ejemplo, en nuestras solicitudes anteriores PCT/AU97/00109 y PCT/AU97/00771.

En un quinto aspecto la presente invención proporciona un procedimiento *ex vivo* para la detección de una infección vírica que comprende la etapa de poner en contacto el compuesto de la presente invención con una muestra de la que se sospecha que contiene el virus.

Se podrá apreciar además que la cantidad de un compuesto de la presente invención requerida para utilizar en el tratamiento variará no únicamente con el compuesto particular seleccionado sino también con la vía de administración, la naturaleza del trastorno a tratar, y la edad y el estado clínico del paciente, y quedará en última instancia a discreción del facultativo o veterinario. Sin embargo, en general, una dosis apropiada se encontrará comprendida entre 0,001 y 100 mg/kg de peso corporal por día, preferentemente comprendida entre 0,01 y 10 mg/kg de peso corporal por día, más preferentemente comprendida entre 0,1 y 1 mg/kg/día.

El tratamiento se inicia preferentemente antes o en el período de la infección y continúa hasta que el virus ya no se encuentra presente en el tracto respiratorio. Sin embargo los compuestos resultan asimismo eficaces si se realiza una administración posinfecciosa, por ejemplo una vez se han confirmado los síntomas.

El tratamiento apropiado se administra una o dos veces, preferentemente únicamente una vez para el tratamiento y preferentemente una vez a la semana para la prevención.

El compuesto se administra convenientemente en forma de dosis unitaria, por ejemplo comprendiendo entre 1 y 100 mg, más convenientemente entre 1 y 20 mg del principio activo por dosis unitaria.

Cuando resulte posible que, para utilizar en la terapia, se administre un compuesto de la presente invención como sustancia química bruta, se prefiere presentar el principio activo como formulación farmacéutica.

De este modo, en un sexto aspecto la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o preventivos. El (los) excipientes ha(n) de ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y de no resultar nocivos para el receptor del (de los) mismo(s).

Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar asimismo en combinación con otros agentes terapéuticos y/o preventivos, por ejemplo otros agentes antiinfecciosos. En particular los compuestos de la presente invención se pueden utilizar con otros agentes antivíricos. La presente invención de este modo proporciona en un séptimo aspecto una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal o derivado del mismo farmacéuticamente aceptable junto con otro principio terapéuticamente y/o preventivamente activo, en particular un agente antivírico.

Las combinaciones a las que se ha hecho referencia anteriormente se pueden presentar para utilizar en forma de una formulación farmacéutica y de este modo dichas formulaciones comprenden una combinación tal como se ha definido anteriormente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable para la misma lo que significa un aspecto adicional de la presente invención.

Los agentes terapéuticos y/o preventivos para utilizar en dichas combinaciones comprenden otros agentes antiinfecciosos, en particular agentes antibióticos y antivíricos tales como los utilizados en el tratamiento de infecciones respiratorias, por ejemplo otros compuestos o vacunas eficaces contra los virus de la gripe, tales como los análogos del ácido siálico a los que se ha hecho referencia anteriormente, por ejemplo, se pueden incorporar a dichas combinaciones zanamivir, oseltamivir, amantadina, rimantadina y ribavirina y Fluvax.

Los componentes individuales de dichas combinaciones se pueden administrar tanto separadamente, secuencialmente o simultáneamente en formulaciones farmacéuticas separadas o combinadas.

Cuando los compuestos de la presente invención se utilizan con un segundo principio activo terapéutico y/o preventivo contra el mismo virus, la dosis de cada compuesto puede ser tanto la misma como distinta de la utilizada cuando cada compuesto se utiliza por separado. Los expertos en la materia podrán estimar las dosis apropiadas.

ES 2 305 301 T3

- Las formulaciones farmacéuticas comprenden aquellas apropiadas para la administración oral, rectal, intranasal, tópica (comprendiendo la bucal y la sublingual), vaginal o parenteral (comprendiendo la intramuscular, la subcutánea y la intravenosa), a aquellas apropiadas para la administración en el tracto respiratorio (comprendiendo las fosas nasales) por ejemplo por inhalación o insuflación. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente, cuando resulte apropiado, en dosis unitarias discretas, y se pueden preparar mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica farmacéutica. Dichos procedimientos comprenden la etapa de unir el principio activo con excipientes líquidos o excipientes sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, si resulta necesario, conformar el producto en la formulación pretendida.
- Las formulaciones farmacéuticas apropiadas para la administración local se pueden presentar convenientemente como unidades discretas tales como cápsulas, sello o comprimidos que comprenden cada uno de ellos una cantidad predeterminada del principio activo; como polvo o gránulos, como solución, suspensión o emulsión. El principio activo se puede presentar asimismo como inyección intravenosa rápida, electuaria o pasta. Los comprimidos y las cápsulas para la administración oral pueden comprender excipientes convencionales tales como aglutinantes, sustancias de relleno, lubricantes, desintegrantes o agentes humectantes. Los comprimidos se pueden revestir según procedimientos muy conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas orales se pueden encontrar por ejemplo en forma de suspensiones acuosas o aceitosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o se pueden presentar como un producto seco para su conformación con agua u otro vehículo adecuado antes de la utilización. Dichas preparaciones líquidas pueden comprender aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, emulsionantes, vehículos no acuosos, que pueden comprender aceites comestibles o conservantes.
- Los compuestos según la presente invención se pueden formular asimismo para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo inyección intravenosa rápida o venoclisis continua, y se pueden presentar como dosis unitarias en ampollas, jeringuillas llenadas previamente, recipientes para la venoclisis de un volumen pequeños o para dosis múltiples con un conservante añadido. Las composiciones se pueden presentar en forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden comprender agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo se puede presentar en forma pulverulenta, obtenido mediante el aislamiento aséptico del sólido estéril o por liofilización a partir de una disolución, para realizar un vehículo apropiado, por ejemplo agua estéril y sin pirógenos, antes de su utilización.
- En el caso de la administración tópica para la epidermis los compuestos según la presente invención se pueden formular como ungüentos, cremas o lociones, o como parches transdérmicos. Los ungüentos y las cremas se pueden formular, por ejemplo con una base acuosa o aceitosa con la adición de los agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones se pueden formular con una base acuosa o aceitosa, y en general comprenderán uno o más agentes emulsionantes, estabilizantes, dispersantes, de suspensión espesantes o colorantes.
- Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca comprenden pastillas para chupar que contienen el principio activo en una base saborizada, habitualmente sacarosa, goma arábiga o goma de tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina o sacarosa o goma arábiga; enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un excipiente líquido adecuado.
- Las formulaciones farmacéuticas apropiadas para la administración rectal en la que el excipiente es un sólido se presentan preferentemente como dosis unitarias en suppositorio. Los excipientes apropiados comprenden manteca de cacao y otros materiales utilizados habitualmente en la técnica, y los supositorios se pueden realizar convenientemente mediante la mezcla del principio activo con el (los) excipiente(s) ablandado(s) o fundidos, a continuación se enfrián y se moldean.
- Las formulaciones apropiadas para la administración vaginal se pueden presentar como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles que comprenden aparte del principio activo dichos excipientes apropiados tal como se conocen en la técnica.
- En el caso de la administración por el tracto respiratorio, comprendiendo la administración intranasal, los inhibidores de la exo- α -sialidasa se pueden administrar mediante cualquiera de los procedimientos y formulaciones utilizados en la técnica para la administración por el tracto respiratorio.
- Por lo tanto, en general, los compuestos se puede administrar en forma de solución o suspensión o como polvo seco.
- Las soluciones y suspensiones serán generalmente acuosas, por ejemplo preparadas a partir de agua sola (por ejemplo agua estéril o sin pirógenos) o agua y un codisolvente fisiológicamente aceptable (por ejemplo etanol, propilenglicol o macrogoles tales como el PEG 400).
- Dichas soluciones o suspensiones pueden comprender además otros excipientes por ejemplo conservantes (tales como el cloruro de benzalconio), agentes solubilizantes / tensioactivos tales como los polisorbatos (por ejemplo Tween 80, Span 80, cloruro de benzalconio), agentes amortiguadores del pH, agentes de ajuste de la isotonicidad (por ejemplo el cloruro sódico), intensificadores de la absorción e intensificadores de la viscosidad. Las suspensiones pueden comprender además agentes de suspensión (por ejemplo celulosa microcristalina, carmelosa sódica).

