

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 872**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/5383</b>	(2006.01)	<b>A61K 9/06</b>	(2006.01)
<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/16</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/12</b>	(2006.01)		
<b>C07D 498/14</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/70</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/20</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/48</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/16</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2017 PCT/JP2017/028923**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2018 WO18030463**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2017 E 17839530 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 3498281**

54 Título: **Derivado de piridona policíclica sustituida y composición farmacéutica que contiene profármaco del mismo**

30 Prioridad:  
**10.08.2016 JP 2016157732**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.11.2024**

73 Titular/es:  
**SHIONOGI & CO., LTD. (100.0%)  
1-8, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku  
Osaka-shi, Osaka 541-0045, JP**

72 Inventor/es:  
**KAWAI, MAKOTO;  
TOMITA, KENJI;  
AKIYAMA, TOSHIYUKI;  
OKANO, AZUSA y  
MIYAGAWA, MASAYOSHI**

74 Agente/Representante:  
**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 989 872 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

Derivado de piridona policíclica sustituida y composición farmacéutica que contiene profármaco del mismo

5 **[Campo técnico]**

Esta invención se refiere a compuestos para usar en métodos para acortar el tiempo necesario para aliviar los síntomas de la gripe; cristales de ciertos compuestos; y composiciones farmacéuticas que incluyen las mismas.

10 **[Antecedentes de la técnica]**

La gripe es una enfermedad infecciosa respiratoria aguda causada por la infección con un virus de la gripe. En Japón, se notifican millones de pacientes similares a la gripe cada invierno, y la gripe va acompañada de una alta morbilidad y mortalidad. La gripe es una enfermedad particularmente importante en una población de alto riesgo, como los bebés y los ancianos, la tasa de complicaciones por la neumonía es alta en las personas mayores y la muerte por gripe afecta a las personas mayores en muchos casos.

Como fármacos contra la gripe, amantadina (nombre comercial: Symmetrel) y rimantidina (nombre comercial: Flumadine), que inhibe el proceso de desnucleación de un virus, y oseltamivir (nombre comercial: Tamiflu) y zanamivir (nombre comercial: Relenza), que son inhibidores de la neuraminidasa que suprimen la gemación del virus y la liberación de una célula. Sin embargo, dado que se teme que surjan problemas de aparición de cepas resistentes y efectos secundarios, y que se produzca una epidemia mundial de un nuevo tipo de virus de la gripe con una alta patogenicidad y mortalidad, se ha deseado el desarrollo de un fármaco contra la gripe que tenga un mecanismo novedoso.

Dado que una endonucleasa dependiente de la cápsula que es una enzima derivada del virus de la gripe es esencial para la proliferación del virus y tiene una actividad enzimática específica del virus que no posee un huésped, se cree que la endonucleasa es adecuada como objetivo de un fármaco contra la gripe. La endonucleasa dependiente de la cápsula de un virus de la gripe tiene un precursor del ARNm del huésped como sustrato y tiene la actividad endonucleasa de producir un fragmento de 9 a 13 bases que incluye una estructura de tapa (sin incluir el número de bases de la estructura de tapa). Este fragmento funciona como cebador de la ARN polimerasa de un virus y se usa para sintetizar el ARNm que codifica una proteína del virus. Es decir, se cree que una sustancia que inhibe la endonucleasa dependiente de la cápsula inhibe la síntesis de una proteína viral al inhibir la síntesis del ARNm del virus y, como resultado, inhibe la proliferación del virus.

Como sustancia que inhibe la endonucleasa dependiente de la cápsula, la flutimida (documento de patente 1 y documento no relacionado con patentes 1 y 2), el ácido 2,4-dioxobutanoico 4-sustituido (documento de patente 2 y documentos no relacionados con patentes 3 y 4), se han descrito los compuestos descritos en los documentos de patente 3 a 12 y similares, pero aún no han llevado al uso clínico como fármacos contra la gripe. Los documentos de patente 9 y 12 describen compuestos que tienen una estructura similar a la usada en la presente invención, pero no describen los compuestos usados en la presente invención. Además, los documentos de patente 13 a 15 describen compuestos que tienen una estructura similar a la usada en la presente invención como un compuesto que tiene actividad inhibitoria de la integrasa; sin embargo, los documentos no describen una endonucleasa dependiente de la cápsula. Además, los documentos de patente 16 y 17 describen una invención relacionada con compuestos que tienen una estructura similar a la usada en la presente invención como un compuesto que tiene una actividad inhibitoria de la endonucleasa dependiente del límite máximo, que ha sido presentada por los solicitantes, pero no describe los compuestos usados en la presente invención.

50 **[Documentos de la técnica anterior]****[Documentos de patente]**

Documento de patente 1: GB2.280.435

55 Documento de patente 2: US-5.475.109

Documento de patente 3: US-2013/0090300

Documento de patente 4: WO2013/057251

60 Documento de patente 5: WO2013/174930

Documento de patente 6: WO2014/023691

65 Documento de patente 7: WO2014/043252

Documento de patente 8: WO2014/074926

Documento de patente 9: WO2014/108406

5 Documento de patente 10: WO2014/108407

Documento de patente 11: WO2014/108408

10 Documento de patente 12: WO2015/038655

Documento de patente 13: WO2005/016927

Documento de patente 14: WO2006/066414

15 Documento de patente 15: WO2007/049675

Documento de patente 16: WO2010/147068

20 Documento de patente 17: WO2012/039414

**[Documentos no relacionados con patentes]**

Documento no relacionado con patentes 1: Tetrahedron Lett 1995, 36(12), 2005

25 Documento no relacionado con patentes 2: Tetrahedron Lett 1995, 36(12), 2009

Documento no relacionado con patentes 3: Antimicrobial Agents And Chemotherapy, diciembre de 1994, págs. 2827-2837

30 Documento no relacionado con patentes 4: Antimicrobial Agents And Chemotherapy, mayo de 1996, pág. 1304-1307

La patente EP 3.473.629 se publicó el 28 de diciembre de 2017 como WO2017/221869. Describe ciertos compuestos para el tratamiento de la gripe; cristales de dichos compuestos y métodos para producir dichos compuestos. También se consideran ciertos productos intermedios.

35 La patente WO 2017/104691 se publicó el 22 de junio de 2017. Describe las terapias combinadas para el tratamiento de la gripe.

La patente WO 2016/175224 se publicó el 3 de noviembre de 2016. Describe compuestos similares para tratar la gripe.

40 PAULINA KOSZALKA et al, "Influenza antivirals currently in late-phase clinical trial", INFLUENZA AND OTHER RESPIRATORY VIRUSES, vol. 11, n.º 3, 1 de mayo de 2017, páginas 240-246, describe diversos medicamentos antivirales dirigidos contra la gripe que en ese momento se encontraban en ensayos clínicos.

45 **[Resumen de la invención]**

**[Problemas que va a resolver la invención]**

50 Un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos para usar en métodos para acortar el tiempo necesario para aliviar los síntomas de la gripe; cristales de ciertos compuestos; y composiciones farmacéuticas que incluyen las mismas.

**[Medios para resolver los problemas]**

55 La presente invención proporciona las invenciones expuestas en las reivindicaciones adjuntas.

**[Efecto de la invención]**

60 El compuesto usado en la presente invención es un profármaco, y el profármaco se convierte en un compuesto original que tiene una actividad inhibitoria sobre la endonucleasa dependiente de la cápsula in vivo después de la administración, por lo que es eficaz como agente terapéutico y/o agente preventivo para la enfermedad infecciosa por el virus de la gripe.

**[Breve descripción de los dibujos]**

65

[Figura 1] La Figura 1 es un resultado de la medición de la concentración plasmática del Compuesto III-2, después de la administración oral del profármaco Compuesto II-6, cuyo compuesto original es el Compuesto III-2, a ratas en condiciones sin ayuno.

5 [Figura 2] La Figura 2 es un resultado de la medición de la concentración plasmática del Compuesto II-6, después de la administración oral del profármaco Compuesto II-6, cuyo compuesto original es el Compuesto III-2, a ratas en condiciones sin ayuno.

10 [Figura 3] La Figura 3 son datos de difracción de rayos X en polvo de cristales en forma I del Compuesto II-6. El eje horizontal indica  $2\theta$  y el eje vertical indica la intensidad.

[Figura 4] La Figura 4 son datos de difracción de rayos X en polvo de cristales de forma II del Compuesto II-6.

15 [Figura 5] La Figura 5 son datos de difracción de rayos X en polvo de cristales de forma III del Compuesto II-6.

### [Mejor modo para llevar a cabo la invención]

20 El significado de cada término usado en la presente descripción se explica a continuación. Cada término se usa en un sentido unificado y se usa en el mismo sentido cuando se usa solo o cuando se usa en combinación con otro término.

La expresión “que consiste en” significa que tiene únicamente componentes.

La expresión “que comprende” significa no restringir a componentes y no excluir factores no descritos.

25 Los compuestos usados en la presente invención se caracterizan porque los compuestos aislados mediante resolución óptica de compuestos tricíclicos sustituidos por el otro grupo tricíclico mejoran la actividad inhibidora de las endonucleasas dependiente del tapón.

30 Los compuestos usados en la presente invención también se caracterizan porque los compuestos se absorben eficazmente en el cuerpo después de la administración (por ejemplo, la administración oral) y muestran una alta eficacia al introducir un grupo para formar un profármaco.

35 Uno o más átomos de hidrógeno, carbono y/u otros átomos en los compuestos usados en la presente invención pueden reemplazarse por isótopos de hidrógeno, carbono y/u otros átomos respectivamente. Los ejemplos de isótopos incluyen hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, yodo y cloro, tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{123}\text{I}$  y  $^{36}\text{Cl}$  respectivamente. Los compuestos usados en la presente invención incluyen compuestos reemplazados por estos isótopos. Los compuestos reemplazados por los isótopos anteriores son útiles como medicamentos e incluyen todos los compuestos radiomarcados usados en la presente invención. En la presente invención se incluye un “método de radiomarcaje” en la fabricación de los  
40 “compuestos radiomarcados” y los “compuestos radiomarcados” son útiles para estudios sobre farmacocinética de fármacos metabolizados, estudios sobre ensayos de unión y/o herramientas de diagnóstico.

45 Un compuesto radiomarcado usado en la presente invención se puede preparar usando métodos bien conocidos en este campo de la invención. Por ejemplo, un compuesto marcado con tritio usado en la presente invención, se puede preparar introduciendo un tritio en un determinado compuesto usado en la presente invención, a través de una reacción catalítica de deshalogenación usando un tritio. Este método comprende hacer reaccionar con un precursor apropiadamente halogenado del compuesto usado en la presente invención con gas tritio en presencia de un catalizador apropiado, tal como Pd/C y en presencia o ausente de una base. El otro método apropiado para preparar un compuesto marcado con tritio se puede consultar en “Isotopes in the Physical and Biomedical Sciences, Vol. 1, Labeled Compounds (Parte A), Capítulo 6 (1987)”. Un compuesto marcado con  $^{14}\text{C}$  puede prepararse utilizando una materia prima que tenga  $^{14}\text{C}$ .

55 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos usados en la presente invención incluyen, por ejemplo, sales con metal alcalino (p. ej., litio, sodio, potasio o similares), metal alcalinotérreo (p. ej., calcio, bario o similares), magnesio, metal de transición (por ejemplo, cinc, hierro o similares), amoníaco, bases orgánicas (por ejemplo, trimetilamina, trietilamina, dicitlohexilamina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, meglumina, etilendiamina, piridina, picolina, quinolina o similares) o aminoácidos, o sales con ácidos inorgánicos (p. ej., ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido carbónico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido yodhídrico o similares) o ácidos orgánicos (p. ej., ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido trifluoroacético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido mandélico, ácido glutárico, ácido málico, ácido benzoico, ácido ftálico, ácido ascórbico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico o similares). Especialmente, se incluyen sales con ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico y similares. Estas sales pueden formarse mediante los métodos habituales.

65 Los compuestos usados en la presente invención o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden formar solvatos (por ejemplo, hidratos o similares) y/o polimorfos cristalinos. Los “solvatos” pueden ser aquellos en donde cualquier

número de moléculas de disolvente (p. ej., moléculas de agua o similares) se coordinan con los compuestos usados en la presente invención. Cuando los compuestos usados en la presente invención o las sales farmacéuticamente aceptables se dejan reposar en el ambiente, los compuestos pueden absorber agua, lo que da como resultado la unión de agua adsorbida o la formación de hidratos. La recristalización de los compuestos usados en la presente invención o sus sales farmacéuticamente aceptables puede producir polimorfos cristalinos.

(Método para producir el compuesto de la presente invención)

A continuación se ilustrará un método general para producir el compuesto usado en la presente invención. En cuanto a la extracción y purificación, se puede llevar a cabo un tratamiento que se lleva a cabo en un experimento normal de química orgánica.

La síntesis del compuesto usado en la presente invención se puede llevar a cabo haciendo referencia a los procedimientos conocidos en la técnica.

Como compuesto de materia prima, se pueden utilizar compuestos disponibles en el mercado, compuestos descritos en la presente descripción, compuestos descritos en las referencias citadas en la presente descripción y otros compuestos conocidos.

Cuando se desea obtener una sal del compuesto de la presente invención, en el caso de que el compuesto usado en la presente invención se obtenga en forma de sal, se puede purificar tal cual y, en el caso de que el compuesto usado en la presente invención se obtenga en forma libre, se puede formar una sal mediante un método normal disolviendo o suspendiendo el compuesto en un disolvente orgánico adecuado y añadiendo un ácido o una base.

Además, el compuesto usado en la presente invención y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo están presentes en forma de aductos con agua o varios disolventes (hidrato o solvato) en algunos casos, y estos aductos se usan en la presente invención.

Los compuestos usados en la presente invención son profármacos para compuestos que tienen una actividad inhibitoria de la endonucleasa dependiente de la cápsula y son útiles como agentes terapéuticos o preventivos para la gripe.

Los compuestos usados en la presente invención son útiles para los síntomas y/o enfermedades que son inducidas por el virus de la gripe. Por ejemplo, son útiles para tratar, prevenir y/o mejorar los síntomas similares a los del resfriado que acompañan a la fiebre, el escalofrío, el dolor de cabeza, el dolor muscular o articular, la fatiga, etc., los síntomas de inflamación de las vías respiratorias como dolor de garganta, secreción nasal, congestión nasal, tos, esputo, etc., los síntomas gastrointestinales como el dolor abdominal, el vómito, la diarrea, etc. y, además, las complicaciones que acompañan a una infección secundaria, como la encefalopatía aguda y la neumonía. Es decir, los compuestos usados en la presente invención son útiles para tratar y/o prevenir enfermedades infecciosas por el virus de la gripe.

Los compuestos usados en la presente invención son eficaces para acortar el tiempo necesario para aliviar los síntomas de la gripe. Por ejemplo, pueden acortar el tiempo necesario para aliviar los síntomas de la gripe entre 20 y 40 horas, preferiblemente entre 25 y 30 horas. En concreto, pueden acortar los tiempos hasta que se alivian la "tos", el "dolor de garganta", el "dolor de cabeza", la "congestión nasal", la "fiebre o escalofríos", el "dolor muscular o articular" y la "fatiga". En particular, son útiles para acortar los tiempos hasta que se alivian la "congestión nasal", el "dolor muscular o articular", la "fatiga", la "fiebre o escalofríos" y el "dolor de cabeza". Además, son útiles para acortar los tiempos hasta que se alivie la "congestión nasal" y el "dolor muscular o articular".

Además, dado que los compuestos usados en la presente invención reducen el virus de la gripe en el cuerpo en un corto período de tiempo, pueden ser un excelente fármaco útil para tratar y/o prevenir las enfermedades infecciosas del virus de la gripe. Tras la administración de los compuestos usados en la presente invención, el efecto de disminuir la cantidad del virus de la gripe en el cuerpo se observa en 72 horas, preferiblemente en 48 horas, más preferiblemente en 24 horas, y se espera que se obtenga un efecto terapéutico más temprano en comparación con otros fármacos.

Además, los compuestos usados en la presente invención tienen utilidad como medicamentos.

Por ejemplo, dado que los compuestos (profármacos) usados en la presente invención tienen las ventajas de que la capacidad de absorción oral es alta, presentan una buena biodisponibilidad, presentan un buen aclaramiento y la transitividad pulmonar es alta, pueden ser medicamentos excelentes.

Dado que los compuestos (compuestos originales) formados a partir de los compuestos (profármacos) usados en la presente invención tienen efectos tales como una alta actividad inhibitoria sobre la endonucleasa dependiente de la estructura del tapón y una alta selectividad debida a una enzima específica del virus, pueden ser medicamentos que tienen efectos secundarios reducidos.

Además, los compuestos usados en la presente invención también tienen las ventajas de que la estabilidad del metabolismo es alta, la solubilidad es alta, la capacidad de absorción oral es alta, la buena biodisponibilidad, el buen aclaramiento, la transitividad pulmonar es alta, la semivida es larga, la tasa de unión no proteica es alta, la inhibición del canal hERG es baja, la inhibición del CYP es baja, se reconoce el efecto inhibidor del CPE (efecto citopático) y/o se muestran efectos negativos en una prueba de fototoxicidad, una prueba de Ames y una prueba de toxicidad genética, o no se causa toxicidad, como daño hepático. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser un medicamento excelente.

