

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 733**

51 Int. Cl.:

C07H 19/20 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2018** **PCT/US2018/016301**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2018** **WO18144640**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2018** **E 18747587 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024** **EP 3577124**

54 Título: **Sal de hemisulfato de nucleótidos para el tratamiento del virus de la hepatitis C**

30 Prioridad:

01.02.2017 US 201762453437 P

10.03.2017 US 201762469912 P

21.04.2017 US 201762488366 P

20.10.2017 US 201762575248 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2025

73 Titular/es:

ATEA PHARMACEUTICALS, INC. (100.00%)
225 Franklin Street, Suite 2100
Boston, MA 02110, US

72 Inventor/es:

MOUSSA, ADEL y
SOMMADOSSI, JEAN-PIERRE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 009 733 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

Sal de hemisulfato de nucleótidos para el tratamiento del virus de la hepatitis C

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud U.S. No. 62/453,437 provisional presentada el 1 de febrero de 2017; 62/469,912 presentada el 10 de marzo de 2017; 62/488,366 presentada el 21 de abril de 2017; y, 62/575,248 presentada el 20 de octubre de 2017.

Campo de la invención

La presente invención es la sal de hemisulfato de un compuesto nucleotídico seleccionado que tiene propiedades terapéuticas inesperadas para tratar un hospedero infectado con hepatitis C, así como composiciones farmacéuticas y formas de dosificación de las mismas.

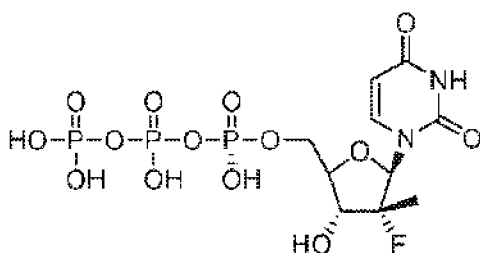
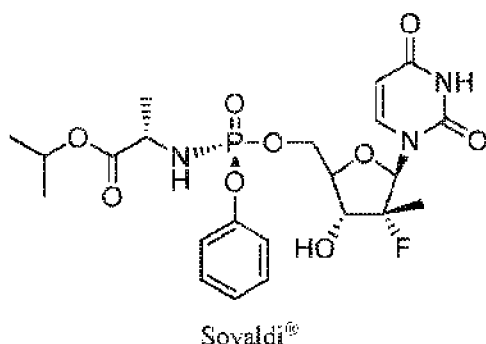
Antecedentes de la invención

La hepatitis C (HCV) es un virus de ARN de cadena sencilla y miembro del género Hepacivirus. Se estima que el 75% de todos los casos de enfermedad hepática son causados por el HCV. La infección por HCV puede provocar cirrosis y cáncer de hígado y, si se le permite progresar, insuficiencia hepática que puede requerir un trasplante de hígado. Aproximadamente 71 millones de personas en todo el mundo viven con infecciones crónicas por HCV y aproximadamente 399,000 personas mueren cada año a causa del HCV, principalmente por cirrosis y carcinoma hepatocelular.

La ARN polimerasa es una diana clave para el desarrollo de fármacos contra virus de ARN de cadena sencilla. La proteína no estructural NS5B ARN polimerasa dependiente de la ARN polimerasa del HCV, es una enzima clave responsable de iniciar y catalizar la síntesis del ARN viral. Hay dos subclases principales de inhibidores de NS5B: análogos de nucleósidos e inhibidores no nucleósidos (NNIs). Los análogos de nucleósidos se anabolizan a trifosfatos activos que actúan como sustratos alternativos para la polimerasa y los inhibidores no nucleósidos (NNIs) se unen a las regiones alostéricas en la proteína. Los inhibidores de nucleósidos o nucleótidos imitan los sustratos naturales de la polimerasa y actúan como terminadores de la cadena. Estos inhiben el inicio de la transcripción del ARN y la elongación de una cadena de ARN naciente.

Además de dirigirse a la ARN polimerasa, otras proteínas virales de ARN también pueden ser atacadas en terapias de combinación. Por ejemplo, las proteínas del HCV que son dianas adicionales para las aproximaciones terapéuticas son NS3/4A (una serina proteasa) y NS5A (una proteína no estructural que es un componente esencial de la replicasa del HCV y ejerce una variedad de efectos sobre las vías celulares).

En diciembre de 2013, el primer inhibidor de la polimerasa NS5B de nucleósido, sofosbuvir (Sovaldi®, Gilead Sciences) fue aprobado. Sovaldi® es un profármaco de fosforamidato de uridina que es absorbido por los hepatocitos y sufre una activación intracelular para producir el metabolito activo, 2'-desoxi-2'-α-fluoro-β-C-metiluridina-5'-trifosfato.



2'-Desoxi-2'-α-fluoro-β-C-metiluridina-5'-trifosfato

Sovaldi® es el primer fármaco que ha demostrado seguridad y eficacia para tratar ciertos tipos de infección por HCV sin la necesidad de la coadministración del interferón. Sovaldi® es el tercer fármaco con designación de terapia innovadora que recibe la aprobación de la FDA.

- 5 En 2014, la FDA de EE.UU aprobó Harvoni® (ledipasvir, un inhibidor de NS5A, y sofosbuvir) para tratar la infección crónica por el virus de la hepatitis C del Genotipo 1. Harvoni® es la primera píldora de combinación aprobada para tratar la infección crónica por HCV del Genotipo 1. También es el primer régimen aprobado que no requiere administración con interferón o ribavirina. Además, la FDA aprobó simeprevir (Olysio™) en combinación con sofosbuvir (Sovaldi®) como un tratamiento de una vez al día, totalmente oral, sin interferón ni ribavirina, para adultos con infección por HCV del Genotipo 1.
- 10 La FDA de EE.UU también aprobó VIEKIRA Pak™ de AbbVie en 2014, un paquete de múltiples píldoras que contenía dasabuvir (un inhibidor no nucleósido de la polimerasa NS5B), ombitasvir (un inhibidor de NS5A), paritaprevir (un inhibidor de NS3/4A) y ritonavir. El VIEKIRA Pak™ se puede utilizar con o sin la ribavirina para tratar a pacientes infectados con HCV del Genotipo 1, incluyendo pacientes con cirrosis compensada. El VIEKIRA Pak™ no requiere co-terapia con interferón.
- 15 En julio de 2015, la FDA de EE.UU aprobó Technivie™ y Daklinza™ para el tratamiento del HCV del genotipo 4 y del HCV del genotipo 3, respectivamente. Technivie™ (Ombitasvir/paritaprevir/ritonavir) fue aprobado para uso en combinación con ribavirina para el tratamiento del HCV del genotipo 4 en pacientes sin cicatrices ni cirrosis y es la primera opción para los pacientes infectados con HCV-4 que no requieren la coadministración con interferón. Daklinza™ fue aprobado para uso con Sovaldi® para tratar las infecciones del HCV del genotipo 3. Daklinza™ es el primer fármaco que ha demostrado seguridad y eficacia en el tratamiento del HCV del genotipo 3 sin la necesidad de coadministración de interferón o ribavirina.
- 20

En octubre de 2015, la FDA de EE.UU advirtió que los tratamientos para el HCV, Viekira Pak y Technivie pueden causar lesiones hepáticas graves, principalmente en pacientes con enfermedad hepática avanzada subyacente, y requirió que se agregara a la etiqueta información adicional sobre seguridad.

- 25 Otras terapias aprobadas actualmente para el HCV incluyen interferón alfa-2b o interferón alfa-2b pegilado (Pegintron®), los cuales se pueden administrar con ribavirina (Rebetol®), telaprevir de NS3/4A (Incivek®, Vertex y Johnson & Johnson), boceprevir (Victrelis™, Merck), simeprevir (Olysio™, Johnson & Johnson), paritaprevir (AbbVie), Ombitasvir (AbbVie), el NNI de Dasabuvir (ABT-333) y Zepatier™ de Merck (una combinación de un solo comprimido de los dos fármacos grazoprevir y elbasvir).
- 30 Actualmente se están desarrollando inhibidores adicionales de la polimerasa NS5B. Merck está desarrollando el profármaco de nucleótido de uridina MK-3682 (anteriormente Idenix IDX21437) y el fármaco se encuentra actualmente en ensayos de combinación de fase II.

- Las patentes de Estados Unidos y las solicitudes WO que describen inhibidores de la polimerasa de nucleósidos para el tratamiento de Flaviviridae, incluyendo HCV, incluyendo aquellas presentadas por Idenix Pharmaceuticals. (6,812,219; 6,914,054; 7,105,493; 7,138,376; 7,148,206; 7,157,441; 7,163,929; 7,169,766; 7,192,936; 7,365,057; 7,384,924; 7,456,155; 7,547,704; 7,582,618; 7,608,597; 7,608,600; 7,625,875; 7,635,689; 7,662,798; 7,824,851; 7,902,202; 7,932,240; 7,951,789; 8,193,372; 8,299,038; 8,343,937; 8,362,068; 8,507,460; 8,637,475; 8,674,085; 8,680,071; 8,691,788; 8,742,101; 8,951,985; 9,109,001; 9,243,025; US2016/0002281; US2013/0064794; WO/2015/095305; WO/2015/081133; WO/2015/061683; 35 WO/2013/177219; WO/2013/039920; WO/2014/137930; WO/2014/052638; WO/2012/154321; Merck (6,777,395; 7,105,499; 7,125,855; 7,202,224; 7,323,449; 7,339,054; 7,534,767; 7,632,821; 7,879,815; 8,071,568; 8,148,349; 8,470,834; 8,481,712; 8,541,434; 8,697,694; 8,715,638; 9,061,041; 9,156,872 y WO/2013/009737); Universidad de Emory (6,348,587; 6,911,424; 7,307,065; 7,495,006; 7,662,938; 7,772,208; 8,114,994; 8,168,583; 8,609,627; US 2014/0212382; y WO2014/1244430); Gilead Sciences/ Pharmasset Inc. (7,842,672; 7,973,013; 8,008,264; 8,012,941; 8,012,942; 8,318,682; 8,324,179; 8,415,308; 8,455,451; 8,563,530; 8,841,275; 8,853,171; 8,871,785; 8,877,733; 8,889,159; 8,906,880; 8,912,321; 8,957,045; 8,957,046; 9,045,520; 9,085,573; 9,090,642; y 9,139,604) y (6,908,924; 6,949,522; 7,094,770; 7,211,570; 7,429,572; 7,601,820; 7,638,502; 7,718,790; 7,772,208; RE42,015; 7,919,247; 7,964,580; 8,093,380; 8,114,997; 8,173,621; 8,334,270; 8,415,322; 8,481,713; 8,492,539; 8,551,973; 8,580,765; 8,618,076; 50 8,629,263; 8,633,309; 8,642,756; 8,716,262; 8,716,263; 8,735,345; 8,735,372; 8,735,569; 8,759,510 y 8,765,710); Hoffman La-Roche (6,660,721), Roche (6,784,166; 7,608,599; 7,608,601 y 8,071,567); Alios BioPharma Inc. (8,895,723; 8,877,731; 8,871,737; 8,846,896; 8,772,474; 8,980,865; 9,012,427; US 2015/0105341; US 2015/0011497; US 2010/0249068; US2012/0070411; WO 2015/054465; WO 2014/209979; WO 2014/100505; WO 2014/100498; WO 2013/142159; WO 2013/142157; WO 2013/096680; WO 55 2013/088155; WO 2010/108135), Enanta Pharmaceuticals (US 8,575,119; 8,846,638; 9,085,599; WO 2013/044030; WO 2012/125900), Biota (7,268,119; 7,285,658; 7,713,941; 8,119,607; 8,415,309; 8,501,699 y 8,802,840), Biocryst Pharmaceuticals (7,388,002; 7,429,571; 7,514,410; 7,560,434; 7,994,139; 8,133,870; 8,163,703; 8,242,085 8,440,813), Alla Chem, LLC (8,889,701 WO 2015/053662), Inhibitex (8,759,318 y WO/2012/092484), productos de Janssen (8,399,429; 8,431,588; 8,481,510; 8,552,021; 8,933,052; 9,006,29 y 60 9,012,428) the University of Georgia Foundation (6,348,587; 7,307,065; 7,662,938; 8,168,583; 8,673,926,

8,816,074; 8,921,384 y 8,946,244), RFS Pharma, LLC (8,895,531; 8,859,595; 8,815,829; 8,609,627; 7,560,550; US 2014/0066395; US 2014/0235566; US 2010/0279969; WO/2010/091386 WO 2012/158811) University College Cardiff Consultants Limited (WO/2014/076490, WO 2010/081082; WO/2008/062206), Achillion Pharmaceuticals, Inc. (WO/2014/169278 y WO 2014/169280), Cocrystal Pharma, Inc. (US 9,173,893), Katholieke Univéasesiteit Leuven (WO 2015/158913), Catabasis (WO 2013/090420) y los Regents of the University of Minnesota (WO 2006/004637).

Atea Pharmaceuticals, Inc. ha divulgado nucleótidos de purina β -D-2'-desoxi-2'- α -fluoro-2'- β -C-sustituido-2-modificado-N⁶- (mono y dimetil) para el tratamiento del HCV en la Patente U.S. No. 9,828,410 y Solicitud PCT No. WO 2016/144918. Atea también ha divulgado nucleótidos β -D-2'-desoxi-2'-sustituido-4'-sustituido-2-N⁶-sustituido-6-amino purina para el tratamiento de infecciones por paramixovirus y ortomixovirus en US 2018/0009836 y WO 2018/009623.

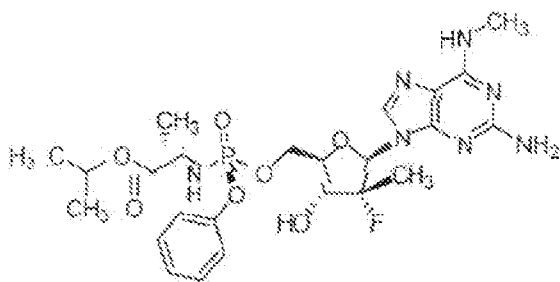
Steven S Good et al. divulgan AT-337, AT-511 y su forma de sal, AT-527: Novel Potent and Selective Pan-genotypic Purine Nucleotide Prodrug Inhibitors of HCV Polymerase en un póster presentado en The 67th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 11-15 de noviembre de 2016, Boston, MA.

Sigue existiendo una fuerte necesidad médica para desarrollar terapias anti HCV que sean seguras, eficaces y bien toleradas. La necesidad se ve acentuada por la expectativa de resistencia a los fármacos. Los antivirales de acción directa más potentes podrían acortar significativamente la duración del tratamiento y mejorar el cumplimiento y las tasas de SVR (respuesta viral sostenida) para pacientes infectados con todos los genotipos del HCV.

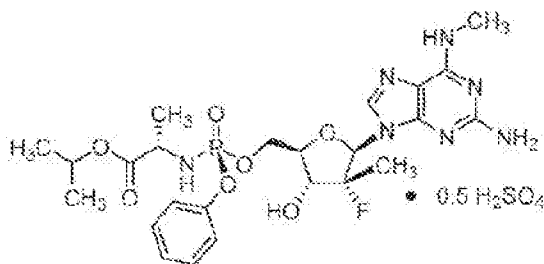
Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar compuestos, composiciones farmacéuticas, métodos y formas de dosificación para tratar y/o prevenir infecciones por HCV.

Sumario de la invención

Se ha descubierto sorprendentemente que la sal de hemisulfato del Compuesto 1, la cual se proporciona a continuación como Compuesto 2, muestra propiedades terapéuticas ventajosas inesperadas, incluyendo biodisponibilidad mejorada y selectividad de órganos diana, sobre su base libre (Compuesto 1). Estas ventajas inesperadas no se podían haber previsto de antemano. El Compuesto 2 es por lo tanto una composición terapéuticamente superior de materia para administrar en una cantidad eficaz a un hospedero con necesidad de la misma, normalmente un humano, para el tratamiento de la hepatitis C. El Compuesto 2 se denomina como la sal de hemisulfato de isopropilo((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(metilamino)-9H-purina-9-yl)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-yl)metoxi)(fenoxy)fosforil)-L-alaninato. El Compuesto 1 se divulga en la Patente U.S. No. 9,828,410.



Compuesto 1



Compuesto 2

El Compuesto 2, como el Compuesto 1, se convierte en su nucleótido trifosfato correspondiente (Compuesto 1-6) en la célula, el cual es el metabolito activo e inhibidor de la ARN polimerasa (véase el Esquema 1 a

continuación). Dado que el Compuesto 1-6 se produce en la célula y no sale de la célula, no es medible en el plasma. Sin embargo, el metabolito 5'-OH del Compuesto 1-7 (véase el Esquema 1) se exporta desde la célula y, por lo tanto, es medible en el plasma y actúa como un sustituto de la concentración del metabolito activo intracelular del Compuesto 1-6.

- 5 Se ha descubierto que la concentración plasmática *in vivo* del Compuesto 1-7 sustituto, y por tanto el Compuesto intracelular 1-6, es sustancialmente mayor cuando se administra el Compuesto 2 *in vivo* que cuando el Compuesto 1 se administra *in vivo*. En una comparación directa de perros dosificados con el Compuesto 1 y el Compuesto 2 (Ejemplo 19, Tabla 28), la dosificación con el Compuesto 2 logró un $AUC_{(0-4hrs)}$ del último metabolito (1-7) de nucleósido guanina 5'-OH que es dos veces más alta que el AUC después de la dosificación del Compuesto 1. Es inesperado que una sal no covalente tenga tal efecto en la concentración plasmática del fármaco parental (Compuesto 1).

- Adicionalmente, el Compuesto 2 se particiona selectivamente *in vivo* al hígado sobre el corazón (Ejemplo 19, Tabla 29), lo cual es benéfico dado que el hígado es el órgano enfermo en los hospederos infectados con HCV. Los perros fueron dosificados con el Compuesto 1 o el Compuesto 2 y se midió la concentración del trifosfato activo (1-6) en el hígado y el corazón. La proporción hígado a corazón de la concentración de trifosfato activo fue mayor después de la dosificación con el Compuesto 2 en comparación con el Compuesto 1 como se muestra en la Tabla 29. Específicamente, la proporción de partición hígado/corazón para el Compuesto 2 es 20 en comparación con una proporción de partición hígado/corazón de 3.1 para el Compuesto 1. Estos datos indican, inesperadamente, que la administración del Compuesto 2 da como resultado la distribución preferencial del trifosfato de guanina activo (Compuesto 1-6) en el hígado sobre el corazón cuando se compara con el Compuesto 1, lo que reduce los posibles efectos fuera de la diana. Fue inesperado que la administración del Compuesto 2 reduciría significativamente la partición no deseada fuera de la diana. Esto permite la administración del Compuesto 2 en una dosis más alta que el Compuesto 1, si así lo desea el profesional de la salud.

- Además, los niveles en tejido hepático y cardíaco del derivado activo de trifosfato de guanina del Compuesto 2 (metabolito 1-6) se midieron después de dosis orales del Compuesto 2 en ratas y monos (Ejemplo 20). Se midieron niveles elevados de trifosfato de guanina activo (1-6) en el hígado de todas las especies analizadas. Importantemente, se midieron niveles no cuantificables del trifosfato de guanina (1-6) en corazones de monos, lo que es indicativo de la formación específica en el hígado del trifosfato activo. De esta forma se descubrió que, en comparación con la dosificación del Compuesto 1, la dosificación del Compuesto 2 mejora la distribución del trifosfato de guanina (1-6).

- Cuando se administra a pacientes sanos e infectados con hepatitis C, el Compuesto 2 fue bien tolerado después de una dosis oral única y los parámetros farmacocinéticos C_{max} , T_{max} y AUC_{tot} fueron comparables en ambos grupos (Tablas 34 y 35). Como se describe en el Ejemplo 24, una dosis única del Compuesto 2 en pacientes infectados con HCV resultó en una actividad antiviral significativa. La exposición plasmática del metabolito 1-7 fue en su mayoría proporcional a la dosis en el intervalo estudiado.

- Los análisis farmacocinéticos/farmacodinámicos individuales de pacientes dosificados con el Compuesto 2 demostraron que la respuesta viral se correlacionaba con la exposición plasmática del metabolito 1-7 del Compuesto 2 (Ejemplo 24, Figuras. 23A-23F), lo que indica que se pueden lograr respuestas viales profundas con dosis sólidas del Compuesto 2.

El Ejemplo 24 confirma que, como realizaciones no limitantes, dosis orales únicas de 300 mg, 400 mg y 600 mg dan como resultado una actividad antiviral significativa en humanos. La concentración plasmática mínima C_{24} del metabolito 1-7 después de una dosis de 600 mg del Compuesto 2 duplicado de la concentración plasmática mínima C_{24} del metabolito 1-7 después de una dosis de 300 mg del Compuesto 2.

- La Figura 24 y el Ejemplo 25 resaltan la sorprendente invención proporcionada por el Compuesto 2 para el tratamiento de la hepatitis C. Como se muestra en la Figura 24, los niveles plasmáticos mínimos en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 después de la dosificación del Compuesto 2 en humanos (600 mg QD (equivalente de base libre de 550 mg) y 450 mg QD (equivalente de base libre de 400 mg)) se predijo y se comparó con la EC_{95} del Compuesto 1 *in vitro* a lo largo de una variedad de aislados clínicos del HCV para determinar si la concentración plasmática en estado estacionario es consistentemente más alta que la EC_{95} , lo que daría como resultado una alta eficacia contra múltiples aislados clínicos *in vivo*. La EC_{95} para el Compuesto 1 es la misma que la EC_{95} del Compuesto 2. Para que el Compuesto 2 sea eficaz, el nivel plasmático mínimo en estado estacionario del metabolito 1-7 debe superar a la EC_{95} .

- Como se muestra en la Figura 24, la EC_{95} del Compuesto 2 contra todos los aislados clínicos probados varió de aproximadamente 18 nM a 24 nM.

Como se muestra en la Figura 24, el Compuesto 2 en una dosis de 450 mg QD (equivalente de base libre de 400 mg) en humanos proporciona una concentración plasmática mínima en estado estacionario prevista ($C_{24,ss}$) de aproximadamente 40 ng/mL. El Compuesto 2 en una dosis de 600 mg QD (equivalente de base libre de 550

mg) en humanos proporciona una concentración plasmática mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) prevista de aproximadamente 50 ng/mL.

Por lo tanto, la concentración plasmática en estado estacionario prevista del metabolito 1-7 sustituto es casi el doble de la EC_{95} contra todos los aislados clínicos probados (incluso el difícil de tratar GT3a), lo cual indica un desempeño superior.

Por el contrario, la EC_{95} del nucleótido estándar de atención sofosbuvir (Sovaldi) varía de 50 nM a 265 nM en todos los aislados clínicos del HCV analizados, con una EC_{95} menor que la concentración en estado estacionario prevista en la dosis comercial de 400 mg para solamente dos aislados, GT2a y GT2b. La EC_{95} para la dosis comercial de 400 mg de sofosbuvir es mayor que la concentración en estado estacionario prevista para otros aislados clínicos, GT1a, GT1b, GT3a, GT4a y GT4d.

Los datos que comparan la eficacia y los parámetros farmacocinéticos del estado estacionario en la Figura 24 demuestran claramente la importancia terapéutica inesperada del Compuesto 2 para el tratamiento de la hepatitis C. De hecho, se prevé que el nivel plasmático del estado estacionario previsto ($C_{24,ss}$) después de la administración del Compuesto 2 sea al menos dos veces mayor que la EC_{95} para todos los genotipos probados, y es de 3 a 5 veces más potente contra GT2. Estos datos indican que el Compuesto 2 tiene una potente actividad antiviral pangenotípica en humanos. Como se muestra en la Figura 24, la EC_{95} de sofosbuvir contra GT1, GT3 y GT4 es mayor a 100 ng/mL. Así que, sorprendentemente, el Compuesto 2 es activo contra el HCV en una forma de dosificación que administra una concentración mínima en estado estacionario más baja (40-50 ng/mL) que la concentración mínima en estado estacionario más (aproximadamente 100 ng/mL) alcanzada por la forma de dosificación equivalente de sofosbuvir.

En una realización, por lo tanto, la invención incluye una forma de dosificación del Compuesto 2 que proporciona una concentración mínima plasmática en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 entre aproximadamente 15-75 ng/mL, por ejemplo, 20-60 ng/mL, 25-50 ng/mL, 40-60 ng/mL o incluso 40-50 ng/mL. Esto es inesperado teniendo en cuenta que la concentración en estado estacionario del metabolito equivalente de sofosbuvir es de aproximadamente 100 ng/mL.