ES 2 305 301 T3

Las soluciones o suspensiones se aplican directamente a las fosas nasales mediante medios convencionales, por ejemplo con un cuentagotas, una pipeta o un nebulizador. Las formulaciones se pueden proporcionar en formas unitarias o multidosis. En este último caso resulta conveniente proporcionar un dosificador. En el caso del cuentagotas o de la pipeta ello se puede conseguir al administrar el paciente un volumen predeterminado apropiado de la solución 5 o suspensión. En el caso de un aerosol ello se puede conseguir por ejemplo mediante una bomba dosificadora de aerosolización rociada.

La administración por el tracto respiratorio se puede realizar asimismo mediante una formulación para aerosol en la que se proporciona un compuesto en un envase presurizado con un propelador apropiado, tal como un compuesto 10 clorofluorocarbonado (CFC), por ejemplo diclorodifluorometano, triclorodifluorometano o diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. El aerosol puede comprender convenientemente asimismo un tensioactivo tal como la lecitina. La dosis del fármaco se puede controlar disponiendo una válvula de dosificación.

Alternativamente los compuestos se pueden proporcionar en forma de un polvo seco, por ejemplo una mezcla de 15 polvo del compuesto en una base apropiada para el polvo tal como lactosa, almidón, derivados del almidón tales como la hipromelosa y la povidona (PVP). Convenientemente el excipiente del polvo formará un gel en las fosas nasales. La composición del polvo se puede presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo en cápsulas o cartuchos de por ejemplo gelatina, o en envases alveolados desde los que se puede administrar al polvo mediante un inhalador.

20 En las formulaciones destinadas a la administración por el tracto respiratorio, que comprenden las formulaciones intranasales, el compuesto presentará generalmente un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo aproximadamente de 5 micrómetros o inferior. Dicho tamaño de partícula se puede obtener por medios conocidos en la técnica, por ejemplo mediante micronización.

25 Cuando se pretenda, se pueden utilizar formulaciones adaptadas para proporcionar una liberación sostenida del principio activo.

30 Preferentemente los compuestos de la presente invención se administran al tracto respiratorio mediante inhalación, insuflación o administración intranasal, o una combinación de los mismos.

“Relenza” se administra por inhalación como polvo de paso total mediante un “Diskhaler” (marcas comerciales del grupo de compañías GlaxoSmithKline). Una formulación similar resultaría adecuada para la presente invención.

35 Por lo tanto, según un octavo aspecto de la presente invención se proporciona un inhalador que comprende una formulación tal como se ha definido anteriormente.

Se podrá apreciar que el inhalador se puede presentar asimismo en forma de un inhalador de aerosolización con dosímetro.

40 A efectos de la presente especificación se comprenderá claramente que el término “comprendiendo” significa “incluyendo pero sin limitarse a”, y que la palabra “comprende” tiene el significado correspondiente.

45 Todas las publicaciones, comprendiendo, pero sin limitarse a las mismas, patentes y solicitudes de patente, citadas en la presente especificación se incorporan a la presente memoria por referencia tal como si cada publicación individual se indicase específicamente e individualmente para incorporarse como referencia a la misma como descritas en su totalidad.

50 Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá a continuación en detalle mediante los siguientes ejemplos no limitativos presentados únicamente como referencia.

55 Métodos automáticos

Método A (LC/MS)

60 Espectrómetro de masas Micromass Platform II funcionando en modo de electroaerosol de iones positivos, intervalo de masas 100 - 1000 uma.

Columna: 3,3 cm x 4,6 mm ID, 3 μ m ABZ+PLUS

Flujo: 3 ml/min

65 Volumen de inyección: 5 μ l

Disolvente A: acetonitrilo al 95% + ácido fórmico al 0,05%

ES 2 305 301 T3

Disolvente B: ácido fórmico al 0,1% + acetato de amonio 10 mMolar

Gradiente: 0% A / 5 min, 100 - 0% B / 5 min

5

Método B

La columna Prep utilizada fue una Supelcosil ABZplus (10 cm x 2,12 cm)

10 Longitud de onda de UV: 230 nm

Flujo: 4 ml/min

15 Disolvente A: acetonitrilo + TFA al 0,05%

Disolvente B: agua + TFA al 0,1%

Gradiente: 20 - 40% A / 20 min, 40% A / 20 min, 40 - 100% A / 0,3 min, 100% A / 15 min, 100 - 20% A / 3 min