Los compuestos usados de la presente invención pueden administrarse por vía oral o parenteral. En el caso de administración oral, los compuestos usados en la presente invención también se pueden usar como una preparación normal, por ejemplo, como cualquier forma de dosificación de preparaciones sólidas tales como comprimidos, polvos, gránulos, cápsulas, etc.; disoluciones; suspensiones oleaginosas; o preparaciones líquidas tales como jarabes o elixires, etc. En el caso de la administración parenteral, los compuestos usados en la presente invención se pueden usar como suspensiones acuosas u oleaginosas, inyectables o gotas nasales. Tras su preparación, pueden usarse arbitrariamente excipientes, aglutinantes, lubricantes, disolventes acuosos, disolventes oleaginosos, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes, etc. convencionales. La composición farmacéutica de la presente invención se puede producir combinando (por ejemplo, mezclando) una cantidad terapéutica y/o profilácticamente eficaz del compuesto usado en la presente invención con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos usados en la presente invención pueden usarse adecuadamente como preparaciones orales debido a su alta capacidad de absorción oral.

La dosis de los compuestos usados en la presente invención es diferente dependiendo del método de administración, la edad, el peso y el estado del paciente, y del tipo de enfermedad.

Según la presente invención, el compuesto se administra por vía oral en una dosis de 10 a 80 mg/día para un adulto, si es necesario, en dosis divididas. En otro caso, en el caso de adultos, se pueden administrar aproximadamente 40 mg u 80 mg en una sola dosis. Según la presente invención, el compuesto se administra por vía oral en una dosis única de 5 a 40 mg en el caso de niños, dependiendo del peso corporal. Además, en el caso de la administración parenteral (no según la presente invención), se administran de aproximadamente 0,01 mg a 1000 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,05 mg a 500 mg, o de aproximadamente 1 mg a 80 mg para adultos por día. La dosis se puede administrar una vez al día o se puede dividir en múltiples dosis al día.

Los compuestos usados en la presente invención se pueden usar en combinación con otros fármacos o similares (en lo sucesivo denominados fármacos combinados) para aumentar la actividad de los compuestos, reducir la dosis de los compuestos o similares. En el caso del tratamiento de la gripe, los compuestos se pueden usar combinados con o en una formulación acoplada con un inhibidor de la neuraminidasa (p. ej., oseltamivir, zanamivir, peramivir, inabiru y similares); inhibidor de la ARN polimerasa dependiente de ARN (p. ej., favipiravir); inhibidor de la proteína M2 (p. ej., amantadina); inhibidor de la unión de la cápsula de PB2 (p. ej., VX-787); anticuerpo anti-HA (p. ej., MHAA4549A); También son posibles los agonistas inmunes (p. ej., nitazoxanida). En este caso, el tiempo de administración de un compuesto usado en la presente invención y el fármaco combinado no está limitado. Se pueden administrar a los sujetos a tratar, en un momento o en momentos diferentes. Además, el fármaco de combinación con un compuesto usado en la presente invención se puede administrar como dos o más formulaciones que comprenden independientemente cada ingrediente activo o una única formulación que comprende cada ingrediente activo.

La dosis de la combinación de fármacos se puede seleccionar apropiadamente en referencia a la dosis clínica. La relación de composición de los compuestos usados en la presente invención y los fármacos administrados conjuntamente se puede seleccionar apropiadamente dependiendo del sujeto por tratar, vía de administración, enfermedad por tratar, síntomas, combinación de los fármacos y similares. Para la administración en seres humanos, por ejemplo, 1 parte en peso de los compuestos usados en la presente invención se puede utilizar en combinación con 0,01 a 100 partes en peso de fármacos administrados conjuntamente.

La presente invención se explicará con más detalle a continuación por medio de ejemplos, ejemplos de síntesis intermedios y ejemplos de prueba de la presente invención, pero la presente invención no se limita a ellos.

El análisis de RMN obtenido en cada ejemplo se llevó a cabo en 300 MHz y se midió usando DMSO-d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>.

El término RT representa un tiempo de retención en LC/MS: cromatografía líquida/espectrometría de masas, y se midió en las siguientes condiciones.

(Condiciones de medición)

(1) Columna: ACQUITY UPLC (marca registrada) BEH C18 (1,7 μm i.d.2,1 x 50 mm) (Waters)

Velocidad de flujo: 0,8 ml/min

Longitud de onda de detección UV: 254 nm

Fase móvil: [A] es ácido fórmico al 0,1 % que contiene solución acuosa y [B] es ácido fórmico al 0,1 % que contiene solución de acetonitrilo

5 Gradiente: se llevó a cabo un gradiente lineal de 5 % a 100 % de disolvente [B] durante 3,5 minutos y el 100 % de disolvente [B] se mantuvo durante 0,5 minutos.

(2) Columna: Shim-pack XR-ODS (2,2  $\mu\text{m}$ , i.d.50  $\times$  3,0 mm) (Shimadzu)

10 Velocidad de flujo: 1,6 ml/min

Longitud de onda de detección UV: 254 nm

15 Fase móvil: [A] es ácido fórmico al 0,1 % que contiene solución acuosa y [B] es ácido fórmico al 0,1 % que contiene solución de acetonitrilo

Gradiente: se llevó a cabo un gradiente lineal de 10 % a 100 % de disolvente [B] durante 3 minutos y el 100 % de disolvente [B] se mantuvo durante 0,5 minutos.

20 Medición del patrón de difracción de rayos X en polvo

La difracción de rayos X en polvo de los cristales obtenidos en cada ejemplo se midió según el método de difracción de rayos X en polvo descrito en Pruebas Generales, Procesos y Aparatos Generales de la Farmacopea Japonesa. Las condiciones de medición se muestran a continuación.

25 (Aparato)

MinFlex 600 RINT-TTR III fabricado por Rigaku Corporation

30 (Método de operación)

Detector: Detector unidimensional de alta velocidad (D/Tec Ultra 2) y método de medición de filo variable: Método de reflexión

35 Tipo de fuente de luz: Tubo de Cu

Longitud de onda utilizada: Radiación de CuK $\alpha$

40 Corriente del tubo: 10 mA o 15 mA

Tensión del tubo: 30 Kv o 40 Kv

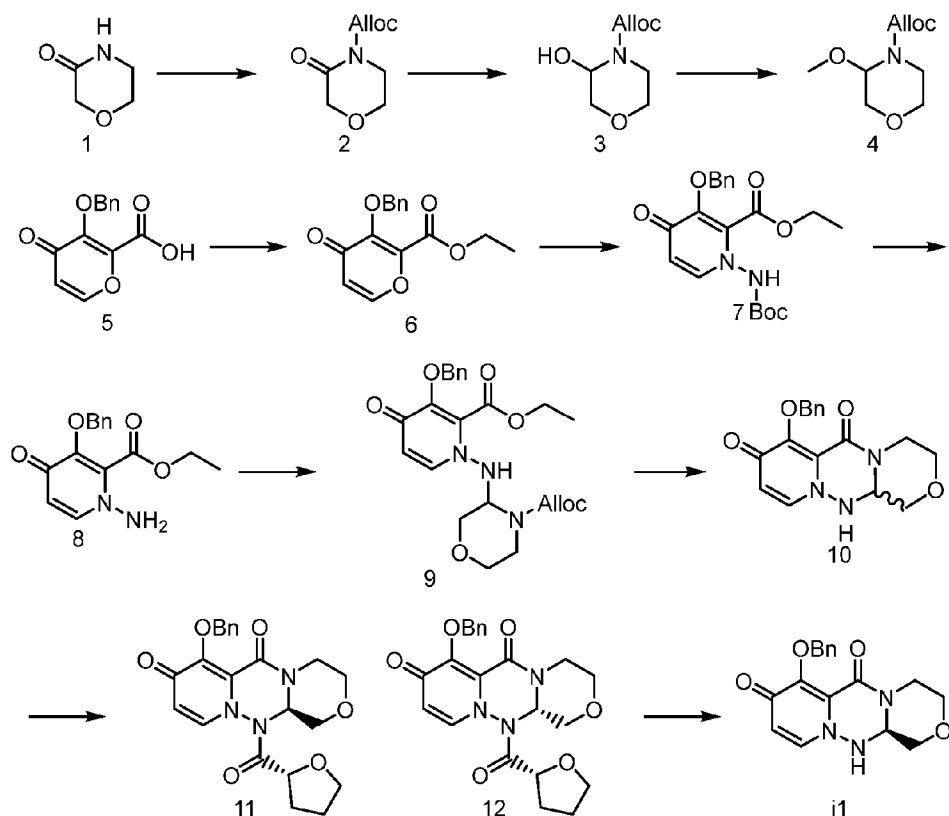
Placa de muestra: Aluminio o vidrio

45 Ángulo de incidencia de rayos X ( $\theta$ ): 3-40°, ancho de muestreo: 0,01° o

Ángulo de incidencia de rayos X ( $\theta$ ): 4-40°, ancho de muestreo: 0,02°

50 En general, el ángulo de difracción ( $2\theta$ ) en la difracción de rayos X en polvo puede tener un margen de error dentro del intervalo de  $\pm 0,2^\circ$  y, por lo tanto, el valor del ángulo de difracción también abarca un intervalo de aproximadamente  $\pm 0,2^\circ$  del valor numérico. En consecuencia, la presente invención abarca no solo un cristal, cuyos ángulos de difracción máximos coinciden completamente en la difracción de rayos X en polvo, sino también un cristal, cuyos ángulos de difracción máximos coinciden dentro de un margen de error de aproximadamente  $\pm 0,2^\circ$ .

55 Ejemplo 1-1: Método para producir el Compuesto i1



## Primera etapa

- 5 A una solución del Compuesto 1 (5,0 g, 49,5 mmol) en THF (100 ml) se añadió gota a gota 1,62 mol/l de n-butilitio en hexano (30,5 ml, 49,5 mmol) a  $-78^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de nitrógeno, y la mezcla se agitó a  $-78^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Se añadió gota a gota a la misma una solución de cloroformiato de alilo (5,96 g, 49,5 mmol) en THF (20 ml) y la mezcla se agitó a  $-78^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. La mezcla se enfrió rápidamente con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio, se calentó a temperatura ambiente y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el Compuesto 2 (5,66 g, 62 %).

10 RMN 1H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3,83 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 3,92 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 4,26 (s, 2H), 4,78 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 5,30 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 5,44 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 5,93-6,03 (m, 1H), segunda etapa

- 15 A una solución del Compuesto 2 (6,6 g, 35,6 mmol) en THF (66 ml) se añadió gota a gota 1,03 mol/l de DIBAL-H en hexano (45,0 ml, 46,3 mmol) y la mezcla se agitó a  $-78^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. La mezcla se enfrió bruscamente con acetona y se añadió a la misma una solución acuosa de sal de Rochelle. La mezcla se agitó y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el Compuesto 3 (6,21 g, 93 %).

20 RMN 1H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3,44 (br, 1H), 3,50-3,64 (m, 2H), 3,71 (br, 1H), 3,95 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,64 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 5,24 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 5,40 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 5,47 (d, J = 4 Hz, 1H), 5,87-6,00 (m, 1H)

## Tercera etapa

- 25 A una solución del Compuesto 3 (6,2 g, 33,1 mmol) en metanol (65 ml) se añadió ácido p-toluenosulfónico monohidratado (0,63 g, 3,31 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se enfrió rápidamente con una solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio, se concentró y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el Compuesto 4 (5,77 g, 87 %).

30 RMN 1H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3,34 (s, 3H), 3,55 (br, 2H), 3,73-3,99 (m, 3H), 4,64 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 5,10-5,20 (m, 1H), 5,25 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,33 (d, J = 16 Hz, 1H), 5,88-6,05 (m, 1H)

## Cuarta etapa

## ES 2 989 872 T3

A una solución del Compuesto 5 (20,0 g, 81 mmol) en DMF (100 ml) se añadieron yoduro de etilo (22,8 g, 146 mmol) y diazabicicoundeceno (18,4 ml, 122 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se vertió en una solución acuosa al 10 % de cloruro de amonio y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el Compuesto 6 (22,3 g, 100 %).

RMN 1H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,23 (t, J = 8,0 Hz, 3H), 4,28 (q, J = 8,0 Hz, 2H), 5,16 (s, 2H), 6,57 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 7,28-7,48 (m, 5H), 8,21 (d, J = 4,0 Hz, 1H).

### 10 Quinta etapa

A una solución del Compuesto 6 (500 mg, 1,82 mmol) en DMA (5,0 ml) se añadieron p-toluenosulfonato de piridinio (1,37 g, 5,47 mmol) y Boc-hidrazina (361 mg, 2,74 mmol), y la mezcla se agitó a 60 °C durante 14 horas. A la mezcla se le añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante la cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo-metanol) para dar el Compuesto 7 (519 mg, rendimiento del 73 %).

RMN 1H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,24 (t, J = 8,0 Hz, 3H), 1,46 (s, 9H), 4,26 (q, J = 8,0 Hz, 2H), 5,28 (s, 2H), 6,40 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,27-7,38 (m, 4H), 7,40-7,45 (m, 2H).

### Sexta etapa

El Compuesto 7 (500 mg, 1,29 mmol) se disolvió en 4 mol/l de cloruro de hidrógeno en acetato de etilo (5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se concentró a presión reducida. Al residuo obtenido se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y la mezcla se extrajo con diclorometano. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el Compuesto 8 (369 mg, 99 %).

RMN 1H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,26 (t, J = 8,0 Hz, 3H), 4,31 (q, J = 8,0 Hz, 2H), 5,24 (s, 2H), 6,47 (d, J = 8,0, 1H), 7,28-7,44 (m, 5H), 7,64 (d, J = 8,0, 1H).

### Séptima etapa

A una solución del Compuesto 8 (365 mg, 1,27 mmol) y el Compuesto 4 (306 mg, 1,52 mmol) en acetonitrilo (8 ml) se añadió gota a gota cloruro de estaño (0,223 ml, 1,90 mmol) a -25 °C en una atmósfera de nitrógeno, y la mezcla se agitó a -25 °C durante 45 minutos. La mezcla se enfrió bruscamente con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se añadió diclorometano a la misma. La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se filtró a través de Celite, y el filtrado se extrajo con diclorometano. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el Compuesto 9 bruto. El Compuesto 9 obtenido se disolvió en THF (8 ml), se le añadieron morfolina (1,10 ml, 12,7 mmol) y tetrakis (trifenilfosfina) paladio (146 mg, 0,127 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A la mezcla se añadió éter dietílico (16 ml), y el sólido precipitado se filtró y se secó para obtener el compuesto 10 (418 mg, 100 %). RMN 1H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2,90-2,99 (m, 1H), 3,13 (t, J = 12,0 Hz, 1H), 3,40-3,46 (m, 1H), 4,00-4,08 (m, 1H), 4,14 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 5,07 (s, 2H), 6,22 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,29-7,40 (m, 3H), 7,56 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,71 (d, J = 8,0 Hz, 1H)

### Octava etapa

A una suspensión de ácido (R)-2-tetrahidrofuroico (855 mg, 7,36 mmol) y el Compuesto 10 (2,00 g, 6,11 mmol) en acetato de etilo (9 ml) se añadieron piridina (4,00 ml, 49,6 mmol) y T3P (50 % en acetato de etilo, 11,0 ml, 18,5 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante la noche. El sólido precipitado se filtró y se lavó con acetato de etilo (4 ml) y etanol (4 ml). El sólido obtenido se suspendió en etanol (6 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 6,5 horas. La suspensión se filtró y el sólido obtenido se lavó con etanol (2 ml) dos veces para obtener el Compuesto 11 (1,18 g, 45,4 %).

RMN-<sup>1</sup>H (DMSO) δ: 1,80-1,94(m, 2H), 1,95-2,14(m, 2H), 3,21-3,35-(m, 2H), 3,50-3,60(m, 1H), 3,70-3,82(m, 3H), 4,00-4,05(m, 1H), 4,32-4,38(m, 1H), 5,14(dd, J=10,8 Hz, 21,6 Hz, 2H), 5,76-5,81(m, 1H), 6,29(d, J=4,8 Hz, 1H), 7,28-7,39 (m, 3H), 7,48-7,54 (m, 2H), 7,64-7,75 (m, 1H)

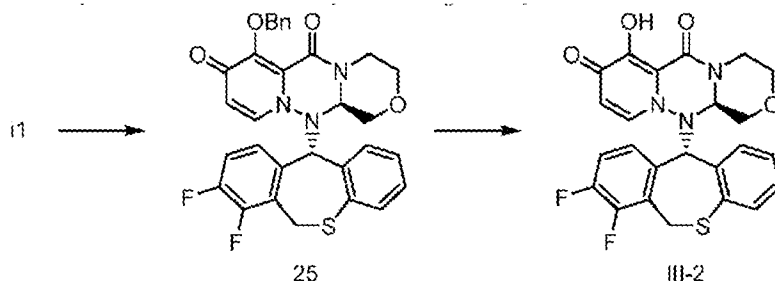
### 60 Novena etapa

A una suspensión del Compuesto 11 (500 mg, 1,18 mmol) en etanol (3,5 ml) se añadió DBU (0,0035 ml, 0,023 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 30 minutos. A la suspensión obtenida se añadió éter diisopropílico (6,5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El sólido precipitado se filtró y se lavó con acetato de etilo (1,5 ml) dos veces para obtener el compuesto i1 (346 mg, 89,9 %).