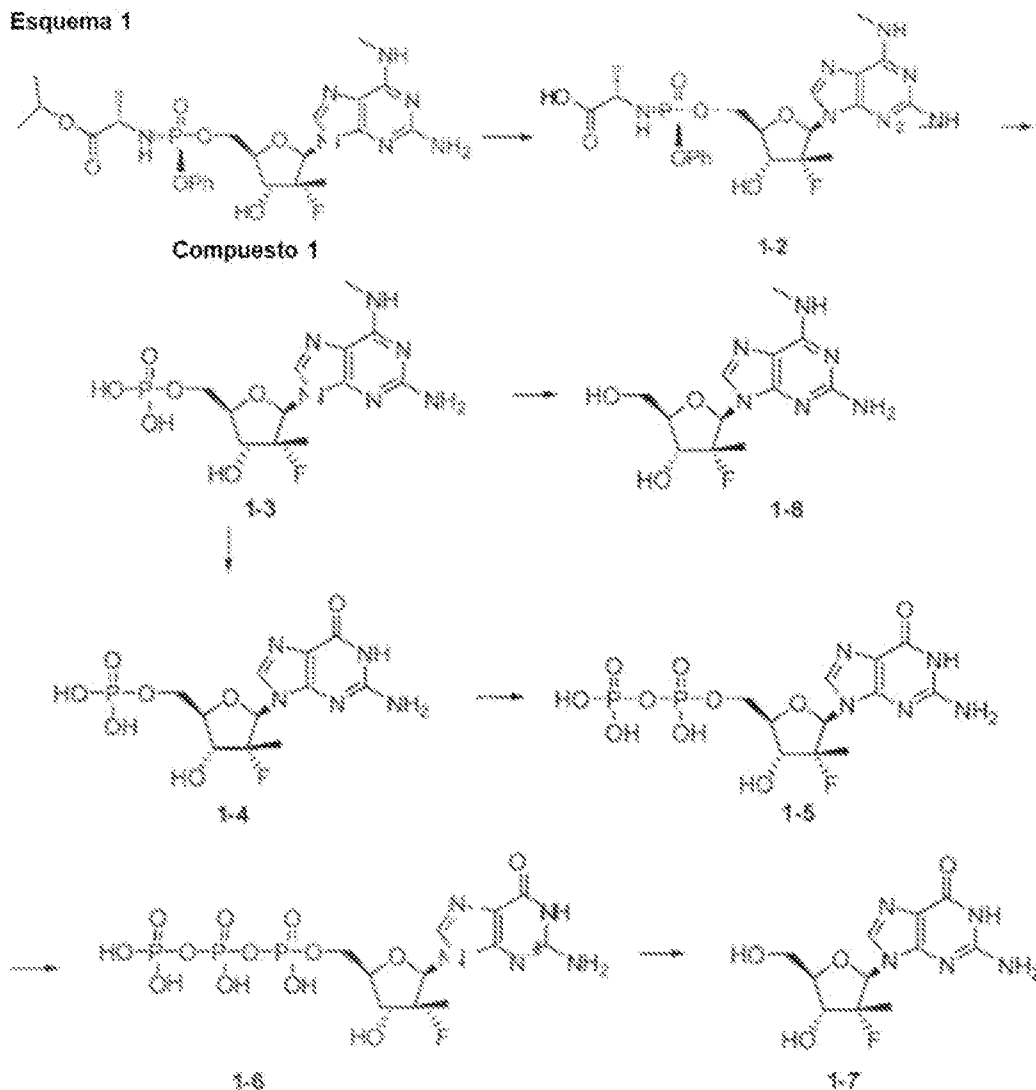
Además, se ha descubierto que el Compuesto 2 es una sal inusualmente estable, altamente soluble y no higroscópica con actividad contra HCV. Esto es sorprendente porque diversas sales del Compuesto 1 distintas de la sal de hemisulfato (Compuesto 2), incluyendo la sal de monosulfato (Compuesto 3), no son físicamente estables, sino que se delicuescen o se convierten en sólidos gomosos (Ejemplo 4), y por lo tanto no son adecuadas para formas de dosificación farmacéuticas sólidas estables. Sorprendentemente, mientras que el Compuesto 2 no se vuelve gomoso, es hasta 43 veces más soluble en agua en comparación con el Compuesto 1 y es 6 veces más soluble que el Compuesto 1 bajo condiciones de fluido gástrico simulado (SGF) (Ejemplo 15).

Como se discutió en el Ejemplo 16, el Compuesto 2 permanece como un sólido blanco con un IR que corresponde al estándar de referencia durante 6 meses bajo condiciones de estabilidad acelerada (40 °C/RH al 75%). El Compuesto 2 es estable durante 9 meses en condiciones ambientales (25 °C/RH al 60%) y en condiciones de refrigerador (5 °C).

Las formas de dosificación sólidas (comprimidos de 50 mg y 100 mg) del Compuesto 2 también son químicamente estables bajo condiciones aceleradas (40 °C/RH al 75%) y de refrigeración (5 °C) durante 6 meses (Ejemplo 26). El Compuesto 2 es estable bajo condiciones ambientales (25 °C/RH al 60%) en una forma de dosificación sólida durante al menos 9 meses.

El esquema 1 proporciona la vía metabólica del Compuesto 1 y el Compuesto 2, que implica la desesterificación inicial del fosforamidato (metabolito 1-1) para formar el metabolito 1-2. Posteriormente el metabolito 1-2 se convierte en el derivado de N^6 -metilo-2,6-diaminopurina-5'-monofosfato (metabolito 1-3), el cual a su vez se metaboliza al nucleósido libre 5'-hidroxi- N^6 -metilo-2,6-diaminopurina (metabolito 1-8) y ((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metilo dihidrogeno fosfato como el 5'-monofosfato (metabolito 1-4). El metabolito 1-4 se anaboliza al difosfato correspondiente (metabolito 1-5) y posteriormente el derivado activo del trifosfato (metabolito 1-6). El 5'-trifosfato se puede metabolizar adicionalmente para generar 2-amino-9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-il)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona (1-7). El metabolito 1-7 se puede medir en el plasma y, por lo tanto, es un sustituto del trifosfato activo (1-6), el cual no es medible en el plasma.

Esquema 1



En una realización, la invención es el Compuesto 2 para uso en el tratamiento de la hepatitis C (HCV) en un hospedero con necesidad del mismo, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, el Compuesto 2 se utiliza como un sólido amorfo. En otro aspecto, el Compuesto 2 se utiliza como un sólido cristalino.

En la presente memoria se describe, pero no se reivindica, un proceso para la preparación del Compuesto 2 que incluye

- (i) un primer paso de disolución del Compuesto 1 en un disolvente orgánico, por ejemplo, acetona, acetato de etilo, metanol, acetonitrilo o éter, o similares, en un matraz o recipiente;
- (ii) cargar un segundo matraz o recipiente con un segundo disolvente orgánico, el cual puede ser el mismo o diferente del disolvente orgánico del paso (i), opcionalmente enfriar el segundo disolvente a 0-10 grados C y agregar gota a gota H_2SO_4 al segundo disolvente orgánico para crear una mezcla de H_2SO_4 /disolvente orgánico; y en el que el disolvente puede ser, por ejemplo, metanol;
- (iii) añadiendo gota a gota la mezcla de H_2SO_4 /disolvente en una proporción molar de 0.5/1.0 del paso (ii) a la solución del Compuesto 1 del paso (i) a temperatura ambiente o a temperatura ligeramente aumentada o disminuida (por ejemplo 23-35 grados C);
- (iv) agitar la reacción del paso (iii) hasta que se forme el precipitado del Compuesto 2, por ejemplo, a temperatura ambiente o a temperatura ligeramente aumentada o disminuida;
- (v) filtrar opcionalmente el precipitado resultante del paso (iv) y lavar con un disolvente orgánico; y

(vi) opcionalmente secar el Compuesto 2 resultante en vacío, opcionalmente a una temperatura elevada, por ejemplo, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 °C.

En una realización, el disolvente orgánico en el paso (i) es 3-metil-2-pentanona. En una realización, el disolvente orgánico en el paso (i) es etil isopropil cetona. En una realización, el disolvente orgánico en el paso (i) es propionato de metilo. En una realización, el disolvente orgánico en el paso (i) es butirato de etilo.

A pesar del volumen de literatura sobre nucleósidos antivirales y solicitudes de patentes, el Compuesto 2 no se ha divulgado específicamente. En consecuencia, la presente invención incluye el Compuesto 2, o una composición farmacéuticamente aceptable o forma de dosificación del mismo, como se describe en la presente memoria.

Se proporcionan compuestos, métodos, formas de dosificación y composiciones para el tratamiento de un hospedero infectado con un virus del HCV mediante la administración de una cantidad eficaz del Compuesto 2. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra en una dosis de al menos alrededor de 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 mg. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra durante un máximo de 12 semanas, durante un máximo de 10 semanas, durante un máximo de 8 semanas, durante un máximo de 6 semanas o durante un máximo de 4 semanas. En realizaciones alternativas, el Compuesto 2 se administra durante al menos 4 semanas, durante al menos 6 semanas, durante al menos 8 semanas, durante al menos 10 semanas o durante al menos 12 semanas. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día o cada dos días. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que alcanza un nivel plasmático mínimo en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 de entre aproximadamente 15-75 ng/mL. En una realización, el Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que alcanza un nivel plasmático mínimo en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 de entre aproximadamente 20-60 ng/mL. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que alcanza un AUC del metabolito 1-7 de entre aproximadamente 1,200 ng*h/mL y 3,000 ng*h/mL. En una realización, el Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que alcanza un AUC del metabolito 1-7 de entre aproximadamente 1,500 y 2,100 ng*h/mL.

Los compuestos, composiciones y formas de dosificación también se pueden utilizar para tratar afecciones relacionadas, tales como afecciones positivas para anticuerpos anti HCV y positivas para antígenos, inflamación hepática crónica de origen viral, cáncer de hígado resultante de la hepatitis C avanzada (carcinoma hepatocelular (HCC)), cirrosis, hepatitis C crónica o aguda, hepatitis C fulminante, hepatitis C crónica persistente y fatiga basada en anti HCV. El compuesto o las formulaciones que incluyen los compuestos también se pueden utilizar de manera profiláctica para prevenir o restringir la progresión de la enfermedad clínica en individuos que son positivos para los anticuerpos o antígenos anti HCV o que han estado expuestos a la hepatitis C.

Por lo tanto, la presente invención incluye las siguientes características:

(a) El Compuesto 2 como se describe en la presente memoria;

(b) Los profármacos del Compuesto 2 (los profármacos que no son de acuerdo con la presente invención)

(c) El uso del Compuesto 2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C;

(d) El Compuesto 2 para uso en el tratamiento de la hepatitis C, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable;

(e) Un método para fabricar un medicamento destinado para al uso terapéutico para el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C, caracterizado porque el Compuesto 2, o una sal farmacéuticamente aceptable, como se describe en la presente memoria, se utiliza en la fabricación;

(f) Una formulación farmacéutica que comprende una cantidad eficaz para el tratamiento del hospedero del Compuesto 2 con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable;

(g) Los procesos para la preparación de productos terapéuticos que contengan una cantidad eficaz del Compuesto 2;

(h) Formas de dosificación sólidas, incluyendo aquellas que proporcionan un perfil farmacocinético ventajoso; y

(i) Los procesos para la fabricación del Compuesto 2, como se describen en la presente memoria, pero no se reivindican.

Descripción breve de las figuras

La Figura 1A es una superposición de difractogramas de XRPD de las muestras 1-1 (Compuesto 1 amorfo), 1-2 (Compuesto 1 cristalino), y 1-3 (Compuesto 2 amorfo) antes de los estudios de estabilidad con propósitos de caracterización como se describe en el Ejemplo 2 y el Ejemplo 5. El eje x es 2Theta medido en grados y el eje y es la intensidad medida en conteos.

- 5 La Figura 1B es la cromatografía de HPLC del Compuesto 1 amorfo (muestra 1-1) para determinar la pureza como se describe en el Ejemplo 2. La pureza de la muestra fue del 98.7%. El eje x es el tiempo medido en minutos y el eje y es la intensidad medida en conteos.

- 10 La Figura 2A es la cromatografía de HPLC del Compuesto 1 cristalino (muestra 1-2) para determinar la pureza como se describe en el Ejemplo 2. La pureza de la muestra fue del 99.11%. El eje x es el tiempo medido en minutos y el eje y es la intensidad medida en conteos.

La Figura 2B es una gráfica de DSC y TGA del Compuesto 1 cristalino (muestra 1-2) antes de cualquier estudio de estabilidad con propósitos de caracterización como se describe en el Ejemplo 2. El eje x es la temperatura medida en °C, el eje y izquierdo es el flujo de calor medido en (W/g) y el eje y derecho es el peso medido en porcentaje.

- 15 La Figura 3 es una imagen de cristalografía de rayos X del Compuesto 1 mostrando la estereoquímica absoluta como se describe en el Ejemplo 2.

- 20 La Figura 4A es una superposición de difractogramas de XRPD de las muestras 1-1 (Compuesto 1 amorfo), 1-2 (Compuesto 1 cristalino), y 1-3 (Compuesto 2 amorfo) después de almacenarlas a 25 °C y humedad relativa al 60% durante 14 días como se describe en el Ejemplo 2. El eje x es 2Theta medido en grados y el eje y es la intensidad medida en conteos.

La Figura 4B es una superposición de difractogramas de XRPD de las muestras 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 y 1-9 después de almacenarlas a 25 °C y humedad relativa al 60% durante 7 días como se describe en el Ejemplo 4. El eje x es 2Theta medido en grados y el eje y es la intensidad medida en conteos.

- 25 La Figura 5A es una superposición de difractogramas de XRPD de las muestras 1-4, 1-6, 1-7 y 1-9 después de almacenarlas a 25 °C y humedad relativa al 60% durante 14 días como se describe en el Ejemplo 4. El eje x es 2Theta medido en grados y el eje y es la intensidad medida en conteos.

La Figura 5B es el patrón de XRPD del Compuesto 2 amorfo (muestra 1-3) como se describe en el Ejemplo 5. El eje x es 2Theta medido en grados y el eje y es la intensidad medida en conteos.

- 30 La Figura 6A es la cromatografía de HPLC del Compuesto 2 amorfo (muestra 1-3) para determinar la pureza como se describe en el Ejemplo 5. La pureza de la muestra fue del 99.6%. El eje x es el tiempo medido en minutos y el eje y es la intensidad medida en conteos.

- 35 La Figura 6B es una gráfica de DSC y TGA para un Compuesto 2 amorfo (muestra 1-3) antes de cualquier estudio de estabilidad con propósitos de caracterización como se describe en el Ejemplo 5. El eje x es la temperatura medida en °C, el eje y izquierdo es el flujo de calor medido en (W/g), y el eje y derecho es el peso medido en porcentaje.

La Figura 7A es una superposición de difractogramas de XRPD de las muestras cristalinas (muestras 2-2, 2-6 y 2-7) y muestras pobremente cristalinas (muestras 2-3, 2-4, 2-5 y 2-8) identificadas a partir de las cristalizaciones del Compuesto 2 (Ejemplo 6). El eje x es 2Theta medido en grados y la intensidad del eje y medida en conteos.

- 40 La Figura 7B es una superposición de difractogramas de XRPD de las muestras amorfas (muestras 2-9, 2-10 y 2-11) identificadas a partir de las cristalizaciones del Compuesto 2 (Ejemplo 6). El eje x es 2Theta medido en grados y la intensidad del eje y medida en conteos.

- 45 La Figura 8A es una superposición de difractogramas de XRPD de las muestras (muestras 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7 y 2-8) después de 6 días de almacenamiento a 25 °C y humedad relativa al 60% (Ejemplo 6). El eje x es 2Theta medido en grados y la intensidad del eje y medida en conteos.

La Figura 8B es una gráfica de DSC y TGA para la muestra 2-2 (Ejemplo 6). El eje x es la temperatura medida en °C, el eje y izquierdo es el flujo de calor medido en (W/g) y el eje y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se proporcionan en el Ejemplo 2.

- 50 La Figura 9A es una gráfica de DSC y TGA para la muestra 2-3 (Ejemplo 6). El eje x es la temperatura medida en °C, el eje y izquierdo es el flujo de calor medido en (W/g) y el eje y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se proporcionan en el Ejemplo 2.

- La Figura 9B es una gráfica de DSC y TGA para la muestra 2-4 (Ejemplo 6). El eje x es la temperatura medida en °C, el eje y izquierdo es el flujo de calor medido en (W/g) y el eje y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se proporcionan en el Ejemplo 2.
- 5 La Figura 10A es una gráfica de DSC y TGA para la muestra 2-5 (Ejemplo 6). El eje x es la temperatura medida en °C, el eje y izquierdo es el flujo de calor medido en (W/g) y el eje y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se proporcionan en el Ejemplo 2.
- La Figura 10B es una gráfica de DSC y TGA para la muestra 2-6 (Ejemplo 6). El eje x es la temperatura medida en °C, el eje y izquierdo es el flujo de calor medido en (W/g) y el eje y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se proporcionan en el Ejemplo 2.
- 10 La Figura 11A es una gráfica de DSC y TGA para la muestra 2-7 (Ejemplo 6). El eje x es la temperatura medida en °C, el eje y izquierdo es el flujo de calor medido en (W/g) y el eje y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se proporcionan en el Ejemplo 2.
- 15 La Figura 11B es una gráfica de DSC y TGA para la muestra 2-8 (Ejemplo 6). El eje x es la temperatura medida en °C, el eje y izquierdo es el flujo de calor medido en (W/g) y el eje y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se proporcionan en el Ejemplo 2.
- La Figura 12A es el patrón de XRPD del Compuesto 4 amorfo (muestra 3-12) como se discute en el Ejemplo 7. El eje x es 2Theta medido en grados y el eje y es la intensidad medida en conteos. No se observó cristalización de una sal malonato independientemente del disolvente utilizado.
- 20 La Figura 12B es una superposición de difractogramas de XRPD de las muestras amorfas (muestras 3-6, 3-10, 3-11 y 3-12) identificadas a partir del intento de cristalización del compuesto 1 con sal de malonato (Ejemplo 7). El eje x es 2Theta medido en grados y el eje y es la intensidad medida en conteos.
- La Figura 13A es el cromatograma de HPLC de la muestra 3-12 de los intentos de cristalización del compuesto 1 con sal malonato como se describe en el Ejemplo 7. La muestra tenía una pureza del 99.2%. El eje x es el tiempo medido en minutos y el eje y es la intensidad medida en mAu.
- 25 La Figura 13B es una superposición de difractogramas de XRPD de las muestras sólidas obtenidas de la cristalización utilizando LAG (muestras 4-13, 4-12, 4-9, 4-3 y 4-1) en comparación con el Compuesto 1 (muestra 1-2) como se describe en el Ejemplo 8. Todos los XRPD coinciden con los patrones del contraión ácido cristalino sin picos adicionales. El eje x es 2Theta medido en grados y el eje y es la intensidad medida en conteos.
- 30 La Figura 14A es una superposición de difractogramas de XRPD de las muestras obtenidas de utilizar acetato de etilo como disolvente de cristalización (muestras 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-8, 6-7, 6-6, 6-5, 6-4 y 6-2) en comparación con el Compuesto 1 cristalino (muestra 1-2) como se describe en el Ejemplo 10. En general, se encontró que los patrones de XRPD coincidían con el patrón del Compuesto 1, con la excepción de las muestras 6-2, 6-4 y 6-5 que muestran ligeras diferencias. El eje x es 2Theta medido en grados y el eje y es la intensidad medida en conteos.
- 35 La Figura 14B es una superposición del difractograma de XRPD de la muestra 5-1 después de una segunda disolución en MEK y la adición del anti disolvente ciclohexano y ácido pamoico como se describe en el Ejemplo 9. La muestra 5-1, cristalizada en ácido pamoico, era un sólido después de la maduración, pero el patrón de XRPD coincidió con el patrón del ácido pamoico.
- 40 La Figura 15A es una superposición de difractogramas de XRPD de las muestras obtenidas de utilizar acetato de etilo como disolvente de cristalización (muestras 6-5, 6-4 y 6-2) en comparación con el Compuesto 1 cristalino (muestra 1-2) como se describe en el Ejemplo 10. En general, se encontró que los patrones de XRPD coincidían con el patrón del Compuesto 1 con excepción de las muestras 6-2, 6-4 y 6-5 que muestran ligeras diferencias. El eje x es 2Theta medido en grados y el eje y es la intensidad medida en conteos y etiquetada con el ácido utilizado en la cristalización.
- 45 La Figura 15B es el patrón de XRPD para el Compuesto 2 como se describe en el Ejemplo 14. El eje x es 2Theta medido en grados y el eje y es la intensidad medida en conteos.
- La Figura 16A es una gráfica de los niveles de concentración del TP activo (metabolito 1-6) en los hígados y corazones de ratas, perros y monos (Ejemplo 18). El eje x es la dosis medida en mg/kg para cada especie y el eje y es la concentración del TP activo medida en ng/g.
- 50 La Figura 16B es una gráfica de los niveles de concentración del TP activo (metabolito 1-6) en el hígado y el corazón de perros (n = 2) medidos 4 horas después de una dosis oral única del Compuesto 1 o el Compuesto 2 (Ejemplo 19). El eje x es la dosis de cada compuesto medida en mg/kg y el eje y es la concentración del TP activo medida en ng/g.

La Figura 17 es el perfil plasmático del Compuesto 1 y el metabolito 1-7 en ratas a las que se les administró una dosis oral única de 500 mg/kg del Compuesto 2 (Ejemplo 20) medido 72 horas después de la dosis. El eje x es el tiempo medido en horas y el eje y es la concentración plasmática medida en ng/mL.

5 La Figura 18 es el perfil plasmático del Compuesto 1 y el metabolito 1-7 en monos a los que se les administraron dosis orales únicas de 30 mg, 100 mg o 300 mg del Compuesto 2 (Ejemplo 20) medido 72 horas después de la dosis. El eje x es el tiempo medido en horas y el eje y es la concentración plasmática medida en ng/mL.

La Figura 19 es una gráfica de EC₉₅ medida en nM de sofosbuvir y del Compuesto 1 contra aislados clínicos del HCV. Los valores de EC₉₅ para el Compuesto 1 son 7-33 veces inferiores a los de sofosbuvir (Ejemplo 22). El eje x está marcado con el genotipo y el eje y es EC₉₅ medida en nM.

10 La Figura 20 es una gráfica de EC₉₅ medida en nM de sofosbuvir y del Compuesto 1 contra cepas de laboratorio de los Genotipos 1a, 1b, 2a, 3a, 4a y 5a del HCV. El Compuesto 1 es aproximadamente 6-11 veces más potente que sofosbuvir en los Genotipos 1-5 (Ejemplo 22). El eje x está marcado con el genotipo y el eje y es EC₅₀ medida en nM.

15 La Figura 21 es una gráfica del perfil de concentración plasmática media-tiempo del Compuesto 1 después de la administración de una dosis única del Compuesto 2 en todas las cohortes de la Parte B del estudio como se describe en el Ejemplo 24. El Compuesto 1 se absorbió y metabolizó rápidamente dentro de aproximadamente 8 horas en todas las cohortes de la Parte B. El eje x es el tiempo medido en horas y el eje y es la concentración plasmática media geométrica medida en ng/mL.

20 La Figura 22 es una gráfica del perfil de concentración plasmática media-tiempo del metabolito 1-7 después de la administración de una dosis única del Compuesto 2 en todas las cohortes de la Parte B del estudio como se describe en el Ejemplo 24. El metabolito 1-7 mostró una concentración plasmática sostenida en todas las cohortes de la Parte B. El eje x es el tiempo medido en horas y el eje y es la concentración plasmática media geométrica medida en ng/mL.

25 La Figura 23A es un análisis farmacocinético/farmacodinámico individual de un sujeto inscrito en la cohorte 1b como se describe en el Ejemplo 24. La gráfica muestra la exposición del metabolito 1-7 plasmático y los niveles de reducción del ARN del HCV. La línea discontinua representa la concentración mínima del metabolito 1-7 necesaria para mantener una respuesta viral mayor que el valor de EC₉₅ frente a GT1b. El eje x es el tiempo medido en horas. El eje y izquierdo es la concentración plasmática del metabolito 1-7 medida en ng/mL y el eje y derecho es la reducción del ARN del HCV medido en log₁₀ IU/mL.

30 La Figura 23B un análisis farmacocinético/farmacodinámico individual de un sujeto inscrito en la cohorte 1b como se describe en el Ejemplo 24. La gráfica muestra la exposición del metabolito 1-7 plasmático y los niveles de reducción del ARN del HCV. La línea discontinua representa la concentración mínima del metabolito 1-7 necesaria para mantener una respuesta viral mayor que el valor de EC₉₅ frente a GT1b. El eje x es el tiempo medido en horas. El eje y izquierdo es la concentración plasmática del metabolito 1-7 medida en ng/mL y el eje y derecho es la reducción del ARN del HCV medido en log₁₀ IU/mL.

40 La Figura 23C es un análisis farmacocinético/farmacodinámico individual de un sujeto inscrito en la cohorte 1b como se describe en el Ejemplo 24. La gráfica muestra la exposición del metabolito 1-7 plasmático y los niveles de reducción del ARN del HCV. La línea discontinua representa la concentración mínima del metabolito 1-7 necesaria para mantener una respuesta viral mayor que el valor de EC₉₅ frente a GT1b. El eje x es el tiempo medido en horas. El eje y izquierdo es la concentración plasmática del metabolito 1-7 medida en ng/mL y el eje y derecho es la reducción del ARN del HCV medido en log₁₀ IU/mL.

45 La Figura 23D es análisis farmacocinético/farmacodinámico individual de un sujeto inscrito en la cohorte 3b como se describe en el Ejemplo 24. Cada gráfica muestra la exposición del metabolito 1-7 plasmático y los niveles de reducción del ARN del HCV. La línea discontinua representa la concentración mínima del metabolito 1-7 necesaria para mantener una respuesta viral mayor que el valor de EC₉₅ frente a GT1b. El eje x es el tiempo medido en horas. El eje y izquierdo es la concentración plasmática del metabolito 1-7 medida en ng/mL y el eje y derecho es la reducción del ARN del HCV medido en log₁₀ IU/mL.