20

Abreviaturas

TFA Ácido trifluoacético

25 DMAP 4-dimetilaminopiridina

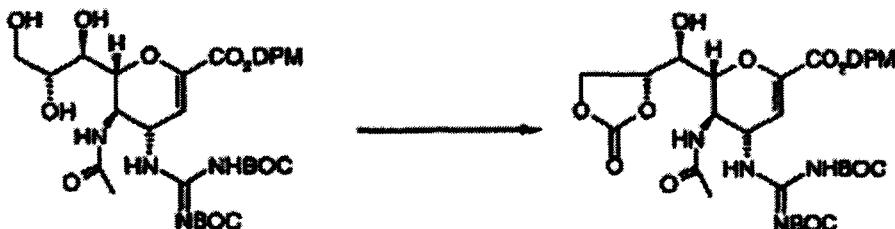
SPE extracción en fase sólida

30 DPM difenilmetano

35 BOC grupo t-butoxicarbonilo

Preparación del producto intermedio 1

35



Producto intermedio 1

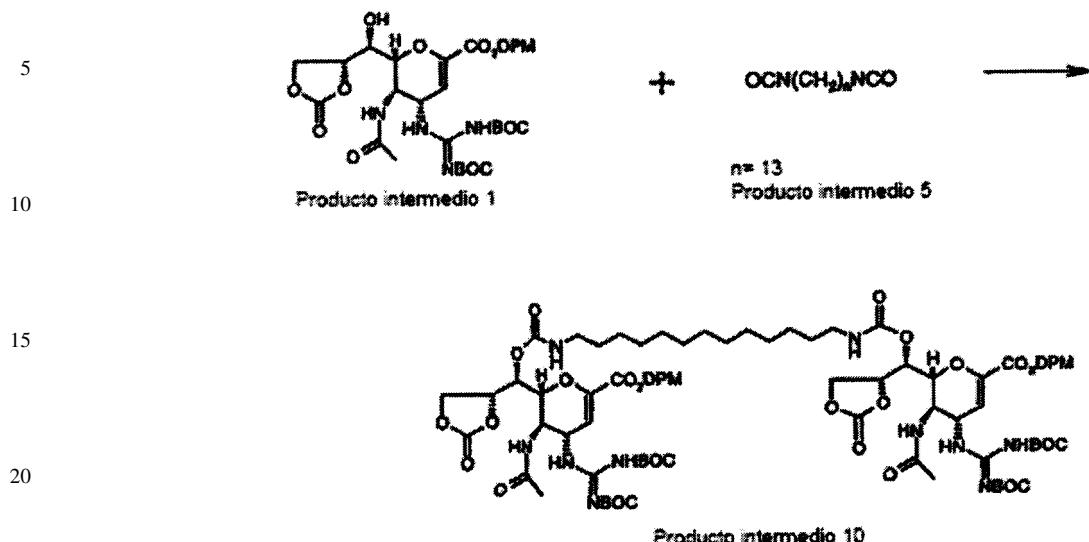
50

Se disolvió benzhidril (2R, 3R, 4S)-3-(acetilamino)-4-((E)-[(terc-butoxicarbonil)amino][(terc-butoxicarbonil)imino]metil}amino)-2-[(1R, 2R)-1,2,3-trihidroxipropil]-3,4-dihidro-2H-piran-6-carboxilato (véase *J. Med. Chem.* 1998, 41, 787 - 797) (12,38 g; 17,7 mmol) en acetonitrilo seco (130 ml) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Se agitó la disolución y se añadió 1,1'-carbonildiimidazol (2,87 g; 17,7 mmol). Tras 16 horas la LC/MS demostró la presencia del triol inicial por lo que se añadió 1,1'-carbonildiimidazol adicional (un total de 0,493 g; 3 mmol). Tras unas horas la LC/MS de mostró que no se encontraban trioles. Se evaporó el disolvente y se sometió el residuo a una columna flash en sílice, eluyendo con 1:1 de acetato de etilo / 40 - 60 de éter de petróleo. Las fracciones que comprendían el producto pretendido se evaporaron y se recogieron en diclorometano, secado con sulfato sódico, se separaron y se evaporaron para proporcionar el producto intermedio 1 (benzhidril (2R, 3R, 4S)-3-(acetilamino)-4-((E)-[(terc-butoxicarbonil)amino][(terc-butoxicarbonil)imino]metil}amino)-2-((S)-hidroxi[(4R)-2-oxo-1,3-dioxolan-4-il]metil}-3,4-dihidro-2H-piran-6-carboxilato) como un producto sólido blanco separado (11,05 g; 86%).

65

ES 2 305 301 T3

Preparación del producto intermedio 10



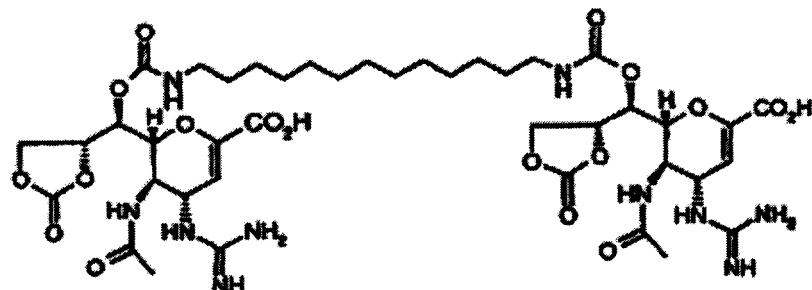
Se disolvió el producto intermedio 1 (0,4 g; 0,56 mmol) en diclorometano seco (0,5 ml). A éste se añadió DMAP (20 mg) y se pasó por 4 filtros moleculares de tipo 3A seguido por el producto intermedio 5 (50 mg; 0,19 mmol). Se sometió la mezcla a reflujo durante la noche y se aplicó directamente a un cartucho de SPE en 10 g de Si eluido con éter dietílico y acetato de etilo para proporcionar el producto intermedio 10 como un cristal incoloro (0,16 g, rendimiento del 50%).

La LC/MS (método A) presentó $(M + 2H^+)/2 = 858$; $T_{REF} = 4,68$ min.