RMN-<sup>1</sup>H (DMSO) δ: 2,80-3,00(m, 1H), 3,10-3,18(m, 1H), 3,38-3,50(m, 1H), 3,98-4,08(m, 2H), 4,10-4,20(m, 1H), 4,76-4,84(m, 1H), 5,04-5,14(m, 2H), 6,22(m, J=7,6 Hz, 1H), 7,27-7,40(m, 4H), 7,56-7,60(m, 2H), 7,70(d, J=7,6 Hz, 1H)

Ejemplo 1-2: Método para producir el Compuesto III-2

5



Primera etapa

10 El Compuesto i1 (1100 g, 3360 mmol) y el 7,8-difluoro-6,11-dihydrodibenzotiepina-11-ol (977 g, 3697 mmol) se suspendieron en T3P al 50 % en peso en acetato de etilo (3208 g, 5041 mmol) y acetato de etilo (1,1 l). A la mezcla se añadió ácido metanosulfónico (436 ml, 6721 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó a 70 °C durante 5,5 horas. A la mezcla se le añadió agua en un baño de agua helada y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió THF a la misma y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con agua y una solución acuosa al 8 % de hidrogenocarbonato de sodio, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en THF (5,5 l) y se añadió carbonato de potasio (790 g, 5713 mmol) al mismo. La mezcla se calentó hasta 50 °C, se añadió gota a gota bromuro de bencilo (240 ml, 2016 mmol) y la mezcla se agitó a 60 °C durante 8,5 horas. A la mezcla se le añadió gota a gota una solución acuosa de ácido clorhídrico de 2 mol/l en un baño de hielo-agua, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con agua y una solución acuosa al 8 % de hidrogenocarbonato de sodio y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Se añadió carbón activado (Norit SX-2, 240 g) a la misma, la mezcla se filtró a través de Celite y el filtrado se concentró a presión reducida. Al residuo obtenido se le añadieron acetato de etilo y hexano y el sólido precipitado se filtró para obtener el Compuesto 25 (1019 g, 1776 mmol, 53 %).

25 RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2,88 (1H, t, J = 11,2 Hz), 3,28-3,39 (2H, m), 3,72 (1H, d, J = 12,6 Hz), 3,86 (1H, d, J = 9,6 Hz), 4,03 (1H, d, J = 13,9 Hz), 4,45 (1H, d, J = 8,6 Hz), 4,67 (1H, d, J = 13,1 Hz), 5,19-5,26 (2H, w), 5,45 (1H, d, J = 10,9 Hz), 5,63 (1H, d, J = 10,9 Hz), 5,77 (1H, d, J = 7,6 Hz), 6,40 (1H, d, J = 7,8 Hz), 6,68 (1H, t, J = 6,9 Hz), 6,94-7,01 (2H, m), 7,03-7,12 (3H, m), 7,29-7,38 (3H, m), 7,61 (2H, d, J = 7,1 Hz).

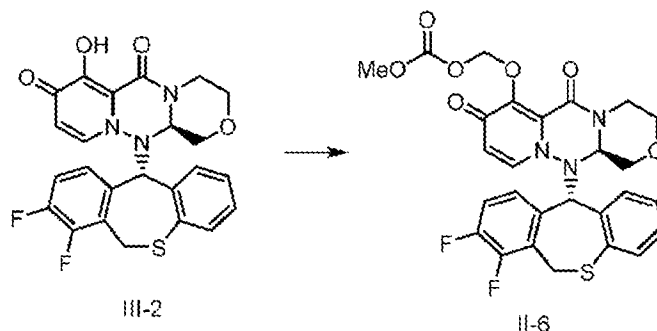
30

Segunda etapa

35 A una solución del Compuesto 25 (1200 g, 2092 mmol) en DMA (3,6 l) se añadió cloruro de litio (443 g, 10,5 mol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a 80 °C durante 3 horas. A la mezcla se le añadieron acetona (1,2 l), solución acuosa de ácido clorhídrico de 0,5 mol/l (6,0 l) y agua (2,4 l) en un baño de hielo-agua, y la mezcla se agitó durante 1 hora. El sólido precipitado se filtró. El sólido obtenido se disolvió en cloroformo, se añadió éter isopropílico y el sólido precipitado se filtró para obtener el Compuesto III-2 (950 g, 1965 mmol, 94 %). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2,99 (1H, dt, J = 17,5, 6,8 Hz), 3,47 (1H, td, J = 11,9, 2,5 Hz), 3,60 (1H, t, J = 10,6 Hz), 3,81 (1H, dd, J = 11,9, 3,3 Hz), 3,96 (1H, dd, J = 11,0, 2,9 Hz), 4,07 (1H, d, J = 13,8 Hz), 4,58 (1H, dd, J = 10,0, 2,9 Hz), 4,67 (1H, dd, J = 13,5, 1,9 Hz), 5,26-5,30 (2H, m), 5,75 (1H, d, J = 7,8 Hz), 6,69 (1H, d, J = 7,7 Hz), 6,83-6,87 (1H, m), 6,99-7,04 (2H, m), 7,07-7,15 (3H, m).

40

Ejemplo 1-3: Método para producir el Compuesto II-6



45

Al Compuesto III-2 (4,0 g, 8,3 mmol) se añadieron carbonato de potasio (1483,4 mg, 10,7 mmol), yoduro de potasio (549,5 mg, 3,3 mmol), tetrahidrofurano (33,1 g), N, N-dimetilacetamida (3,8 g) y agua (80,3 mg), y la mezcla se agitó. La temperatura se aumentó a 60 °C y se añadió carbonato de clorometilmetilo (1758,9 mg, 14,2 mmol). La mezcla se agitó a 60 °C durante 9 horas y se enfrió a 20 °C. Se añadieron ácido acético (822,0 mg), 2-propanol (3,1 g) y agua (20,0 g), y la mezcla se extrajo dos veces con tetrahidrofurano (1,8 g, 8,9 g). La capa orgánica obtenida se concentró a presión reducida hasta un peso líquido de aproximadamente 32 g separando por destilación el disolvente. La temperatura se aumentó a 45 °C, se añadió 2-propanol (1,6 g) y la mezcla se enfrió a 20 °C. Se añadió una solución acuosa de acetato de sodio preparada a partir de acetato de sodio (339,0 mg) y agua (46,0 g), y la mezcla se enfrió a 5 °C. La mezcla se agitó a 5 °C durante 3 horas y los precipitados blancos amarillentos pálidos producidos se filtraron. Los sólidos obtenidos se lavaron con una solución mixta de 2-propanol (4,7 g) y agua (6,0 g), y los sólidos se lavaron nuevamente con 2-propanol (6,3 g). Se añadió dimetilsulfóxido (30,9 g) a los sólidos blancos amarillentos pálidos obtenidos y la mezcla se agitó. La temperatura se aumentó a 60 °C y se añadió una solución mixta de sulfóxido de dimetilo (2,2 g) y agua (4,8 g). Además, se añadió una solución mixta de sulfóxido de dimetilo (19,9 g) y agua (28,4 g), y la mezcla se enfrió a 20 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 3 horas y los precipitados blancos producidos se filtraron. Los sólidos obtenidos se lavaron con una solución mixta de sulfóxido de dimetilo (8,0 g) y agua (4,8 g), y los sólidos se lavaron nuevamente con agua (12,0 g). Los sólidos obtenidos se secaron para obtener cristales blancos (forma I) del Compuesto II-6 (4,21 g).

RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>) δ: 2,91-2,98 (1H, m), 3,24-3,31 (1H, m), 3,44 (1H, t, J = 10,4 Hz), 3,69 (1H, dd, J = 11,5, 2,8 Hz), 3,73 (3H, s), 4,00 (1H, dd, J = 10,8, 2,9 Hz), 4,06 (1H, d, J = 14,3 Hz), 4,40 (1H, d, J = 11,8 Hz), 4,45 (1H, dd, J = 9,9, 2,9 Hz), 5,42 (1H, dd, J = 14,4, 1,8 Hz), 5,67 (1H, d, J = 6,5 Hz), 5,72-5,75 (3H, m), 6,83-6,87 (1H, m), 7,01 (1H, d, J = 6,9 Hz), 7,09 (1H, dd, J = 8,0, 1,1 Hz), 7,14-7,18 (1H, m), 7,23 (1H, d, J = 7,8 Hz), 7,37-7,44 (2H, m).

Difracción de rayos X en polvo 2θ (°): 8,6 ± 0,2°, 14,1 ± 0,2°, 17,4 ± 0,2°, 20,0 ± 0,2°, 24,0 ± 0,2°, 26,3 ± 0,2°, 29,6 ± 0,2° y 35,4 ± 0,2°.

La Figura 3 muestra los resultados de difracción de rayos X en polvo de los cristales de forma I del Compuesto II-6.

Ejemplo 2: Método para producir cristales de forma II del Compuesto II-6

Se añadieron acetonitrilo (50 ml) y agua (5 ml) al Compuesto II-6 (10,00 g), el compuesto se calentó hasta disolverse y se añadió agua (95 ml) al mismo. La solución se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y los cristales precipitados se filtraron. Los cristales obtenidos se sometieron a secado por flujo continuo para obtener cristales de forma II (9,04 g) del Compuesto II-6.

La Figura 4 muestra los resultados de difracción de rayos X en polvo de los cristales de forma II del Compuesto II-6.

Ejemplo 3: Método para producir cristales de forma III del Compuesto II-6

Se añadió acetato de metilo (400 ml) al Compuesto II-6 (10,00 g) y el compuesto se calentó hasta disolverse. El acetato de metilo (aproximadamente 230 ml) de la solución se concentró a presión reducida, la solución se agitó durante 70 minutos a temperatura ambiente y los cristales precipitados se filtraron. Los cristales obtenidos se sometieron a secado por flujo continuo para obtener cristales de forma III (7,87 g) del Compuesto II-6.

La Figura 5 muestra los resultados de difracción de rayos X en polvo de los cristales de forma III del Compuesto II-6.

Los ejemplos de ensayos biológicos para los compuestos usados en la presente invención se describen a continuación.

Ejemplo de prueba 1: Medición de la actividad inhibidora de la endonucleasa dependiente del límite máximo (CEN)

1) Preparación del sustrato

30merRNA (5'-pp-[m<sup>2</sup>-O] GAA UAU(-Cy3) GCA UCA CUA GUAAGC UUU GCU CUA-BHQ2-3'): fabricado por Japan Bio Services Co., LTD.) en el que G en un extremo 5' está modificado con difosfato, un grupo hidroxilo en la posición 2' está modificado por metoxilación, U sexto desde un extremo 5' es etiquetado con Cy3, y un extremo de 3' etiquetado con BHQ2, se compró y se añadió una estructura de tapa utilizando el sistema ScriptCap fabricado por EPICENTRE (un producto era m<sup>7</sup>G [5']-ppp-[5'] [m<sup>2</sup>-O]GAA UAU(-Cy3) GCA UCA CUA GUAAGC UUU GCU CUA(-BHQ2)-3'). Este se separó y se purificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizado y se usó como sustrato.

2) Preparación de la enzima

El RNP se preparó a partir de una partícula de virus usando un método estándar (documento de referencia: VIROLOGY(1976) 73, p327-338 OLGA M. ROCHOVANSKY). Específicamente, se inoculó el virus AWSN/33 (1 × 10<sup>3</sup> PFU/ml, 200 μl) en un huevo de gallina embrionada de 10 días de edad. Tras la incubación a 37 °C durante 2 días, se recuperó el líquido alantoideo del huevo de gallina. Se purificó una partícula de virus mediante

## ES 2 989 872 T3

ultracentrifugación usando sacarosa al 20 %, se solubilizó usando TritonX-100 y lisolecitina, y se recogió una fracción de RNP (fracción de glicerol al 50-70 %) mediante ultracentrifugación usando un gradiente de densidad de glicerol del 30-70 %, y se usó como una solución enzimática (que contenía aproximadamente 1 nM de complejo PB1-PB2-PA).

### 5 3) Reacción enzimática

Una solución de reacción enzimática (2,5 µl) (composición: Se dispensó hidrocloreuro de tris 53 mM (pH 7,8), MgCl<sub>2</sub>, 1 mM, ditiotreitól 1,25 mM, NaCl 80 mM, glicerol al 12,5 %, solución enzimática (0,15 µl) en una placa de 384 pocillos hecha de polipropileno. A continuación, se añadieron a la placa 0,5 pl de una solución del compuesto de ensayo que se había diluido en serie con sulfóxido de dimetilo (DMSO). Como control positivo (PC) o control negativo (NC), se añadieron 0,5 pl de DMSO a la placa, respectivamente. Cada placa se mezcló bien. A continuación, se añadieron 2 pl de una solución de sustrato (ARN de sustrato 1,4 nM, Tween20 al 0,05 %) para iniciar una reacción. Tras una incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos, se recogió 1 pl de la solución de reacción y se añadió a 10 pl de una solución de formamida Hi-Di (que contenía GeneScan 120 Liz Size Standard como marcador de tamaño: fabricado por Applied Biosystems (ABI)) para detener la reacción. Para la NC, la reacción se detuvo previamente añadiendo EDTA (4,5 mM) antes del inicio de la reacción (todas las concentraciones descritas anteriormente son concentraciones finales).

### 20 4) Medición de la relación de inhibición (valor IC<sub>50</sub>)

La solución para la que se detuvo la reacción se calentó a 85 °C durante 5 minutos, se enfrió rápidamente en hielo durante 2 minutos y se analizó con un analizador genético ABI PRIZM 3730. El pico del producto de endonucleasa dependiente de la capa se cuantificó mediante el software de análisis ABI Genemapper, se obtuvo una relación de inhibición de la reacción CEN (%) de un compuesto de ensayo estableciendo las intensidades de fluorescencia de PC y NC en una inhibición del 0 % y una inhibición del 100 %, respectivamente, y se obtuvo un valor de IC<sub>50</sub> utilizando el software de ajuste de curvas (XLfit2.0: Modelo 205 (fabricado por IDBS), etc.).

(Resultado)

30 Compuesto III-2: CEN IC<sub>50</sub> = 1,93 nM

Ejemplo de prueba 2: Ensayo de confirmación del efecto inhibitorio de la CPE

<Material>

35 • E-MEM de FCS al 2 % de (preparado añadiendo kanamicina y FCS al MEM (medio esencial mínimo) (Invitrogen))

40 • E-MEM de BSA al 0,5 % de (preparado añadiendo kanamicina y BSA al MEM (medio esencial mínimo) (Invitrogen))

• HBSS (solución salina equilibrada de Hanks)

45 • célula MDBK

Las células se ajustaron al número de células apropiado ( $3 \times 10^5$ /ml) con E-MEM de FCS al 2 %.

• célula MDCK

50 Después de lavar con HBSS dos veces, las células se ajustaron al número de células apropiado ( $5 \times 10^5$ /ml) con E-MEM de BSA al 0,5 %.

• Solución de tripsina

55 La tripsina del páncreas porcino (SIGMA) se disolvió en PBS (-) y se filtró con un filtro de 0,45 µm.

• EnVision (PerkinElmer)

60 • WST-8 Kit (Kishida Chemical Co., Ltd.)

• Solución SDS al 10 %

<Procedimiento de operación>

65 • Dilución y dispensación de la muestra de prueba

## ES 2 989 872 T3

Como medio de cultivo, se usó E-MEM de FCS al 2 % cuando se usaron células MDBK y se usó E-MEM de BSA al 0,5 % cuando se usaron células MDCK. En lo sucesivo, para diluir el virus, las células y una muestra de ensayo, se usó el mismo medio de cultivo.

5 Se diluyó previamente una muestra de ensayo con un medio de cultivo hasta una concentración apropiada y, a continuación, se preparó una dilución en serie de 2 a 5 veces en una placa de 96 pocillos (50 pl/pocillo). Se prepararon dos placas, una para medir la actividad antigripal y otra para medir la citotoxicidad. Cada ensayo se realizó por triplicado para cada fármaco.

10 Cuando se usaron células MDCK, se añadió tripsina a las células hasta alcanzar una concentración final de 3 pg/ml solo para medir la actividad antigripal.

15 • Dilución y dispensación del virus de la gripe

El virus de la gripe se diluyó con un medio de cultivo hasta una concentración apropiada de antemano, y cada 50 pl/pocillo se dispensó en una placa de 96 pocillos que contenía una sustancia de ensayo. Cada 50 pl/pocillo de un medio de cultivo se dispensó en una placa que contenía una sustancia de ensayo para medir la citotoxicidad.

20 • Dilución y dispensación de la célula

Cada 100 pl/pocillo de células que se habían ajustado al número de células apropiado se dispensó en una placa de 96 pocillos que contenía una muestra de ensayo.

25 Se mezcló con una batidora de placas y se incubó en una incubadora de CO<sub>2</sub> durante 3 días para medir la actividad antigripal y medir la citotoxicidad.

• Dispensación del WST-8

30 Las células de la placa de 96 pocillos que se había incubado durante 3 días se observaron visualmente bajo un microscopio y se comprobó el aspecto de las células y la presencia o ausencia de un cristal de la sustancia de ensayo. El sobrenadante se retiró para que las células no se absorbieran de la placa.