50 La Figura 23E es un análisis farmacocinético/farmacodinámico individual de un sujeto inscrito en la cohorte 3b como se describe en el Ejemplo 24. Cada gráfica muestra la exposición del metabolito 1-7 plasmático y los niveles de reducción del ARN del HCV. La línea discontinua representa la concentración mínima del metabolito 1-7 necesaria para mantener una respuesta viral mayor que el valor de EC₉₅ frente a GT1b. El eje x es el tiempo medido en horas. El eje y izquierdo es la concentración plasmática del metabolito 1-7 medida en ng/mL y el eje y derecho es la reducción del ARN del HCV medido en log₁₀ IU/mL.

55 La Figura 23F es un análisis farmacocinético/farmacodinámico individual de un sujeto inscrito en la cohorte 3b como se describe en el Ejemplo 24. Cada gráfica muestra la exposición del metabolito 1-7 plasmático y los niveles de reducción del ARN del HCV. La línea discontinua representa la concentración mínima de metabolito 1-7 necesaria para mantener una respuesta viral mayor que el valor de EC₉₅ frente a GT1b. El eje x es el tiempo

medido en horas. El eje y izquierdo es la concentración plasmática del metabolito 1-7 medida en ng/mL y el eje y derecho es la reducción del ARN del HCV medido en \log_{10} IU/mL.

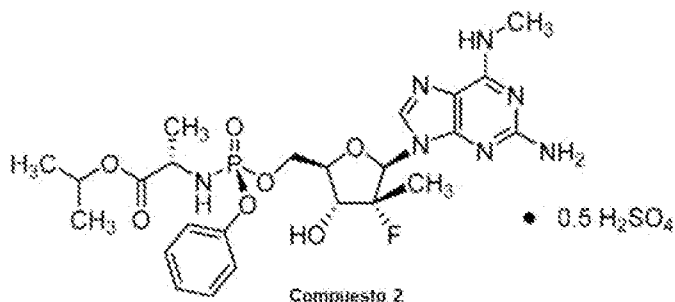
La Figura 24 es una gráfica de los valores de EC_{95} del Compuesto 1 y sofosbuvir contra aislados clínicos de pacientes infectados con GT1, GT2, GT3 y GT4 del HCV. La línea horizontal discontinua (---) representa la concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) de nucleósido de sofosbuvir después de una dosis de 400 mg QD de sofosbuvir. La línea horizontal completa (—) representa la concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 después de 600 mg del Compuesto 2 (equivalente a 550 mg del Compuesto 1). La línea horizontal punteada (-----) representa la concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 después de 450 mg de Compuesto 2 (equivalente a 400 mg del Compuesto 1). Como se discute en el Ejemplo 25, el nivel plasmático mínimo en estado estacionario previsto ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 después de 600 mg y 450 mg del Compuesto 2 excede la EC_{95} *in vitro* del Compuesto 1 contra todos los aislados clínicos probados. El nivel plasmático mínimo en estado estacionario ($C_{24,ss}$) de sofosbuvir sólo supera la EC_{95} en aislados clínicos de GT2. El eje x está etiquetado con los aislados clínicos y la tabla debajo del eje x enlista los valores de EC_{95} para el Compuesto 1 y sofosbuvir. El eje y es la EC_{95} frente los aislados clínicos medidos en ng/mL. La EC_{95} se expresa como equivalente del nucleósido. El sofosbuvir y Compuesto 2 se administraron diariamente (QD).

La Figura 25 es un diagrama de flujo que muestra el proceso de fabricación de comprimidos de 50 mg y 100 mg del Compuesto 2 como se describe en el Ejemplo 26. En el paso 1, celulosa microcristalina, Compuesto 2, lactosa monohidrato y croscarmelosa de sodio se filtran a través de un tamiz de 600 μ m. En el paso 2, el contenido del paso 1 se carga en una licuadora en V y se mezcla durante 5 minutos a 25 rpm. En el paso 3, el estearato de magnesio se filtra a través de un tamiz de 600 μ m. En el paso 4, se carga estearato de magnesio en la licuadora en V que contiene el contenido del paso 2 (celulosa microcristalina, Compuesto 2, lactosa monohidrato y croscarmelosa de sodio) y se mezclaron durante 2 minutos a 25 rpm. La mezcla común se divide posteriormente para la producción de comprimidos de 50 mg y comprimidos de 100 mg. Para producir comprimidos de 50 mg, la mezcla del paso 4 se comprime con una herramienta cóncava estándar redonda de 6 mm. Para producir comprimidos de 100 mg, la mezcla del paso 4 se comprime con una herramienta cóncava estándar redonda de 8 mm. Posteriormente, los comprimidos se empaquetan en frascos HDPE sellados por inducción con tapas de PP con desecante.

La Figura 26 es la sal de hemisulfato que muestra propiedades farmacológicas ventajosas sobre su base libre correspondiente para el tratamiento de un virus del HCV.

Descripción detallada de la invención

La invención divulgada en la presente memoria es un compuesto, una composición y una forma de dosificación sólida para el tratamiento de infecciones o exposición a humanos y otros animales hospederos del virus del HCV que incluye la administración de una cantidad eficaz de la sal de hemisulfato de isopropilo(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-(metilamino)-9*H*-purina-9-yl)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)-*L*-alaninato (Compuesto 2) como se describe en la presente memoria, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, el Compuesto 2 es un sólido amorfo. En aún otra realización, el Compuesto 2 es un sólido cristalino.



El compuesto, las composiciones y las formas de dosificación también se pueden utilizar para tratar afecciones relacionadas con la exposición al virus del HCV o que se producen como resultado de ella. Por ejemplo, el compuesto activo se puede utilizar para tratar afecciones con anticuerpos de HCV positivos y antígenos de HCV positivos, inflamación hepática crónica de origen viral, cáncer de hígado resultante de la hepatitis C avanzada (por ejemplo, carcinoma hepatocelular), cirrosis, hepatitis C aguda, hepatitis C fulminante, hepatitis C persistente crónica y fatiga basada en anticuerpos anti HCV.

Los compuestos y las composiciones activas también se pueden utilizar para tratar la variedad de genotipos del HCV. Se han identificado a nivel mundial al menos seis genotipos distintos del HCV, cada uno de los cuales tiene múltiples subtipos. Los Genotipos 1-3 prevalecen en todo el mundo y los Genotipos 4, 5 y 6 están más limitados geográficamente. El Genotipo 4 es común en el Oriente Medio y África. El Genotipo 5 se encuentra

principalmente en Sudáfrica. El Genotipo 6 existe predominantemente en el sudeste asiático. Aunque el genotipo más común en los Estados Unidos es el Genotipo 1, definir el genotipo y el subtipo puede ayudar en el tipo y la duración del tratamiento. Por ejemplo, diferentes genotipos responden de manera diferente a diferentes medicamentos y los tiempos de tratamiento óptimos varían dependiendo del genotipo de la infección.

5 Dentro de los genotipos, los subtipos, tales como el Genotipo 1a y el Genotipo 1b, también responden de manera diferente al tratamiento. La infección con un tipo de genotipo no excluye una infección posterior con un genotipo diferente.

Como se describe en el Ejemplo 22, el Compuesto 2 es activo contra una variedad de genotipos del HCV, incluidos los Genotipos 1-5. En una realización, el Compuesto 2 se utiliza para tratar el Genotipo 1 del HCV, el Genotipo 2 del HCV, el Genotipo 3 del HCV, el Genotipo 4 del HCV, el Genotipo 5 del HCV o el Genotipo 6 del HCV. En una realización, el Compuesto 2 se utiliza para tratar el Genotipo 1a del HCV. En una realización, el Compuesto 2 se utiliza para tratar el Genotipo 1b del HCV. En una realización, el Compuesto 2 se utiliza para tratar el Genotipo 2a del HCV. En una realización, el Compuesto 2 se utiliza para tratar el Genotipo 2b del HCV. En una realización, el Compuesto 2 se utiliza para tratar el Genotipo 3a del HCV. En una realización, el Compuesto 2 se utiliza para tratar el Genotipo 4a del HCV. En una realización, el Compuesto 2 se utiliza para tratar el Genotipo 4d del HCV.

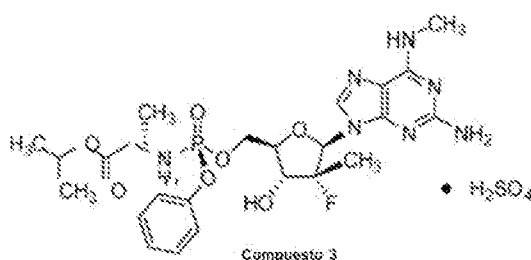
En una realización, el Compuesto 1 o el Compuesto 2 se utiliza para tratar el Genotipo 5a del HCV. En una realización, el Compuesto 1 o el Compuesto 2 se utilizan para tratar el Genotipo 6a del HCV. En una realización, el Compuesto 1 o el Compuesto 2 se utilizan para tratar el Genotipo 6b, 6c, 6d, 6e, 6f, 6g, 6h, 6i, 6j, 6k, 6l, 6m, 6n, 6o, 6p, 6q, 6r, 6s, 6t o 6u del HCV.

Como se discute en el Ejemplo 25 y se muestra en la Figura 24, la concentración mínima en estado estacionario prevista ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 después de una dosis de 450 mg (400 mg de base libre) y una dosis de 600 mg (550 mg de base libre) del Compuesto 2 es de aproximadamente 40 ng/mL a 50 ng/mL. Este nivel de $C_{24,ss}$ excedió la EC_{95} del Compuesto 1 en los Genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a y 4d del HCV. Estos datos confirman que el Compuesto 2 tiene una potente actividad pangénotípica. Esto es sorprendente porque el Compuesto 2 logra una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) más pequeña que la concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito de nucleósido de sofosbuvir después de una dosis de sofosbuvir equivalente. La concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito de nucleósido correspondiente de sofosbuvir es de aproximadamente 100 ng/mL, pero este nivel solo excede la EC_{95} de sofosbuvir frente a aislados clínicos de GT2 (Figura 24). El Compuesto 2 es más potente que el sofosbuvir contra GT1, GT2, GT3 y GT4 y, por lo tanto, permite una forma de dosificación que proporciona una concentración mínima en estado estacionaria más pequeña de su metabolito que, no obstante, es eficaz contra todos los genotipos probados del HCV. En una realización, una forma de dosificación del Compuesto 2 se administra de forma que logra una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 de entre aproximadamente 15-75 ng/mL. En una realización, una forma de dosificación del Compuesto 2 se administra de forma que logra una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 de entre aproximadamente 20 y 60 ng/mL, 20 y 50 ng/mL o 20 y 40 ng/mL.

En una realización, el compuesto, las formulaciones o las formas de dosificación sólidas que incluyen el compuesto también se pueden utilizar de manera profiláctica para prevenir o retardar la progresión de la enfermedad clínica en individuos que son positivos para el anticuerpo del HCV o para el antígeno del HCV o que han estado expuestos a la hepatitis C.

En particular, se ha descubierto que el Compuesto 2 es activo contra el HCV y muestra propiedades farmacológicas y similares a las de un fármaco superiores en comparación con su base libre (Compuesto 1). Sorprendentemente, el Compuesto 2 está más biodisponible y alcanza un AUC más alta que el Compuesto 1 (Ejemplo 19) y el Compuesto 2 es más selectivo para el órgano diana, el hígado, que el Compuesto 1 (Ejemplo 19).

El Compuesto 2 también es ventajoso sobre el Compuesto 1 en términos de solubilidad y estabilidad química. Esto es sorprendente porque la sal monosulfato de isopropilo((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(metilamino)-9H-purina-9-yl)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-yl)metoxi)(fenoxi)fosforil)-L-alaninato (Compuesto 3) es inestable y presenta la apariencia de una goma pegajosa, mientras que el Compuesto 2, la sal de hemisulfato, es un sólido blanco estable. La sal de hemisulfato, tanto en forma sólida como en una dosificación sólida, es muy estable durante 9 meses y no es higroscópica.

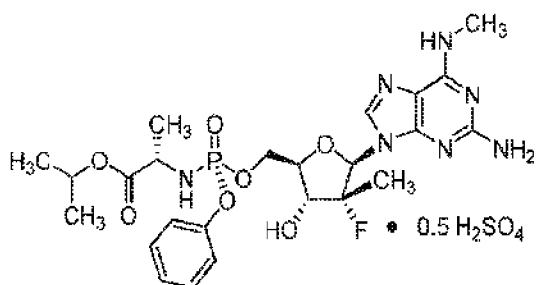
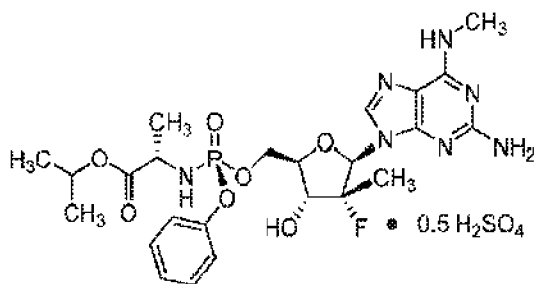
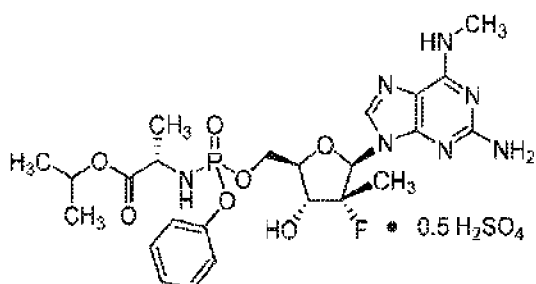


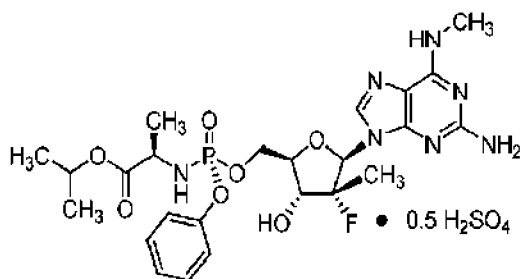
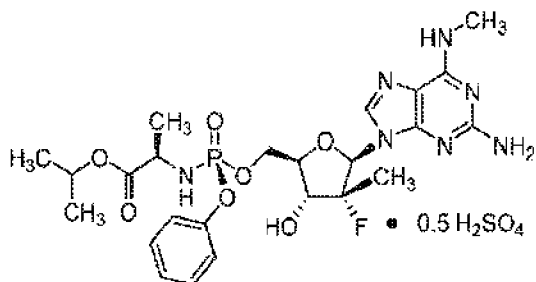
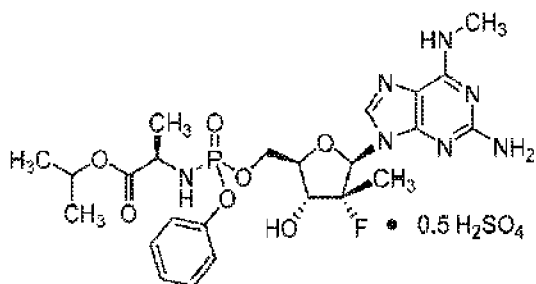
A pesar del volumen de literatura sobre nucleósidos antivirales y solicitudes de patentes, el Compuesto 2 no se ha divulgado específicamente.

- El Compuesto 2 tiene estereoquímica S en el átomo de fósforo lo cual ha sido confirmado con cristalografía de rayos X (Figura 3, Ejemplo 2). En realizaciones alternativas, el Compuesto 2 se puede utilizar en la forma de cualquier proporción deseada de enantiómeros R y S de fósforo, incluyendo hasta enantiómeros puros. En algunas realizaciones, el Compuesto 2 se utiliza en una forma que está al menos 90% libre del enantiómero opuesto, y puede estar al menos 98%, 99% o incluso 100% libre del enantiómero opuesto. A menos que se describa lo contrario, un Compuesto 2 enantioméricamente enriquecido está al menos 90% libre del enantiómero opuesto. Además, en una realización alternativa, el aminoácido del fosforamido puede estar en la configuración D o L, o una mezcla de las mismas, incluyendo una mezcla racémica.

- A menos que se especifique lo contrario, los compuestos descritos en la presente memoria se proporcionan en la configuración β-D. En una realización alternativa, los compuestos se pueden proporcionar en una configuración β-L. Asimismo, cualquier grupo sustituyente que muestre quiralidad se puede proporcionar en forma racémica, enantiomérica, diastereomérica o cualquier mezcla de las mismas. Cuando un fosforamido muestre quiralidad, se puede proporcionar como un derivado de fósforo quiral R o S o una mezcla de los mismos, incluyendo una mezcla racémica. En la presente memoria se describen todas las combinaciones de estas configuraciones estereo. La invención se define por la reivindicación 1. En otra realización, al menos uno de los hidrógenos del Compuesto 2 (el nucleótido o la sal de hemisulfato) se puede reemplazar con deuterio.

- Estas configuraciones alternativas no forman parte de la invención y solo se pretenden para propósitos ilustrativos, incluyen, pero no se limitan a,





- 5 I. Sal de hemisulfato de isopropilo((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(metilamino)-9H-purina-9-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)-L-alaninato (Compuesto 2)

El compuesto activo de la invención es el Compuesto 2, el cual se puede proporcionar en una composición farmacéuticamente aceptable o en una forma de dosificación sólida de la misma. En una realización, el Compuesto 2 es un sólido amorfo. En aún otra realización adicional, el Compuesto 2 es un sólido cristalino.

Síntesis del compuesto 2

- 10 Se describe en la presente memoria, pero no se reivindica, un proceso para la preparación del Compuesto 2 que incluye
- (i) un primer paso de disolución del Compuesto 1 en un disolvente orgánico, por ejemplo, acetona, acetato de etilo, metanol, acetonitrilo o éter, o similares, en un matraz o recipiente;
- 15 (ii) cargar un segundo matraz o recipiente con un segundo disolvente orgánico, el cual puede ser el mismo o diferente del disolvente orgánico del paso (i), opcionalmente enfriar el segundo disolvente a 0-10 grados C y agregar gota a gota H_2SO_4 al segundo disolvente orgánico para crear una mezcla de H_2SO_4 /disolvente orgánico; y en el que el disolvente puede ser, por ejemplo, metanol;
- 20 (iii) añadir gota a gota la mezcla de H_2SO_4 /disolvente orgánico en una proporción molar de 0.5/1.0 del paso (ii) a la solución del Compuesto 1 del paso (i) a temperatura ambiente o a temperatura ligeramente aumentada o disminuida (por ejemplo 23-35 grados C);
- (iv) agitar la reacción del paso (iii) hasta que le precipitado del Compuesto 2 se forme, por ejemplo, a temperatura ambiente o a temperatura ligeramente aumentada o disminuida;
- (v) filtrar opcionalmente el precipitado resultante del paso (iv) y lavar con un disolvente orgánico; y
- 25 (vi) opcionalmente secar el Compuesto 2 resultante en vacío, opcionalmente a una temperatura elevada, por ejemplo, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 °C.

En ciertas realizaciones, el paso (i) anterior se lleva a cabo en acetona. Adicionalmente, el segundo disolvente orgánico en el paso (ii) puede ser, por ejemplo, metanol y la mezcla de disolventes orgánicos en el paso (v) es metanol/acetona.

En una realización, el Compuesto 1 se disuelve en acetato de etilo en el paso (i). En una realización, el Compuesto 1 se disuelve en tetrahidrofurano en el paso (i). En una realización, el Compuesto 1 se disuelve en acetonitrilo en el paso (i). En una realización adicional, el Compuesto 1 se disuelve en dimetilformamida en el paso (i).

- 5 En una realización, el segundo disolvente orgánico en el paso (ii) es etanol. En una realización, el segundo disolvente orgánico en el paso (ii) es isopropanol. En una realización, el segundo disolvente orgánico en el paso (ii) es *n*-butanol.

En una realización, se utiliza para lavar una mezcla de disolventes en el paso (v), por ejemplo, etanol/acetona.

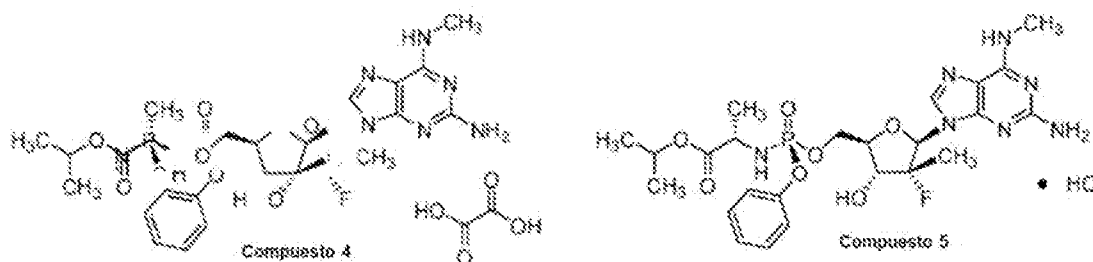
- 10 En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es isopropanol/acetona. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es *n*-butanol/acetona. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es etanol/acetato de etilo. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es isopropanol/acetato de etilo. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es *n*-butanol/acetato de etilo. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es etanol/tetrahidrofurano. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es isopropanol/tetrahidrofurano. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es *n*-butanol/tetrahidrofurano. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es etanol/acetonitrilo. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es isopropanol/acetonitrilo. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es *n*-butanol/acetonitrilo. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es etanol/dimetilformamida. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es isopropanol/dimetilformamida. En una realización, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es *n*-butanol/dimetilformamida.

II. Metabolismo de Isopropilo((*S*)-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-(metilamino)-9*H*-purina-9-*il*)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-*il*)metoxi)(fenoxi)fosforil)-*L*-alaninato (Compuesto 2)

- 25 El metabolismo del Compuesto 1 y el Compuesto 2 implica la producción de un 5'-monofosfato y el posterior anabolismo de la base N⁶-metilo-2,6-diaminopurina (1-3) para generar ((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-9*H*-purina-9-*il*)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-*il*)metil dihidrógeno fosfato (1-4) como el 5'-monofosfato. Posteriormente, el monofosfato se anaboliza adicionalmente a la especie de trifosfato activa: el 5'-trifosfato (1-6). El 5'-trifosfato se puede metabolizar adicionalmente para generar 2-amino-9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-3-metiltetrahidrofuran-2-*il*)-1,9-dihidro-6*H*-purin-6-ona (1-7). Alternativamente, el 5'-monofosfato 1-2 se puede metabolizar para generar la base de purina 1-8. La vía metabólica del isopropilo((*S*)-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-(metilamino)-9*H*-purina-9-*il*)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-*il*)metoxi)(fenoxi)fosforilo)-*L*-alaninato se ilustra en el Esquema 1 (mostrado anteriormente).

- 35 III. Sales adicionales del Compuesto 1 (no de acuerdo con la presente invención)

En realizaciones alternativas, la presente invención proporciona el Compuesto 1 como una sal de oxalato (Compuesto 4) o una sal de HCl (Compuesto 5).



- 40 Tanto la sal de oxalato 1:1 como la sal de HCl 1:1 forman sólidos con propiedades razonables para formas de dosificación sólidas para el tratamiento de un hospedero como un humano con hepatitis C. Sin embargo, la sal de oxalato puede ser menos deseada, y quizás no adecuada, si el paciente es susceptible a los cálculos renales. La sal de HCl es más higroscópica que la sal de hemisulfato. Por lo tanto, la sal de hemisulfato sigue siendo la forma de sal más deseada del Compuesto 1 con propiedades inesperadas.

IV. Definiciones

- 45 El término "configuración D" tal como se utiliza en el contexto de la presente invención se refiere a la configuración principal que imita la configuración natural de las fracciones de azúcar en oposición a los nucleósidos no naturales o la configuración "L". El término "β" o "anómero β" se utiliza con referencia a los análogos de nucleósidos en los cuales la base del nucleósido está configurada (dispuesta) por encima del plano de la fracción furanosa en el análogo del nucleósido.

Los términos "coadministrar" y "coadministración" o terapia de combinación se utilizan para describir la administración del Compuesto 2 de acuerdo con la presente invención en combinación con al menos otro agente activo, por ejemplo, cuando sea apropiado, al menos un agente anti HCV adicional. El momento de la coadministración lo determina mejor el especialista médico que trata al paciente. A veces es preferible que los

5 agentes sean administrados al mismo tiempo. Alternativamente, los fármacos seleccionados para la terapia de combinación se pueden administrar en diferentes momentos al paciente. Por supuesto, cuando hay más de una infección viral o de otro tipo u otra afección, los presentes compuestos se pueden combinar con otros agentes para tratar esa otra infección o afección según sea necesario.

El término "hospedero", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un organismo unicelular o multicelular en el cual un virus del HCV se puede replicar, incluyendo líneas celulares y animales, y típicamente un humano. El término hospedero se refiere específicamente a células infectadas, células transfectadas con todo o parte del genoma del HCV y animales, en particular primates (incluyendo chimpancés) y humanos. En la mayoría de las aplicaciones animales de la presente invención, el hospedero es un paciente humano. Sin embargo, la presente invención prevé claramente aplicaciones veterinarias en ciertas indicaciones (como los

10 chimpancés). El hospedero puede ser, por ejemplo, bovino, equino, aviar, canino, felino, etc.