De un modo similar se preparó lo siguiente:

n	diisocianato	dicarbamato	$(M + 2H^+)/2$	T_{REF} (min)
10	producto intermedio 2	producto intermedio 7	837	4,58
11	producto intermedio 3	producto intermedio 8	844	4,68
12	producto intermedio 4	producto intermedio 9	851	4,66
14	producto intermedio 6	producto intermedio 11	865	4,75

Preparación del producto intermedio 15



ES 2 305 301 T3

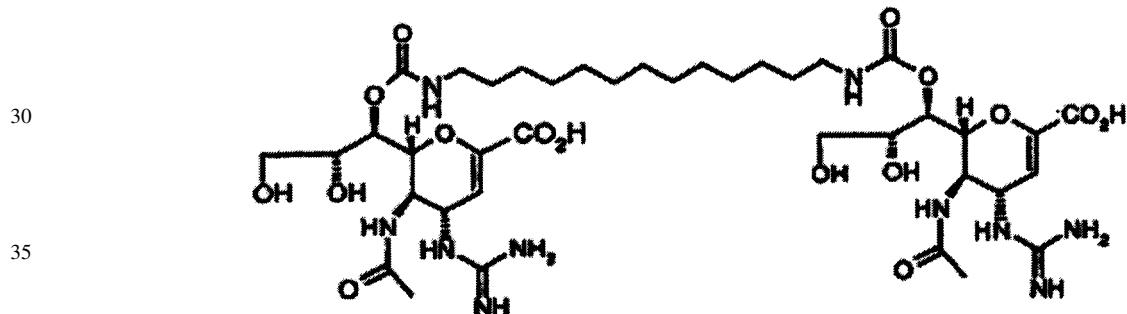
Se disolvió el producto intermedio 10 (0,16 g; 0,093 mmol) en una mezcla 10:1 de diclorometano: anisol (6,3 ml) a temperatura ambiente. A ésta se añadió TFA (6,3 mg) y la disolución resultante se agitó durante 2,5 horas y a continuación se evaporó al vacío. La trituración del residuo con éter proporcionó el producto intermedio 15 como sal de di-TFA (92 mg, rendimiento del 82%). La LC/MS (método A) presentó $(M + 2H^+)/2 = 492$; $T_{RET} = 2,61$ min.

5

De un modo similar se preparó lo siguiente:

n	diisocianato	dicarbamato	$(M + 2H^+)/2$	T_{REF} (min)
10	producto intermedio 7	producto intermedio 12	471	2,31
15	producto intermedio 8	producto intermedio 13	478	2,43
20	producto intermedio 9	producto intermedio 14	485	2,51
	producto intermedio 11	producto intermedio 16	499	2,68

25



40 Ejemplo 4: n = 13

Ácido bis (2R, 3R, 4S)-3-(acetilamino)-2-[(1R, 21R, 22R)-21-((2R, 3R, 4S)-3-(acetilamino)-4-[(amino(imino)metil)amino]-6-carboxi-3,4-dihidro-2H-piran-2-il)-1-[(1R)-1,2-dihidroxietil]-22,23-dihidroxi-3,19-dioxo-2,20-dioxa-4,18-diazatricos-1-il)-4-[(amino(imino)metil)amino]-3,4-dihidro-2H-piran-6-carboxílico (sal del ácido trifluoacético)

45 El producto intermedio 15 (92 mg; 0,076 mmol) se disolvió en una mezcla de agua (16 ml) y metanol (16 ml). A ésta se añadió trietilamina (4 ml) y se agitó la disolución durante 1 hora. Los compuestos orgánicos volátiles se eliminaron al vacío y el residuo se ajustó a un pH de 2 con TFA. La HPLC preparativa en fase inversa (método B) proporcionó el ejemplo 4 como sal de di-TFA (35,5 mg; rendimiento del 40%). La LC/MS (método A) presentó $(M + 2H^+)/2 = 466$; $T_{RET} = 2,45$ min.

50 Análisis elemental:- Obtenido: C, 42,00; H, 5,79; N, 11,00%. Calculado para el tetrahidrato: C, 41,95; H, 6,18; N, 11,38%. NMR (D_2O) δ : 5,85 (2H, d, 2 x CH); 4,85 (2H, dd, 2 x CH); 4,46 (2H, dd, 2 x CH); 4,34 (2H, dd, 2 x CH); 4,05, 2H, t, 2 x CH); 3,94 (2H, m, 2 x CH); 3,58 (2H, dd, CH_2); 3,42 (2H, dd, CH_2); 2,95 (4H, m, 2 x CH_2); 1,88 (6H, s, 2 x CH_3); 1,38 (4H, br.m, 2 x CH_2); 1,22 - 1,10 (18 H, br.m, 9 x CH_2) p.p.m.

Ejemplo 4a

60 *Preparación a gran escala del ejemplo 4*

65 El producto intermedio 15 (2,8 g; 2,3 mmol) se disolvió en agua (50,4 ml). A éste se le añadió metanol (50,4 ml) y a continuación trietilamina (6,4 ml; 46 mmol). La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, el volumen de la mezcla de la reacción se redujo en aproximadamente un 33% al vacío a 35 grados C. A continuación se ajustó el pH a 2 con TFA (0,5 ml). La disolución acidulada se inyectó a continuación en un sistema de HPLC Prochrom LC50 que comprendía una columna de 20 cm x 5 cm empaquetada con un material de empaquetado Kromasil C8 de 7 micrómetros. Se sometió la columna a un gradiente de elución:

ES 2 305 301 T3

Disolvente A: agua + TFA al 1%

Disolvente B: acetonitrilo / agua al 75% + TFA al 1%

5 Flujo: 80 ml/min

Gradiente: 0% B a 100% B / 40 min

10 Se combinaron las fracciones apropiados y se eliminó el acetonitrilo al vacío a 35 grados C. Se absorbió el residuo acuoso en una columna de Amberchrom CG-161 (resina PSDVB) de 10 cm x 22 mm y la columna se lavó con agua y a continuación se eluyó con acetonitrilo : MeOH : agua en una proporción de 2:2:1 (500 ml). Se eliminó el disolvente al vacío para producir una goma. La adición de isopropanol (20 ml) produjo un sólido que se secó para obtener el producto como el ión dipolar (1,68 g).

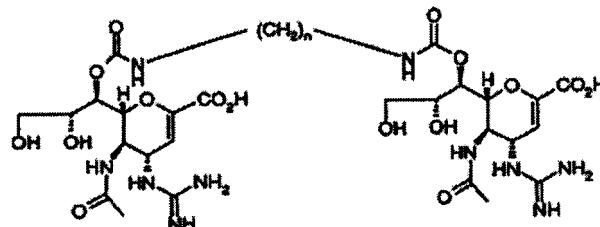
15 Ejemplo 4b

Cristalización del ejemplo 4

20 El ión dipolar (100 mg; 0,1075 mmol) se disolvió en agua (35 ml). Se le añadió bicarbonato sódico (18,06 mg; 0,215 mmol) y la disolución resultante se liofilizó para proporcionar un sólido blanco. Una muestra (2 mg) de dicho sólido se disolvió en agua (0,8 ml) y se evaporó hasta obtener un aceite meloso. Se añadió dioxano (1 ml) y se formó un sólido blanco. Se dejó depositar el sólido y se retiró el sobrenadante. Se añadió más dioxano (1 ml) y se volvió a retirar el sobrenadante. Dicho procedimiento se repitió dos veces más y se secó al vacío el sólido obtenido. El examen 25 con luz polarizada demostró la cristalinidad.