35 El kit WST-8 se diluyó 10 veces con un medio de cultivo y cada 100 µl se dispensó en cada pocillo. Después de mezclar con una mezcladora de placas, las células se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> durante 1 a 3 horas.

Tras la incubación, con respecto a la placa para medir la actividad antigripal, se dispensaron 10 pl/pocillo de una solución de SDS al 10 % para inactivar un virus.

40 • Medición de la absorbancia

Tras mezclar la placa de 96 pocillos, se midió la absorbancia con EnVision a dos longitudes de onda de 450 nm/620 nm.

45 <Cálculo del valor de cada elemento de medición>

El valor se calculó usando Microsoft Excel o un programa que tuviera la capacidad de cálculo y procesamiento equivalente, basándose en la siguiente ecuación de cálculo.

50 • Cálculo de la concentración de inhibición efectiva para lograr un 50 % de muerte celular infectada por gripe (EC<sub>50</sub>)

$$EC_{50} = 10^z$$

55 (Resultado)

Compuesto III-2: CPE EC<sub>50</sub> = 1,13 nM

60 Basándose en los resultados anteriores, los compuestos originales usados en la presente invención muestran una alta actividad inhibidora de la endonucleasa dependiente de la cápsula (CEN) y/o un alto efecto inhibidor de la CPE y, por lo tanto, pueden ser un agente útil para el tratamiento y/o la prevención de los síntomas y/o la enfermedad inducidos por la infección con el virus de la gripe.

65 Ejemplo de prueba 3: Ensayo de inhibición de CYP

Utilizando microsomas hepáticos humanos agrupados comercialmente disponibles y empleando, como marcadores, O-deetilación de 7-etoxiresorufina (CYP1A2), metil-hidroxilación de tolbutamida (CYP2C9), 4'-hidroxilación de mefenitoína (CYP2C19), O-desmetilación de dextrometorfano (CYP2D6) e hidroxilación de terfenadina (CYP3A4) como reacciones típicas del metabolismo del sustrato de las cinco formas principales de enzimas CYP humanas (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4), se evaluó el grado inhibitor de cada cantidad de producción de metabolitos por el compuesto de la presente invención.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: sustrato, 0,5 pmol/l de etoxiresorufina (CYP1A2), 100 pmol/l de tolbutamida (CYP2C9), 50 pmol/l de S-mefenitoína (CYP2C19), 5 µmol/l de dextrometorfano (CYP2D6), 1 pmol/l de terfenadina (CYP3A4); tiempo de reacción, 15 minutos; temperatura de reacción, 37 °C; enzima, microsomas hepáticos humanos agrupados 0,2 mg de proteína/ml; concentración de un compuesto usado en la presente invención, 1, 5, 10, 20 µmol/l (cuatro puntos).

Cada uno de los cinco tipos de sustratos, microsomas hepáticos humanos o un compuesto usado en la presente invención en 50 mmol/l de tampón Hepes como solución de reacción se añadió a una placa de 96 pocillos en la composición descrita anteriormente, NADPH, como cofactor para iniciar las reacciones del metabolismo como marcadores y, después de la incubación a 37 °C durante 15 minutos, se añadió una solución de metanol/acetoneitrilo = 1/1 (v/v) para detener la reacción. Después de la centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos, se cuantificó la resorufina (metabolito CYP1A2) en el sobrenadante mediante un contador de múltiples marcadores fluorescente y el hidróxido de toltributamida (metabolito CYP2C9P), el hidróxido de mefenitoína 4' (metabolito CYP2C19), el dextrometorfano (metabolito CYP2D6) y el alcohol terfenadina (metabolito CYP3A4) se cuantificaron mediante LC/MS/MS.

La adición de solo DMSO, que es un disolvente que disuelve un compuesto usado en la presente invención, a un sistema de reacción se adoptó como control (100 %), la actividad restante (%) se calculó en cada concentración de un compuesto usado en la presente invención añadida como solución y la IC50 se calculó mediante presunción inversa mediante un modelo logístico usando una concentración y una tasa de inhibición.

(Resultado)

Compuesto III-2: cinco tipos >20 µmol/l

Ejemplo de prueba 4: Ensayo BA

Materiales y métodos para los experimentos para evaluar la absorción oral

(1) Animales experimentales: se utilizaron ratones o ratas SD.

(2) Condiciones de cría: se permitió que los ratones o ratas SD tuvieran acceso libre a alimentación sólida y agua del grifo esterilizada.

(3) Ajuste de dosificación y grupos: La administración oral y la administración intravenosa se realizaron con la dosificación predeterminada. El agrupamiento se estableció como sigue. (La dosificación se modificó por compuesto)

Administración oral de 1 a 30 mg/kg (n = 2 a 3)

Administración intravenosa de 0,5 a 10 mg/kg (n = 2 a 3)

(4) Preparación de soluciones de administración: La administración oral se realizó en forma de solución o suspensión. La administración intravenosa se realizó después de la solubilización.

(5) Vías de administración: la administración oral se realizó obligatoriamente en el estómago mediante sonda oral. La administración intravenosa se realizó desde la vena caudal mediante jeringas con aguja.

(6) Elementos de evaluación: La sangre se recogió en serie y la concentración de un compuesto usado en la presente invención en el plasma se midió mediante LC/MS/MS.

(7) Análisis estadístico: En cuanto a la transición de la concentración de un compuesto usado en la presente invención en el plasma, el área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo (AUC) se calculó mediante el programa del método de mínimos cuadrados no lineales, WinNonlin (una marca registrada), y la biodisponibilidad (BA) de un compuesto usado en la presente invención se calculó a partir de las AUC del grupo de administración oral y del grupo de administración intravenosa.

(Resultado)

Compuesto II-6: 14,9 %

Compuesto III-2: 4,2 %

5 Basándose en los resultados anteriores, el profármaco tenía una biodisponibilidad mejorada con respecto al compuesto original.

10 Por lo tanto, el compuesto usado en la presente invención tiene una excelente capacidad de absorción oral y puede ser un agente útil para el tratamiento y/o la prevención de los síntomas y/o la enfermedad inducida por la infección con el virus de la gripe.

10 Ejemplo de prueba 5: Ensayo de estabilidad del metabolismo

15 Utilizando microsomas hepáticos humanos agrupados que se comercializan, se hizo reaccionar un compuesto usado en la presente invención durante un tiempo constante, y se calculó una tasa remanente comparando una muestra reaccionada y una muestra no reaccionada, con lo que se evaluó un grado de metabolismo en el hígado.

20 Se realizó una reacción (reacción oxidativa) a 37 °C durante 0 minutos o 30 minutos en presencia de 1 mmol/l de NADPH en 0,2 ml de un tampón (50 mmol/l de Tris-HCl pH 7,4, 150 mmol/l de cloruro de potasio, 10 mmol/l de cloruro de magnesio) que contenía 0,5 mg de proteína/ml de microsomas hepáticos humanos. Después de la reacción, se añadieron 50 µl de la solución de reacción a 100 µl de una solución de metanol/acetonitrilo = 1/1 (v/v), se mezcló y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El compuesto usado en la presente invención en el sobrenadante se cuantificó mediante LC/MS/MS o extracción en fase sólida (SPE) /MS, y se calculó la cantidad restante del compuesto usado en la presente invención después de la reacción, dejando que la cantidad de compuesto a un tiempo de reacción de 0 minutos fuera del 100 %. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en ausencia de NADPH y la reacción de glucuronidación se realizó en presencia de UDP-ácido glucurónico 5 mM en lugar de NADPH, seguida de operaciones similares.

(Resultado) El % de inhibición se mostró a 2 pmol/l de compuesto de prueba.

30 Compuesto III-2: 90,1 %

Ejemplo de prueba 6: Prueba MBI fluorescente de CYP3A4 f

35 La prueba MBI fluorescente de CYP3A4 es una prueba para investigar la mejora de la inhibición del CYP3A4 de un compuesto usado en la presente invención mediante una reacción metabólica, y la prueba se realizó utilizando, como enzima CYP3A4 expresada en *Escherichia coli*, y empleando, como índice, una reacción en la que la 7-benciloxitri fluorometilcumarina (7-BFC) es desbencilada por la enzima CYP3A4 para producir un metabolismo de, 7-hidroxitri fluorometilcumarina (HFC) que emite luz fluorescente.

40 Las condiciones de reacción fueron las siguientes: sustrato, 5,6 µmol/l de BFC; tiempo de reacción previo, 0 o 30 minutos; tiempo de reacción, 15 minutos; temperatura de reacción, 25 °C (temperatura ambiente); contenido de CYP3A4 (expresado en *Escherichia coli*), antes de la reacción: 62,5 pmol/ml; en la reacción, 6,25 pmol/ml (a una dilución de 10 veces); concentración de fármaco de ensayo de un compuesto usado en la presente invención, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 pmol/l (seis puntos).

45 Se añadieron una enzima en un tampón K-Pi (pH 7,4) y una solución de un compuesto usado en la presente invención como solución previa a la reacción a una placa de 96 pocillos con la composición anterior de la reacción previa, una parte de la misma se transfirió a otra placa de 96 pocillos para que se diluyera 1/10 con un sustrato y un tampón K-Pi, se añadió NADPH como cofactor para iniciar una reacción como índice (sin preincubación) y, después durante un tiempo predeterminado de reacción, se añadió acetonitrilo/0,5 mol/l de Tris (trishidroxiaminometano) = 4/1 (V/V) para detener la reacción. Además, se añadió NADPH a una solución de preincubación restante para iniciar una preincubación (con preincubación) y, tras un tiempo predeterminado de preincubación, una parte se transfirió a otra placa para que se diluyera 1/10 con un sustrato y un tampón K-Pi para iniciar una reacción como índice. Después de un tiempo predeterminado de reacción, se añadió acetonitrilo/0,5 mol/l Tris (trishidroxiaminometano) = 4/1 (V/V) para detener la reacción. Para la placa en la que se había realizado cada reacción índice, se midió un índice de fluorescencia del 7-HFC, que es un metabolito, con un lector de placas fluorescentes. (Ex = 420 nm, Em = 535 nm).

60 La adición de solo DMSO, que es un disolvente que disuelve un compuesto usado en la presente invención, a un sistema de reacción se adoptó como control (100 %), la actividad restante (%) se calculó en cada concentración de un compuesto usado en la presente invención añadida como solución, y el IC<sub>50</sub> se calculó mediante presunción inversa mediante un modelo logístico usando una concentración y una tasa de inhibición. Cuando la diferencia entre los valores de IC<sub>50</sub> es de 5 pmol/l o más, se definió como (+) y, cuando la diferencia es de 3 pmol/l o menos, se definió como (-).

(Resultado)

65 Compuesto III-2: (-)

## Ejemplo de prueba 7: Ensayo de fluctuación Ames

Se evaluó la mutagenicidad de los compuestos usados en la presente invención.

Se inocularon 20  $\mu$ l de bacilo tifoidea de rata almacenado por congelación (cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, cepa TA100) en 10 ml de un medio nutritivo líquido (caldo nutritivo Oxoid al 2,5 % n.º 2), y este se cultivó antes de agitar a 37 °C durante 10 horas. Se centrifugaron 9 ml de una solución bacteriana de la cepa TA98 (2000 x g, 10 minutos) para eliminar la solución de cultivo. La bacteria se suspendió en 9 ml de un tampón Micro F ( $K_2HPO_4$ : 3,5 g/l,  $KH_2PO_4$ : 1 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$ : 1 g/l, citrato trisódico deshidratado: 0.25 g/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1 g/l), la suspensión se añadió a 110 ml de un medio de exposición (tampón Micro F que contenía biotina: 8 pg/ml, histidina: 0,2 pg/ml, glucosa: 8 mg/mL). La cepa TA100 se añadió a 120 ml del medio de exposición en relación con 3,16 ml de la solución bacteriana para preparar una solución bacteriana de prueba. Cada 12  $\mu$ l de solución de DMSO de un compuesto usado en la presente invención o compuesto de referencia (dilución de varias etapas desde una dosis máxima de 50 mg/ml a una relación de 2 a 3 veces), DMSO como control negativo y 50 pg/ml de solución de 4-nitroquinolina-1-óxido DMSO para la cepa TA98, 0,25 pg/ml de solución de 2-(2-furil)-3-(5-nitro-2-furil)acrilamida DMSO para la cepa TA100 bajo la condición de no activación del metabolismo, 40 pg/ml de solución de 2-aminoantraceno DMSO para la cepa TA98, 20  $\mu$ g/ml de solución de 2-aminoantraceno DMSO para la cepa TA100 bajo la condición de activación del metabolismo como control positivo y 588  $\mu$ l de la solución bacteriana de prueba (una solución mixta de 498  $\mu$ l de la solución bacteriana de prueba y 90  $\mu$ l de la mezcla S9 en la condición de activación del metabolismo) se mezclaron, y se cultivó con agitación a 37 °C durante 90 minutos. Se mezclaron 460  $\mu$ l de la solución bacteriana expuesta al compuesto de la presente invención o compuesto de referencia con 2300  $\mu$ l de un medio indicador (tampón Micro F que contenía biotina: 8 pg/ml, histidina: 0,2 pg/ml, glucosa: 8 mg/mL, púrpura de bromo cresol: 37,5 pg/ml), cada 50  $\mu$ l se dispensó en una microplaca de 48 pocillos/dosis y esta se sometió a cultivo estacionario a 37 °C durante 3 días. Dado que un pocillo que contiene una bacteria que ha obtenido la capacidad de proliferación por mutación de un gen enzimático de síntesis de aminoácidos (histidina) se vuelve de púrpura a amarillo debido a un cambio de pH, se cuenta el pocillo de proliferación de bacterias que se ha vuelto amarillo en 48 pocillos por dosis, y se evaluó comparando con un grupo de control negativo. (-) significa que la mutagenicidad es negativa y (+) es positiva.

(Resultado)

Compuesto III-2: (-)

## Ejemplo de prueba 8: ensayo de hERG

Con el fin de evaluar el riesgo de una prolongación del intervalo QT de electrocardiograma del compuesto usado en la presente invención, los efectos del compuesto usado en la presente invención en la corriente  $K^+$  rectificadora retardada ( $I_{Kr}$ ), que desempeña un papel importante en el proceso de repolarización ventricular, se estudió utilizando células HEK293 que expresan el canal de gen relacionado con el éter-a-go-go humano (hERG).

Después de retener una célula a un potencial de membrana de -80 mV mediante el método de pinzamiento en parches de células enteras utilizando un sistema de pinza en parches automatizado (PatchXpress 7000A, Axon Instruments Inc.), se registró el  $I_{Kr}$  inducido por la estimulación del pulso de despolarización a +40 mV durante 2 segundos y, además, la estimulación del pulso de repolarización a -50 mV durante 2 segundos. Después de que la corriente generada se estabilizó, la solución extracelular ( $NaCl$ : 135 mmol/l,  $KCl$ : 5,4 mmol/l,  $NaH_2PO_4$ : 0,3 mmol/l,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ : 1,8 mmol/l,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ : 1 mmol/L, glucosa: 10 mmol/L, HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico): 10 mmol/l, pH = 7,4), en la que el compuesto de la presente invención se había disuelto en una concentración objetiva, se aplicó a la célula a temperatura ambiente durante 10 minutos. A partir del registro de  $I_{Kr}$ , se midió un valor absoluto de la corriente de pico de cola basado en el valor de la corriente al potencial de membrana en reposo utilizando un software de análisis (DataXpress ver.1, Molecular Devices Corporation). Además, se calculó el % de inhibición en relación con el pico de corriente de cola antes de la aplicación del compuesto utilizado en la presente invención, y se comparó con el grupo aplicado como vehículo (solución de dimetilsulfóxido al 0,1 %) para evaluar la influencia del compuesto utilizado en la presente invención sobre el  $I_{Kr}$ .

(Resultado) Se mostró un % de inhibición entre 0,3 y 10  $\mu$ M del compuesto de ensayo.

Compuesto III-2: 7,9 %

## Ejemplo de prueba 9: Ensayo de solubilidad

La solubilidad del compuesto utilizado en la presente invención se determinó en condiciones de adición de DMSO al 1 %. Se preparó una solución de 10 mmol/l del compuesto con DMSO y se añadieron 2  $\mu$ l de la solución del compuesto usado en la presente invención, respectivamente, a 198  $\mu$ l de solución de JP-1 (se añadió agua a 2,0 g de cloruro de sodio y 7,0 ml de ácido clorhídrico para alcanzar 1000 ml) y solución de JP-2 (1 volumen de agua) a 1 volumen de la solución, que contiene 3,40 g de dihidrogenofosfato de potasio y 3,55 g. de hidrogenofosfato disódico anhidro hasta alcanzar 1000 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y la mezcla se filtró. El filtrado se diluyó

diez veces con metanol/agua = 1/1 (v/v), y la concentración del compuesto en el filtrado se midió con LC/MS o SPE/MS por el método de calibración absoluta.