Sustitución isotópica

La presente invención incluye compuestos y el uso del compuesto 2 con sustituciones isotópicas deseadas de átomos en cantidades superiores a la abundancia natural del isótopo, es decir, enriquecido. Los isótopos son átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa, es decir, el mismo número de protones, pero un número diferente de neutrones. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos del hidrógeno, por ejemplo, el deuterio (^2H) y tritio (^3H) se pueden utilizar en cualquier lugar en las estructuras descritas. Alternativamente o, además, se pueden utilizar isótopos de carbono, por ejemplo, ^{13}C y ^{14}C . Una sustitución isotópica preferible es el deuterio por hidrógeno en una o más ubicaciones en la molécula para mejorar el rendimiento del fármaco. El deuterio puede estar unido en un lugar de rotura de enlace durante el metabolismo (un efecto isotópico cinético de α -deuterio) o cerca o al lado del sitio de rotura de enlace (un efecto isotópico cinético de β -deuterio). Achillion Pharmaceuticals, Inc. (WO/2014/169278 y WO/2014/169280) describe la deuteración de nucleótidos para mejorar su farmacocinética o farmacodinámica, incluyendo en la posición 5 de la molécula.

20

25

La sustitución con isótopos tal como el deuterio puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, tal como, por ejemplo, una mayor vida media in vivo o menores requisitos de dosificación. La sustitución de deuterio por hidrógeno en un sitio de descomposición metabólica puede reducir la tasa de o eliminar el metabolismo en ese enlace. En cualquier posición del compuesto en la que pueda estar presente un átomo de hidrógeno, el átomo de hidrógeno puede ser cualquier isótopo de hidrógeno, incluyendo protio (^1H), deuterio (^2H) y tritio (^3H). Por lo tanto, la referencia en la presente memoria a un compuesto abarca todas las formas isotópicas potenciales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

30

35

El término análogo "etiquetado isotópicamente" se refiere a un análogo que es un "análogo deuterado", un "análogo etiquetado con ^{13}C ", o un "análogo etiquetado con ^{13}C /deuterado". El término "análogo deuterado" significa un compuesto descrito en la presente memoria, en el que un isótopo H, es decir, hidrógeno/protio (^1H), se sustituye por un isótopo H, es decir, deuterio (^2H). La sustitución del deuterio puede ser parcial o completa. La sustitución parcial de deuterio significa que al menos un hidrógeno es sustituido por al menos un deuterio. En ciertas realizaciones, el isótopo está enriquecido en un isótopo en un 90, 95 o 99% o más en cualquier ubicación de interés. En algunas realizaciones, es deuterio el que está enriquecido un 90, 95 o 99% en una ubicación deseada. Salvo que se indique lo contrario, la deuteración es al menos 80% en la ubicación seleccionada. La deuteración del nucleósido puede ocurrir en cualquier hidrógeno reemplazable que proporcione los resultados deseados.

40

45

V. Métodos de tratamiento o profilaxis (no de acuerdo con la presente invención)

El tratamiento, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la administración del Compuesto 2 a un hospedero, por ejemplo, un humano que está o puede llegar a estar infectado con un virus del HCV.

El término "profiláctico" o preventivo, cuando se utiliza, se refiere a la administración del Compuesto 2 para prevenir o reducir la probabilidad de la aparición del trastorno viral. La presente invención incluye tanto terapias de tratamiento como terapias profilácticas o preventivas. En una realización, el Compuesto 2 se administra a un hospedero que ha estado expuesto y, por lo tanto, corre el riesgo de contraer una infección por una infección del virus de la hepatitis C.

50

La invención se dirige a un método de tratamiento o profilaxis de un virus de la hepatitis C, incluyendo formas resistentes a fármacos y resistentes a múltiples fármacos del HCV y estados relacionados patológicos, afecciones o complicaciones de una infección por HCV, incluyendo cirrosis y hepatotoxicidades relacionadas, así como otras afecciones que son secundarias a una infección por HCV, tales como debilidad, pérdida de

55

- 5 apetito, pérdida de peso, agrandamiento del pecho (especialmente en hombres), sarpullido (especialmente en las palmas de las manos), dificultad con la coagulación de la sangre, vasos sanguíneos en forma de araña en la piel, confusión, coma (encefalopatía), acumulación de fluido en la cavidad abdominal (ascitis), varices esofágicas, hipertensión portal, insuficiencia renal, agrandamiento del bazo, disminución de las células sanguíneas, anemia, trombocitopenia, ictericia y cáncer hepatocelular, entre otros. El método comprende administrar a un hospedero con necesidad del mismo, normalmente un humano, una cantidad eficaz del Compuesto 2 como se describe en la presente memoria, opcionalmente en combinación con al menos un agente bioactivo adicional, por ejemplo, un agente anti HCV adicional, adicionalmente en combinación con un aditivo portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 En aún otro aspecto, la presente invención es un método para la prevención o profilaxis de una infección por HCV o un estado patológico o un estado patológico relacionado o subsecuente, afección o complicación de una infección por HCV, incluyendo cirrosis y hepatotoxicidades relacionadas, debilidad, pérdida de apetito, pérdida de peso, agrandamiento del pecho (especialmente en hombres), sarpullido (especialmente en las palmas de las manos), dificultad con la coagulación de la sangre, vasos sanguíneos en forma de araña en la
- 15 piel, confusión, coma (encefalopatía), acumulación de líquido en la cavidad abdominal (ascitis), varices esofágicas, hipertensión portal, insuficiencia renal, agrandamiento del bazo, disminución de las células sanguíneas, anemia, trombocitopenia, ictericia y cáncer hepatocelular (de hígado), entre otros, comprendiendo dicho método administrar a un paciente en riesgo una cantidad eficaz del Compuesto 2 como se describió anteriormente en combinación con un portador, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable,
- 20 opcionalmente en combinación con otro agente anti HCV. En otra realización, los compuestos activos de la invención se pueden administrar a un paciente después de un trasplante de hígado relacionado con la hepatitis para proteger el nuevo órgano.
- En una realización alternativa, el Compuesto 2 se proporciona como la sal de hemisulfato de un fosforamidoato del Compuesto 1 distinto del fosforamidoato específico descrito en la ilustración del compuesto. Los expertos en la técnica conocen una amplia gama de fosforamidoatos que incluyen diversos ésteres y fosfoésteres, cualquier combinación de los cuales se puede utilizar para proporcionar un compuesto activo como se describe en la presente memoria en forma de una sal de hemisulfato.
- 25 En una realización alternativa, el Compuesto 2 se proporciona como la sal de hemisulfato de un fosforamidoato del Compuesto 1 distinto del fosforamidoato específico descrito en la ilustración del compuesto. Los expertos en la técnica conocen una amplia gama de fosforamidoatos que incluyen diversos ésteres y fosfoésteres, cualquier combinación de los cuales se puede utilizar para proporcionar un compuesto activo como se describe en la presente memoria en forma de una sal de hemisulfato.

VI. Composiciones farmacéuticas y formas de dosificación

- 30 En un aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden una cantidad eficaz de virus anti HCV del Compuesto 2 como se describe en la presente memoria, opcionalmente en combinación con un portador, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable, además opcionalmente en combinación o alternancia con al menos un otro compuesto activo. En una realización, la invención incluye una forma de dosificación sólida del Compuesto 2 en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 En un aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden una cantidad eficaz anti HCV del Compuesto 2 descrito en la presente memoria, opcionalmente en combinación con un portador, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable, además opcionalmente en combinación con al menos un otro agente antiviral, tal como un agente anti HCV.
- 40 La invención incluye composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad eficaz para tratar una infección por el virus de la hepatitis C del Compuesto 2 de la presente invención o profármaco, en un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización alternativa, la invención incluye composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad eficaz para prevenir una infección por el virus de la hepatitis C del Compuesto 2 de la presente invención o profármaco, en un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45 Una persona con habilidades ordinarias en la técnica reconocerá que una cantidad terapéuticamente eficaz va a variar según la infección o afección a tratar, su gravedad, el régimen de tratamiento que se va a emplear, la farmacocinética del agente utilizado, así como el paciente o sujeto (animal o humano) a tratar, y dicha cantidad terapéutica puede ser determinada por el médico tratante o el especialista.
- 50 El Compuesto 2 de acuerdo con la presente invención, se puede formular en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. En general, es preferible administrar la composición farmacéutica en forma administrable por vía oral, y en particular, una forma de dosificación sólida tal como una pastilla o un comprimido. Ciertas formulaciones se pueden administrar por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, tópica, transdérmica, bucal, subcutánea, mediante supositorio u otra vía, incluyendo pulverización intranasal. Las formulaciones intravenosas e intramusculares a menudo se administran en salina estéril. Una persona con habilidades ordinarias en la técnica puede modificar las formulaciones para hacerlas más solubles en agua u
- 55 otro vehículo; por ejemplo, esto se puede lograr fácilmente mediante modificaciones menores (formulación de sal, esterificación, etc.) que están dentro de los conocimientos ordinarios en la técnica. También está dentro de las capacidades de los médicos de rutina modificar la vía de administración y el régimen de dosificación del Compuesto 2 con la finalidad de gestionar la farmacocinética de los presentes compuestos para obtener el máximo efecto benéfico en los pacientes, como se describe con más detalle en la presente memoria.

En ciertas formas de dosificación farmacéutica, la forma del profármaco de los compuestos, incluyendo especialmente derivados acilados (acetilados u otros) y éteres (alquílicos y relacionados), ésteres de fosfato, tiofosforamidados, fosforamidados y varias formas de sal de los presentes compuestos, se pueden utilizar para lograr el efecto deseado. Una persona con habilidades ordinarias en la técnica reconocerá cómo modificar fácilmente los presentes compuestos a formas de profármaco para facilitar la administración de compuestos activos a un sitio diana dentro del organismo hospedero o del paciente. La persona con habilidades ordinarias en la técnica también aprovechará los parámetros farmacocinéticos favorables de las formas del profármaco, donde sea aplicable, al administrar los presentes compuestos a un sitio diana dentro del organismo hospedero o paciente para maximizar el efecto previsto del compuesto.

La cantidad del Compuesto 2 incluido dentro de la formulación terapéuticamente activa de acuerdo con la presente invención es una cantidad eficaz para lograr el resultado deseado de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, para tratar la infección por HCV, reducir la probabilidad de una infección por HCV o la inhibición, reducción y/o abolición del HCV o sus efectos secundarios, incluyendo estados de enfermedad, afecciones y/o complicaciones que ocurren de manera secundaria al HCV. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz del presente compuesto en una forma de dosificación farmacéutica puede variar de alrededor de 0.001 mg/kg hasta alrededor de 100 mg/kg por día o más, más a menudo, ligeramente menos de alrededor de 0.1 mg/kg hasta más de alrededor de 25 mg/kg por día del paciente o considerablemente más, dependiendo del compuesto utilizado, la afección o infección tratada y la vía de administración. El Compuesto 2 a menudo se administra en cantidades que varían de alrededor de 0.1 mg/kg hasta alrededor de 15 mg/kg por día del paciente, dependiendo de la farmacocinética del agente en el paciente. Este intervalo de dosis generalmente produce concentraciones efectivas del compuesto activo en la sangre las cuales pueden variar de alrededor de 0.001 hasta alrededor de 100, de alrededor de 0.05 hasta alrededor de 100 microgramos/cc de sangre en el paciente.

A menudo, para tratar, prevenir o retrasar la aparición de estas infecciones y/o reducir la probabilidad de una infección por el virus del HCV, o un estado de enfermedad secundaria, afección o complicación del HCV, se administrará el Compuesto 2 en una forma de dosificación sólida en una cantidad que varía de alrededor de 250 microgramos hasta alrededor de 800 miligramos o más al menos una vez al día, por ejemplo, al menos alrededor de 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 u 800 miligramos o más, una, dos, tres o hasta cuatro veces al día de acuerdo con la dirección del proveedor de atención médica. El Compuesto 2 a menudo se administra por vía oral, pero se puede administrar por vía parenteral, tópica o en forma de supositorio, así como por vía intranasal, como un pulverizador nasal o como se describe en la presente memoria. De manera más general, el Compuesto 2 se puede administrar en forma de comprimido, cápsula, inyección, formulación intravenosa, suspensión, líquido, emulsión, implante, partícula, esfera, crema, ungüento, supositorio, forma inhalable, forma transdérmica, bucal, sublingual, tópica, gel, mucosa y similares.

Cuando una forma de dosificación en la presente memoria se refiere a una dosis en peso de miligramo, se refiere a la cantidad del Compuesto 2 (es decir, el peso de la sal de hemisulfato) a menos que se especifique lo contrario.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica está en una forma de dosificación que contiene de alrededor de 1 mg hasta alrededor de 2000 mg, de alrededor de 10 mg hasta alrededor de 1000 mg, de alrededor de 100 mg hasta alrededor de 800 mg, de alrededor de 200 mg hasta alrededor de 600 mg, de alrededor de 300 mg hasta alrededor de 500 mg, o de alrededor de 400 mg hasta alrededor de 450 mg del Compuesto 2 en una forma de dosificación unitaria. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica está en una forma de dosificación, por ejemplo en una forma de dosificación sólida, que contiene hasta alrededor de 10, alrededor de 50, alrededor de 100, alrededor de 125, alrededor de 150, alrededor de 175, alrededor de 200, alrededor de 225, alrededor de 250, alrededor de 275, alrededor de 300, alrededor de 325, alrededor de 350, alrededor de 375, alrededor de 400, alrededor de 425, alrededor de 450, alrededor de 475, alrededor de 500, alrededor de 525, alrededor de 550, alrededor de 575, alrededor de 600, alrededor de 625, alrededor de 650, alrededor de 675, alrededor de 700, alrededor de 725, alrededor de 750, alrededor de 775, alrededor de 800, alrededor de 825, alrededor de 850, alrededor de 875, alrededor de 900, alrededor de 925, alrededor de 950, alrededor de 975, o alrededor de 1000 mg o más del Compuesto 2 en una forma de dosificación unitaria. En una realización, el Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que proporciona al menos alrededor de 300 mg. En una realización, el Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que proporciona al menos alrededor de 400 mg. En una realización, el Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que proporciona al menos alrededor de 500 mg. En una realización, el Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que proporciona al menos alrededor de 600 mg. En una realización, el Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que proporciona al menos alrededor de 700 mg. En una realización, el Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que proporciona al menos alrededor de 800 mg. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante un máximo de 12 semanas. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante un máximo de 10 semanas. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante un máximo de 8 semanas. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante un máximo de 6 semanas. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos una vez

al día durante un máximo de 4 semanas. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante al menos 4 semanas. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante al menos 6 semanas. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante al menos 8 semanas. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante al menos 10 semanas. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante al menos 12 semanas. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos cada dos días durante un máximo de 12 semanas, hasta un máximo de 10 semanas, hasta un máximo de 8 semanas, hasta un máximo de 6 semanas o hasta un máximo de 4 semanas. En ciertas realizaciones, el Compuesto 2 se administra al menos cada dos días durante al menos 4 semanas, al menos 6 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas o al menos 12 semanas. En una realización, al menos alrededor de 600 mg del Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante un máximo de 6 semanas. En una realización, al menos alrededor de 500 mg del Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante un máximo de 6 semanas. En una realización, al menos alrededor de 400 mg del Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante un máximo de 6 semanas. En una realización, al menos 300 mg del Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante un máximo de 6 semanas. En una realización, al menos 200 mg del Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante un máximo de 6 semanas. En una realización, al menos 100 mg del Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante un máximo de 6 semanas.

El metabolito 1-6 es el trifosfato activo del Compuesto 2, pero el Metabolito 1-6 no es medible en plasma. Un sustituto del metabolito 1-6 es el metabolito 1-7. El metabolito 1-7 es un metabolito del nucleósido medible en plasma y, por lo tanto, es una indicación de las concentraciones intracelulares del metabolito 1-6. Para una máxima actividad antiviral del HCV, una forma de dosificación del Compuesto 2 debe lograr una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 que excede el valor de la EC_{95} del Compuesto 2. Como se muestra en la Figura 24, la EC_{95} del Compuesto 1 contra aislados clínicos de GT1, GT2, GT3 y GT4 es inferior a 25 ng/mL (los valores de EC_{95} del Compuesto 1 y EC_{95} del Compuesto 1 son los mismos). En una realización, una forma de dosificación del Compuesto 2 se administra de manera que logra una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 que está entre aproximadamente 15 a 75 ng/mL. En una realización, una forma de dosificación del Compuesto 2 se administra de manera que logra una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) de metabolito 1-7 que está entre aproximadamente 20 a 60 ng/mL. En una realización, una forma de dosificación del Compuesto 2 se administra de manera que logra una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 que está entre aproximadamente 30 a 60 ng/mL. En una realización, una forma de dosificación del Compuesto 2 se administra de manera que logra una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 que está entre aproximadamente 20 y 50 ng/mL. En una realización, una forma de dosificación del Compuesto 2 se administra de manera que logra una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 que está entre aproximadamente 30 a 50 ng/mL. En una realización, una forma de dosificación del Compuesto 2 se administra de manera que logra una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 que está entre aproximadamente 20 a 45 ng/mL. En una realización, una forma de dosificación del Compuesto 2 administra de manera que logra una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 que está entre aproximadamente 20 a 30 ng/mL. En una realización, una forma de dosificación del Compuesto 2 administra de manera que logra una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 que está entre aproximadamente 20 a 35 ng/mL. En una realización, una forma de dosificación del Compuesto 2 administra de manera que logra una concentración mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito 1-7 que está entre aproximadamente 20 a 25 ng/mL. Las formas de dosificación aproximadas son $\pm 10\%$ de la concentración mínima en estado estacionario.

En una realización, el Compuesto 2 se dosifica en una cantidad que logra un AUC (área bajo la curva) del metabolito 1-7 de entre aproximadamente 1,200 y 3,000 ng/mL. En una realización, el Compuesto 2 se dosifica en una cantidad que logra un AUC del metabolito 1-7 de entre aproximadamente 1,500 y 3,000 ng/mL. En una realización, el Compuesto 2 se dosifica en una cantidad que logra un AUC del metabolito 1-7 de entre aproximadamente 1,800 y 3,000 ng/mL. En una realización, el Compuesto 2 se dosifica en una cantidad que logra un AUC del metabolito 1-7 de entre aproximadamente 2,100 y 3,000 ng/mL. En una realización preferible, el Compuesto 2 se dosifica en una cantidad que alcanza un AUC del metabolito 1-7 de aproximadamente 2,200 ng*h/mL. Las formas de dosificación aproximadas son $\pm 10\%$ del AUC.

En el caso de la coadministración del Compuesto 2 en combinación con otro compuesto anti HCV como se describe en la presente memoria, la cantidad del Compuesto 2 de acuerdo con la presente invención, para ser administrado en intervalos de alrededor de 0.01 mg/kg del paciente hasta alrededor de 800 mg/kg o más del paciente o considerablemente más, dependiendo del segundo agente a ser coadministrado y su potencia contra el virus, la condición del paciente y la gravedad de la enfermedad o infección a ser tratada y la vía de administración. El otro agente anti HCV se puede administrar, por ejemplo, en cantidades que oscilan de alrededor de 0.01 mg/kg hasta alrededor de 800 mg/kg. Los ejemplos de cantidades de dosificación del segundo agente activo son cantidades que varían desde alrededor de 250 microgramos hasta alrededor de 750 mg o más al menos una vez al día, por ejemplo, al menos alrededor de 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700 u 800 miligramos o más, hasta cuatro veces al día. En ciertas

realizaciones preferibles, el Compuesto 2 a menudo se puede administrar en una cantidad que varía de alrededor de 0.5 mg/kg hasta alrededor de 50 mg/kg o más (normalmente hasta alrededor de 100 mg/kg), dependiendo generalmente de la farmacocinética de los dos agentes en el paciente. Estos intervalos de dosis generalmente producen concentraciones efectivas del compuesto activo en la sangre en el paciente.

- 5 Para los propósitos de la presente invención, una cantidad profiláctica o preventivamente eficaz de las composiciones de acuerdo con la presente invención se encuentra dentro del mismo intervalo de concentración que el establecido anteriormente para la cantidad terapéuticamente eficaz y normalmente es la misma que una cantidad terapéuticamente eficaz.

- 10 La administración del Compuesto 2 puede variar desde continua (goteo intravenoso) hasta varias administraciones orales o intranasales por día (por ejemplo, Q.I.D) o administración transdérmica y puede incluir administración oral, tópica, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica (la cual puede incluir un agente que mejora la penetración), bucal y supositorio, entre otras vías de administración. También se pueden utilizar comprimidos orales con cubierta entérica para mejorar la biodisponibilidad de los compuestos para una vía de administración oral. La forma de dosificación más eficaz dependerá de la
- 15 biodisponibilidad/farmacocinética del agente particular elegido, así como de la gravedad de la enfermedad en el paciente. Las formas de dosificación orales son particularmente preferibles debido a la facilidad de administración y al posible cumplimiento favorable del paciente.

- 20 Para preparar las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 2 de acuerdo con la presente invención, a menudo se mezcla íntimamente con un portador farmacéuticamente aceptable de acuerdo con las técnicas convencionales de preparación farmacéutica para producir una dosis. Un portador puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo en la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral. En la preparación de composiciones farmacéuticas en forma de dosificación oral, se puede utilizar cualquiera de los medios farmacéuticos habituales. Por lo tanto, para preparaciones orales líquidas tales como suspensiones,
- 25 elixires y soluciones, se pueden utilizar portadores y aditivos adecuados que incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, colorantes y similares. Para preparaciones orales sólidas tales como polvos, comprimidos, cápsulas, y para preparaciones sólidas tales como supositorios, se pueden utilizar portadores y aditivos adecuados que incluyen almidones, portadores de azúcar, tales como dextrosa, manitol, lactosa y portadores relacionados, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes,
- 30 agentes desintegrantes y similares. Si se desea, los comprimidos o las cápsulas pueden ser de cubierta entérica o de liberación sostenida mediante técnicas estándar. El uso de estas formas de dosificación puede mejorar significativamente la biodisponibilidad de los compuestos en el paciente.

- 35 Para las formulaciones parenterales, el portador generalmente comprenderá agua estéril o una solución acuosa de cloruro de sodio, aunque también se pueden incluir otros ingredientes, incluyendo aquellos que ayudan a la dispersión. Por supuesto, cuando se va a utilizar agua estéril y se mantendrá como estéril, las composiciones y los portadores también deben de esterilizarse. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear portadores líquidos, agentes de suspensión y similares adecuados.

- 40 Las suspensiones liposomales (incluyendo los liposomas dirigidos a antígenos virales) también se pueden preparar mediante métodos convencionales para producir portadores farmacéuticamente aceptables. Esto puede ser adecuado para la administración de nucleósidos libres, nucleósidos de acilo/alquilo o formas de profármaco de éster de fosfato de los compuestos nucleósidos de acuerdo con la presente invención.

En realizaciones típicas de acuerdo con la presente invención, el Compuesto 2 y las composiciones descritas se utilizan para tratar, prevenir o retrasar una infección por HCV o un estado de enfermedad, afección o complicación secundaria del HCV.

- 45 VII. Terapia de combinación y alternancia

- Es bien sabido que pueden surgir variantes de virus resistentes a los fármacos después de un tratamiento prolongado con un agente antiviral. La resistencia a los fármacos a veces se produce por la mutación de un gen que codifica para una enzima utilizada en la replicación viral. La eficacia de un fármaco contra una infección por HCV se puede prolongar, aumentar o restaurar mediante la administración del compuesto en combinación
- 50 o alternancia con otro, y quizás incluso con dos o tres compuestos antivirales más que inducen una mutación diferente o actúan a través de una vía diferente a la del fármaco principal. Alternativamente, la farmacocinética, la biodistribución, la vida media u otros parámetros del fármaco se pueden alterar mediante dicha terapia de combinación (la cual puede incluir una terapia de alternancia si se considera concertada). Dado que el Compuesto 2 divulgado es un inhibidor de la polimerasa NS5B, puede ser útil administrar el compuesto a un
- 55 hospedero en combinación con, por ejemplo, un

(1) Inhibidor de proteasa, tal como un inhibidor de proteasa NS3/4A;

(2) Inhibidor de NS5A;

- (3) Otro inhibidor de la polimerasa NS5B;
- (4) Inhibidor sin sustrato de NS5B;
- (5) Interferón alfa-2a, el cual puede estar pegilado o modificado de otro modo, y/o ribavirina;
- (6) Inhibidor no basado en sustrato;
- 5 (7) Inhibidor de la helicasa;
- (8) Oligodesoxinucleótido anti sentido (S-ODN);
- (9) Aptámero;
- (10) Ribozima resistente a la nucleasa;
- (11) iARN, incluyendo microARN y SiARN;
- 10 (12) Anticuerpo, anticuerpo parcial o dominio del anticuerpo contra el virus, o
- (13) Antígeno viral o antígeno parcial que induce una respuesta de anticuerpos del hospedero.