Los ejemplos E1, E2, E3 y E5 se prepararon utilizando un procedimiento análogo al del ejemplo 4.

30



35

40 Ejemplo 1: n = 10

Ácido bis (2R,3R,4S)-3-(acetilamino)-2-[(1R, 18R, 19R)-18-((2R, 3R, 4S)-3-(acetilamino)-4-{{[amino(imino)metil]amino}-6-carboxi-3,4-dihidro-2H-piran-2-il}-1-[(1R)-1,2-dihidroxietil]-19,20-dihidroxi-3,16-dioxo-2,17-dioxa-4,15-diazaciclos-1-il)-4-{{[amino(imino)metil]amino}-3,4-dihidro-2H-piran-6-carboxílico (sal del ácido trifluoacético)

45 La LC/MS (método A) presentó $(M + 2H^+)/2 = 445$; $T_{RET} = 2,13$ min.

50

Ejemplo 2: n = 11

Ácido bis (2R, 3R, 4S)-3-(acetilamino)-2-[(1R, 19R, 20R)-19-((2R, 3R, 4S)-3-(acetilamino)-4-{{[amino(imino)metil]amino}-6-carboxi-3,4-dihidro-2H-piran-2-il}-1-[(1R)-1,2-dihidroxietil]-20,21-dihidroxi-3,17-dioxo-2,18-dioxa-4,16-diazahenicos-1-il)-4-{{[amino(imino)metil]amino}-3,4-dihidro-28-piran-6-carboxílico (sal del ácido trifluoacético)

55 La LC/MS (método A) presentó $(M + 2H^+)/2 = 452$; $T_{RET} = 2,25$ min.

60

Ejemplo 3: n = 12

Ácido bis (2R, 3R, 4S)-3-(acetilamino)-2-[(1R, 20R, 21R)-20-((2R, 3R, 4S)-3-(acetilamino)-4-{{[amino(imino)metil]amino}-6-carboxi-3,4-dihidro-2H-piran-2-il}-1-[(1R)-1,2-dihidroxietil]-21,22-dihidroxi-3,18-dioxo-2,19-dioxa-4,17-diazadocos-1-il)-4-{{[amino(imino)metil]amino}-3,4-dihidro-2H-piran-6-carboxílico (sal del ácido trifluoacético)

65

La LC/MS (método A) presentó $(M + 2H^+)/2 = 459$; $T_{RET} = 2,34$ min.

ES 2 305 301 T3

Ejemplo 5: n = 14

5 Acido bis(2R,3R,4S)-3-(acetilamino)-2-((1R,22R,23R)-22-((2R,3R,4S)-3-(acetilamino)-4-([amino(imino)methyl]amino)-6-carboxi-3,4-dihidro-2H-piran-2-il)-1-[(1R)-1,2-dihidroxietil]-23,24-dihidroxi-3,20-dioxo-2,21-dioxa-4,19-diazatetracos-1-il)-4-([amino(imino)methyl]amino)-3,4-dihidro-2H-piran-6-carboxilico (sal del acido trifluoacetico)

La LC/MS (método A) presentó $(M + 2H^+)/2 = 473$; $T_{RET} = 2,50$ min.

10 Ejemplo 6

Análisis de los compuestos de fórmula (I) - Inhibición de la reproducción del virus de la gripe

15 Se realizaron análisis del efecto citopático (CPE) esencialmente tal como describen Watanabe *et al.* (*J. Virological Methods*, 1994 48 257). Las células MDCK se infectaron con un inóculo definido del virus (determinado mediante experimentación para que sea el mínimo suficiente para provocar el CPE adecuado en 72 horas y que resulte susceptible de controlar los compuestos a concentraciones consideradas coherentes con las normativas publicadas) en presencia de disoluciones en serie de los compuestos de la presente invención. Los cultivos se incubaron hasta 72 horas a 37°C en una atmósfera del CO₂ al 5%. El nivel del CPE y por lo tanto de la multiplicación vírica se determinó mediante el metabolismo del colorante vírico bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) según procedimientos publicados (véase por ejemplo, Watanabe *et al.*, 1994). La concentración del compuesto que inhibió el CPE en un 50% (DI₅₀) se calculó mediante un programa informático de ajuste a curvas. se analizaron los virus de la gripe A/Sydney/5/97 y B/Harbin/7/95 y los resultados se presentan en la Tabla 1. Los datos comparable para un compuesto descrito específicamente en el documento WO 00/55149 y para el compuesto A se presentan asimismo en la Tabla 1.

25

TABLA 1

	DI ₅₀ µg/ml	DI ₅₀ M	DI ₅₀ µg/ml	DI ₅₀ M
Descripción	A/Sydney/5/97 +	A/Sydney/5/97 +	B/Harbin/7/95	B/Harbin/7/95
Compuesto A	0,023 ± 0,024	69	0,013 ± 0,011	39
E1	0,0002	0,179	0,0004	0,09
E2	0,0001	0,09	0,00007	0,09
E3	0,0001, 0,0001	0,087	0,0001, 0,0001	0,087
E4	0,0001	0,086	0,0001	0,086
E5	0,0001	0,085	0,0003	0,26
Compuesto número 8 *	0,0007, 0,0005	0,58, 9,75	0,007 ± 0,01	5,8
Compuesto número 10 *	0,057	66	> 0,1	> 115

55 * Tal como se hace referencia en el documento WO 00/55149

+ Datos proporcionados en el documento WO 00/55149 con respecto al virus H3N2 aislado A/Victoria/3/75 en vez del A H3N2 aislado. Cuando se comparan dichos datos, los expertos en la materia podrán apreciar que las diferencias en la potencia antivírica no resulta inusuales para un compuesto determinado cuando se analiza

60 contra distintos virus *in vitro*. Por ejemplo, Woods *et al.* (*Antimicrob Agents Chemother* 1993 37: 1473 – 9) han indicado que el compuesto A presenta un amplio intervalo de valores de CE₅₀ (desde 0,02 a 0,16 µM) en ensayos *in vitro* que implican aislados clínicos recientes. Por consiguiente, se consideró más potente el compuesto 8 en análisis de CPE que implican los virus de la gripe A H3N2 revientes aislados A/Sydney/5/97 en vez del anterior H3N2 aislado A/Victoria/3/75.

ES 2 305 301 T3

Los datos proporcionados en la tabla 1 demuestran que los compuestos E1 a E5, además de resultar sustancialmente más potentes que el compuesto A altamente activo, son incluso más potentes contra el A/Sydney/5/97 y sustancialmente más potentes contra el virus de la gripe B asilado B/Harbin/7/95 asilado que los compuestos 8 y 10 del documento WO 00/55149.