(Resultado)

5

Compuesto III-2: 42,2 pmol/l

Ejemplo de prueba 10: Ensayo de solubilidad en polvo

10 Se introdujeron cantidades apropiadas del compuesto utilizado en la presente invención en viales y se añadieron 200  
 pl del primer fluido JP (se añadió agua a 2,0g de cloruro sódico en 7,0 ml de ácido clorhídrico para alcanzar 1000 ml),  
 segundo fluido JP (se añadió agua a 500 ml de solución tampón fosfato con un pH de 6,8) y 20 mmol/l de taurocolato  
 sódico (TCA) / segundo fluido JP (se añadió el segundo fluido JP a 1,08 g de TCA en el segundo fluido JP para  
 15 alcanzar 100 ml) se añadió a cada vial. Cuando el compuesto se disolvió por completo, se añadió la cantidad apropiada  
 de compuesto. Después de agitar durante 1 hora a 37 °C, la mezcla se filtró y se añadieron 100 µL de metanol a 100 µl  
 de cada filtrado (doble dilución). La magnificación de la dilución se cambió si fue necesario. Tras confirmarse si había  
 burbujas de aire y precipitados en los viales, los viales se agitaron con un tapón hermético. La concentración del  
 compuesto se determinó con HPLC mediante el método de calibración absoluta.

20 (Resultado)

Compuesto III-2: Solución de JP-1; 7,1 pg/ml, solución de JP-2; 4,4 pg/ml, 20 mmol/l de solución de TCA/JP-2;  
 16,1 µg/ml

25 Ejemplo de prueba 11: Prueba de Ames

La prueba de Ames se realizó usando Salmonellas (*Salmonella typhimurium*) TA 98, TA100, TA1535 y TA1537 y  
 Escherichia coli WP2uvrA como cepas de prueba con o sin activación metabólica en el método de preincubación para  
 comprobar la presencia o ausencia de mutagenicidad génica de los compuestos usados en la presente invención.

30

(Resultado)

Compuesto III-2: (-)

35 Ejemplo de prueba 12: Prueba de hemólisis ligera

El compuesto usado en la presente invención se disolvió a las concentraciones objetivo y se mezcló con una  
 suspensión del 2,5 % v/v de glóbulos rojos preparada a partir de sangre desfibrinada de oveja en una microplaca a  
 40 concentraciones del 0,0008 al 0,1 % p/v. Las mezclas se expusieron a 10<sup>5</sup>J/cm<sup>2</sup> de irradiación UV dentro de un  
 intervalo de longitud de onda de 290 a 400 nm, UVA y UVB utilizando lámparas fluorescentes ultravioletas, lámparas  
 GL20SE y FL20S-BLB fabricadas por Sankyo Denki Co., Ltd. y Panasonic Corporation, respectivamente. Una vez  
 completada la irradiación, las mezclas se centrifugaron y se recogió un sobrenadante de la mezcla y se colocó en una  
 45 microplaca. La fototoxicidad se evaluó midiendo una absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y 630 nm en el  
 sobrenadante. Los datos de absorbancia a longitudes de onda de 540 nm y 630 nm se usaron como indicadores del  
 daño de la biomembrana (% de fotohemólisis) y de la hiperoxidación de la membrana lipídica (formación de  
 metahemoglobina), respectivamente. Los criterios de fototoxicidad fueron los siguientes; Se consideró que no era  
 fototóxico (-) cuando se observó un % de fotohemólisis < 10 y un cambio máximo de la absorbancia a 630 nm ( $\Delta$ OD)  
 < 0,05. Se consideró que no era fototóxico (+) cuando la fotohemólisis era superior al 10 % y el cambio máximo en la  
 50 absorbancia a 630 nm ( $\Delta$ OD) era superior a 0,05.

50

(Resultado)

Compuesto III-2: (-)

55 Ejemplo de prueba 13: Transición de la concentración plasmática

Se midió la concentración plasmática del Compuesto III-2 y el Compuesto II-6 después de la administración oral del  
 profármaco Compuesto II-6, cuyo compuesto original era el Compuesto III-2, a ratas en condiciones sin ayuno. El  
 resultado se muestra en las Figuras 1 y 2.

60

La concentración del Compuesto II-6 en todas las muestras de plasma era un límite de determinación o inferior. Por  
 lo tanto, se descubrió que el compuesto profármaco II-6, cuyo compuesto original era el Compuesto III-2, había  
 cambiado rápidamente al Compuesto III-2 in vivo después de la administración (véase la Figura 2).

65 Basándose en los resultados de las pruebas anteriores, se reveló que el compuesto convertido en un profármaco se  
 absorbió en el cuerpo después de la administración oral y se convirtió rápidamente en un compuesto original en la

sangre. Por lo tanto, los compuestos (compuestos originales y/o profármacos) usados en la presente invención pueden ser agentes útiles para el tratamiento y/o la prevención de los síntomas y/o enfermedades inducidas por la infección con el virus de la gripe.

5 Ejemplo de prueba 14: Prueba de administración intravenosa

Materiales experimentales examinados y método de prueba de administración intravenosa

(1) Animales utilizados: Se usaron ratas SD.

10 (2) Condiciones de cría: Se suministraron gránulos y agua del grifo esterilizada a ratas SD ad libitum.

(3) Dosificación y agrupación: Se administró una dosis predeterminada por vía intravenosa. Los grupos se establecieron del modo siguiente. (La dosis varió para cada compuesto)

15 Administración intravenosa 0,5-1 mg/kg (n = 2-3)

(4) Preparación de solución de administración: La administración intravenosa se realizó después de la solubilización.

20 (5) Método de administración: La administración intravenosa se realizó con una jeringa equipada con aguja en la vena caudal.

(6) Criterio de valoración: Se recogió sangre a lo largo del tiempo y la concentración plasmática del compuesto usado en la presente invención se midió usando LC/MS/MS.

(7) Análisis estadístico: En cuanto a la transición de la concentración plasmática del compuesto usado en la presente invención, el aclaramiento corporal total (Cl<sub>tot</sub>) y la semivida de eliminación (t<sub>1/2</sub>, z) se calcularon usando el programa de mínimos cuadrados no lineales WinNonlin (marca registrada).

30 (Resultados)

Compuesto n.º III-2:

35 CL total: 16,4 ml/min/kg

t<sub>1/2</sub>, z: 3,4 horas

40 A partir de los resultados anteriores, se descubrió que el Compuesto III-2 es un compuesto que tiene un bajo aclaramiento corporal total y una semivida larga.

Por lo tanto, el compuesto usado en la presente invención tiene una persistencia excelente y puede ser un agente útil para el tratamiento y/o la prevención de los síntomas y/o la enfermedad inducidos por la infección con el virus de la gripe.

45 Ejemplo de prueba 15: Prueba clínica

La eficacia y la seguridad de una sola administración oral de un fármaco en investigación (ingrediente activo (Compuesto II-6): 10 mg, 20 mg, 40 mg) a pacientes infectados por el virus de la gripe se evaluaron mediante un estudio comparativo aleatorizado, controlado con placebo y doble ciego. En cuanto al criterio de valoración principal, los sujetos evaluaron por sí mismos en una escala de 4 puntos [0: ninguno, 1: leve, 2: moderado, 3: grave] en relación con el tiempo necesario para aliviar los síntomas de la gripe (el tiempo transcurrido desde el inicio de la administración del fármaco en investigación hasta los 7 síntomas de la gripe (“tos”, “dolor de garganta”, “dolor de cabeza”, “congestión nasal”, “fiebre o escalofríos”, “dolor muscular o articular”, y “fatiga”) se aliviaron) para evaluar la eficacia del fármaco en investigación frente al placebo.

Se seleccionaron como sujetos los pacientes que cumplieran todos los criterios siguientes.

(a) Pacientes masculinos o femeninos de 20 años o más y menores de 65 años

60 (b) Pacientes que cumplan todos los criterios siguientes y a los que se les haya diagnosticado una enfermedad infecciosa por el virus de la gripe

- Positivo en el diagnóstico rápido de la gripe [prueba rápida de antígenos (RAT)] basado en una muestra nasal o faríngea

65

- Temperatura corporal (temperatura axilar) de 38,0 °C o más
- Presentar uno o más síntomas moderados o graves entre los siguientes síntomas sistémicos y síntomas respiratorios debido a una enfermedad infecciosa por el virus de la gripe
- Síntomas sistémicos (dolor de cabeza, fiebre o escalofríos, dolor muscular o articular, fatiga)
- Síntomas respiratorios (tos, dolor de garganta, congestión nasal)

5

10 (C) Pacientes dentro de las 48 horas siguientes al inicio (en el momento del registro)

La definición de inicio es cualquiera de las siguientes.

- Cuando la temperatura corporal aumentó por primera vez (al menos un aumento de 1 °C con respecto a la temperatura normal)
- Cuando se desarrollaron uno o más de los síntomas sistémicos y respiratorios

15

Método para administrar un fármaco en fase de investigación

20

(i) Medicamento de prueba

Comprimido de 10 mg del Compuesto II-6: Comprimido circular recubierto con película de color blanco a blanco amarillento pálido que contiene 10 mg del Compuesto II-6

25

Comprimido de 20 mg del Compuesto II-6: Comprimido recubierto con película de color blanco a blanco amarillento pálido, elíptico, que contiene 20 mg del Compuesto II-6

30

(ii) Placebo o fármaco de control

Placebo para un comprimido de 10 mg del Compuesto II-6: Comprimido indistinguible del comprimido de 10 mg del Compuesto II-6

35

Placebo para un comprimido de 20 mg del Compuesto II-6: Comprimido indistinguible del comprimido de 20 mg del Compuesto II-6

Dosificación y método de administración

40

Los sujetos elegibles se asignaron aleatoriamente a un grupo de 10 mg, un grupo de 20 mg, un grupo de 40 mg y un grupo de placebo del Compuesto II-6 en una proporción de 1:1:1:1. Los sujetos recibieron una única administración oral de un total de 3 comprimidos del Compuesto II-6 y/o comprimidos de placebo en una combinación indicada en la siguiente tabla el día 1.

45

Medicamento en fase de investigación para cada grupo administrado

[Tabla 38]

Grupos de tratamiento	Compuesto II-6, comprimido de 10 mg	Compuesto II-6, comprimido de 20 mg	Comprimido de placebo que coincide con el Compuesto II-6, comprimido de 10 mg	Comprimido de placebo que coincide con el Compuesto II-6, comprimido de 20 mg
Compuesto II-6, comprimido de 10 mg	1 comprimido	-	-	2 comprimidos
Compuesto II-6, comprimido de 20 mg	-	1 comprimido	1 comprimido	1 comprimido
Compuesto II-6, comprimido de 40 mg	-	2 comprimidos	1 comprimido	-
Placebo	-	-	1 comprimido	2 comprimidos

50

Principal criterio de valoración de eficacia

El criterio principal de valoración de eficacia es el momento de aliviar los síntomas de la gripe (el momento de aliviar los síntomas de la gripe).

5 Es el tiempo desde el inicio de la administración hasta el alivio de los síntomas de la gripe. El alivio de los síntomas de la gripe se refiere a cuando los 7 síntomas de la gripe (tos, dolor de garganta, dolor de cabeza, congestión nasal, fiebre o escalofríos, dolor muscular o articular y fatiga) pasan a ser “0: ninguno” o “1: leve” en el diario del paciente que lleva el sujeto, y esta afección continúa al menos 21,5 horas (24 horas, 10 %).

10 Criterio de valoración secundario de eficacia

El criterio de valoración secundario de eficacia es el siguiente.

(1) Es hora de aliviar cada síntoma de la gripe

15 Es el tiempo desde el inicio de la administración hasta el alivio de cada síntoma de la gripe. El alivio de un síntoma se refiere a cuando el elemento objetivo pasa a ser “0: ninguno” o “1: leve”, y esta afección dura al menos 21,5 horas (24 horas, 10 %).

20 Análisis del criterio de valoración principal

En cuanto al tiempo necesario para aliviar los síntomas de la gripe, que es el criterio de valoración principal, se describen el análisis principal y el análisis secundario. Además del grupo ITTI, el análisis primario también se realizó en el grupo PPS para el análisis de sensibilidad. Otros análisis se realizaron solo en el grupo ITTI.

25 (1) Análisis primario

30 El cociente de riesgo, el intervalo de confianza del 95 % y el valor P de cada grupo administrado en relación con el grupo de placebo se calcularon mediante un modelo de riesgo proporcional de Cox utilizando el tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe como respuesta, los grupos administrados como efectos fijos y el hábito actual de fumar y la puntuación total de 7 síntomas de la gripe al inicio de la administración, que son factores de asignación, como covariables. Para evitar un aumento de la probabilidad de error de tipo I debido a la realización de la prueba varias veces, el valor P se ajustó mediante el método de Hommel.

35 (2) Análisis secundario

40 El grupo de placebo y cada grupo al que se administró el fármaco en investigación se compararon mediante una prueba de Wilcoxon generalizada y estratificada, utilizando el tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe como respuesta, los grupos administrados como variables explicativas y la categoría (11 puntos o menos, 12 puntos o más) de la puntuación total de 7 síntomas de la gripe antes de la administración y el hábito de fumar, que son factores de asignación, como factores de estratificación.

45 Además, se trazó una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo a fin de calcular la mediana del tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe y su intervalo de confianza del 95 %. Se utilizó el método de Greenwood para calcular el intervalo de confianza.

Análisis del criterio de valoración secundario

(1) Tiempo hasta cada alivio de los síntomas de la gripe

50 Se realizó el mismo análisis que en el criterio de valoración principal, y el tiempo transcurrido hasta cada alivio de los síntomas de la gripe se consideró una respuesta. En este momento, los casos en donde el síntoma antes de la administración era “0: ninguno” o “1: leve” se excluyeron del objetivo de análisis.

(1) Resultados del criterio de valoración principal (tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe)

55 De los 400 pacientes seleccionados al azar, 389 pacientes (98 pacientes (98 %) del grupo administrado de 10 mg, 95 pacientes (95 %) del grupo administrado de 20 mg, 99 pacientes (99 %) del grupo administrado de 40 mg y 97 pacientes (97 %) del grupo de placebo) completaron la prueba. En cuanto al criterio de valoración principal, la población de ITTI (casos en donde se administró un fármaco en fase de investigación y se confirmó la infección por el virus de la gripe) estaba compuesta por 400 pacientes.

65 Los casos establecidos según el protocolo consistieron en 368 pacientes (89 pacientes (89 %) en el grupo administrado de 10 mg, 92 pacientes (92 %) en el grupo administrado de 20 mg, 96 pacientes (96 %) en el grupo administrado de 40 mg y 91 pacientes (91 %) en el grupo de placebo). En cuanto a la población ITTI de cada grupo, la prueba de detección rápida de antígenos descubrió que entre el 75 y el 79 % de los pacientes estaban infectados por el virus de la gripe A y del 21 al 25 % de los pacientes estaban infectados por el virus de la gripe B.

Los resultados del análisis se muestran en las tablas siguientes.

[Tabla 39]

5

	Fármaco de prueba: grupo administrado de 10 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 20 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 40 mg	Grupo al que se administró el placebo
N (humano)	100	100	100	100
Valor de la mediana (hora)	54,2	51	49,5	77,7
Intervalo de confianza del 95 % (hora)	47,7, 66,8	44,5, 62,4	44,5, 64,4	67,6, 88,7
Diferencia con el placebo (hora)	-23,4	26,6	28,2	-
Prueba de Wilson generalizada				
Valor de P	0,0085	0,0182	0,0046	-
Modelo de riesgo proporcional de Cox en relación con el placebo				
Coefficiente de riesgo	0,758	0,81	0,817	-
Intervalo de confianza del 95 %	0,571, 1,007	0,608, 1,078	0,614, 1,087	-
Valor de P	0,0561	0,1488	0,165	-

El criterio de valoración principal de esta prueba, es decir, la mediana del tiempo transcurrido hasta que se aliviaron los síntomas, fue de 54,2 horas en el grupo administrado de 10 mg (IC 95 %: 47,7, 66,8), 51,0 horas en el grupo administrado de 20 mg (IC 95 %: 47,7, 66,8), 49,5 horas en el grupo administrado de 40 mg (IC 95 %: 44,5, 64,4) y 77,7 horas en el grupo de placebo (IC del 95 %: 67,6, 88,7).

10

(2) Tiempo hasta que se alivie cada uno de los siete síntomas

15

Las siguientes tablas muestran los resultados del análisis del tiempo transcurrido hasta que se alivie cada uno de los 7 síntomas de la gripe (“tos”, “dolor de garganta”, “dolor de cabeza”, “congestión nasal”, “fiebre o escalofríos”, “dolor muscular o articular”, “fatiga”).