Los ejemplos no limitantes de agentes anti HCV que se pueden administrar en combinación con el Compuesto 2 de la invención, solos o con múltiples fármacos de esta lista, son:

- 15 (i) inhibidores de la proteasa tal como telaprevir (Incivek®), boceprevir (Victrelis™), simeprevir (Olysio™), paritaprevir (ABT-450), glecaprevir (ABT-493), ritonavir (Norvir), ACH-2684, AZD-7295, BMS-791325, danoprevir, Filibuvir, GS-9256, GS-9451, MK-5172, Setrobuvir, Sovaprevir, Tegobuvir, VX-135, VX-222 y ALS-220;
- (ii) inhibidores de NS5A tal como ACH-2928, ACH-3102, IDX-719, daclatasvir, ledipasvir, velpatasvir (Epclusa), elbasvir (MK-8742), grazoprevir (MK-5172) y Ombitasvir (ABT-267);
- 20 (iii) inhibidores de NS5B tal como AZD-7295, Clemizol, dasabuvir (Exviera), ITX-5061, PPI-461, PPI-688, sofosbuvir (Sofaldi®), MK-3682 y mericibina;
- (iv) Inhibidores de NS5B tal como ABT-333 y MBX-700;
- (v) Anticuerpo tal como GS-6624;
- 25 (vi) Fármacos de combinación tal como Harvoni (ledipasvir/sofosbuvir); VIEKIRA Pak (ombitasvir/paritaprevir/ritonavir/dasabuvir); Viekirax (ombitasvir/paritaprevir/ritonavir); G/P (paritaprevir y glecaprevir); Technivie (ombitasvir/paritaprevir/ritonavir) y Epclusa (sofosbuvir/velpatasvir) y Zepatier (elbasvir y grazoprevir).

- Si el Compuesto 2 se administra para tratar el virus de la hepatitis C avanzado que conduce a cáncer de hígado o cirrosis, en una realización, el compuesto se puede administrar en combinación o alternancia con otro fármaco que se utiliza típicamente para tratar el carcinoma hepatocelular (HCC), por ejemplo, como se describe por Andrew Zhu en "New Agents on the Horizon in Hepatocellular Carcinoma" Therapeutic Advances in Medical Oncology, V 5(1), January 2013, 41-50. Los ejemplos de compuestos adecuados para la terapia de combinación donde el hospedero tiene o está en riesgo de tener HCC incluyen agentes anti angiogénicos, sunitinib, brivanib, linifanib, ramucirumab, bevacizumab, cediranib, pazopanib, TSU-68, lenvatinib, anticuerpos contra EGFR, inhibidores de mTor, inhibidores de MEK e inhibidores de histona deacetilasa.

Ejemplos

Métodos generales

- Los espectros de RMN ¹H, ¹⁹F y ³¹P se registraron en un espectrómetro Brücker de transformación de Fourier de 400 MHz. Los espectros se obtuvieron con DMSO-d₆ a menos que se indique lo contrario. Las multiplicidades de espín se indican mediante los símbolos s (singlete), d (doblete), t (tripleto), m (multiplete) y br (ancho). Las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hz. Las reacciones se llevaron a cabo generalmente bajo una atmósfera de nitrógeno seco utilizando disolventes anhidros de Sigma-Aldrich. Todos los productos químicos comunes se compraron de fuentes comerciales.

En los ejemplos se utilizan las siguientes abreviaturas:

- 45 AUC: Área bajo la curva

C₂₄: Concentración del fármaco en plasma a las 24 horas

$C_{24,ss}$: Concentración a las 24 horas después de la dosificación en estado estacionario.

$C_{m\acute{a}x}$: Concentración máxima del fármaco alcanzada en plasma.

DCM: Diclorometano

EtOAc: Acetato de etilo

5 EtOH: Etanol

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

NaOH: Hidróxido de sodio

Na_2SO_4 : Sulfato de sodio (anhidro)

MeCN: Acetonitrilo

10 $MeNH_2$: Metilamina

MeOH: Metanol

Na_2SO_4 : Sulfato de sodio

$NaHCO_3$: Bicarbonato de sodio

NH_4Cl : Cloruro de amonio

15 NH_4OH : Hidróxido de amonio

PE: Éter de petróleo

Ph_3P : Trifenilfosfina

RH: humedad relativa

Gel de sílice (malla de 230 a 400, Sorbente)

20 $t-BuMgCl$: Cloruro de magnesio *t*-butilo

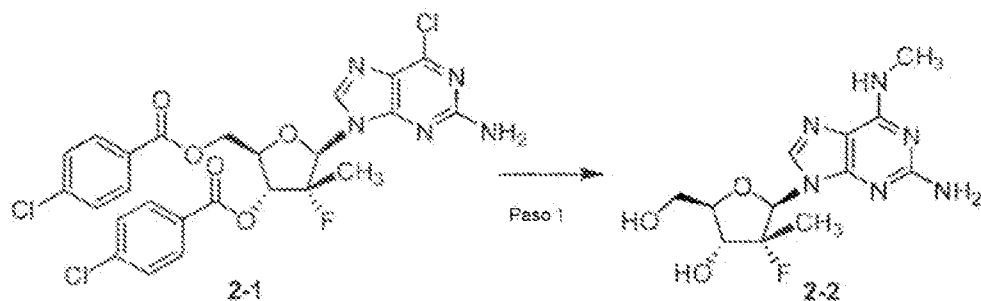
$T_{m\acute{a}x}$: Tiempo en el que se logra la $C_{m\acute{a}x}$

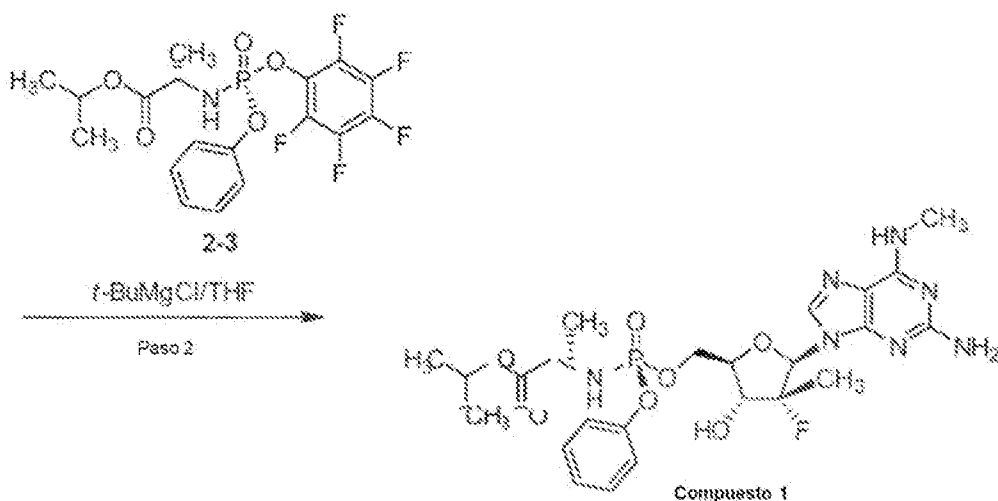
THF: Tetrahidrofurano (THF), anhidro

TP: Trifosfato

Ejemplo 1. Síntesis del Compuesto 1

25 Esquema 2





Paso 1: Síntesis de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-Amino-6-(metilamino)-9H-purina-9-yl)-4-fluoro-2-(hidroximetil)-4-metiltetrahidrofuran-3-ol (2-2)

Se cargó un matraz de 50 L con metanol (30 L) y se agitó a $10 \pm 5^\circ\text{C}$. NH_2CH_3 (3.95 Kg) se ventiló lentamente en el reactor a $10 \pm 5^\circ\text{C}$. El Compuesto 2-1 (3.77 kg) se añadió en lotes a $20 \pm 5^\circ\text{C}$ y se agitó durante 1 hora para obtener una solución transparente. La reacción se agitó durante 6-8 horas más, momento en el que la HPLC indicó que el intermedio era menos del 0.1 % de la solución. El reactor se cargó con NaOH sólido (254 g), se agitó durante 30 minutos y se concentró a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ (grado de vacío: -0.095). El residuo resultante se cargó con EtOH (40 L) y se volvió a suspender durante 1 hora a 60°C . A continuación, la mezcla se filtró a través de celita y la torta de filtración se volvió a suspender con EtOH (15 L) durante 1 hora a 60°C . El filtrado se filtró una vez más, se combinó con el filtrado de la filtración anterior y posteriormente se concentró a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ (grado de vacío: -0.095). Se precipitó una gran cantidad de sólido. Se añadió EtOAc (6 L) al residuo sólido y la mezcla se concentró a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ (grado de vacío: -0.095). Posteriormente se añadió DCM al residuo y la mezcla se volvió a suspender a reflujo durante 1 hora, se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se secó a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ en un horno de vacío para proporcionar el compuesto 2-2 como un sólido blanquecino (1.89 Kg, 95.3%, pureza del 99.2%).

Método analítico para el compuesto 2-2: La pureza del compuesto 2-2 (15 mg) se obtuvo utilizando un sistema de HPLC Agilent 1100 con una columna de Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6*150mm 4-Micrones con las siguientes condiciones: caudal de 1 mL/min, lectura a 254 nm, temperatura de la columna de 30°C , volumen de inyección de 15 μL y un tiempo de corrida de 31 minutos. La muestra se disolvió en acetonitrilo - agua (20:80) (v/v). El gradiente del método se muestra a continuación.

Tiempo (min)	A% (0.05 de TFA en agua)	B% (Acetonitrilo)
0	95	5
8	80	20
13	50	50
23	5	95
26	5	95
26.1	95	5
31	95	5

Paso 2: Síntesis de isopropilo((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-Amino-6-(metilamino)-9H-purina-9-yl)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-yl)metoxi)(fenoxi)fosforil)-L-alaninato (Compuesto 1)

El compuesto 2-2 y el compuesto 2-3 (isopropilo ((perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil)-L-alaninato) se disolvieron en THF (1 L) y se agitaron bajo nitrógeno. Posteriormente, se enfrió la suspensión a una temperatura inferior a -5°C y se añadió lentamente una solución de 1.7 M de *t*-BuMgCl (384 mL) durante 1.5 horas mientras se mantenía una temperatura de 5 - 10°C . Se añadió a la suspensión una solución de NH_4Cl (2 L) y agua (8 L) a temperatura

ambiente, después de DCM. La mezcla se agitó durante 5 minutos antes de añadir una solución acuosa al 5% de K_2CO_3 (10 L) y la mezcla se agitó durante 5 minutos adicionales antes de filtrar a través de diatomita (500 g). La diatomita se lavó con DCM y se separó el filtrado. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa de K_2CO_3 al 5% (10 L x 2), salmuera (10 L x 3) y se secó sobre Na_2SO_4 (500 g) durante aproximadamente 1 hora. Mientras tanto, todo este proceso se repitió 7 veces en paralelo y se combinaron los 8 lotes. Las fases orgánicas se filtraron y se concentraron a $45 \pm 5^\circ C$ (grado de vacío de 0.09 Mpa). Se añadió EtOAc y la mezcla se agitó durante 1 hora a $60^\circ C$ y posteriormente a temperatura ambiente durante 18 horas. Posteriormente, la mezcla se filtró y se lavó con EtOAc (2 L) para obtener el Compuesto 1 crudo. El material crudo se disolvió en DCM (12 L), se añadió heptano (18 L) a $10-20^\circ C$ y la mezcla se dejó agitar durante 30 minutos a esta temperatura. La mezcla se filtró, se lavó con heptano (5 L) y se secó a $50 \pm 5^\circ C$ para proporcionar el Compuesto 1 puro (1650 g, 60%).

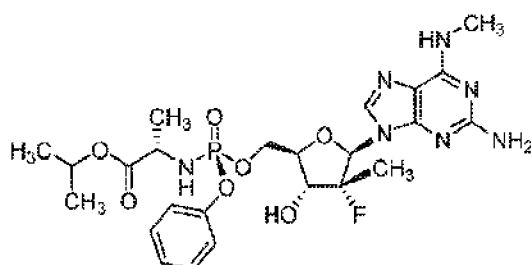
Método analítico para el Compuesto 1: La pureza del Compuesto 1 (25 mg) se obtuvo utilizando un sistema de HPLC Agilent 1100 con una columna de Waters XTerra de fenilo de $5\mu m$ $4.6 \times 250 mm$ con las siguientes condiciones: caudal de 1 mL/min, lectura a 254 nm, temperatura de la columna de $30^\circ C$, volumen de inyección de 15 μL y un tiempo de corrida de 25 minutos. La muestra se disolvió en acetonitrilo - agua (50:50) (v/v). El gradiente del método se muestra a continuación.

Tiempo (min)	A% (H_3PO_4 al 0.1% en agua)	B% (Acetonitrilo)
0	90	10
20	20	80
20.1	90	10
25	90	10

Ejemplo 2. Caracterización del Compuesto 1 amorfo y cristalino

El Compuesto 1 amorfo y el Compuesto 1 cristalino fueron analizados inicialmente mediante XRPD, 1H RMN y HPLC. Los patrones de XRPD para ambos compuestos se muestran en la Figura 1A y los trazos de HPLC para determinar la pureza se muestran en las Figuras 1B y 2A, respectivamente. La Tabla 1 es una lista de picos de XRPD del Compuesto 1 cristalino y la Tabla 2 es una lista de tiempos de retención relativos (RTT) de los trazos de HPLC. El Compuesto 1 amorfo tenía una pureza del 98.61% y el Compuesto 1 cristalino tenía una pureza del 99.11%. Ambos compuestos eran un sólido blanco. La Figura 2B son las gráficas de TGA y DSC del Compuesto 1 cristalino. Para el Compuesto 1 cristalino, se observó una endoterma a $88.6^\circ C$ y hubo una pérdida de masa del 7.8% de $80 - 110^\circ C$.

Una muestra de Compuesto 1 se recrystalizó de EtOAc/hexano y se extrajo con ORTEP. La estructura absoluta del Compuesto 1 se confirmó mediante la recrystalización de un solo cristal. La Figura 3 es el dibujo de ORTEP del Compuesto 1. Los datos del cristal y los datos de la medición se muestran en la Tabla 3. La estereoquímica absoluta del Compuesto 1 basada en la cristalografía de rayos X se muestra a continuación:



Los datos de DSC se recolectaron en un Q2000 de TA Instruments equipado con un muestreador automático de 50 posiciones. La calibración de capacidad térmica se realizó utilizando zafiro y la calibración de energía y temperatura se realizó utilizando indio certificado. Por lo general, se calentaron aproximadamente 3 mg de cada muestra en una cacerola de aluminio perforada a $10^\circ C/min$ desde $25^\circ C$ hasta $200^\circ C$. Se mantuvo una purga de nitrógeno seco a 50 ml/min sobre la muestra. El software de control del instrumento fue Advantage para Q Series v2.8.0.394 y Thermal Advantage v5.5.3 y los datos se analizaron utilizando Universal Analysis v4.5A.

Los datos de TGA se recolectaron en un TGA Q500 de TA Instruments, equipado con un muestreador automático de 16 posiciones. El instrumento fue calibrado con temperatura utilizando Alumel y Níquel certificados. Por lo general, se cargaron 5-10 mg de cada muestra en una bandeja de DSC de aluminio tarada previamente y se calentó a $10^\circ C/min$ desde temperatura ambiente hasta $350^\circ C$. Se mantuvo una purga de

ES 3 009 733 T3

nitrógeno a 60 ml/min sobre la muestra. El software de control del instrumento fue Advantage para Q Series v2.5.0.256 y Thermal Advantage v5.5.3 y los datos se analizaron utilizando Universal Analysis v4.5.

Compuesto 1 amorfo (1-1):

5 ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.01-115 (m, 9H), 1.21 (d, $J=7.20$ Hz, 3H), 2.75 -3.08 (m, 3 H), 3.71 – 3.87 (m, 1 H), 4.02 - 4.13 (m, 1 H), 4.22 - 4.53 (m, 3 H), 4.81 (s, 1 H), 5.69 - 5.86 (m, 1 H), 6.04 (br d, $J=19.33$ Hz, 4 H), 7.12 - 7.27 (m, 3 H), 7.27-7.44 (m, 3H), 7.81 (s, 1H)

Compuesto 1 cristalino (1-2):

10 ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0.97 - 1.16 (m, 16 H), 1.21 (d, $J=7.07$ Hz, 3 H), 2.87 (br s, 3 H), 3.08 (s, 2 H), 3.79 (br d, $J=7.07$ Hz, 1 H), 4.08 (br d, $J=7.58$ Hz, 1 H), 4.17 - 4.55 (m, 3 H), 4.81 (quin, $J=6.25$ Hz, 1 H), 5.78 (br s, 1 H), 5.91 - 6.15 (m, 4 H), 7-10-7.26 (m, 3 H), 7.26-7.44 (m, 3 H), 7.81 (s, 1 H)

Tabla 1. Lista de picos del Compuesto 1 cristalino

Ángulo 2θ	espaciado d / Å	Intensidad / Conteo	Intensidad / %
6.03	14.64	1005	39.0
7.36	12.00	315	12.2
7.94	11.13	1724	66.9
9.34	9.47	2500	97.0
9.51	9.29	860	33.4
9.77	9.05	1591	61.8
11.08	7.98	2576	100.0
12.02	7.36	171	6.6
12.95	6.83	319	12.4
13.98	6.33	241	9.4
14.30	6.19	550	21.4
14.69	6.03	328	12.7
15.20	5.82	2176	84.5
15.94	5.56	1446	56.1
16.75	5.29	1009	39.2
17.29	5.13	700	27.2
17.72	5.00	1213	47.1
18.11	4.89	1565	60.8
18.46	4.80	302	11.7
18.89	4.69	385	14.9
19.63	4.52	636	24.7
20.37	4.36	1214	47.1
20.74	4.28	1198	46.5
21.24	4.18	640	24.8
22.31	3.98	961	37.3
22.88	3.88	806	31.3

ES 3 009 733 T3

23.43	3.79	355	13.8
24.08	3.69	573	22.2
24.49	3.63	159	6.2
25.00	3.56	351	13.6
25.36	3.51	293	11.4
26.09	3.41	235	9.1
26.26	3.39	301	11.7
26.83	3.32	696	27.0
27.35	3.26	436	16.9
27.46	3.25	363	14.1
28.07	3.18	200	7.8
28.30	3.15	195	7.6
28.82	3.10	599	23.3
29.85	2.99	217	8.4
30.26	2.95	186	7.2
30.75	2.91	333	12.9
31.12	2.87	149	5.8
31.85	2.81	238	9.2
33.28	2.69	261	10.1
34.77	2.58	171	6.6
35.18	2.55	175	6.8
36.83	2.44	327	12.7
37.41	2.40	172	6.7

Tabla 2. Tiempos de retención relativos de cromatografías de HPLC del Compuesto 1 amorfo y del Compuesto 1 cristalino

Compuesto 1 amorfo		Compuesto 1 cristalino	
RRT	% de Área	RRT	% de Área
0.48	0.15	0.48	0.17
0.51	0.04	0.48	0.17
0.48	0.15	0.94	0.12
0.51	0.04	1.00	99.11
0.94	0.13	1.04	0.22
0.98	0.21	1.37	0.07
1.00	98.61		
1.04	0.29		

1.37	0.31	
------	------	--

Tabla 3. Cristales y mediciones de datos del Compuesto 1

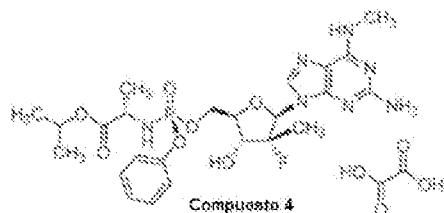
Precisión de enlace	C-C = 0.0297 Å, Longitud de onda = 1.54184	
Célula	a=10.1884(3) alfa=90	b=28.6482(9) beta=113.184(4) c=12.9497(5) gama=90
Temperatura	150 K	
	Calculado	Reportado
Volumen	3474.5(2)	3474.5(2)
Grupo del Espacio	P21	P 1 21 1
Grupo del Pasillo	P 2yb	P 2yb
Fórmula de la fracción	C ₂₄ H ₃ 4F N ₇ O ₇ P	2(C ₂₄ H ₃₄ F N ₇ O ₇ P)
Suma de la fórmula	C ₂₄ H ₃ 4F N ₇ O ₇ P	C ₄₈ H ₆₈ F ₂ N ₁₄ O ₁₄ P ₂
Mr	582.55	1165.10
Dx, g cm ⁻³	1.114	1.114
Z	4	2
Mu (mm ⁻¹)	1.139	1.139
F ₀₀₀	1228.0	1228.0
F ₀₀₀ '	1233.21	
h, k, l _{máx}	12,34,15	12,34,15
N _{ref}	12742 [6510]	8259
T _{min} , T _{máx}	0.790, 0.815	0.808, 1.000
T _{min} '	0.716	
Método de corrección	# Límites T reportados: T _{min} = 0.808 T _{máx} = 1.00	
AbsCorr	MULTI-ESCANEEO	
Integridad de los datos	1.27/0.65	
Theta (máx)	68.244	
R (reflexiones)	0.2091 (7995)	
wR2 (reflexiones)	0.5338 (8259)	
S	2.875	
Npar	716	

5 Esta caracterización inicial fue seguida después de un almacenamiento a 25 °C /humedad relativa al 60% (RH) durante 14 días con análisis mediante HPLC y XRPD después de 7 y 14 días. La Figura 4A es el XRPD después de 14 días a 25 °C / 60% (RH). El Compuesto 1 amorfo (muestra 1-1) permaneció poco cristalino, mientras que

el Compuesto 1 cristalino (muestra 1-2) mantuvo su cristalinidad, pero ambos compuestos se mantuvieron estables después de 14 días a 25 °C / 60% (RH).

Ejemplo 3. Formación de sal de oxalato del Compuesto 4

- 5 Inicialmente, la sal de oxalato del Compuesto 1, Compuesto 4, se formó mediante la mezcla de la sal oxálica con disolvente (5 vol, 100 µL) y permitiendo que cualquier solución se evaporara a temperatura ambiente. Se dejó madurar cualquier suspensión (temperatura ambiente - 50 °C) durante 3 horas y se comprobó la cristalinidad.



- 10 La Tabla 4 muestra los diferentes disolventes utilizados en la producción del Compuesto 4. Todos los disolventes excepto dos (ciclohexano y *n*-heptano) proporcionan productos cristalinos. A pesar de la alta cristalinidad y solubilidad del Compuesto 4, las sales de oxalato no son aceptables para el desarrollo clínico debido a la posible formación de cálculos renales y se exploraron otras sales del compuesto 1.

Tabla 4. Formación de Oxalato del Compuesto 4

Disolvente	Observación posterior a la adición de ácido a temperatura ambiente.	Observación después de la maduración/evaporación
EtOH	Solución	OXA - Forma 1
IPA	Solución	OXA - Forma 1
Acetona	Solución	OXA - Forma 1
MEK	Solución	OXA - Forma 1
EtOAc	Suspensión	OXA - Forma 1
<i>i</i> ProAc	Suspensión	OXA - Forma 1
THF	Solución	OXA - Forma 1
Tolueno	Solución	OXA - Forma 1
MeCN	Solución	OXA - Forma 1
IPA: agua al 10%	Solución	OXA - Forma 1
TBME	Suspensión	OXA - Forma 1
Ciclohexano	Suspensión	Amorfo
<i>n</i> -Heptano	Suspensión	Amorfo

15 Ejemplo 4. Compuestos de sal del Compuesto 1 amorfo

- 20 Dado que el compuesto de sal de oxalato 4 (Ejemplo 3) no se pudo llevar a cabo en ensayos clínicos debido a su potencial para formar cálculos renales, las sales amorfas del Compuesto 1 se formaron con los contraiones enlistados en la Tabla 5. El Compuesto 1 se disolvió en *t*-butanol (20 vol, 6 ml) y la solución se trató con los contraiones ácidos (1 equivalente para cada muestra excepto la muestra 1-9 que tenía 0.5 equivalentes de sulfato). Posteriormente las muestras fueron congeladas con el disolvente eliminado mediante liofilización. El sólido residual en las muestras 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8 y 1-9 se analizó inicialmente mediante XRPD y HPLC.

Tabla 5. Detalles de la formación de sal amorfa

ID de la muestra	Detalles de la muestra	Detalles de la solución de stock	Observación	RMN
1-4	HCl (1:1)	1M de THF	Sólido blanco	3 protones menos ~0.3 eq de <i>t</i> -BuOH
1-5	Sulfúrico (1:1)	1M de THF	Sólido blanco	3 protones menos ~0.3 eq de <i>t</i> -BuOH
1-6	Fumárico (1:1)	0.5 M de MeOH:THF (1:1)	Sólido vidrioso	1.05 eq de ácido fumárico 0.84 eq de <i>t</i> -BuOH
1-7	Benzoico (1:1)	1M de THF	Sólido blanco	1.0 eq de ácido benzoico 0.34 eq de <i>t</i> -BuOH
1-8	Succínico (1:1)	1M de MeOH	Sólido blanco pegajoso	~ 1.1 eq de ácido succínico 0.37 eq de <i>t</i> -BuOH
1-9	Sulfúrico (ácido:API 0.5:1)	1M de THF	Sólido blanco	3 protones menos ~0.3 eq de <i>t</i> -BuOH

Se tomaron espectros de ¹H RMN para todas las muestras.