5

Ejemplo 7

Ensayo de reducción de placas

10 Se sembraron células de riñón canino Madin Darby (MDCK) en placas de cultivo tisular de seis pocillos y se hicieron multiplicar hasta converger mediante procedimientos estándar. Se diluyeron los virus de la gripe en un volumen mínimo de disolución salina amortiguada con fosfato enriquecida con seroalbúmina bovina al 0,2% para proporcionar una valoración estimada de 50 a 100 unidades formadoras de placas (pfu) por pocillo. Tras la adsorción a las células MDCK durante una hora a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% se aspiraron los inóculos víricos inocula y se sustituyeron con medio de cultivo vírico (medio mínimo de Eagle enriquecido con BSA, tripsina e insulina / transferrina / selenio a unas concentraciones óptimas) que contenía suficiente agaragar o agarosa (generalmente del 1 al 2%) para provocar que el medio gelificase a temperatura ambiente y a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% hasta que se desarrollaron las placas (generalmente 2 a 4 días). Las placas se pueden visualizar con un colorante adecuado (por ejemplo violeta cristal al 0,4% violeta cristal en disolución salina) antes de realizar el recuento. La potencia antivírica 15 se expresó como la concentración del producto analizado que reduce el número de placas en un 50% del valor de control sin tratar (CE₅₀).

20

		CE ₅₀					
		PRA					
Ejemplo	A/WSN *	A/Vic *	A/Syd *	A/New *	A/Pan *	A/Bay *	
Compuesto A	5,6 > 100	5,5 ± 8,2 0,0023	2,4 0,000429	0,27 0,23	2,7, 3	35	
	3	0,06, 0,2	< 0,0001				
	2						
	4	< 0,0001, < 0,01, 0,2	< 0,0001	0,043	< 0,0001		
	5	< 0,0001, < 0,001, 0,02, 0,3	0,032	< 0,0001	0,032	< 0,0001	
Amantadina Oseltamivir		220		11	157		
		0,11		0,23	0,3		
* A/WSN/33 BVLV09 (H1N1) A/Victoria/3/75 BVLV017 (H3N2) A/Sydney/5/97 BVLV015 (H3N2) A/New Caledonia/20199 BVLV008 (H1N1) A/Panama/2007/99 BVLV008 (H3N2) A/Bayern/7/95 BVLV006 (H1N1)							

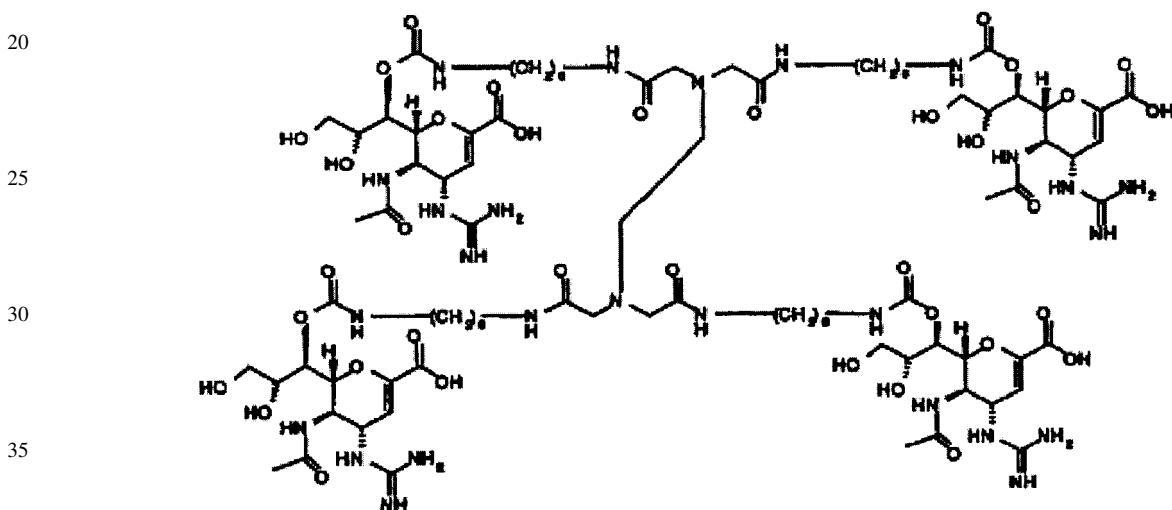
		CE ₅₀ ng/ml			
		PRA			
Ejemplo	B/Vic *	B/Harb *	B/HongK *	B/Yam *	
Compuesto A	3, 20 0,09, 0,01	0,19	21 ± 6 < 0,0001	0,2, 3,1 < 0,0001, <	
	3			0,0001	
	2	0,04, 0,05		< 0,0001	
	4	0,01, 0,1		< 0,0001	
	5	0,05, 0,1	0,06 0,37	< 0,0001 > 10.000 32	2061 0,7
Amantadina Oseltamivir					
* B/Victoria/1/67 B/Hong Kong/5/72 BVLV012 B/Harbin/7/95 BVLV008 B/Yamanashi/166/98 BVLV007					

Ejemplo 8

Valoración de la duración prolongada de la acción

5 Se anestesiaron los roedores y se les administró el compuesto de interés por vía endotraqueal con una dosis de 0,8 ml/kg. A continuación se mantuvieron los roedores en posición vertical hasta que se recuperaron completamente. En distintos instantes, por ejemplo, 2, 8, 24 y 48 horas tras la administración, se determinaron los valores del compuesto en el tejido pulmonar mediante procedimientos analíticos. Se puede utilizar cualquier procedimiento analítico para detectar dicho tipo de compuesto. El período en el que los niveles del compuesto desciendan por debajo de la 10 sensibilidad de las técnicas analíticas identificadas determinará el período de permanencia del compuesto en el tejido pulmonar.

15 Los datos de la retención en los pulmones de rata para los compuestos seleccionados se presentan a continuación. Se ha de indicar que todos los experimentos comprendieron una dosificación conjunta de un estándar interno, principalmente el compuesto 3 de la publicación de patente internacional n.º WO 02/20514, para permitir la comparación. Los datos se expresan como la proporción con respecto a dicho compuesto, cuya estructura se presenta a continuación.