(i) Tiempo hasta que se alivie el síntoma de “congestión nasal”

20

[Tabla 40]

	Fármaco de prueba: grupo administrado de 10 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 20 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 40 mg	Grupo al que se administró el placebo
N (humano)	49	38	45	47
Valor de la mediana (IC del 95 %) (hora)	25,2 (19,0, 47,2)	21,6 (13,4, 30,5)	21,9 (16,0, 28,7)	42,8 (22,9, 68,3)
Diferencia con el placebo (hora)	17,6	21,3	21	-
Valor de P (prueba de G. Wilcoxon) <sup>a</sup>	0,043	0,0516	0,0003	-
Coefficiente de riesgo (IC del 95 %) <sup>b</sup>	0,742 (0,494, 1,114)	0,59 (0,379, 0,920)	0,564 (0,369, 0,862)	-
Valor P (modelo Cox) <sup>b</sup>	0,15	0,0199	0,0081	-

(ii) Tiempo hasta que se alivie el síntoma de “dolor muscular o articular”

[Tabla 41]

5

	Fármaco de prueba: grupo administrado de 10 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 20 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 40 mg	Grupo al que se administró el placebo
N (humano)	73	77	71	71
Valor de la mediana (IC del 95 %) (hora)	31,2 (24,9, 39,9)	29,9 (22,8, 37,0)	25,4 (20,5, 28,9)	41,9 (28,7, 48,6)
Diferencia con el placebo (hora)	-10,7	12	16,4	-
Valor de P (prueba de G. Wilcoxon) <sup>a</sup>	0,2153	0,0346	0,0048	-
Coefficiente de riesgo (IC del 95 %) <sup>b</sup>	0,77 (0,553, 1,072)	0,687 (0,494, 0,955)	0,657 (0,469, 0,920)	-
Valor P (modelo Cox) <sup>b</sup>	0,1217	0,0255	0,0145	-

(iii) Tiempo hasta que se alivie el síntoma de “fatiga”

[Tabla 42]

10

	Fármaco de prueba: grupo administrado de 10 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 20 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 40 mg	Grupo al que se administró el placebo
N (humano)	82	82	77	79
Valor de la mediana (IC del 95 %) (hora)	32 (29,2, 39,9)	31,3 (26,7, 42,4)	31,1 (24,6, 38,6)	42,7 (30,3, 53,2)
Diferencia con el placebo (hora)	-10,7	-11,5	-11,7	-
Valor de P (prueba de G. Wilcoxon) <sup>a</sup>	0,1221	0,0594	0,0224	-
Coefficiente de riesgo (IC del 95 %) <sup>b</sup>	0,783 (0,574, 1,069)	0,8/6 (0,637, 1,203)	0,724 (0,527, 0,995)	-
Valor P (modelo Cox) <sup>b</sup>	0,1236	0,412	0,0463	-

(iv) Tiempo hasta que se alivie el síntoma de “fiebre o escalofríos”

[Tabla 43]

15

	Fármaco de prueba: grupo administrado de 10 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 20 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 40 mg	Grupo al que se administró el placebo
N (humano)	97	93	94	95
Valor de la mediana (IC del 95 %) (hora)	24,7 (21,3, 28,4)	29,4 (22,0, 34,8)	23 (19,8, 28,6)	28,8 (21,1, 33,4)
Diferencia con el placebo (hora)	-4,1	0,6	-5,8	-
Valor de P (prueba de G. Wilcoxon) <sup>a</sup>	0,0602	0,3774	0,0258	-

	Fármaco de prueba: grupo administrado de 10 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 20 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 40 mg	Grupo al que se administró el placebo
Coficiente de riesgo (IC del 95 %)ª	0,635 (0,475, 0,850)	0,848 0,634, 1,133)	0,71 (0,529, 0,951)	-
Valor P (modelo Cox)ª	0,0023	0,2642	0,0216	-

(v) Tiempo hasta que se alivie el síntoma de “dolor de cabeza”

[Tabla 44]

5

	Fármaco de prueba: grupo administrado de 10 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 20 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 40 mg	Grupo al que se administró el placebo
N (humano)	61	58	54	57
Valor de la mediana (IC del 95 %) (hora)	42,2 (29,8, 47,3)	37 (28,5, 43,5)	37,9 (28,6, 44,5)	43,7 (29,7, 53,6)
Diferencia con el placebo (hora)	-1,5	-6,7	-5,8	-
Valor de P (prueba de G. Wilcoxon)ª	0,6846	0,7741	0,0904	-
Coficiente de riesgo (IC del 95 %)ª	0,803 (0,557, 1,157)	0,936 0,635, 1,381)	0,655 (0,447, 0,961)	-
Valor P (modelo Cox)ª	0,2388	0,7404	0,0304	-

(vi) Tiempo hasta que se alivie el síntoma de “tos”

[Tabla 45]

10

	Fármaco de prueba: grupo administrado de 10 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 20 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 40 mg	Grupo al que se administró el placebo
N (Humano)	74	74	78	75
Valor de la mediana (IC del 95 %) (hora)	31,1 (21,3, 41,5)	29,8 (21,9, 32,9)	24,6 (16,1, 29,4)	31,2 (20,9, 51,4)
Diferencia con el placebo (hora)	-0,1	-1,4	-6,6	-
Valor de P (prueba de G. Wilcoxon)ª	0,6643	0,8536	0,1551	-
Coficiente de riesgo (IC del 95 %)ª	0,941 (0,675, 1,312)	0,883 0,636, 1,226)	0,865 (0,626, 1,196)	-
Valor P (modelo Cox)ª	0,7188	0,4569	0,3796	-

(vii) Tiempo hasta que se alivie el síntoma de “dolor de garganta”

[Tabla 46]

15

	Fármaco de prueba: grupo administrado de 10 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 20 mg	Fármaco de prueba: grupo administrado de 40 mg	Grupo al que se administró el placebo
--	--	--	--	---

## ES 2 989 872 T3

N (Humano)	56	64	55	46
Valor de la mediana (IC del 95 %) (hora)	35,3 (21,2, 49,8)	2/0,8 (19,9, 32,1)	31,9 (17,3, 43,0)	26,3 (16,5, 45,2)
Diferencia con el placebo (hora)	9,1	1,5	5,6	-
Valor de P (prueba de G. Wilcoxon) <sup>a</sup>	0,2905	0,6293	0,993	-
Coefficiente de riesgo (IC del 95 %) <sup>b</sup>	1,312 (0,882, 1,951)	1,05 (0,713, 1,547)	1,092 (0,738, 1,617)	-
Valor P (modelo Cox) <sup>b</sup>	0,18	0,8047	0,6602	-
<p>una prueba de Wilson generalizada estratificada en relación con el placebo. Factores de estratificación: El hábito de fumar y las puntuaciones compuestas de los síntomas al inicio del estudio.</p> <p>b Modelo de riesgo proporcional de Cox en relación con el placebo. Covariables: El hábito de fumar y las puntuaciones compuestas de los síntomas al inicio del estudio.</p> <p>Subconjunto de pacientes cuya puntuación de síntomas al inicio del estudio fue un IC “moderado” o “grave”: Intervalo de confianza</p>				

Un análisis que utilizó un modelo de riesgo proporcional de Cox reveló que el grupo administrado de 40 mg, en comparación con el grupo de placebo, mostró una disminución significativa en el tiempo hasta que aparecieron los 5 síntomas siguientes: Se aliviaron la “congestión nasal”, el “dolor muscular o articular”, la “fatiga”, la “fiebre o escalofríos” y el “dolor de cabeza”. Por ejemplo, en cuanto a dos síntomas, a saber, “congestión nasal” y “dolor muscular o articular”, la mediana del tiempo transcurrido hasta que estos síntomas mejoraron fue de 21,0 horas y 16,4 horas, respectivamente, y fueron más cortos en el grupo de 40 mg administrado que en el grupo de placebo.

También se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo administrado de 10 mg y en el grupo administrado de 20 mg con respecto a los siguientes síntomas: “dolor muscular o articular”, “congestión nasal” y “fiebre o escalofríos”.

Ejemplo de prueba 16: Ensayo clínico (Ph3: Adultos y adolescentes)

La eficacia y la seguridad de una sola administración oral de un fármaco en investigación (ingrediente activo (Compuesto II-6): Se evaluaron 40 mg, 80 mg) a pacientes infectados por el virus de la gripe mediante un estudio comparativo aleatorizado y doble ciego en comparación con 75 mg de oseltamivir administrados dos veces al día durante 5 días o un placebo. En cuanto al criterio de valoración principal, los sujetos evaluaron por sí mismos en una escala de 4 puntos [0: ninguno, 1: leve, 2: moderado, 3: grave] en relación con el tiempo necesario para aliviar los síntomas de la gripe (el tiempo transcurrido desde el inicio de la administración del fármaco en investigación hasta los 7 síntomas de la gripe (“tos”, “dolor de garganta”, “dolor de cabeza”, “congestión nasal”, “fiebre o escalofríos”, “dolor muscular o articular”, y “fatiga”) se aliviaron) para evaluar la eficacia del fármaco en investigación frente al placebo.

Además, en cuanto al criterio de valoración secundario de la eficacia, la eficacia y los efectos secundarios del fármaco en investigación se evaluaron según el título del virus de la gripe utilizando un hisopo nasal o faríngeo.

Se seleccionaron como sujetos los pacientes que cumplieran todos los criterios siguientes.

- (a) Pacientes masculinos o femeninos de 12 años o más y menores de 65 años
- (b) Pacientes que cumplan todos los criterios siguientes y a los que se les haya diagnosticado una enfermedad infecciosa por el virus de la gripe
  - Temperatura corporal (temperatura axilar) de 38,0 °C o más
  - Presentar uno o más síntomas moderados o graves entre los siguientes síntomas sistémicos y síntomas respiratorios debido a una enfermedad infecciosa por el virus de la gripe
  - Síntomas sistémicos (dolor de cabeza, fiebre o escalofríos, dolor muscular o articular, fatiga)
  - Síntomas respiratorios (tos, dolor de garganta, congestión nasal)
- (c) Pacientes dentro de las 48 horas siguientes al inicio (en el momento del registro)

La definición de inicio es cualquiera de las siguientes.

- Cuando la temperatura corporal aumentó por primera vez (al menos un aumento de 1 °C con respecto a la temperatura normal)

5

- Cuando se desarrollaron uno o más de los síntomas sistémicos y respiratorios

Método para administrar un fármaco en fase de investigación

10 (i) Medicamento de prueba

Comprimido de 20 mg del Compuesto II-6

15 (ii) Placebo o fármaco de control

Placebo para un comprimido de 20 mg del Compuesto II-6

Cápsula de 75 mg de oseltamivir

20 Placebo para una cápsula de 75 mg de oseltamivir: Cápsula indistinguible de una cápsula de 75 mg de oseltamivir

Dosificación y método de administración

25 Los pacientes elegibles de entre 20 y 64 años se asignaron al azar a un grupo que recibió una sola administración del Compuesto II-6 (40 u 80 mg según el peso corporal), un grupo que recibió 75 mg de oseltamivir dos veces al día durante 5 días y un grupo de placebo en una proporción de 2:2:1.

30 Los pacientes elegibles de 12 a 19 años de edad se asignaron al azar a un grupo que recibió una sola administración del Compuesto II-6 (40 u 80 mg según el peso corporal) y a un grupo al que se administró placebo en una proporción de 2:1.

La dosis del Compuesto II-6 fue de 40 mg para los sujetos que pesaban menos de 80 kg y de 80 mg para los sujetos que pesaban 80 kg o más.

35 Medicamento en fase de investigación para cada grupo administrado

[Grupo del Compuesto II-6]

Día 1:

40

Los comprimidos de 20 mg del Compuesto II-6 se administraron por vía oral (2 comprimidos o 4 comprimidos dependiendo del peso corporal). Las cápsulas de placebo para el oseltamivir se administraron por vía oral dos veces al día (mañana, tarde), una cápsula por administración.

45 Del Día 2 al Día 5:

Las cápsulas de placebo para el oseltamivir se administraron por vía oral dos veces al día (mañana, tarde), una cápsula por administración.

50 [Grupo de oseltamivir]

Día 1:

55 Los comprimidos de placebo para el Compuesto II-6 se administraron por vía oral (2 comprimidos o 4 comprimidos dependiendo del peso corporal). Se administraron cápsulas de 75 mg de oseltamivir por vía oral dos veces al día (mañana, tarde), una cápsula por administración.

Del Día 2 al Día 5:

60 Se administraron cápsulas de 75 mg de oseltamivir por vía oral dos veces al día (mañana, tarde), una cápsula por administración.

[Grupo del placebo]

65 Día 1:

## ES 2 989 872 T3

Los comprimidos de placebo para el Compuesto II-6 se administraron por vía oral (2 comprimidos o 4 comprimidos dependiendo del peso corporal). Las cápsulas de placebo para el oseltamivir se administraron por vía oral dos veces al día (mañana, tarde), una cápsula por administración.

5 Del Día 2 al Día 5:

Las cápsulas de placebo para el oseltamivir se administraron por vía oral dos veces al día (mañana, tarde), una cápsula por administración.

10 El “Día 1” indica el primer día de administración, y “del Día 2 al Día 5” indica del segundo al quinto día contado desde el primer día de administración.

Principal criterio de valoración de eficacia

15 El criterio principal de valoración de eficacia es el momento de aliviar los síntomas de la gripe (el momento de aliviar los síntomas de la gripe).

20 Es el tiempo desde el inicio de la administración hasta el alivio de los síntomas de la gripe. El alivio de los síntomas de la gripe se refiere a cuando los 7 síntomas de la gripe (tos, dolor de garganta, dolor de cabeza, congestión nasal, fiebre o escalofríos, dolor muscular o articular y fatiga) pasan a ser “0: ninguno” o “1: leve” en el diario del paciente que lleva el sujeto, y esta afección continúa al menos 21,5 horas (24 horas, 10 %).

Criterio de valoración secundario de eficacia

25 El criterio de valoración secundario de eficacia es el siguiente.

(1) Proporción de pacientes con una valoración positiva del virus de la gripe en cada punto

30 (2) Cantidad de cambio en el título del virus con respecto al valor basal en cada punto

(3) Tiempo hasta la finalización de la diseminación viral según el título del virus

(4) Incidencia de efectos secundarios

35 La concentración del virus se midió de la siguiente manera.

(1) Las células MDCK-SIAT1 sembradas en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano se cultivaron en un incubador con un 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 ± 1 °C durante 1 día.

40 (2) Una cepa estándar (virus de la gripe AH3N2, A/Victoria/361/2011), estado de almacenamiento: -80 °C, origen: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas), una muestra (recolectada de pacientes en la prueba clínica de fase III del Compuesto II-6 y almacenada en un congelador a temperatura ultrabaja) y un medio para el control celular se diluyeron de 10<sup>1</sup> a 10<sup>7</sup> veces mediante un método de dilución en serie de 10 veces.

45 (3) Después de confirmar las células presentes en forma de lámina con un microscopio invertido, se retiró el medio y se añadió un nuevo medio a 100 pl/pocillo.

(4) Se retiró el medio.

50 (5) Cada una de las muestras (10<sup>0</sup> a 10<sup>7</sup>) preparadas en el punto (2) anterior se inoculó a 100 pl/pocillo, utilizando 4 pocillos por muestra.

(6) La adsorción centrífuga se realizó a temperatura ambiente a 1000 rpm durante 30 minutos.

55 (7) Después de la centrifugación, se retiró el medio y las células se lavaron una vez con un nuevo medio.

(8) Se añadió un nuevo medio a 100 pl/pocillo.

(9) La incubación se realizó en una incubadora con un 5 % de CO<sub>2</sub> a 33 ± 1 °C durante 3 días.

60 (10) Tras la incubación, se evaluó el efecto citopático (CPE) con un microscopio invertido.

Método para determinar si tiene un título de virus positivo

65 Cuando se superó el límite de detección medido mediante el método de medición del título de virus anterior, se determinó que era positivo.

Análisis del criterio de valoración principal

5 En cuanto al tiempo necesario para aliviar los síntomas de la gripe, que es el criterio de valoración principal, se describen el análisis principal y el análisis secundario. El análisis principal se realizó en el grupo ITTI.

(1) Análisis primario

10 En el caso de los pacientes de 12 a 64 años, el grupo de placebo y el grupo al que se administró el fármaco en fase de investigación se compararon mediante una prueba de Wilcoxon generalizada y estratificada, utilizando la puntuación total de 7 síntomas de la gripe antes de la administración (11 puntos o menos, 12 puntos o más) y regiones (Japón/Asia, otras regiones) como factores de estratificación.

15 Además, se trazó una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo a fin de calcular la mediana del tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe y el intervalo de confianza del 95 % de los mismos, así como la diferencia entre los grupos en cuanto al tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe y el intervalo de confianza del 95 % del mismo.

20 (2) Análisis secundario

Para los pacientes de 20 a 64 años, se comparó el tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe entre el grupo del Compuesto II-6 y el grupo de oseltamivir mediante el mismo método que en el análisis primario.

25 Análisis del criterio de valoración secundario

Los siguientes criterios de valoración secundarios de eficacia se compararon entre el grupo del Compuesto II-6 y el grupo de placebo y entre el grupo del Compuesto II-6 y el grupo de oseltamivir (el grupo de edad de 20 a 64 años).

30 (1) Proporción de pacientes con una valoración positiva del virus de la gripe en distintos momentos

Solo se incluyeron en el análisis los pacientes que tenían un título del virus igual o superior al límite de determinación antes del inicio de la administración en la visita 1. En cada visita, se aplicó una prueba de Mantel-Haenszel usando la puntuación total de 7 síntomas de la gripe antes de la administración y las regiones como factores de estratificación, y se comparó la proporción de pacientes con un título del virus positivo entre dos grupos.

35 (2) Cantidad de cambio en el título del virus con respecto al valor basal en varios momentos

40 Solo se incluyeron en el análisis los pacientes que tenían un título del virus antes del inicio de la administración en la visita 1. En cada visita, se aplicó una prueba de van Elteren usando la puntuación total de 7 síntomas de la gripe antes de la administración y las regiones como factores de estratificación, y se comparó la cantidad de cambios en el título del virus de la gripe con respecto al valor basal entre dos grupos.