Muestra 1-4, sal de HCl (1:1):

¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.93 – 1.39 (m, 16 H), 2.97 (br s, 2 H), 3.70 – 3.88 (m, 1 H), 4.10 (br s, 1 H), 4.18 – 4.49 (m, 3 H), 4.70 – 4.88 (m, 1 H), 5.71 – 5.94 (m, 1 H), 6.07 (br d, *J*= 19.07 Hz, 2 H), 7.14 – 7.27 (m, 3 H), 7.29 – 7.44 (m, 2 H), 7.83 – 8.19 (m, 1 H)

Muestra 1-5, Sal sulfúrica (1:1):

¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.97– 1.38 (m, 15 H), 2.96 (br s, 2 H), 4.06 – 4.18 (m, 1 H), 4.19– 4.49 (m, 3 H), 4.66 – 4.91 (m, 1 H), 5.70 –5.95 (m, 1 H), 5.96 – 6.16 (m, 2 H), 7.10– 7.27 (m, 3 H), 7.30–7.43 (m, 2 H), 7.88 – 8.19 (m, 1 H)

Muestra 1-6, sal fumárica (1:1):

¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.95 – 1.31 (m, 21 H), 2.87 (br s, 3 H), 3.79 (br d, *J*= 7.20 Hz, 1 H), 4.01 – 4.13 (m, 1 H), 4.16 – 4.23 (m, 1 H), 4.16 – 4.24 (m, 1 H), 4.20 (s, 1 H), 4.18 – 4.23 (m, 1 H), 4.24 – 4.52 (m, 1 H), 4.24 – 4.52 (m, 1 H), 4.24 – 4.49 (m, 1 H), 4.72 – 4.88 (m, 1 H), 5.68 – 5.86 (m, 1 H), 6.04 (br d, *J*=19.33 Hz, 4 H), 6.63 (s, 1 H), 6.61 – 6.66 (m, 1 H), 7.12 – 7.27 (m, 3 H), 7.27 – 7.45 (m, 3 H), 7.81 (s, 1 H), 13.16 (br s, 2 H)

Muestra 1-7, sal benzoica (1:1):

¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.96 – 1.30 (m, 15 H), 2.87 (br s, 3 H), 3.79 (br d, *J*= 7.07 Hz, 1 H), 4.07 (br s, 1 H), 4.20 (s, 1 H), 4.25 – 4.52 (m, 3 H), 4.81 (s, 1 H), 5.71 – 5.85 (m, 1 H), 6.04 (br d, *J*= 19.33 Hz, 4 H), 7.08 – 7.27 (m, 3 H), 7.27 – 7.43 (m, 3 H), 7.45 – 7.57 (m, 2 H), 7.63 (s, 1 H), 7.81 (s, 1 H), 7.95 (dd, *J*=8.27, 1.33 Hz, 2 H), 12.98 (br s, 1 H)

Muestra 1-8, sal succínica (1:1):

¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.98 – 1.28 (m, 15 H), 2.42 (s, 5 H), 2.87 (br s, 3 H), 3.57 – 3.62 (m, 1 H), 3.70 – 3.86 (m, 1 H), 4.02 – 4.14 (m, 1 H), 4.20 (s, 1 H), 4.24 – 4.51 (m, 3 H), 4.70 – 4.88 (m, 1 H), 5.69 – 5.86 (m, 1 H), 6.04 (br d, *J*= 19.33 Hz, 4 H), 7.12 – 7.27 (m, 3 H), 7.27 – 7.44 (m, 3 H), 7.81 (s, 1 H), 11.95 – 12.58 (m, 2 H)

Muestra 1-9, sal sulfúrica (0.5:1):

¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 1.02 – 1.31 (m, 15 H), 2.94 (br s, 3 H), 3.79 (br d, *J*= 7.20 Hz, 2 H), 4.09 (br s, 1 H), 4.22 – 4.48 (m, 3 H), 4.72 – 4.90 (m, 1 H), 5.71 – 5.92 (m, 1 H), 6.07 (br d, *J*=19.07 Hz, 2 H), 7.12 – 7.28 (m, 3 H), 7.31 – 7.44 (m, 2 H), 7.75 – 8.19 (m, 1 H).

Las muestras fueron entonces sometidas a almacenamiento a 25 °C / humedad relativa (HR) al 60% durante 14 días con análisis mediante HPLC y XRPD después de 7 (Figura 4B) y 14 días (Figura 5A). Todas las sales preparadas permanecieron amorfas y las observaciones se muestran en la Tabla 6. Se encontró que las sales de monosulfato (muestra 1-5) y succinato (muestra 1-8) eran físicamente inestables y se deslicuescieron o se convirtieron en una goma durante el curso del estudio. Se encontró que tanto las sales de fumarato (muestra

1-6) como las de benzoato (muestra 1-7) eran sólidos vítreos. Se descubrió que la sal de HCl (muestra 1-4) conservaba su apariencia física. Sorprendentemente, la sal de hemisulfato (muestra 1-9) también conservó su apariencia física como un sólido blanco en contraste con el compuesto de monosulfato (muestra 1-5), la cual era una goma pegajosa. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Se encontró que la sal de HCl mono (muestra 1-4) y la sal de hemisulfato (muestra 1-9) eran física y químicamente estables después de 2 semanas de almacenamiento a 25 °C / humedad relativa (RH) al 60%. Aunque ambas sales se mantuvieron estables durante las dos semanas, la sal de hemisulfato fue superior a la sal de HCl porque la sal de HCl era higroscópica, lo que la hacía menos útil en comparación con la sal de hemisulfato para el almacenamiento a largo plazo o uso.

Tabla 6. Estabilidad de las muestras después de 7 y 14 días a 25 °C / RH al 60%

ID de la muestra	Tiempo de exposición a 25 °C / RH al 60% (días)					
	0		7		14	
	HPLC	Observación	HPLC	Observación	HPLC	Observación
1-1	98.6	Sólido blanco	98.7	Sólido blanco	98.5	Sólido blanco
1-2	99.1	Sólido blanco	99.2	Sólido blanco	99.0	Sólido blanco
1-3	99.7	Sólido blanco	99.6	Sólido blanco	99.4	Sólido blanco
1-4	98.7	Sólido blanco	98.8	Sólido blanco	98.6	Sólido blanco
1-5	98.4	Sólido blanco	55.7	Sólido blanco pegajoso	-	Goma pegajosa
1-6	98.7	Sólido vidrioso	98.6	Sólido vítreo transparente	98.4	Sólido vítreo blanco
1-7	98.8	Sólido blanco	98.8	Sólido vítreo transparente	98.7	Sólido vítreo transparente
1-8	98.7	Sólido blanco pegajoso	-	Aceite delicuescido / pegajoso	-	Delicuescido
1-9	98.7	Sólido blanco	98.1	Sólido blanco	96.4	Sólido blanco

Ejemplo 5. Caracterización del Compuesto 2 amorfo

El Compuesto 2 amorfo fue analizado inicialmente mediante XRPD, ¹HRMN, DSC, TGA y HPLC. El patrón de XRPD para el Compuesto 2 amorfo recubierto con el Compuesto 1 amorfo y el Compuesto 1 cristalino se muestra en la Figura 1A y el patrón de XRPD del Compuesto 2 amorfo solo se muestra en la Figura 5B. La Tabla 7 es una lista de picos del patrón de XRPD que se muestra en la Figura 5B. El trazo de HPLC para determinar la pureza se muestra en la Figura 6A. La Tabla 8 es una lista de tiempos de retención relativos (RTT) del trazo de HPLC que se muestra en la Figura 6A. El Compuesto 2 amorfo era 99.68% puro. La Figura 6B es una gráfica de TGA y DSC del Compuesto 2 amorfo. Los detalles experimentales de los experimentos de TGA y DSC se proporcionan en el Ejemplo 2.

Tabla 7. Lista de picos para el Compuesto 2 amorfo

Ángulo /°2θ	d espaciado / Å	Intensidad / Conteos	Intensidad / %
4.20	21.03	486	81.8
4.67	18.91	482	81.0
5.16	17.10	595	100.0
9.13	9.68	547	92.0

Tabla 8. Cromatograma de HPLC del Compuesto 2 amorfo

Compuesto 2 amorfo	
RRT	% de Área
0.48	0.02
0.48	0.02
0.67	0.01
0.94	0.13
1.00	99.68
1.04	0.06

Compuesto 2 amorfo:

¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.93 – 1.29 (m, 13 H), 2.94 (br s, 3 H), 3.79 (td, *J*=10.04, 7.07 Hz, 2 H), 4.05 – 4.19 (m, 1 H), 4.19 – 4.50 (m, 3 H), 4.81 (quin, *J*= 6.25 Hz, 1 H), 5.71 – 5.94 (m, 1 H), 5.97 – 6.16 (m, 2 H), 7.14 – 7.28 (m, 3 H), 7.31 – 7.44 (m, 2 H), 7.82 – 8.09 (m, 1 H)

Ejemplo 6. Cristalización del Compuesto 2 amorfo

Dado que se encontró que la sal de hemisulfato permanecía como un sólido después del estudio de estabilidad de 14 días como se muestra en la Tabla 6, se realizaron pruebas preliminares que estudiaron las condiciones de cristalización utilizando 11 disolventes diferentes. El Compuesto 2 amorfo se suspendió en 5 volúmenes de disolvente a 25 °C (muestra 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10 y 2-11). A aquellas muestras que no fluían libremente (2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8 y 2-10) se les añadieron 5 volúmenes adicionales de disolvente. Posteriormente, las muestras se dejaron madurar a 25 - 50 °C (1 °C/min entre temperaturas y 4 horas a cada temperatura) durante 6 días, excepto por la muestra 2-1, la cual se observó que era una solución transparente después de 1 día y se permitió evaporar bajo condiciones ambientales. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Los patrones cristalinos resultaron de la cristalización con isobutanol (muestra 2-1), acetona (muestra 2-2), EtOAc (muestra 2-6) e *i*PrOAc (muestra 2-7). También se identificaron dos muestras poco cristalinas a partir de la cristalización con MEK (muestra 2-4) y MIBK (muestra 2-5). Los patrones de XRPD se muestran en la Figura 7A.

Tabla 9. Condiciones de cristalización del Compuesto 2

ID de la muestra	Disolvente	Observación después de 5 volúmenes	Observación después de 10 volúmenes	Observación después de 1 día de maduración	XRPD
2-1	IPA	Sólido - no fluye libremente	Suspensión de flujo libre	Solución, evaporada a RT, obteniéndose una goma.	Goma
2-2	Isobutanol	Sólido - no fluye libremente	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Cristalino - Patrón 2
2-3	Acetona	Sólido - no fluye libremente	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Cristalino - Patrón 3
2-4	MEK	Sólido - no fluye libremente	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Pobremente cristalino - Patrón 4
2-5	MIBK	Sólido - no fluye libremente	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Pobremente cristalino - Patrón 4
2-6	EtOAc	Sólido - no fluye libremente	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Cristalino - Patrón 1
2-7	<i>i</i> PrOAc	Sólido - no fluye libremente	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Cristalino - Patrón 1

2-8	THF	Sólido - no fluye libremente	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Pobremente cristalino
2-9	TBME	Suspensión de flujo libre	-	Suspensión	Amorfo
2-10	Tolueno	Sólido - no fluye libremente	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Amorfo
2-11	Heptano	Suspensión de flujo libre	-	Suspensión	Amorfo

Las siete muestras (Muestras 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7 y 2-8) fueron analizadas mediante DSC, TGA, ¹H-RMN e IC (Tabla 10, Figura 8A, Figura 8B, Figura 9A, Figura 9B, Figura 10A, Figura 10B, Figura 11A, y Figura 11B) así como mediante XRPD después de 6 días de almacenamiento a 25 °C / humedad relativa (RH) al 60% (todas las muestras permanecieron cristalinas / pobremente cristalinas después de la estabilidad). Todas las muestras retuvieron aproximadamente la mitad de un equivalente de sulfato, pero contenían una cantidad relativamente grande de disolvente residual. En la Figura 7B se muestra una superposición de los difractogramas de rayos X de las muestras amorfas 2-9, 2-10 y 2-11.

Tabla 10. Caracterización de muestras cristalinas del Compuesto 2

ID de la muestra	Disolvente	DSC	TGA	¹ HRMN	IC (corregido para TGA)
2-2	Isobutanol	Endo 113.8 °C	8.3% de ambiente-140°C	1.1 eq de isobutanol	0.45 eq
2-3	Acetona	Endo 30-95°C Endo 100-145°C	7.6% de ambiente - 140 °C	0.5 eq de acetona	0.46 eq
2-4	MEK	Complejo amplio endo 30-115 °C Endo 115-145°C	8.5% de ambiente - 140°C	0.8 eq de MEK	0.45 eq
2-5	MIBK	Endo amplio 30-105 °C Endo 114.7 °C	5.2% de ambiente - 110 °C	0.2 eq de MIBK	0.46 eq
2-6	EtOAc	Endo agudo 113.6 °C	2.0% de ambiente-100°C	0.9 eq de EtOAc	0.46 eq
2-7	iProAc	Endo 30-90°C	1.6% de ambiente-90°C	0.8 eq de iProAc	0.45 eq
2-8	THF	Endo 30-100°C Endo agudo 115.6 °C	4.2% de ambiente-130°C	0.7 eq de THF	0.45 eq

Se tomaron espectros de ¹HRMN para todas las muestras y se enlistan a continuación.

Muestra 2-2:

¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.83 (d, *J*= 6.69 Hz, 7 H), 0.99 – 1.26 (m, 14 H), 1.61 (dt, *J*=13.26, 6.63 Hz, 1 H), 3.73 – 3.87 (m, 2 H), 4.03 – 4.18 (m, 1 H), 4.18 – 4.51 (m, 4 H), 4.66 – 4.92 (m, 1 H), 4.70 – 4.90 (m, 1 H), 4.72 – 4.88 (m, 1 H), 5.81 (br s, 1 H), 5.93 – 6.11 (m, 2 H), 7.10 – 7.26 (m, 3 H), 7.14 – 7.26 (m, 1 H), 7.30 – 7.41 (m, 2 H), 7.94 (br s, 1 H)

Muestra 2-3:

¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 1.00 – 1.26 (m, 13 H), 2.09 (s, 3 H), 3.74 – 3.87 (m, 2 H), 4.10 (br d, *J*=7.70 Hz, 1 H), 4.22 – 4.50 (m, 3 H), 4.81 (quin, *J*= 6.28 Hz, 1 H), 5.71 – 5.90 (m, 1 H), 5.96 – 6.15 (m, 2 H), 7.12 – 7.26 (m, 3 H), 7.31 – 7.41 (m, 2 H), 7.79 – 8.07 (m, 1 H)

Muestra 2-4:

- 5 ¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.91 (t, *J*= 7.33 Hz, 3 H), 1.01 – 1.28 (m, 13 H), 2.08 (s, 2 H), 3.72 – 3.89 (m, 2 H), 4.10 (br d, *J*=8.08 Hz, 1 H), 4.23 – 4.47 (m, 3 H), 4.81 (quin, *J*= 6.25 Hz, 1 H), 5.69 – 5.89 (m, 1 H), 5.94 – 6.13 (m, 2 H), 7.14 – 7.25 (m, 3 H), 7.32 – 7.41 (m, 2 H), 7.79 – 8.11 (m, 1 H)

Muestra 2-5:

- 10 ¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.86 (d, *J*= 6.69 Hz, 1 H), 0.98 – 1.33 (m, 13 H), 2.02 – 2.09 (m, 1 H), 4.03 – 4.17 (m, 1 H), 4.22 – 4.50 (m, 3 H), 4.81 (quin, *J*= 6.25 Hz, 1 H), 5.81 (br s, 1 H), 5.93 – 6.15 (m, 2 H), 7.11 – 7.27 (m, 3 H), 7.31 – 7.41 (m, 2 H), 7.77 – 8.21 (m, 1 H)

Muestra 2-6:

- 15 ¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.98 – 1.28 (m, 15 H), 2.00 (s, 3 H), 3.99 – 4.14 (m, 3 H), 4.21 – 4.49 (m, 3 H), 4.81 (quin, *J*= 6.22 Hz, 1 H), 5.82 (br s, 1 H), 5.93 – 6.14 (m, 2 H), 7.11 – 7.26 (m, 3 H), 7.29 – 7.42 (m, 2 H), 7.79 – 8.17 (m, 1 H)

Muestra 2-7:

¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.92 – 1.28 (m, 17 H), 1.97 (s, 2 H), 4.04 – 4.16 (m, 1 H), 4.20 – 4.51 (m, 3 H), 4.71 – 4.93 (m, 2 H), 5.82 (br s, 1 H), 5.95 – 6.14 (m, 2 H), 7.11 – 7.28 (m, 3 H), 7.31 – 7.43 (m, 2 H), 7.75 – 8.21 (m, 1 H)

- 20 Muestra 2-8:

¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.81 - 1.11 (m, 13 H), 1.19 (s, 1 H), 1.53 – 1.66 (m, 1 H), 3.87 – 4.01 (m, 1 H), 4.06 – 4.32 (m, 3 H), 4.64 (quin, *J*= 6.25 Hz, 1 H), 5.55 – 5.75 (m, 1 H), 5.77 – 5.97 (m, 2 H), 6.94 – 7.10 (m, 3 H), 7.13 – 7.26 (m, 2 H), 7.66 – 7.96 (m, 1 H)

Ejemplo 7. Falla en la cristalización de la sal de malonato amorfa (Compuesto 4)

- 25 Como se muestra en el Ejemplo 3, se identificó una sal de oxalato cristalina al determinar las sales adecuadas para el Compuesto 1, pero la sal de oxalato del Compuesto 4 no se pudo llevar a cabo en ensayos clínicos debido a su potencial para causar cálculos renales. Por lo tanto, se intentó la cristalización de la sal malonato químicamente relacionada (Compuesto 5) utilizando los mismos 11 disolventes que para la sal de hemisulfato. El Compuesto 1 (12 × 50 mg, muestras 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11 y 3-12) se disolvió en *t*-butanol (20 vol) y posteriormente las soluciones se trataron con 1 equivalente de una solución stock de ácido malónico (1 M en THF). Posteriormente las muestras se congelaron y se eliminó el disolvente mediante liofilización. A las muestras 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10 y 3-11 se les añadió el disolvente relevante (5 volúmenes) a temperatura ambiente. Cualquier solución resultante se permitió evaporar bajo condiciones ambientales, mientras que las gomas o los sólidos se permitieron madurar a 25 - 50 °C (1 °C/min entre temperaturas y 4 horas a cada temperatura) durante 5 días. Los sólidos fueron analizados mediante XRPD (Figura 12B), pero se encontró que todas las muestras formaban una goma o eran amorfas (Figura 12B). Los resultados se muestran en la Tabla 11. La única muestra sólida (amorfa) (3-12) fue analizada mediante ¹H-RMN y HPLC y se encontró que contenía alrededor de 1 equivalencia de ácido malónico (los picos se superponen), así como 0.6 eq. de *t*-BuOH. El compuesto tenía una pureza del 99.2% (Figura 13A). La Figura 12A es un XRPD de la muestra 3-12 y la Figura 13A es la cromatografía de HPLC de la muestra 3-12.

Muestra 3-12:

¹H RMN (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.81 - 1.11 (m, 13 H), 1.19 (s, 1 H), 1.53 – 1.66 (m, 1 H), 3.87 – 4.01 (m, 1 H), 4.06 – 4.32 (m, 3 H), 4.64 (quin, *J*= 6.25 Hz, 1 H), 5.55 – 5.75 (m, 1 H), 5.77 – 5.97 (m, 2 H), 6.94 – 7.10 (m, 3 H), 7.13 – 7.26 (m, 2 H), 7.66 – 7.96 (m, 1 H)

- 45 Tabla 11. Condiciones de cristalización de la sal de malonato amorfo del Compuesto 4

ID de la muestra	Disolvente	Observación después de 5 volúmenes	Observación después de 5 días de maduración/evaporación.	XRPD
3-1	IPA	Solución transparente*	Goma transparente	-
3-2	Isobutanol	Solución transparente*	Goma transparente	-

3-3	Acetona	Solución transparente*	Goma transparente	-
3-4	MEK	Solución transparente*	Goma transparente	-
3-5	NIBK	Solución y algo de goma	Goma transparente	-
3-6	EtOAc	Solución transparente*	Goma transparente y apariencia cristalina	Amorfo
3-7	iProAc	Goma	Goma transparente	-
3-8	THF	Solución transparente*	Goma transparente	-
3-9	TBME	Suspensión espesa	Goma transparente	-
3-10	Tolueno	Goma blanca / sólido	Goma blanca	Amorfo
3-11	Heptano	Sólido blanco (estático)	Goma blanca	Amorfo
3-12	-	(Sólido blanco - sin disolvente)	(Sólido blanco pegajoso - condiciones ambientales)	Amorfo

* Evaporado a temperatura ambiente.

Ejemplo 8. Falla en la formación adecuada de la sal utilizando molienda asistida por líquido (LAG)

Se realizó un estudio de molienda asistida por líquido (LAG) para determinar sales adecuadas distintas del hemisulfato utilizando los 14 contraiones ácidos de la Tabla 12.

5 Tabla 12. Soluciones stock de contraiones utilizadas en la cristalización de LAG

Contraión	Disolvente (1 M)
Pamoico	DMSO
Malónico	THF
D-Glucurónico	Agua
DL-Mandélico	THF
D-Glucónico	THF
Glicólico	THF
L-Láctico	THF
Oleico	THF
L-Ascórbico	Agua
Adípico	THF (calor)
Caproico	THF
Esteárico	THF
Palmítico	THF
Metanosulfónico	THF

10 El Compuesto 1 (30 mg) se colocó en viales de HPLC con dos cojinetes de bolas de 3 mm. Los materiales se humedecieron con disolvente (15 µl de etanol, muestra 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13 y 4-14) y se añadió 1 equivalente del contraión ácido. Posteriormente, las muestras se molieron durante 2 horas a 650 rpm utilizando un sistema de molienda Fritsch con un adaptador Automaxion. La mayoría de las muestras después de la molienda resultaron ser gomas transparentes y no se analizaron más (Tabla 13). Aquellas que se observó que contenían sólido se analizaron mediante XRPD y, en todos los casos, los patrones obtenidos coincidieron con los del contraión ácido cristalino sin picos adicionales (Figura 13B).

Tabla 13. Observaciones y resultados de XRPD de LAG de los Compuestos 1

ID de la muestra	Ácido	Observación después de la molienda	XRPD
4-1	Pamoico	Goma amarilla/sólido	Ácido pamoico y halo amorfo
4-2	Malónico	Goma transparente	-
4-3	D-Glucurónico	Goma blanca/sólido	Ácido D-Glucurónico y halo amorfo
4-4	DL-Mandélico	Goma transparente	-
4-5	D-Glucónico	Goma transparente	-
4-6	Glicólico	Goma transparente	
4-7	L-Láctico	Goma transparente	-
4-8	Oleico	Goma transparente	-
4-9	L-Ascórbico	Goma blanca/sólido	Ácido L-Ascórbico y halo amorfo
4-10	Adípico	Goma transparente	-
4-11	Caproico	Goma transparente	-
4-12	Estearico	Goma blanca/sólido	Ácido estearico y halo amorfo
4-13	Palmítico	Goma blanca/sólido	Ácido palmítico y halo amorfo
4-4	Metanosulfónico	Goma transparente	-

Ejemplo 9. Falla en la obtención de la formación adecuada de la sal utilizando Metilo Etilo cetona (MEK)

5 A continuación, se utilizó metilo etilo cetona (MEK) como un disolvente para estudiar sales adecuadas distintas de la sal de hemisulfato. Utilizando los 14 contraiones ácidos de la Tabla 12, el estudio se realizó disolviendo el Compuesto 1 (50 mg) en MEK (20 vol) a temperatura ambiente. Las soluciones fueron tratadas con 1 equivalencia de los contraiones seleccionados (Tabla 12). Posteriormente, las muestras se enfriaron a 5 °C a 0.1 °C/min y se agitaron a esta temperatura durante la noche. Todas las muestras se permitieron evaporar bajo condiciones ambientales y todos los sólidos observados se analizaron mediante XRPD. Esta evaporación produjo principalmente gomas, con la excepción de las muestras con ácido estérico (muestra 4-12) y ácido palmítico (muestra 5-13), las cuales proporcionaron disolventes vítreos. Estos sólidos eran amorfos mediante XRPD, pero no se obtuvieron formas cristalinas de la sal. Los resultados se muestran en la Tabla 14. (Figura 13A).

Tabla 14. Resultados de la disolución del Compuesto 1 en MEK (20 volúmenes)

ID de la muestra	Ácido	Disolvente para ácido a 1 M	Observación sobre la adición de ácido	Observación después de enfriarse	Observación después de la evaporación
5-1	Pamoico	DMSO	Solución amarilla	Solución amarilla	Goma amarilla
5-2	Malónico	THF	Solución	Solución	Goma transparente
5-3	D-Glucurónico	Agua	Solución	Solución	Goma transparente
5-4	DL-Mandélico	THF	Solución	Solución	Goma transparente

5-5	D-Glucónico	THF	Precipitado blanco	Solución turbia	Goma transparente
5-6	Glicólico	THF	Solución	Solución	Goma transparente
5-7	L-Láctico	THF	Solución	Solución	Goma transparente
5-8	Oleico	THF	Solución	Solución	Goma transparente
5-9	L-Ascórbico	Agua	Solución	Solución	Goma amarilla
5-10	Adípico	THF (calor)	Solución	Solución	Goma transparente
5-11	Caproico	THF	Solución	Solución	Goma transparente
5-12	Esteárico	THF	Solución	Solución turbia	Sólido vítreo transparente*
5-13	Palmítico	THF	Solución	Solución	Sólido vítreo transparente*
5-14	Metanosulfónico	THF	Solución	Solución	Goma transparente

Solución stock preparada antes de la adición del ácido.