45 Se incluyen los datos para el compuesto A con finalidades comparativas. Los compuestos de la presente invención presentan una retención significativamente superior a los 7 días que el compuesto A cuando se expresa como proporción de la concentración del compuesto con respecto a la concentración estándar.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 305 301 T3

Resultados del ensayo de retención en pulmones de rata								
Momento	Compuesto	Dosis	[cmpd]	Media [cmpd]	[Compuesto 3 de la PCT AU01/01128]	Media [Compuesto 3 de la PCT AU01/01128]	Media proporción [pulmón]	
horas		mg/kg	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g		[cmpd] / Compuesto 3 de la PCT AU01/01128
48	Ejemplo 3	0,1	591	1117	655	1413	0,79	
48	Ejemplo 3	0,1	1845		1840			
48	Ejemplo 3	0,1	914		1744			
168	Ejemplo 3	0,1	111	376	242	550	0,68	
168	Ejemplo 3	0,1	471		580			
168	Ejemplo 3	0,1	546		829			
48	Ejemplo 3	0,1	2414	1172	1098	1044	1,70	
48	Ejemplo 4	0,1	1927		1352			
48	Ejemplo 4	0,1	977		681			
168	Ejemplo 4	0,1	929	756	636	509	1,48	
168	Ejemplo 4	0,1	914		524			
168	Ejemplo 4	0,1	426		367			
48	Ejemplo 5	0,1	3044	4803	784	1487	3,25	
48	Ejemplo 5	0,1	6268		2046			
48	Ejemplo 5	0,1	5097		1605			
168	Ejemplo 5	0,1	2750	1789	632	363	4,95	
168	Ejemplo 5	0,1	1255		242			
168	Ejemplo 5	0,1	1388		216			
48	Compuesto A (zanamivir)	0,1	421	352	698	1368	0,26	
48	Compuesto A (zanamivir)	0,1	369		1901			
48	Compuesto A (zanamivir)	0,1	267		1507			
168	Compuesto A (zanamivir)	0,1	91	61	815	750	0,08	
168	Compuesto A (zanamivir)	0,1	47		925			
168	Compuesto A (zanamivir)	0,1	45		512			

Ejemplo 9

Valoración alternativa de la duración prolongada de la acción y de la eficacia

5 Se ha descrito anteriormente el protocolo para infectar ratones (1 a 4). Se inocularon ratones ligeramente anestesiados por las narinas externas con el virus de la gripe.

10 *Procedimiento y régimen del tratamiento.* Se administró una dosis única del compuesto en un momento definido hasta 10 días antes de la infección, preferentemente de 4 a 7 días antes de la infección, o tras la infección, preferentemente inmediatamente tras la infección y hasta 48 horas tras la infección. En la mayor parte de los experimentos se utilizó una cepa no letal de la gripe, y se determinó la eficacia mediante las reducciones en la valoración del virus en los pulmones. A cada ratón al que se administró el compuesto antes de la infección, se extirparon los pulmones tras la infección en un solo día, o en días tras la infección, preferentemente en los días 1 a 4 tras la infección. Se analizaron las muestras pulmonares homogeneizadas con respecto al virus utilizando procedimientos probados, y se estimaron y 15 compararon las valoraciones de las cargas víricas con las valoraciones de los virus en los ratones sin tratar.

20 En aquellos experimentos en los que se utilizó una cepa letal de la gripe adaptada a ratones, se valoró la eficacia mediante el incremento del índice de supervivencia y/o el número de supervivientes en comparación con los ratones sin tratar.

20

Referencias

25 1. **Ryan, D. M., J. Ticehurst, M. H. Dempsey, and C.R. Penn, 1994.** Inhibition of influenza virus replication in mice by GG167 (4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid) is consistent with extracellular activity of viral neuraminidase (sialidase). *Antimicrob. Agents and Chemother.* 38 (10): 2270 - 2275.

30 2. von **Itzstein M., W. -Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, T. V. Phan, M. L. Smythe, H. F. White, S. W. Oliver, P. M. Colman, J. N. Varghese, D. M. Ryan, J. M. Woods, R. C. Bethell, V. J. Hogham, J. M. Cameron, and C. R. Penn. 1993.** Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* (London) 363: 418-423.

35 3. **Woods, J. M., R. C. Bethell, J. A. V. Coates, N. Healey, S. A. Hiscox, B. A. Pearson, D. M. Ryan, J. Ticehurst, J. Tilling, S. A. Walcott, and C. R. Penn. 1993.** 4-Guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1473 - 1479.

40 4. **Robert J Fenton, Peter J Morley, Ian J Owens, David Gower, Simon Parry, Lee Crossman and Tony Wong (1999).** Chemoprophylaxis of influenza A virus infections, with single doses of zanamivir, demonstrates that zanamivir is cleared slowly from the respiratory tract. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 43, 11, 2642 - 2647.

Referencias citadas en la descripción

45 La lista de referencias citadas por el solicitante se presenta únicamente para una mayor comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido mucho cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO declina toda responsabilidad en este sentido.

50 **Documentos de patente citados en la descripción**

- WO 9116320 A [0003]
- WO 9518800 A [0003]
- WO 9520583 A [0003]
- WO 9806712 A [0003]
- AU 9700771 W [0003] [0031]
- WO 0055149 A [0004] [0005] [0087] [0087] [0088]
- AU 9700109 W [0031]
- WO 0220514 A [0091]

Publicaciones que no corresponden a patentes citadas en la descripción

- **MEINDL** *et al. Virology*, 1974, vol. 58, 457 [0003]
- 5 • *N. Engl. J. Med.*, 1997, vol. 337, 874-880 [0003]
- **T.W. GREEN**; P.G.M. **NUTS**. Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley & Sons, 1991 [0015]
- 10 • *J. Med. Chem.*, 1998, vol. 41, 787-797 [0071]
- **WATANABE** *et al. J. Virological Methods*, 1994, vol. 48, 257 [0087]
- **WOODS** *et al. Antimicrob Agents Chemother*, 1993, vol. 37, 1473-9 [0120]
- 15 • **RYAN**, D.M.; **J. TICEHURST**; **M.H. DEMPSEY**; **C.R. PENN**. Inhibition of influenza virus replication in mice by GG167 (4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid) is consistent with extracellular activity of viral neuraminidase (sialidase). *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 1994, vol. 38 (10), 2270-2275 [0095]
- 20 • **ITZSTEIN** M., W. -Y.; **WU**, G.B. **KOK**; M. S. **PEGG**; J.C. **DYASON**; B. **JIN**; T.V. **PHAN**; M.L. **SMYTHE**; H.F. **WHITE**; S.W. **OLIVER**; P.M. **COLMAN**. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*, 1993, London, 1993, vol. 363, 418-423 [0095]
- 25 • **WOODS**, J.M.; **R.C. BETHELL**; **J.A.V. COATES**; **N. HEALEY**; **S.A. HISCOX**; **B.A. PEARSON**; **D.M. RYAN**; **J. TICEHURST**; **J. TILLING**; **S.A. WALCOTT**. 4-Guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993, vol. 37, 1473-1479 [0095]
- 30 • **ROBERT J FENTON**; **PETER J MORLEY**; **IAN J OWENS**; **DAVID GOWER**; **SIMON PARRY**; **LEE CROSSMAN**; **TONY WONG**. Chemoprophylaxis of influenza A virus infections, with single doses of zanamivir, demonstrates that zanamivir is cleared slowly from the respiratory tract. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 1999, vol. 43 (11), 2642-2647 [0095].