(3) Tiempo hasta la finalización de la diseminación viral según el título del virus

45 Solo se incluyeron en el análisis los pacientes que tenían un título del virus igual o superior al límite de determinación antes del inicio de la administración en la visita 1. Se aplicó una prueba de Wilcoxon generalizada estratificada que utilizó la puntuación total de 7 síntomas de gripe antes de la administración y las regiones como factores de estratificación.

50 (4) Incidencia de efectos secundarios

Se contaron el número de episodios de efectos secundarios y el número de pacientes con efectos secundarios para cada grupo de administración.

55 (1) Resultados del criterio de valoración principal (tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe)

60 De los 1436 pacientes seleccionados al azar, 1366 pacientes (578 pacientes en el grupo al que se administró 40 mg u 80 mg del Compuesto II-6, 498 pacientes en el grupo al que se administró oseltamivir y 290 pacientes en el grupo de placebo) completaron la prueba. En cuanto al criterio de valoración principal, los casos de ITTI (casos en donde se siguió el GCP, se administró el fármaco en investigación y se confirmó la infección por el virus de la gripe) consistieron en 1064 pacientes.

65 Los casos establecidos según el protocolo consistieron en 990 pacientes (427 pacientes en el grupo al que se administró 40 mg u 80 mg del Compuesto II-6, 351 pacientes en el grupo al que se administró oseltamivir y 212 pacientes en el grupo de placebo).

Los resultados del análisis se muestran en la siguiente tabla.

[Tabla 47]

	12 años o más y menos de 65 años		20 años o más y menos de 65 años	
	Grupo al que se administró el Compuesto II-6	Grupo al que se administró el placebo	Grupo al que se administró el Compuesto II-6	Grupo al que se administró Oseltamivir
Número de pacientes	455	230	375	377
Mediana (hora)	53,7	80,2	53,5	53,8
Intervalo de confianza del 95 % (hora)	49,5-58,5	72,6-87,1	48,0-58,5	50,2-56,4
Diferencia entre grupos <sup>a</sup> (hora)	-26,5	---	-0,3	---
Intervalo de confianza del 95 % de diferencia entre los grupos (hora) <sup>b</sup>	-35,8, 17,8	---	-6,6, 6,6	---
Valor de P (prueba generalizada estratificada de Wilcoxon) <sup>c</sup>	<0,0001	---	0,7560	---
a Frente a placebo o frente a oseltamivir b Estimación de Bootstrap c Se utilizaron las regiones y la puntuación total de 7 síntomas de la gripe antes de la administración como factores de estratificación, y se censuraron en la evaluación final en el caso de los pacientes cuyos síntomas no se aliviaron.				

5 En el grupo de ITTI, el tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe (mediana) (IC 95 %) fue de 53,7 horas (IC 95 %: 49,5, 58,5) en el grupo del Compuesto II-6, mientras que 80,2 horas (IC del 95 %): 72,6, 87,1) en el grupo de placebo, y la diferencia entre el grupo del Compuesto II-6 y el grupo de placebo fue de -26,5 horas. El tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas gripales del grupo del Compuesto II-6 fue significativamente más corto que el del grupo placebo en el análisis primario mediante una prueba de Wilcoxon generalizada estratificada ( $p < 0,0001$ ).

10 En el subgrupo de pacientes de 20 años o más y menores de 65 años, el tiempo necesario para aliviar los síntomas de la gripe fue de 53,5 horas (IC del 95 %: 48,0, 58,5) en el grupo del Compuesto II-6, mientras que durante 53,8 horas (IC del 95 %: 50,2, 56,4) en el grupo de oseltamivir, y la diferencia entre el grupo del Compuesto II-6 y el grupo de oseltamivir fue de -0,3 horas. No hubo diferencias significativas entre los tiempos de alivio de los síntomas de la gripe del grupo del Compuesto II-6 y del grupo de oseltamivir en la prueba generalizada estratificada de Wilcoxon.

Análisis del criterio de valoración secundario

20 (1) Proporción de pacientes que tienen una valoración positiva del virus de la gripe en varios momentos

Los resultados del análisis se muestran en la siguiente tabla.

[Tabla 48]

Punto temporal de observación		12 años o más y menos de 65 años		20 años o más y menos de 65 años	
		Grupo al que se administró el Compuesto II-6	Grupo al que se administró el placebo	Grupo al que se administró el Compuesto II-6	Grupo al que se administró Oseltamivir
		N = 427	N = 210	N = 352	N = 359
Día 2	Proporción	47,8 % (197/412)	96,0 % (193/201)	47,6 % (161/338)	91,0 % (315/346)
	Intervalo de confianza del 95 %	42,9, 52,8	92,3, 98,3	42,2, 53,1	87,5, 93,8
	Valor de p <sup>a</sup>	<0,0001	---	<0,0001	---

ES 2 989 872 T3

Día 3	Proporción	21,5 % (67/404)	70,2 % (134191)	19,8 % (66133)	57,3 % (197/344)
	Intervalo de confianza del 95 %	17,6, 25,9	63,1, 76,5	15,7, 24,5	51,9, 62,6
	Valor de p <sup>a</sup>	<0,0001	---	<0,0001	---
Día 4	Proporción	16,7 % (19114)	56,1 % (32157)	16,1 % (14/87)	27,6 % (29105)
	Intervalo de confianza del 95 %	10,3, 24,8	42,4, 69,3	9,1, 25,5	19,3, 37,2
	Valor de p <sup>a</sup>	<0,0001	---	0,0852	---
Día 5	Proporción	13,6 % (55/403)	29,7 % (57/192)	13,0 % (431339)	20,9 % (70/335)
	Intervalo de confianza del 95 %	10,4, 17,4	23,3, 36,7	9,6, 17,1	16,7, 25,6
	Valor de p <sup>a</sup>	<0,0001	---	0,0066	---
Día 6	Proporción	8,2 % (8197)	12,5 % (6148)	5,6 % (4171)	9,0 % (7/78)
	Intervalo de confianza del 95 %	3,6, 15,6	4,7, 25,2	1,6, 13,8	3,7, 17,6
	Valor de p <sup>a</sup>	0,4767	---	0,6187	---
Día 9	Proporción	2,9 % (12/407)	4,6 % (91197)	3,0 % (10135)	3,2 % (11339)
	Intervalo de confianza del 95 %	1,5, 5,1	2,1, 8,5	1,4, 5,4	1,6, 5,7
	Valor de p <sup>a</sup>	0,3379	---	0,8618	---

El Día 2 indica 24 horas después, contadas desde el primer día de administración, el Día 3 indica 48 horas después, el Día 4 indica 72 horas después, el Día 5 indica 96 horas después, el Día 6 indica 120 horas después y el día 9 indica 192 horas después.

a Frente a placebo o frente a oseltamivir. Prueba de Mantel-Haenszel. Se utilizaron las regiones y la puntuación total de 7 síntomas de la gripe antes de la administración como factores de estratificación y se destinaron a un grupo que tenía un título del virus positivo antes de la administración.

La proporción de pacientes con un título positivo del virus fue significativamente menor en el grupo del Compuesto II-6 que en el grupo placebo en el Día 2 (prueba de Mantel-Haenszel:  $p < 0,0001$ ), e igualmente, significativamente menor en el grupo del Compuesto II-6 que en el grupo placebo en el Día 3 ( $p < 0,0001$ ). En el subgrupo de pacientes de 20 años o más y menores de 65 años, la proporción de pacientes con un título de virus positivo fue significativamente menor en el grupo del Compuesto II-6 que en el grupo de oseltamivir el Día 2 y el Día 3 ( $p < 0,0001$ ).

(2) Cantidad de cambio en el título del virus con respecto al valor basal en varios puntos

10 Los resultados del análisis se muestran en la siguiente tabla.

[Tabla 49]

Punto temporal de observación		12 años o más y menos de 65 años		20 años o más y menos de 65 años	
		Grupo al que se administró el Compuesto II-6	Grupo al que se administró el placebo	Grupo al que se administró el Compuesto II-6	Grupo al que se administró Oseltamivir
		N = 427	N = 210	N = 352	N = 359
Día 2	Número de pacientes	412	201	338	346
	Media	-4,44	-1,19	-4,39	-2,51

ES 2 989 872 T3

	Desviación estándar	2,03	2,43	2,07	2,03
	Valor de p <sup>a</sup>	<0,0001	---	<0,0001	---
Día 3	Número de pacientes	404	191	333	344
	Media	-4,82	-2,91	-4,78	-4,20
	Desviación estándar	1,99	2,85	2,03	2,02
	Valor de p <sup>a</sup>	<0,0001	---	<0,0001	---
Día 4	Número de pacientes	114	57	87	105
	Media	-4,50	-3,31	-4,46	-4,63
	Desviación estándar	2,02	2,34	2,03	1,89
	Valor de p <sup>a</sup>	0,0008	---	0,8010	---
Día 5	Número de pacientes	403	192	331	335
	Media	-4,95	-4,47	-4,95	-4,98
	Desviación estándar	1,93	2,21	1,94	1,82
	Valor de p <sup>a</sup>	0,0132	---	0,9425	---
Día 6	Número de pacientes	97	48	71	78
	Media	-4,58	-4,68	-4,56	-4,85
	Desviación estándar	1,99	2,12	1,99	1,95
	Valor de p <sup>a</sup>	0,9307	---	0,2256	---
Día 9	Número de pacientes	407	197	335	339
	Media	-5,06	-4,87	-5,03	-5,22
	Desviación estándar	1,87	1,85	1,89	1,70
	Valor de p <sup>a</sup>	0,1684	---	0,3267	---

Unidad: lógica [TCID<sub>50</sub>/ml].

El Día 2 indica 24 horas después, contadas desde el primer día de administración, el Día 3 indica 48 horas después, el Día 4 indica 72 horas después, el Día 5 indica 96 horas después, el Día 6 indica 120 horas después y el día 9 indica 192 horas después.

a Frente a placebo o frente a oseltamivir. Prueba de van Elteren. Se utilizaron las regiones y la puntuación total de 7 síntomas de gripe antes de la administración como factores de estratificación. Destinado a un grupo que tiene una concentración positiva del virus antes de la administración.

5 El título del virus disminuyó significativamente en el grupo del Compuesto II-6 en comparación con el grupo placebo en el Día 2, y del mismo modo, disminuyó significativamente en comparación con el grupo placebo en el Día 3 (prueba de van Elteren:  $p < 0,0001$ ). En el subgrupo de pacientes de 20 años o más y menores de 65 años, el título del virus disminuyó significativamente en el grupo del Compuesto II-6 en comparación con el grupo de oseltamivir el Día 2 y el Día 3 ( $p < 0,0001$ ).

(3) Tiempo hasta la finalización de la diseminación viral según el título del virus

10 Los resultados del análisis se muestran en la siguiente tabla.

[Tabla 50]

	12 años o más y menos de 65 años		20 años o más y menos de 65 años	
	Grupo al que se administró el Compuesto II-6	Grupo al que se administró el placebo	Grupo al que se administró el Compuesto II-6	Grupo al que se administró Oseltamivir
Número de pacientes	423	207	346	355
Intervalo de confianza del 95 % (hora)	24,0, 48,0	---	24,0, 48,0	72,0, 96,0
Diferencia entre grupos (hora) <sup>a</sup>	-72,0	---	-48,0	---
Valor de P (prueba generalizada estratificada de Wilcoxon) <sup>b</sup>	<0,0001	---	<0,0001	---

a Frente a placebo o frente a oseltamivir.

b Se utilizaron las regiones y la puntuación total de 7 síntomas de la gripe antes de la administración como factores de estratificación.

Censurado en la evaluación final para los pacientes cuyo título del virus no se eliminó.

Su objetivo era analizar a los pacientes que tenían un título del virus positivo el Día 1 y cuyos datos sobre el tiempo transcurrido hasta la finalización de la diseminación viral no faltaban.

5 El tiempo (mediana) hasta el cese de la diseminación viral basado en el título del virus fue de 24,0 horas en el grupo del Compuesto II-6, mientras que fue de 96,0 horas en el grupo placebo, y fue significativamente más corto en el grupo del Compuesto II-6 que en el grupo placebo (prueba de Wilcoxon generalizada estratificada:  $p < 0,0001$ ). El tiempo transcurrido hasta el cese de la diseminación viral en el subgrupo de pacientes de 20 años o más y menores de 65 años fue de 24,0 horas en el grupo del Compuesto II-6 y de 72,0 horas en el grupo de oseltamivir, y fue significativamente más corto en el grupo del Compuesto II-6 que en el grupo de oseltamivir ( $p < 0,0001$ ).

10 (4) Incidencia de eventos adversos

No se notifican los eventos adversos graves cuya relación causal no se puede negar. Los efectos adversos cuya relación causal no se puede negar se produjeron en 27 pacientes de 610 pacientes (4,4 %, 37 episodios) en el grupo del Compuesto II-6, 12 pacientes de 309 pacientes (3,9 %, 19 episodios) en el grupo de placebo y 43 pacientes de 513 pacientes (8,4 %, 53 episodios) en el grupo de oseltamivir. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las incidencias en el grupo del Compuesto II-6 y el grupo de placebo (prueba exacta de Fisher, valor de P bilateral: 0,8627). Sin embargo, la incidencia en el grupo del Compuesto II-6 fue significativamente menor que en el grupo de oseltamivir (prueba exacta de Fisher, valor de P bilateral: 0,0088).

20 Ejemplo de prueba 17: Ensayo clínico (Ph3: Niño)

25 La eficacia y la seguridad de una sola administración oral de un fármaco en investigación (ingrediente activo (Compuesto II-6): Se evaluaron 5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg) en pacientes infectados por el virus de la gripe. En cuanto al criterio de valoración principal, los tutores o los sujetos por sí solos evaluaron y midieron el tiempo transcurrido hasta que se aliviaron los síntomas de la gripe (el tiempo transcurrido desde el inicio de la administración del fármaco en investigación hasta que se aliviaron los síntomas de la gripe (“tos”, “secreción nasal/congestión nasal” y “fiebre”)) para evaluar la eficacia del fármaco en investigación.

30 La “tos” y la “secreción nasal/congestión nasal” se evaluaron en una escala de 4 puntos [0: ninguna, 1: leve, 2: moderada, 3: grave].

Se seleccionaron como sujetos los pacientes que cumplían todos los criterios siguientes.

- 35 (a) Pacientes masculinos o femeninos de 6 meses o más y menores de 12 años
- (b) Pacientes que cumplan todos los criterios siguientes y a los que se les haya diagnosticado una enfermedad infecciosa por el virus de la gripe
  - 40 - Positivo en el diagnóstico rápido de la gripe [prueba rápida de antígenos (RAT)] basado en una muestra nasal o faríngea
  - Temperatura corporal (temperatura axilar) de 38,0 °C o más
  - 45 - Presentar uno o más síntomas moderados o graves entre los síntomas respiratorios debidos a una enfermedad infecciosa por el virus de la gripe en pacientes de 7 años o más

(c) Pacientes dentro de las 48 horas siguientes al inicio (en el momento del registro). El inicio se define cuando se confirma por primera vez que la temperatura corporal supera los 37,5 °C.

5 (d) Pacientes con un peso corporal de 5 kg o más.

Método para administrar un fármaco en fase de investigación

(i) Medicamento de prueba

10 Comprimido de 5 mg del Compuesto II-6: La mitad de un comprimido de 10 mg del Compuesto II-6

Comprimido de 10 mg del Compuesto II-6

15 Comprimido de 20 mg del Compuesto II-6

Dosificación y método de administración

20 Los pacientes recibieron una única administración oral el día 1 en una dosis calculada en función del peso corporal (consulte la tabla siguiente).

[Tabla 51]

Peso corporal del paciente en el momento del cribado	Dosis del Compuesto II-6	Comprimido del Compuesto II-6
5 kg o más y menos de 10 kg	5 mg	La mitad de un comprimido de 10 mg
10 kg o más y menos de 20 kg	10 mg	Un comprimido de 10 mg
20 kg o más y menos de 40 kg	20 mg	Un comprimido de 20 mg o dos comprimidos de 10 mg
40 kg o más	40 mg	Dos comprimidos de 20 mg

25 Principal criterio de valoración de eficacia

El criterio principal de valoración de eficacia es el momento de aliviar los síntomas de la gripe (el momento de aliviar los síntomas de la gripe).

30 Es el tiempo desde el inicio de la administración hasta el alivio de los síntomas de la gripe. El alivio de un síntoma de la gripe se refiere al momento en que las siguientes letras a y b están satisfechas desde el inicio de la administración, y esta afección clínica continúa al menos 21,5 horas (24 horas, 10 %).

35 a. Tanto “tos” como “goteo nasal/congestión nasal” aparecen como “0: ninguna” o “1: leve” en el diario del paciente

b. La temperatura corporal (temperatura axilar) es inferior a 37,5 °C

40 Análisis del criterio de valoración principal

En cuanto al tiempo necesario para aliviar los síntomas de la gripe, que es el criterio de valoración principal, se describe el análisis principal. El análisis principal se realizó en el grupo ITTI.

45 (1) Análisis primario

Se trazó una curva de Kaplan-Meier del tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe (“tos”, “secreción nasal/congestión nasal” y “fiebre”) (el tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe) para calcular la mediana del tiempo necesario para completar el alivio de los síntomas de la gripe y el intervalo de confianza del 95 % correspondiente. Los pacientes cuyos síntomas de gripe no se aliviaron por completo durante el período de observación fueron tratados como casos censurados.