*Las muestras se analizaron mediante XRPD y arrojaron patrones amorfos además picos del contraíón ácido.

5 Dado que todas las muestras eran amorfas, todas las muestras se redisolieron en MEK (5 vol) y se añadió ciclohexano (20 vol de antidisolvente) a temperatura ambiente, seguido de 1 hora de agitación a 25 °C. A continuación, las muestras se permitieron madurar entre 50 - 5 °C (1 °C/min entre temperaturas, 4 horas a cada temperatura) durante 2 días antes de cambiar el ciclo a 50 - 25 °C durante 4 días adicionales. Las muestras fueron observadas a simple vista después de la maduración. Los resultados se muestran en la Tabla 15. Después de la maduración, se encontró que todas las muestras, excepto 5-1 (con ácido pamoico), eran gomas. La muestra 5-1, un sólido amarillo, se analizó mediante XRPD y se encontró que el patrón coincidía con la forma conocida del ácido pamoico (Figura 14B) y por lo tanto no se obtuvieron formas cristalinas de la sal.

Tabla 15. Resultados de la redisolución del Compuesto 1 en MEK (5 volúmenes) y anti disolvente

ID de la muestra	Observación inmediata	Observación después de 10 minutos	Observación después de 60 minutos	Observación después de la maduración
5-1	Precipitado	Goma	Goma	Suspensión amarilla**
5-2	Precipitado	Goma	Goma	Goma
5-3	Precipitado/goma	Goma	Goma	Goma
5-4	Precipitado	Goma	Goma	Goma
5-5	Precipitado/goma	Goma	Goma	Goma
5-6	Precipitado	Goma	Goma	Goma
5-7	Precipitado	Goma	Goma	Goma
5-8	Precipitado	Suspensión ligera	Goma	Goma
5-9	Precipitado	Goma	Goma	Goma
5-10	Precipitado	Goma	Goma	Goma
5-11	Precipitado	Suspensión ligera	Goma	Goma

5-12	Precipitado	Suspensión ligera	Goma	Goma
5-13	Precipitado	Suspensión ligera	Goma	Goma
5-14	Precipitado	Goma	Goma	Goma

**Muestra analizada mediante XRPD con coincidencia de patrones de forma conocida de ácido pamoico (sin picos adicionales)

Ejemplo 10. Falla en la obtención de la formación adecuada de la sal utilizando Acetato de Etilo

- 5 A continuación, se utilizó acetato de etilo para estudiar sales adecuadas distintas de la sal de hemisulfato. Utilizando los 14 contraiones ácidos de la Tabla 12, el estudio se realizó mediante la disolución del Compuesto 1 (50 mg) en acetato de etilo (20 vol) a 50 °C. Las soluciones se trataron con 1 equivalente de los contraiones seleccionados (Tabla 12). Posteriormente, las muestras se enfriaron a 5 °C a 0.1 °C/min y se agitaron a esta temperatura durante 4 días. Las soluciones se permitieron evaporar bajo condiciones ambientales mientras se analizaban los sólidos mediante XRPD. Los resultados de las cristalizaciones utilizando acetato de etilo están en la Tabla 16. A diferencia del Ejemplo 8, donde el disolvente era MEK, se observó que la mayoría de las
- 10 muestras eran suspensiones después del enfriamiento de la mezcla de ácido:compuesto (aquellas que eran soluciones se permitieron evaporar bajo condiciones ambientales). Sin embargo, en general se encontró que los difractogramas de XRPD coincidían con el Compuesto 1 cristalino. Las muestras 6-2, 6-4 y 6-5 tienen algunas ligeras diferencias (Figura 14A y Figura 15A). No se obtuvieron formas cristalinas de la sal.

- 15 Tabla 16. Resultados de la disolución del Compuesto 1 en EtOAc (20 volúmenes)

ID de la muestra	Ácido	Disolvente para ácido a 1 M	Observación después de la adición de ácido	Observación después del enfriamiento	XRPD	Observación después de la evaporación
6-1	Pamoico	DMSO	Solución amarilla	Solución amarilla*	-	Goma
6-2	Malónico	THF	Solución	Suspensión blanca	Ligeras diferencias con la base libre	-
6-3	D-Glucurónico	Agua	Solución	Solución*	-	Goma
6-4	DL-Mandélico	THF	Solución	Suspensión blanca	Ligeras diferencias con la base libre	-
6-5	D-Glucónico	THF	Precipitado blanco	Posible goma blanca	Ligeras diferencias con la base libre	-
6-6	Glicólico	THF	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-7	L-Láctico	THF	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-8	Oleico	THF	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-9	L-Ascórbico	Agua	Solución	Solución*	-	Sólido blanco en el lateral / goma amarilla - amorfo
6-10	Adípico	THF (calor)	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-

6-11	Caproico	THF	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-12	Estéarico	THF	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-13	Palmitico	THF	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-14	Metanosulfónico	THF	Precipitado blanco	Solución / Goma transparente*	-	Goma transparente

Ejemplo 11. Determinación de pureza química mediante HPLC

El análisis de pureza en el Ejemplo 2 y el Ejemplo 4 se realizó en un sistema de Agilent serie HP1100 equipado con un detector de arreglo de diodos y utilizando el software ChemStation vB.04.03 utilizando el método que se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Método de HPLC para la determinación de la pureza química

Parámetro	Valor		
Tipo de método	Fase inversa con gradiente de elución		
Preparación de la muestra	0.5 mg/ml en acetonitrilo : agua a 1:1		
Columna	Supelco Ascentis Express C18, 100 × 4.6 mm, 2.7 µm		
Temperatura de la columna (°C)	25		
Inyección (µl)	5		
Longitud de onda, ancho de banda (nm)	255, 90		
Caudal (ml/min)	2		
Fase A	TFA al 0.1% en agua		
Fase B	TFA al 0.085% en acetonitrilo		
Calendario	Tiempo (min)	% de Fase A	% de Fase B
	0	95	5
	6	5	95
	6.2	95	5
	8	95	5

Ejemplo 12. Técnicas de difracción de rayos X en polvo (XRPD)

Los patrones de XRPD en los Ejemplos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se recolectaron en un difractómetro PANalytical Empyrean utilizando radiación Cu K α (45 kV, 40 mA) en geometría de transmisión. En el haz incidente se utilizó una rendija de 0.5°, una máscara de 4 mm y rendijas Soller de 0.4 rad con un espejo de enfoque. Un detector PIXcel^{3D} colocado sobre el haz difractado, estaba ajustado con una rendija receptora y rendijas Soller de 0.04 rad. El desempeño del instrumento se comprueba semanalmente utilizando polvo de silicio. El software utilizado para la recolección de datos fue X'Pert Data Collector v. 5.3 y los datos fueron analizados y presentados utilizando Diffrac Plus EVA v. 15.0.0.0 o Highscore Plus v. 4.5. Las muestras se prepararon y analizaron en una placa de metal o de 96 pocillos Millipore en el modo de transmisión. Se utilizó una película transparente de rayos X entre las láminas de metal en la placa de pocillos de metal y se utilizaron polvos (aproximadamente 1-2 mg) tal como se recibieron. La placa Millipore se utilizó para aislar y analizar sólidos de las suspensiones

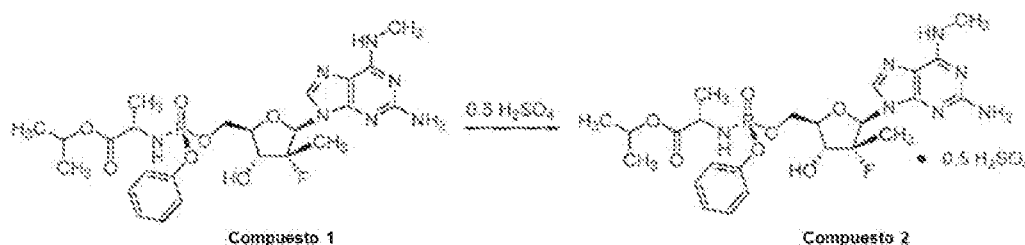
agregando una pequeña cantidad de suspensión directamente a la placa antes de la filtración bajo un ligero vacío.

El modo de escaneo para la placa de metal utilizó el eje de escaneo de gonio, mientras que para la placa Millipore se utilizó un escaneo de 2θ . Se realizó una comprobación del desempeño utilizando polvo de silicio (placa de pocillos de metal). Los detalles de la recolección de datos fueron un intervalo angular de 2.5 a 32.0° de 2θ , un tamaño de paso de 0.0130° de 2θ y un tiempo total de recolección de datos de 2.07 minutos.

También se recolectaron muestras en un difractómetro Bruker D8 utilizando radiación $\text{Cu K}\alpha$ (40 kV, 40 mA), un goniómetro de $\theta - 2\theta$ y divergencia de $V4$ y rendijas receptoras, un monocromador de Ge y un detector Lynxeye. El desempeño del instrumento se verifica utilizando un estándar de corindón certificado (NIST 1976). El software utilizado para la recolección de datos fue *DiffracPlus XRD Commander v2.6.1* y los datos se analizaron y presentaron utilizando *Diffrac Plus EVA v15.0.0.0*.

Las muestras se corrieron bajo condiciones ambientales como muestras de placa plana utilizando el polvo tal como se recibió. La muestra se empaquetó con cuidado en una cavidad cortada en una oblea de silicio pulida, de fondo cero (510). La muestra se rotó en su propio plano durante el análisis. Los detalles de la recolección de datos fueron un intervalo angular de 2 a 42° de 2θ , un tamaño de paso de 0.05° de 2θ y un tiempo de recolección de 0.5 s/paso.

Ejemplo 13. Síntesis del Compuesto 2 amorfo



Se cargó un matraz de 250 mL con MeOH (151 mL) y se enfrió la solución a $0-5^\circ\text{C}$. Se añadió una solución concentrada de H_2SO_4 gota a gota durante 10 minutos. Se cargó un matraz separado con el Compuesto 1 (151 g) y acetona (910 mL), y se añadió la solución de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ gota a gota a $25-30^\circ\text{C}$ durante 2.5 horas. Se precipitó una gran cantidad de sólido. Después de agitar la solución durante $12-15$ horas a $25-30^\circ\text{C}$, la mezcla se filtró, se lavó con MeOH/acetona (25 mL/ 150 mL) y se secó a $55-60^\circ\text{C}$ en vacío para proporcionar el Compuesto 2 (121 g, 74%).

Método analítico para el Compuesto 2: La pureza del Compuesto 2 se obtuvo utilizando un sistema de HPLC Agilent 1100 con una columna de Waters XTerra de fenilo $5\mu\text{m}$ $4.6 \times 250\text{mm}$ con las siguientes condiciones: caudal de 1 mL/min, lectura a 254 nm, temperatura de la columna de 30°C , volumen de inyección de 10 μL y un tiempo de corrida de 30 minutos. La muestra se disolvió en ACN:agua ($90:10$, v/v). El gradiente del método para la separación se muestra a continuación. $R_t(\text{min})$ del Compuesto 2 fue de aproximadamente 12.0 minutos.

Tiempo (min)	H_3PO_4 al 0.1% en agua % de (A)	Acetonitrilo % de (B)
0	90	10
20	20	80
20.1	90	10
30	90	10

$^1\text{HRMN}$: (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.41 (br, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.36 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.17 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.73 (s, 2H), 6.07 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.00 (dd, $J = 12.0, 8.0$ Hz, 1H), 5.81 (br, 1H), $4.84-4.73$ (m, 1H), $4.44-4.28$ (m, 3H), 4.10 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), $3.85-3.74$ (m, 1H), 2.95 (s, 3H), 1.21 (s, $J = 4.0$ Hz, 3H), $1.15-1.10$ (m, 9H).

Ejemplo 14. Caracterización del Compuesto 2

El Compuesto 2 se caracterizó adicionalmente a simple vista, $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$, $^{19}\text{FRMN}$, MS, HPLC y XRPD (Figura 15B). El disolvente residual se midió mediante GC. El contenido de agua se midió mediante titulación de Karl Fischer y el contenido de agua fue solamente del 0.70% . Los datos se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18. Sumario de los datos de caracterización adicionales del Compuesto 2

Prueba	Resultado
Apariencia	Sólido blanco
RMN	Los picos de ^1H RMN se enlistan en el Ejemplo 4
MS	MS(ESI+ve) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 582.3$ - se ajusta a la estructura
HPLC	99.8% mediante AUC a 254 nm (promedio de dos preparaciones)
Disolvente residual mediante GC	Metanol - 57 ppm Acetona - 752 ppm Diclorometano - 50 ppm Acetato de etilo - 176 ppm
Contenido de agua	0.70%

Ejemplo 15. Solubilidad del Compuesto 1 y del Compuesto 2

- Se probaron el Compuesto 1 y el Compuesto 2 para determinar su solubilidad en medios de prueba biorelevantes, incluyendo el fluido gástrico simulado (SGF), el fluido gástrico simulado en estado de ayuno (FaSSIF) y el fluido gástrico en estado de alimentación (FeSSIF). Los resultados para el Compuesto 1 se muestran en la Tabla 19 y los resultados para el Compuesto 2 se muestran en la Tabla 20. Las muestras se agitaron a temperatura ambiente (20 - 25 °C). El Compuesto 2 era más de 40 veces más soluble que el Compuesto 1 en agua a las 2 horas y más de 25 veces más soluble a las 24 horas. En condiciones de SGF, el Compuesto 2 tuvo una solubilidad de 84.2 mg/mL a las 24 horas en comparación con la solubilidad de 15.6 mg/mL del Compuesto 1 en el mismo punto de tiempo. El Compuesto 2 también fue más soluble a las 2 horas en las condiciones de SGF que el Compuesto 1, y lo suficientemente soluble para permitir la prueba incluso después de 48 horas, mientras que la prueba a las 48 horas no se realizó con el Compuesto 1.

Tabla 19. Resultados de la prueba de solubilidad del Compuesto 1

Medios de prueba	Solubilidad (en mg/mL)		Apariencia	Término descriptivo
	2 horas	24 horas		
Agua	1.5	2.5	Solución transparente*	Ligeramente soluble
SGF	13.8	15.6	Solución transparente con goma en el fondo	Escasamente soluble
FaSSIF	1.7	1.7	Túrbida	Ligeramente soluble
FeSSIF	2.8	2.9	Túrbida	Ligeramente soluble

- *La muestra parecía ser transparente, pero se logró una solubilidad de solo 1.5 mg/mL. Después de una investigación más exhaustiva, se observó que se formó una película gomosa en la barra de agitación. El ingrediente farmacéutico activo del Compuesto 1 formó una bola gomosa en diluyente (agua al 90%/acetonitrilo al 10%) durante la preparación estándar, lo que requirió un largo tiempo de sonicación para disolverse por completo.

Tabla 20. Resultados de la prueba de solubilidad del Compuesto 2

Medios de prueba	Solubilidad (en mg/mL de base salina)			Apariencia	Término descriptivo
	2 horas	24 horas	48 horas		
Agua	65.3	68.0	N/A	Túrbida	Soluble
SGF	89.0	84.2	81.3	Túrbida	Soluble

FaSSIF	1.9	2.0	N/A	Túrbida	Ligeramente soluble
FeSSIF	3.3	3.4	N/A	Túrbida	Ligeramente soluble

Ejemplo 16. Estabilidad química del Compuesto 2

- Se probó la estabilidad química del Compuesto 2 a 25 y 40 °C durante un período de 6 meses monitoreando la pureza orgánica, el contenido de agua, ¹HRMN, DSC y Ramen IR. El sistema de cierre de contenedores para el estudio fue una bolsa de válvula medicinal combinada con una película laminada farmacéutica sobre la bolsa y gel de sílice desecante entre las dos capas. Se midió el Compuesto 2 (1 g) en cada recipiente. Posteriormente, las bolsas se almacenaron a 25 °C/RH al 60% (humedad relativa) y 40 °C/RH al 75% (humedad relativa). Se midieron la pureza orgánica, el contenido de agua, ¹HRMN, DSC y Raman en el tiempo 0, mes 1, mes 2, mes 3 y mes 6.
- Se obtuvo la pureza del Compuesto 2 utilizando un sistema Shimadzu LC-20AD con una columna de Waters XTerra de fenilo, 5 µm, 4.6 x 250 mm con las siguientes condiciones: caudal de 1 mL/min, lectura a 254 nm, temperatura de la columna de 35 °C y volumen de inyección de 10 µL. La muestra se disolvió en acetonitrilo – agua (90:10) (v/v). El gradiente del método se muestra a continuación.

Tiempo (min)	A% (ACN)	B% (agua)
0	90	10
20	20	80
20.1	90	10
30	90	10

- El contenido de agua del Compuesto 2 (250 mg) se determinó mediante un aparato de titulación de agua utilizando el método de titulación de Karl Fischer.

- Los resultados se muestran en la Tabla 21 y la Tabla 22. Cuando el Compuesto 2 se almacenó durante 6 meses a 25 y 40 °C, la tasa de degradación fue mínima. A los 3 meses, el Compuesto 2 tenía una pureza del 99.75% en las condiciones de 25 °C y del 99.58 % en las condiciones de 40 °C. A los 6 meses, el Compuesto 2 todavía tenía una pureza del 99.74% en las condiciones de 25 °C y del 99.30% en las condiciones de 40 °C. A 25 °C, el porcentaje del producto de degradación aumentó del 0.03% en el día 0 al 0.08% después de 6 meses. A 40 °C, el porcentaje del producto de degradación aumentó del 0.03% al 0.39%. En el transcurso de 6 meses, el porcentaje de agua aumentó aproximadamente 0.6% a 25 °C y aumentó aproximadamente 0.7% a 40 °C.

- La caracterización mediante ¹HRMN, Raman y DSC del Compuesto 2 a los 1, 2, 3 y 6 meses fue la misma que la caracterización del Compuesto 2 el día 0 en ambas condiciones de temperatura (Tabla 22), destacando la estabilidad a largo plazo del Compuesto 2.

Tabla 21. Tasa de degradación del Compuesto 2 durante 6 meses a 25 y 40 °C

	Probado en el tiempo	Porcentaje de agua	Porcentaje de pureza	Porcentaje del producto de degradación	Porcentaje máximo de impurezas
25 °C	Día 0	1.2	99.82	0.03	0.12
	Mes 1	1.9	99.77	0.04	0.12
	Mes 2	1.8	99.75	0.06	0.12
	Mes 3	1.8	99.75	0.06	0.12
	Mes 6	1.8	99.74	0.08	0.13
40 °C	Día 0	1.2	99.82	0.03	0.12
	Mes 1	2.0	99.71	0.09	0.12
	Mes 2	1.9	99.63	0.15	0.12

	Mes 3	1.9	99.58	0.20	0.12
	Mes 6	1.9	99.30	0.39	0.14

Tabla 22. Caracterización del Compuesto 2 durante el estudio de degradación

	Probado en el tiempo	¹ HRMN	Raman	DSC
25 °C	Día 0	Prueba inicial	Prueba inicial	Prueba inicial
	Mes 1	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0
	Mes 2	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0
	Mes 3	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0
	Mes 6	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0
40 °C	Día 0	Prueba inicial	Prueba inicial	Prueba inicial
	Mes 1	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0
	Mes 2	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0
	Mes 3	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0
	Mes 6	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0	Lo mismo que el día 0

5 Se midieron estudios adicionales de la estabilidad química del Compuesto 2 para determinar los niveles de impurezas y agua. Se probaron tres condiciones: estabilidad acelerada (40 ± 2 °C / RH al $75 \pm 5\%$) durante un período de 6 meses, estabilidad ambiental (25 ± 2 °C / RH al $60 \pm 5\%$) durante un período de 9 meses y estabilidad bajo condiciones de refrigerador (5 ± 3 °C) durante un período de 9 meses. Los resultados para la estabilidad acelerada, la estabilidad ambiental y las condiciones de refrigerador se muestran en la Tabla 23, la Tabla 24 y la Tabla 25, respectivamente. Con base en los resultados de estos estudios, el Compuesto 2 es muy estable químicamente.

10 En el estudio de estabilidad acelerada (Tabla 23), en cada punto de tiempo (1^{er} mes, 3^{er} mes, y 6^{to} mes) donde se midió el Compuesto 2, la apariencia del Compuesto 2 siempre fue un sólido blanco y el IR coincidió con el estándar de referencia. Después de seis meses, las impurezas totales de la sustancia 1 relacionada fueron solamente del 0.08% y no se detectó sustancia 2 relacionada ni isómeros.

15 Tabla 23. Estabilidad acelerada (40 ± 2 °C / RH al $75 \pm 5\%$) del Compuesto 2

Elementos		Especificación	Punto de tiempo de prueba			
			Mes 0	1 ^{er} mes	3 ^{er} mes	6 ^{to} mes
Apariencia		Sólido blanco o blanquecino	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanco
IR		corresponde con el estándar de referencia	corresponde con el estándar de referencia	/	corresponde con el estándar de referencia	corresponde con el estándar de referencia
Agua		$\leq 2.0\%$	0.45%	0.21%	0.36%	0.41%
Sustancia 1 relacionada	Impureza A	$\leq 0.15\%$	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	Impureza B	$\leq 0.15\%$	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	Impureza F	$\leq 0.15\%$	N. D.	N. D.	N. D.	0.01%
	Impureza H	$\leq 0.15\%$	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

	Cualquier otra impureza individual	≤0.10%	0.01%	0.02%	0.01%	0.05%
	Impurezas totales	≤0.2%	0.01%	0.02%	0.02%	0.08%
Sustancia 2 relacionada	Impureza G	≤0.15%	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
Isómero	Impureza C	≤0.15%	N. D.	/	N. D.	N. D.
	Impureza D	≤0.15%	N. D.	/	N. D.	N. D.
	Impureza E	≤0.15%	N. D.	/	N. D.	N. D.
Ensayo		98.0% ~ 102.0%	98.8%	101.5%	99.6%	99.5%
Pruebas microbianas	TAMC	≤1000 cfu/g	<1 cfu/g	/	/	/
	Moho y levadura	≤100 cfu/g	<1 cfu/g	/	/	/
	E. coli	No detectado	N. D.	/	/	/

N. D.: No detectado

En el estudio de estabilidad ambiental donde se midieron los niveles de apariencia, IR, agua e impurezas durante nueve meses, la apariencia del Compuesto 2 siempre fue un sólido blanco y el IR siempre correspondió con la muestra de referencia. Los resultados (Tabla 24) resaltan cuán químicamente estable es el Compuesto 2. Después de 9 meses, el porcentaje de agua en la muestra era solo del 0.20% y las impurezas totales de la sustancia 1 relacionada eran solo del 0.02%. De manera similar a los estudios de estabilidad acelerada, no se detectó la sustancia 2 relacionada ni ningún isómero del Compuesto 2.

Tabla 24. Estabilidad ambiental (25 ± 2 °C / RH al $60 \pm 5\%$) del Compuesto 2

Elemento		Especificación	Punto de tiempo de prueba				
			Mes 0	1 ^{er} mes	3 ^{er} mes	6 ^{to} mes	9 ^{no} mes
Apariencia		Sólido blanco o blanquecino	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanquecino
IR		corresponde con el estándar de referencia	corresponde con el estándar de referencia	/	corresponde con el estándar de referencia	corresponde con el estándar de referencia	corresponde con el estándar de referencia
Agua		≤2.0%	0.45%	0.19%	0.29%	0.46%	0.20%
Sustancia 1 relacionada	Impureza A	≤0.15%	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	Impureza B	≤0.15%	N. D.	N. D.	0.03%	N. D.	N. D.
	Impureza F	≤0.15%	N. D.	N. D.	0.02%	0.01%	N. D.
	Impureza H	≤0.15%	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	Cualquier otra	≤0.10%	0.01%	0.01%	0.03%	0.02%	0.02%

	impureza individual						
	Impurezas totales	≤0.2%	0.01%	0.02%	0.11%	0.05%	0.02%
Sustancia 2 relacionada	Impureza G	≤0.15%	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
Isómero	Impureza C	≤0.15%	N. D.	/	N. D.	N. D.	N. D.
	Impureza D	≤0.15%	N. D.	/	N. D.	N. D.	N. D.
	Impureza E	≤0.15%	N. D.	/	N. D.	N. D.	N. D.
Ensayo		98.0% ~ 102.0 %	98.8%	101.1 %	99.6%	99.7%	100.9%
Pruebas microbianas	TAMC	≤1000 cfu/g	<1 cfu/g	/	/	/	/
	Moho y levadura	≤100 cfu/g	<1 cfu/g	/	/	/	/
	E. coli	No detectado	N. D.	/	/	/	/

N. D.: No detectado

Los resultados de la medición de la estabilidad bajo condiciones de refrigerador se muestran en la Tabla 25. Las únicas impurezas detectadas incluso después de 9 meses fueron las de la sustancia 1 relacionada y el agua. El contenido de agua después de 9 meses fue del 0.32% y las impurezas totales de la sustancia 1 relacionada fueron solo del 0.01% de la muestra. El compuesto 2 es muy estable bajo condiciones de refrigerador.