35

40

45

50

55

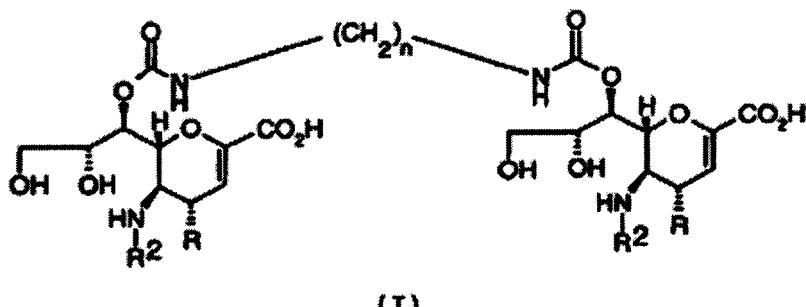
60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):

5



en la que

20

R es un grupo amino o guanidino;

R² es acetilo o trifluoroacetilo; y

25

n es un número entero comprendido entre 10 y 18

o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

30

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R es un grupo guanidino.

3. Compuesto según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que R² es un grupo acetilo.

35

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que n se encuentra comprendido entre 10 y 14.

5. Compuesto según la reivindicación 4, en el que n se encuentra comprendido entre 12 y 14.

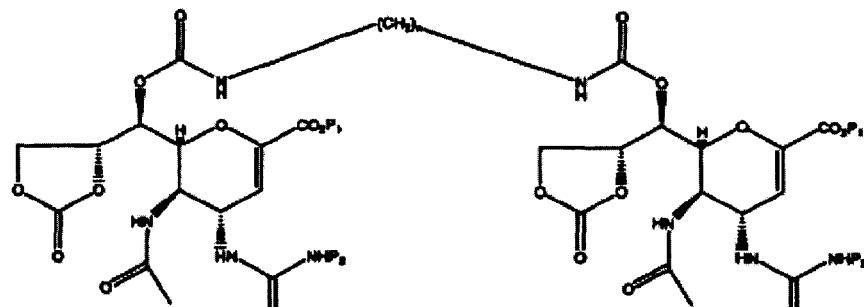
40

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un derivado modificado en los grupos funcionales carboxilo, los grupos funcionales hidroxilo, en los grupos amino o en los grupos guanidina.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el derivado es un éster alquílico, un éster arílico o un éster acetílico.

45

8. Procedimiento de preparación del compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende la etapa de desprotección de un compuesto de fórmula (II).



(II)

65

en la que n se define como en la reivindicación 1, P₁ es un grupo protector del ácido carboxílico y P₂ es un grupo protector de la amina.

ES 2 305 301 T3

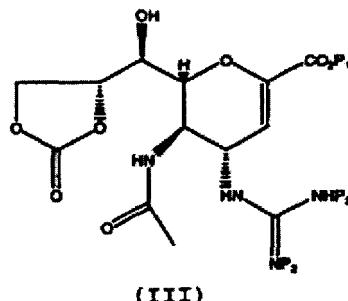
9. Procedimiento de preparación del compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (III)

5

10

15



en la que P_1 y P_2 son tal como se ha definido en la reivindicación 8

20

con un compuesto de fórmula (IV):



25

en el que n es tal como se ha definido en la reivindicación 1 para formar el compuesto de fórmula (II) tal como se ha definido en la reivindicación 8; y;

(b) desproteger el compuesto de fórmula (II).

30

10. Procedimiento de preparación del compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas de:

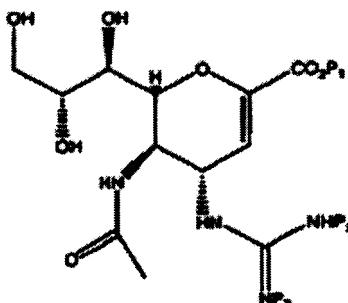
35

(a) proteger un compuesto de fórmula (V)

40

45

50



en la que P_1 y P_2 son tal como se ha definido en la reivindicación 9

para formar el compuesto de fórmula (III) tal como se ha definido en la reivindicación 8;

55

(b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (III) con el compuesto de fórmula (IV) tal como se han definido en la reivindicación 9 para formar el compuesto de fórmula (II) tal como se ha definido en la reivindicación 8; y

60

(c) desproteger el compuesto de fórmula (II).

11. Formulación farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado del mismo, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

65

12. Formulación farmacéutica según la reivindicación 11, que comprende además uno o más ingredientes terapéuticos y/o preventivos.

ES 2 305 301 T3

13. Formulación farmacéutica según la reivindicación 12, en la que el otro ingrediente terapéutico o preventivo es un agente antiinfeccioso.
14. Formulación farmacéutica según la reivindicación 13, en la que el agente antiinfeccioso es un agente antivírico o antibiótico.
15. Formulación farmacéutica según la reivindicación 14, en la que los agentes antibiótico o antivírico son aquellos utilizados para tratar infecciones respiratorias.
- 10 16. Formulación farmacéutica según la reivindicación 15, en la que el agente es zanamivir, oseltamivir, amantadina, rimantadina, ribavirina y/o Fluvax.
- 15 17. Inhalador que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una formulación según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16.
18. Inhalador según la reivindicación 17 que se encuentra adaptado para la administración oral como polvo de paso total.
19. Inhalador según la reivindicación 17 que es un inhalador de aerosoles con dosímetro.
- 20 20. Utilización del compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección vírica.
21. Compuesto de fórmula I según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para utilizar en tratamientos.
- 25 22. Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para utilizar en la prevención o el tratamiento de una infección vírica.
23. Compuesto según la reivindicación 22, en el que la infección vírica es una infección provocada por un ortomixovirus o un paramixovirus.
- 30 24. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23 en el que la infección vírica es una infección gripe A o B, la paragripal, parotiditis o la enfermedad de Newcastle.
- 35 25. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 en el que la administración se realiza en el tracto respiratorio por inhalación, insuflación o por vía intranasal o mediante una combinación de las mismas.
- 40 26. Procedimiento *ex vivo* para la detección de una infección vírica que comprende la etapa de poner en contacto el compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con una muestra de la que se sospecha que contiene el virus.

45

50

55

60

65