(1) Resultados del criterio de valoración principal (tiempo transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe)

55 En cuanto al criterio de valoración principal, participaron 103 pacientes. El tiempo (mediana) transcurrido hasta el alivio de los síntomas de la gripe en el grupo de ITTI fue de 44,6 horas (IC del 95 %: 38,9, 62,5).

Ejemplo de formulación

Los siguientes ejemplos de formulación son meramente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

5 Ejemplo de formulación 1: Comprimidos

Los compuestos usados en la presente invención, la lactosa y el estearato de calcio, se mezclan. La mezcla se tritura, se granula y se seca para dar un tamaño adecuado de gránulos. A continuación, se añade estearato de calcio a los gránulos, y la mezcla se comprime y se moldea para dar comprimidos.

10

Ejemplo de formulación 2: Cápsulas

Los compuestos usados en la presente invención, la lactosa y el estearato de calcio, se mezclan uniformemente para obtener medicamentos en polvo en forma de polvos o gránulos finos. Los medicamentos en polvo se llenan en envases de cápsulas para administrar las cápsulas.

15

Ejemplo de formulación 3: Gránulos

Los compuestos usados en la presente invención, la lactosa y el estearato de calcio, se mezclan uniformemente y la mezcla se comprime y se moldea. A continuación, se tritura, se granula y se tamiza para obtener los tamaños adecuados de gránulos.

20

Ejemplo de formulación 4: Comprimidos desintegrados por vía oral

25 Los compuestos usados en la presente invención y la celulosa cristalina se mezclan, se granulan y se preparan comprimidos para dar comprimidos desintegrados por vía oral.

Ejemplo de formulación 5: Jarabes secos

30 Los compuestos usados en la presente invención y la lactosa se mezclan, trituran, granulan y tamizan para obtener tamaños adecuados de jarabes secos.

Ejemplo de formulación 6: Inyecciones

35 Los compuestos usados en la presente invención y el tampón de fosfato se mezclan para administrar la inyección.

Ejemplo de formulación 7: Infusiones

Los compuestos usados en la presente invención y el tampón de fosfato se mezclan para administrar la inyección.

40

Ejemplo de formulación 8: Inhalaciones

El compuesto usado en la presente invención y la lactosa se mezclan y se trituran finamente para dar inhalaciones.

45 Ejemplo de formulación 9: Pomadas

Los compuestos usados en la presente invención y la vaselina se mezclan para dar pomadas.

Ejemplo de formulación 10: Parches

50

Los compuestos usados en la presente invención y la base, tal como el emplastro adhesivo o similares, se mezclan para dar parches.

[Aplicabilidad industrial]

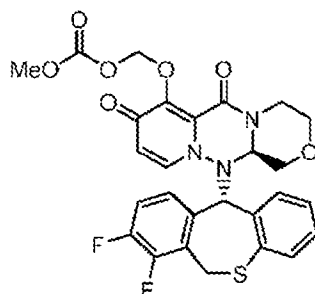
55

Los compuestos originales usados en la presente invención tienen actividad inhibidora de la endonucleasa (CEN) dependiente del límite máximo después de la absorción en el cuerpo. Los compuestos (los compuestos originales y/o los profármacos) usados en la presente invención pueden ser agentes útiles para el tratamiento y/o la prevención de los síntomas y/o la enfermedad inducidos por la infección con el virus de la gripe. La composición farmacéutica es eficaz para acortar el tiempo necesario para aliviar los síntomas de la gripe y es útil para tratar y/o prevenir una enfermedad infecciosa por el virus de la gripe.

60

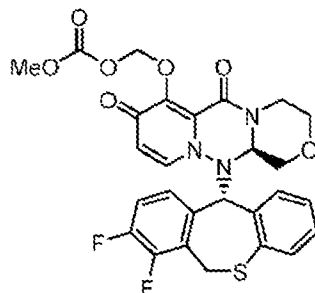
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para usar en un método para acortar el tiempo para aliviar los síntomas de la gripe, en donde el compuesto se administra por vía oral en una dosis de 10 a 80 mg/día para un adulto, y en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula:



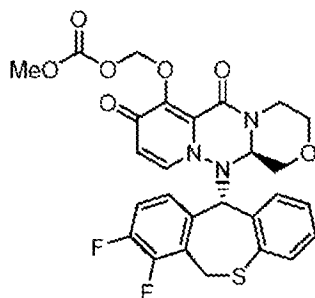
o su sal farmacéuticamente aceptable.

2. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según la reivindicación 1, en donde el compuesto se administra por vía oral durante un día.
3. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según la reivindicación 1, en donde el compuesto se administra por vía oral en una dosis única de 10 mg, 20 mg o 40 mg.
4. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable para usar según la reivindicación 1, en donde el compuesto se administra por vía oral en una dosis única de 40 mg u 80 mg en el caso de adultos.
5. Un compuesto para usar en un método para acortar el tiempo para aliviar los síntomas de la gripe, en donde el compuesto se administra por vía oral en una dosis única de 5 a 40 mg en el caso de niños, dependiendo del peso corporal, y en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula:



o su sal farmacéuticamente aceptable.

6. Un cristal del compuesto de la siguiente fórmula:



7. El cristal según la reivindicación 6, en donde el cristal tiene dos o más picos en los ángulos de difracción (2 $\theta$ ) seleccionados entre  $8,6 \pm 0,2^\circ$ ,  $14,1 \pm 0,2^\circ$ ,  $17,4 \pm 0,2^\circ$ ,  $20,0 \pm 0,2^\circ$ ,  $24,0 \pm 0,2^\circ$ ,  $26,3 \pm 0,2^\circ$ ,  $29,6 \pm 0,2^\circ$  y  $35,4 \pm 0,2^\circ$  en un espectro de difracción de rayos X en polvo.

8. El cristal según la reivindicación 6, en donde el cristal tiene picos en los ángulos de difracción ( $2\theta$ ) de:  $8,6 \pm 0,2^\circ$ ,  $14,1 \pm 0,2^\circ$ ,  $17,4 \pm 0,2^\circ$ ,  $20,0 \pm 0,2^\circ$ ,  $24,0 \pm 0,2^\circ$ ,  $26,3 \pm 0,2^\circ$ ,  $29,6 \pm 0,2^\circ$  y  $35,4 \pm 0,2^\circ$  en un espectro de difracción de rayos X en polvo.
- 5 9. El cristal según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para usar en un método para acortar el tiempo para aliviar los síntomas de la gripe, en donde el cristal se administra por vía oral en una dosis de 10 a 80 mg/día para un adulto.
- 10 10. El cristal para usar según la reivindicación 9, en donde el compuesto se administra por vía oral durante un día.
11. El cristal para usar según la reivindicación 9, en donde el compuesto se administra por vía oral en una dosis única de 10 mg, 20 mg o 40 mg.
- 15 12. El cristal para usar según la reivindicación 9, en donde el compuesto se administra por vía oral en una dosis única de 40 mg u 80 mg en el caso de adultos.
- 20 13. El cristal según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para usar en un método para acortar el tiempo para aliviar los síntomas de la gripe, en donde el cristal se administra por vía oral en una dosis única de 5 a 40 mg en el caso de niños, dependiendo del peso corporal.
14. Una composición farmacéutica que comprende el cristal según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.

Figura 1

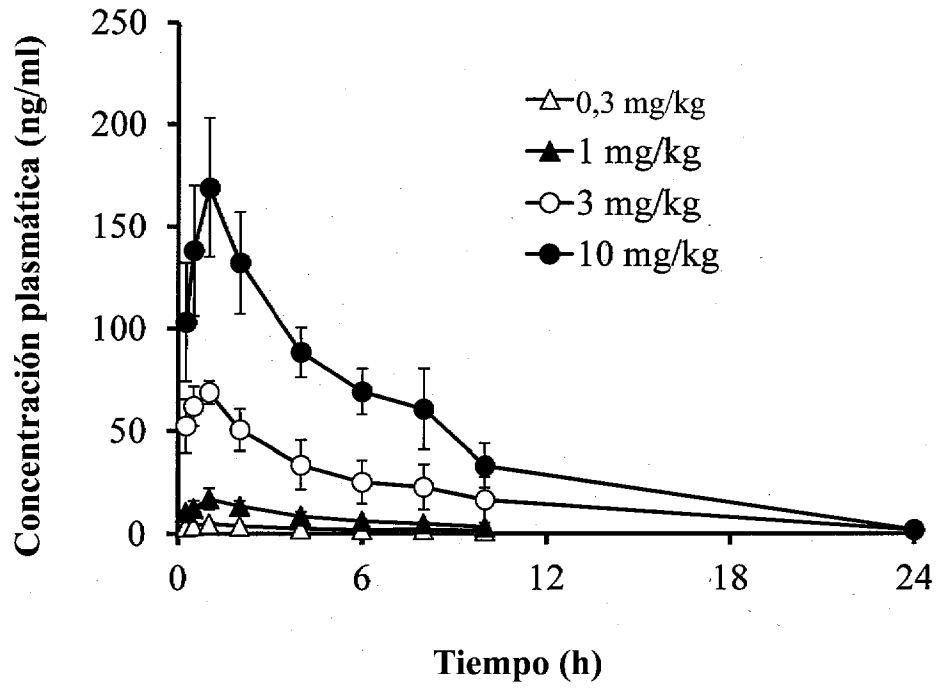


Figura 2

Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/ml)			
	0,3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg
0.25	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
0.5	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
4	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
6	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
10	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
24	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ: por debajo del límite inferior de cuantificación (< 0,500 ng/ml)

Figura 3

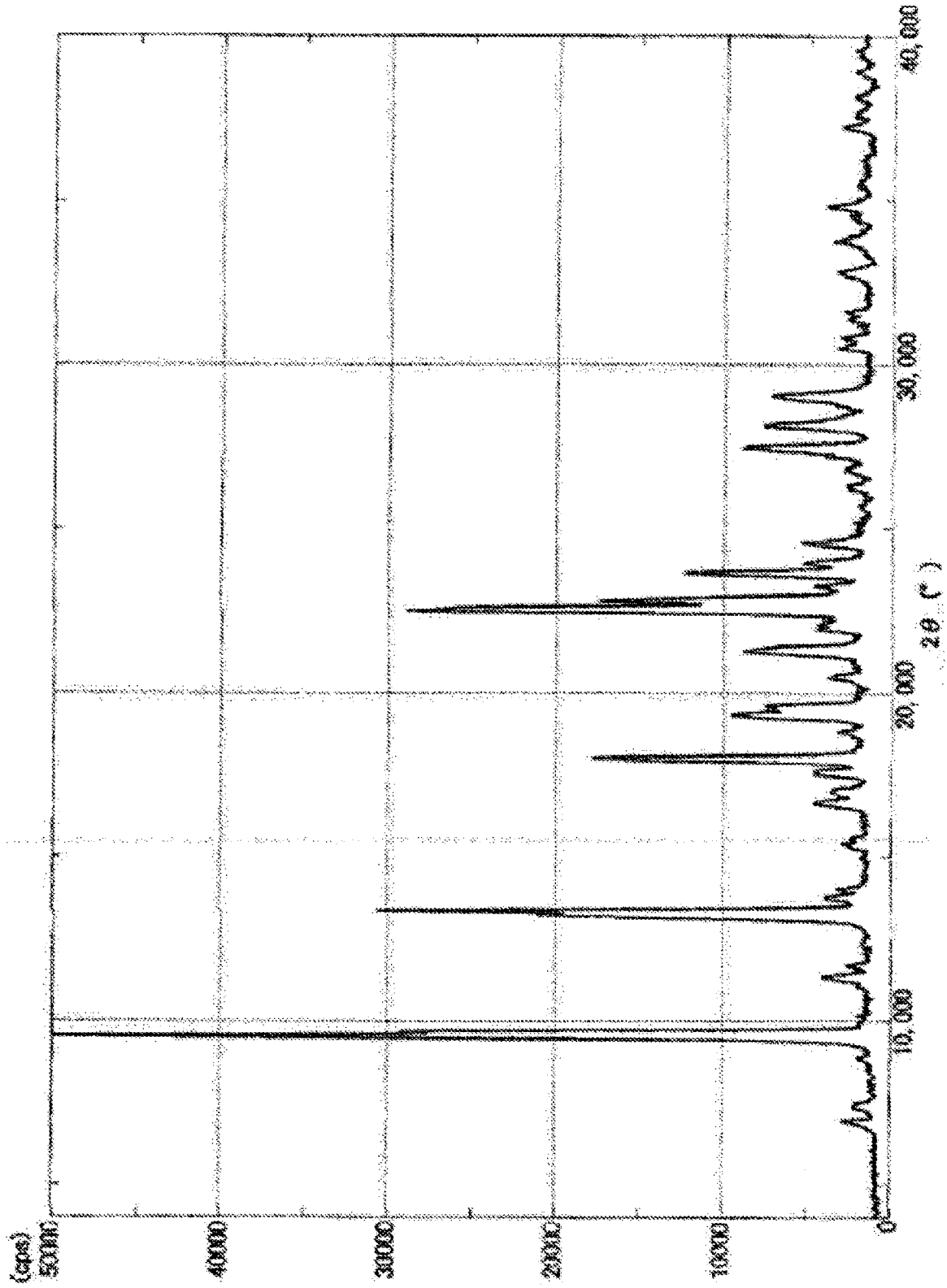


Figura 4

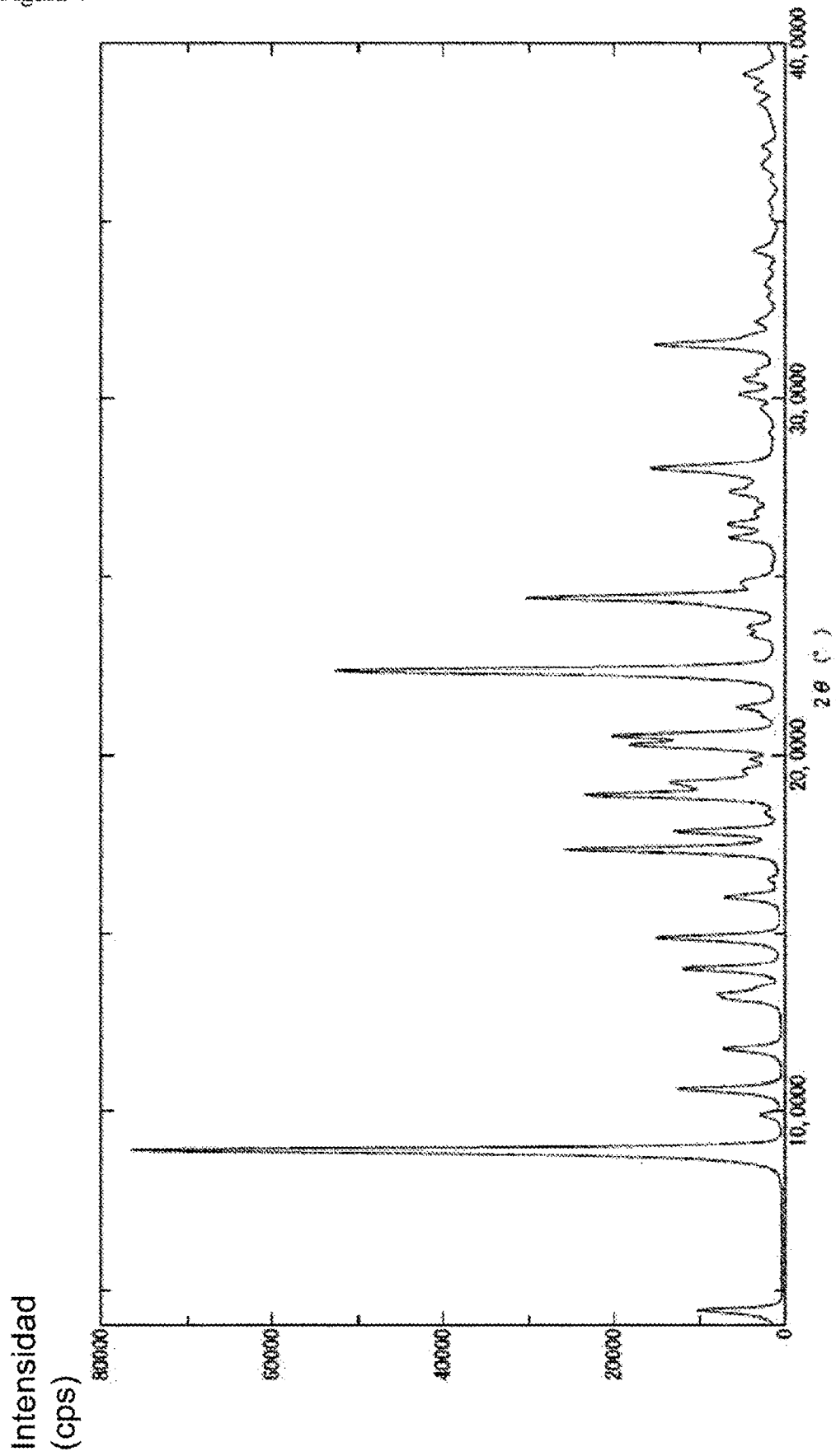


Figura 5