Tabla 25. Estabilidad bajo condiciones de refrigerador (5 ± 3 °C) del Compuesto 2

Elemento		Especificación	Punto de tiempo de prueba				
			0 meses	1 ^{er} mes	3 ^{er} mes	6 ^{to} mes	9 ^{no} mes
Apariencia		Sólido blanco o blanquecino	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanco	Sólido blanquecino
IR		corresponde con el estándar de referencia	corresponde con el estándar de referencia	/	corresponde con el estándar de referencia	corresponde con el estándar de referencia	corresponde con el estándar de referencia
Agua		<2.0%	0.45%	0.19%	0.32%	0.42%	0.32%
Sustancia relacionada 1	Impureza A	≤0.15%	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	Impureza B	≤0.15%	N. D.	N. D.	0.01%	N. D.	N. D.
	Impureza F	≤0.15%	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	Impureza H	≤0.15%	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

	Cualquier otra impureza individual	≤0.10%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%
	Impurezas totales	≤0.2%	0.01%	0.01%	0.03%	0.03%	0.01%
Sustancia relacionada 2	Impureza G	≤0.15%	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
Isómero	Impureza C	≤0.15%	N. D.	/	N. D.	N. D.	N. D.
	Impureza D	≤0.15%	N. D.	/	N. D.	N. D.	N. D.
	Impureza E	≤0.15%	N. D.	/	N. D.	N. D.	N. D.
Ensayo		98.0% ~ 102.0 %	98.8%	101.1 %	100.2%	98.6%	101.4%
Pruebas microbianas	TAMC	≤1000 cfu/g	<1 cfu/g	/	/	/	/
	Moho y levadura	≤100 cfu/g	<1 cfu/g	/	/	/	/
	E. coli	No detectado	N. D.	/	/	/	/

N. D.: No detectado

Ejemplo 17. Niveles plasmáticos de metabolitos después de dosis orales únicas del Compuesto 2

Se administró una dosis oral única del Compuesto 2 a ratas, perros y monos, y se midieron los niveles plasmáticos de ciertos metabolitos que se muestran en el Esquema 1.

- 5 La conversión del Compuesto 2 al Compuesto 1 y el metabolito 1-7 se muestran en la Tabla 26 y los resultados para el metabolito 1-8 y el metabolito 1-2 se muestran en la Tabla 27. En ratas, se observaron niveles bajos de exposición del Compuesto 1, pero se observaron altos niveles del metabolito 1-7, el metabolito del nucleósido del trifosfato activo (metabolito 1-6). En monos, se midieron exposiciones aproximadamente proporcionales a la dosis del Compuesto 1. En perros, se midieron exposiciones supra proporcionales del Compuesto 1,
- 10 indicativas de la eliminación metabólica en el hígado. A lo largo del estudio, se observaron significativamente más vómitos en los perros (5/5 en el grupo de dosis alta) que en los monos (1/5 en el grupo de dosis alta).

Tabla 26. Niveles plasmáticos del Compuesto 1 y del metabolito 1-7 después de dosis orales únicas del Compuesto 2

Especies	Dosis* (mg/kg)	Compuesto 1			Metabolito 1-7	
		C _{máx} (ng/mL)	T _{máx} (hr)	AUC _{0-último} (hr*ng/mL)	C _{máx} (ng/mL)	AUC _{0-último} (hr*ng/mL)
Rata ^a	500	70.5	0.25	60.9	748	12000
Perro ^b	30	1530	0.25-1	1300	783	9270
	100	8120	0.5-1	10200	2030	24200
	300	21300	204	44300	4260	60800
Mono ^b	30	63.5	0.5-2	176	42.5	1620
	100	783	1-2	1100	131	3030
	300	501	204	1600	93.6	3660

3 machos por dosis por especie; *formulaciones de dosificación: ^aCMC al 0.5%, Tween 80 al 0.5% en agua, ^bpolvo en cápsulas

Tabla 27. Niveles plasmáticos de los metabolitos 1-8 y 1-2 después de una dosis oral única del Compuesto 2

Especies	Dosis* (mg/kg)	Metabolito 1-8		Metabolito 1-2	
		C _{máx} (ng/mL)	AUC _{0-último} (hr*ng/mL)	C _{máx} (ng/mL)	AUC _{0-último} (hr*ng/mL)
Rata ^a	500	5060	35100	9650	20300
Perro ^b	30	291	905	196	610
	100	1230	4370	886	2830
	300	5380	35300	2380	8710
Mono ^b	30	209	5690	300	1730
	100	406	12300	1350	8160
	300	518	16800	1420	11400

3 machos por dosis por especie; *formulaciones de dosificación: ^aCMC al 0.5%, Tween 80 al 0.5% en agua, ^bpolvo en cápsulas

Ejemplo 18. Exposición del tejido al trifosfato activo después de la dosis oral del Compuesto 2

Se midieron los niveles de trifosfato activo (TP) del Compuesto 2 (metabolito 1-6) en el tejido cardíaco y hepático 4 horas después de las dosis orales del Compuesto 2. Se obtuvieron muestras de hígado y corazón 4 horas después de una dosis única del Compuesto 2, se ultracongelaron, homogeneizaron y analizaron mediante LC-MS/MS para los niveles intracelulares del TP activo. Los niveles en tejido se midieron en ratas, perros y monos como se muestra en la Figura 16A. Se midieron niveles elevados del TP activo en el hígado de todas las especies analizadas. Se midieron niveles relativamente bajos del TP activo en los corazones de los perros debido a la saturación del metabolismo hepático del primer paso, y se midieron niveles no cuantificables del TP en corazones de ratas y monos, lo que indica una formación específica en el hígado del TP activo. Aunque no se muestra, en comparación con la dosificación del Compuesto 1, la dosificación el Compuesto 2 mejoró la distribución del TP.

Ejemplo 19. Comparación farmacológica del Compuesto 1 y del Compuesto 2 en perros

Una comparación directa de la dosificación en perros del Compuesto 1 y el Compuesto 2 se llevó a cabo. El estudio midió los niveles plasmáticos del Compuesto 1 y del metabolito 1-7 (del Esquema 1) hasta 4 horas después de la dosificación con el Compuesto 1 (25 mg/kg) y el Compuesto 2 (30 mg/kg) (Tabla 28), y el AUC_(0-4 hr) del metabolito 1-7 fue el doble de grande con el Compuesto 2 en comparación con el Compuesto 1. Las exposiciones normalizadas a la dosis del Compuesto 1 y metabolito 1-7 se muestran en la Tabla 28. Los valores para AUC_(0-4 hr) para el Compuesto 1, metabolito 1-7, y la suma del Compuesto 1 + metabolito 1-7 fueron mayores después de la dosificación con el Compuesto 2.

Tabla 28. Comparación de los niveles plasmáticos después de la dosificación del Compuesto 1 y del Compuesto 2

Compuesto dosificado	^a AUC _(0-4 hr) normalizada a la dosis media (μM*hr) para:		
	Compuesto 1	Metabolito 1-7	Compuesto 1 + Metabolito 1-7
Compuesto 1 (25 mg/kg)	0.2	1.9	2.1
Compuesto 2 (30 mg/kg)	1.0	4.1	5.1

^aValores normalizados del AUC_(0-4 hr) a una dosis de 25 mg/kg

Las concentraciones de las proporciones hígado/corazón de trifosfato indican que la dosificación con el Compuesto 2, en comparación con el Compuesto 1, aumenta la administración selectiva del trifosfato al hígado,

como se muestra en la Tabla 29. El $AUC_{(0-4 \text{ hr})}$ del metabolito activo de guanina (1-6) medido después de la administración del Compuesto 1 medido en el corazón fue de 174 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$, mientras que el $AUC_{(0-4 \text{ hr})}$ del metabolito activo de guanina (1-6) medido después de la administración del Compuesto 2 en el corazón fue de 28 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$. La proporción hígado/corazón para el Compuesto 2 fue de 20 en comparación con una proporción hígado/corazón de 3.1 para el Compuesto 1.

Tabla 29. Comparación de la exposición del hígado y el corazón después de la dosificación de los Compuestos 1 y 2

Compuesto dosificado	^a $AUC_{(0-4 \text{ hr})}$ normalizada a la dosis media ($\mu\text{M}\cdot\text{hr}$) para:		
	Hígado	Corazón	Hígado / Corazón
Compuesto 2	565	28 ^b	20
Compuesto 1	537	174	3.1

^aConcentraciones del TP activo (1-6; Esquema 1) normalizadas a una dosis de 25 mg/kg

^bExtrapolado por debajo del límite inferior de cuantificación de la curva de calibración

- El efecto de una mayor selectividad por el hígado sobre el corazón cuando el Compuesto 2 se administró en comparación con el Compuesto 1 también se muestra en la Figura 16B. Los niveles de trifosfato activo en el tejido cardíaco y hepático después de una dosis del Compuesto 2 (30 mg/kg) se compararon con los niveles en tejido del trifosfato activo después de una dosis del Compuesto 1 (25 mg/kg). La concentración del TP activo fue mayor en el hígado que en el corazón para el Compuesto 1 y el Compuesto 2, pero el TP activo fue más selectivo para el hígado que para el corazón cuando se dosificó el Compuesto 2 en comparación con el Compuesto 1.

Ejemplo 20. Perfiles plasmáticos de metabolitos del Compuesto 2 en ratas y monos

A ratas Sprague-Dawley macho y monos cinomólogos (3 animales por grupo de dosis) se les administraron dosis orales únicas del Compuesto 2. Se analizaron alícuotas de plasma preparadas a partir de muestras de sangre tratadas con Diclorvos mediante LC-MS/MS para concentraciones del Compuesto 1 y el metabolito 1-7 (el metabolito del nucleósido del trifosfato activo del Compuesto 2 se muestra en el Esquema 1) y los parámetros farmacocinéticos se determinaron utilizando WinNonlin. Los resultados de una dosis única de 500 mg/kg en ratas se muestran en la Figura 17 y los resultados para una dosis única de 30, 100 o 300 mg/kg en monos se muestran en la Figura 18. Los resultados también se resumen en la Tabla 30.

Los niveles plasmáticos elevados del metabolito 1-7, el metabolito del nucleósido del trifosfato activo (TP) del Compuesto 2, son indicativos de la formación de altos niveles del TP, incluso en ratas donde se observan niveles plasmáticos muy bajos del profármaco del nucleótido original debido a la corta vida media del Compuesto 1 en sangre de rata (<2 min). Los niveles plasmáticos persistentes del metabolito 1-7 reflejan la larga vida media del TP.

En monos, las exposiciones plasmáticas (AUC) del Compuesto 1 eran aproximadamente proporcionales a la dosis, mientras que las exposiciones del metabolito 1-7 fueron algo menores que las proporcionales a la dosis, aunque los valores del AUC tanto para el fármaco parental como para el metabolito del nucleósido del TP activo continúan aumentando hasta la dosis más alta probada (300 mg/kg).

La administración oral del Compuesto 2 en ratas y monos produjo exposiciones plasmáticas altas y dependientes de la dosis al metabolito 1-7 (el metabolito del nucleósido del trifosfato activo intracelular del Compuesto 2); las exposiciones del metabolito 1-7 continuaron aumentando hasta la dosis más alta probada, lo que refleja la formación sustancial del TP activo en estas especies.

Tabla 30. Niveles plasmáticos de los compuestos 1 y 1-7 después de una dosis oral única del Compuesto 2

	Especies	Rata ^a	Mono ^b		
	Dosis (mg/kg)	500	30	100	300
Compuesto 1	$C_{\text{máx}}$ (ng/mL)	60.8	63.5	783	501
	$T_{\text{máx}}$ (hr)	0.25	0.5-2	1-2	204

	AUC _{0-último} (hr*ng/mL)	78.2	176	1100	1600
Metabolito 1-7	C _{máx} (ng/mL)	541	42.5	131	93.6
	AUC _{0-último} (hr*ng/mL)	9640	1620	3030	3660
	T _{máx} (hr)	6-8	12-24	4	4-24
	T _{1/2} (hr)	15.3	11.5	15.0	18.8

Formulaciones de la dosis: ^aCMC al 0.5%, Tween 80 al 0.5% en agua, ^bpolvo en cápsulas

Ejemplo 21. El efecto del trifosfato activo del Compuesto 1 y del Compuesto 2 sobre la integridad mitocondrial

La eficiencia relativa de la incorporación del trifosfato activo (TP) del Compuesto 1 y Compuesto 2, metabolito 1-6 (Esquema 1), mediante la ARN polimerasa mitocondrial humana se comparó con la eficiencia relativa del TP activo de sofosbuvir y el TP activo de INX-189. No es probable que el Compuesto 1 y el Compuesto 2 afecten la integridad mitocondrial ya que su trifosfato activo es incorporado pobremente por la ARN polimerasa mitocondrial humana con una eficiencia similar a la del trifosfato de sofosbuvir; la eficiencia relativa de incorporación del trifosfato de INX-189 fue hasta 55 veces mayor. Los resultados se muestran en la Tabla 31. La incorporación de estos análogos mediante la ARN polimerasa mitocondrial humana dependiente del ARN (POLRMT) se determinó de acuerdo con Arnold et al. (Sensitivity of Mitochondrial Transcription and Resistance of RNA Polymerase II Dependent Nuclear Transcription to Antiviral Ribonucleotides. *PLoS Pathog*, 2012, 8, e1003030).

Tabla 31. Parámetros cinéticos para los análogos de nucleótidos evaluados con ARN polimerasa mitocondrial humana

Análogo del nucleótido	K _{pol} (s ⁻¹)	K _{d,app} (μM)	K _{pol} /K _{d,app} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	Eficiencia relativa*
2'-desoxi-2'-F-2'-C-metilo UTP (TP activo de sofosbuvir)	0.00034 ± 0.00005	590 ± 250	5.8 × 10 ⁻⁷ ± 2.6 × 10 ⁻⁷	1.0 × 10 ⁻⁶
2'-C-metilo GTP (TP activo de INX-189)	0.051 ± 0.002	240 ± 26	2.1 × 10 ⁻⁴ ± 0.2 × 10 ⁻⁴	5.5 × 10 ⁻⁵
TP activo del Compuesto 1 y del Compuesto 2 (metabolito 1-6)	0.0017 ± 0.0002	204 ± 94	8.3 × 10 ⁻⁶ ± 4.0 × 10 ⁻⁶	2.2 × 10 ⁻⁶

*Eficiencia relativa = (K_{pol}/K_{d,app})_{nucleótido análogo} / (K_{pol}/K_{d,app})_{nucleótido natural}

Ejemplo 22. Actividad del Compuesto 1 contra replicones que contienen la secuencia de NS5B

Un panel de replicones que contienen las secuencias de NS5B de varios genotipos del HCV derivados de 6 cepas de referencia de laboratorio (GT1a, 1b, 2a, 3a, 4a y 5a) (Figura 19) y de 8 muestras de plasma de pacientes con HCV (GT1a, 1b, 2a, 2b, 3a-1, 3a-2, 4a y 4d) (Figura 20) se utilizaron para determinar la potencia del Compuesto 1 y sofosbuvir.

El Compuesto 1 fue más potente que el sofosbuvir contra las cepas clínicas y de laboratorio del HCV. El Compuesto 1 mostró una potente actividad antiviral pangenotípica *in vitro* contra aislados clínicos de tipo silvestre con EC₉₅ < 80 nM, la cual es de 4 a 14 veces más potente que el sofosbuvir. Como se muestra en la Figura 20, los valores de EC₉₅ del Compuesto 1 fueron de 7-33 veces menores que el sofosbuvir contra aislados clínicos de todos los genotipos del HCV analizados. Los valores de EC₉₅ del Compuesto 1 fueron de 6-11 veces menores que el sofosbuvir contra cepas de laboratorio de los genotipos 1 a 5 del HCV (Figura 19).

Ejemplo 23. Estudio de dosis única ascendente (SAD) del Compuesto 2 en voluntarios sanos (Parte A) y pacientes infectados con GT1-HCV (Parte B)

Se probó el Compuesto 2 en un estudio de dosis única ascendente (SAD) para medir su seguridad, tolerabilidad y farmacocinética en sujetos sanos (Parte A). La Parte A fue un estudio SAD aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo. Los sujetos sanos de la Parte A recibieron una dosis única del Compuesto 2 o del placebo en estado de ayuno. Los sujetos estuvieron confinados en la clínica desde el día -1 hasta el día 6.

La dosificación en cada cohorte se escalonó de tal manera que 2 sujetos (1 activo: 1 placebo) se evaluaron durante 48 horas después de la dosificación antes de que se dosificara el resto de la cohorte. Cada cohorte recibió el Compuesto 2 en orden ascendente. La dosificación de cohortes secuenciales se realizó con base en la revisión de los datos de seguridad disponibles (hasta el día 5) y los datos farmacocinéticos plasmáticos (hasta 24 h) de la cohorte anterior.

Se procedió a escalar la dosis después de la revisión satisfactoria de estos datos. A medida que surgieron datos farmacocinéticos y de seguridad de las cohortes anteriores, las dosis evaluadas en las cohortes 3a-4a se ajustaron mediante incrementos no mayores a 100 mg. La dosis máxima total evaluada en la Parte A no superó los 800 mg. El régimen de dosificación para la Parte A se muestra en la Tabla 32.

Tabla 32. Régimen de dosificación para la administración del Compuesto 2, Parte A del estudio

Cohorte	Población	N (activo: placebo)	Compuesto 2 (Compuesto 1)*
1a	Saludable	6:2	50 (45) mg × 1 día
2a	Saludable	6:2	100 (90) mg × 1 día
3a	Saludable	6:2	200 (180) mg × 1 día
4a	Saludable	6:2	400 (360) mg × 1 día

*Las dosis clínicas se expresan en términos del Compuesto 2, con el equivalente de base aproximado del Compuesto 1 entre paréntesis.

Los voluntarios sanos en la Parte A del estudio fueron sujetos masculinos y femeninos de entre 18 y 65 años. Los receptores del activo y del placebo se agruparon dentro de cada cohorte de la Parte A para preservar el estudio ciego.

También se probó el Compuesto 2 en un estudio de dosis única ascendente (SAD) para medir su seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y actividad antiviral en pacientes infectados con GT1-HCV (Parte B). Los sujetos de la Parte B recibieron una dosis única del Compuesto 2 en el estado de ayuno. Los pacientes estuvieron confinados en la clínica desde el día -1 hasta el día 6.

La Parte B se inició después de la revisión de los datos de seguridad (hasta el día 5) y farmacocinéticos plasmáticos (hasta las 24 h) de la cohorte 3a de la Parte A. Los datos de seguridad disponibles (hasta el día 5) y los datos farmacocinéticos (hasta las 24 h) se revisaron para la primera cohorte de la Parte B (cohorte 1b) antes de inscribir a las cohortes posteriores en la Parte B. Las cohortes subsiguientes en la Parte B solo se dosificaron después de revisar los datos de seguridad y farmacocinéticos disponibles de las dosis respectivas de la Parte A, así como la seguridad disponible (hasta el día 5) de las cohortes anteriores de la Parte B.

Después de la revisión satisfactoria de estos datos se procedió a escalar la dosis hasta 600 mg en pacientes infectados con el HCV. El régimen de dosificación para la Parte B se muestra en la Tabla 33.

Tabla 33. Régimen de dosificación del Compuesto 2 en la parte B del estudio

Cohorte	Población	N (activo)	Compuesto 2 (Compuesto 1)*
1b	Infectado por GT1 HCV	3	100 (90) mg × 1 día
2b	Infectado por GT1 HCV	3	300 (270) mg × 1 día
3b	Infectado por GT1 HCV	3	400 (360) mg × 1 día
4b	Infectado por GT1 HCV	3	600 (540) mg × 1 día

*Las dosis clínicas se expresan en términos del Compuesto 2, con el equivalente de base aproximado del Compuesto 1 entre paréntesis.

Los pacientes infectados con HCV eran sujetos infectados con GT1, no cirróticos y sin tratamiento previo, con una carga viral de $\geq 5 \log_{10}$ IU/ml.

No se registraron eventos adversos graves y no se requirieron interrupciones prematuras en la Parte A ni en la Parte B. Todos los efectos adversos fueron de intensidad leve a moderada y no se evidenciaron patrones relacionados con la dosis, incluyendo parámetros de laboratorio, signos vitales y ECGs.

Ejemplo 24. Resultados del estudio de dosis única ascendente (SAD) del Compuesto 2

La farmacocinética del Compuesto 1 y el nucleósido del metabolito 1-7 se midieron después de la dosis única del Compuesto 2. Las concentraciones plasmáticas mínimas C_{24} (C_{24h}) de metabolito 1-7 en pacientes infectados con HCV después de una dosis de 600 mg del Compuesto 2 fue de 25.8 ng/mL, la cual es más del doble de la dosis de concentración plasmática después de una dosis de 300 mg del Compuesto 2. El metabolito 1-7 (mostrado en el Esquema 1) solo se puede generar mediante la desfosforilación del fosfato intracelular del metabolito 1-4, metabolito 1-5, y metabolito 1-6, que es la especie activa. Por lo tanto, el metabolito 1-7 se puede considerar un sustituto de la especie activa. Los datos farmacocinéticos para todas las cohortes se muestran en la Tabla 34 y la Tabla 35. Los valores se reportan como media \pm SD, excepto para $T_{m\acute{a}x}$ donde se reporta la mediana (intervalo). Los parámetros farmacocinéticos fueron comparables en pacientes sanos e infectados con HCV.

Tabla 34. Farmacocinética humana del Compuesto 1 y del metabolito 1-7 después de la administración de una dosis única del Compuesto 2 en voluntarios sanos

	Dosis (mg)	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	AUC_{tot} (ng*h/mL)	$T_{1/2}$ (h)	C_{24h} (ng/mL)
Parte A, Sujetos sanos						
Compuesto 1	50	46.4 \pm 17.6	0.5 (0.5-0.5)	36.4 \pm 12.3	0.32 \pm 0.02	--
	100	156 \pm 96.3	0.5 (0.5-1.0)	167 \pm 110	0.53 \pm 0.24	--
	200	818 \pm 443	0.5 (0.5-3.0)	656 \pm 255	0.71 \pm 0.16	--
	400	1194 \pm 401	0.5 (0.5-1.0)	1108 \pm 326	0.86 \pm 0.15	--
Metabolito 1-7	50	27.9 \pm 5.62	3.5 (3.0-4.0)	285 \pm 69.4	7.07 \pm 4.59	2.28 \pm 0.95
	100	56.6 \pm 14.0	4.0 (3.0-6.0)	663 \pm 242	17.7 \pm 14.7	4.45 \pm 1.87
	200	111 \pm 38.8	5.0 (3.0-6.0)	1524 \pm 497	15.9 \pm 7.95	13.7 \pm 5.09
	400	153 \pm 49.4	6.0 (4.0-8.0)	2342 \pm 598	15.6 \pm 6.37	23.5 \pm 6.31

*Basado en un perfil de 24 horas.

Tabla 35. Farmacocinética humana del Compuesto 1 y del metabolito 1-7 después de la administración del Compuesto 2 en pacientes infectados con GT1-HCV

	Dosis (mg)	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	AUC_{tot} (ng*h/mL)	$T_{1/2}$ (h)	C_{24h} (ng/mL)
Compuesto 1	100	212 \pm 32.0	0.5 (0.5-1.0)	179 \pm 54.4	0.54 \pm 0.12	--
	300	871 \pm 590	0.5 (0.5-1.0)	818 \pm 475	0.64 \pm 0.20	--
	300	2277 \pm 893	0.5 (0.5-1.0)	1856 \pm 1025	0.84 \pm 0.18	--
	400	2675 \pm 2114	1.0 (1.0-2.0)	2408 \pm 1013	0.86 \pm 0.18	--
	600	3543 \pm 1649	1.0 (0.5-1.0)	4132 \pm 1127	0.70 \pm 0.13	--
Metabolito 1-7	100	50.2 \pm 15.4	6.0 (4.0-6.0)	538 \pm 103*	8.4 \pm 4.3*	3.60 \pm 0.40
	300	96.9 \pm 38.9	6.0 (3.0-6.0)	1131 \pm 273*	8.1 \pm 2.4*	10.9 \pm 3.51
	300	123 \pm 16.6	4.0 (3.0-6.0)	1420 \pm 221	--	18.0 \pm 8.83

	400	160 ± 36.7	4.0 (4.0-4.0)	2132 ± 120	11.6 ± 1.21	22.5 ± 3.29
	600	198 ± 19.3	4.0 (4.0-6.0)	2176 ± 116	--	25.8 ± 4.08

*Basado en un perfil de 24 horas.

Los perfiles de concentración plasmática media-tiempo del Compuesto 1 y del metabolito 1-7 también se calcularon para todas las cohortes de la Parte A y la Parte B del estudio. La Figura 21 es la concentración plasmática media del Compuesto 1 después de una dosis única del Compuesto 2 y la Figura 22 es la concentración plasmática media del metabolito 1-7 después de una dosis única del Compuesto 2. Como se muestra en la Figura 21, el Compuesto 1 se absorbió rápidamente y se metabolizó rápida/extensivamente en todas las cohortes de la Parte B. Como se muestra en la Figura 22, el metabolito 1-7 fue un metabolito importante y mostró concentraciones plasmáticas sostenidas. La exposición al plasma del Compuesto 1 estaba relacionada con la dosis mientras que la exposición del metabolito 1-7 fue proporcional a la dosis.

Para los sujetos infectados con HCV de la Parte B, se realizaron mediciones de cuantificación del ARN del HCV antes, durante y después de la administración del Compuesto 2. Las determinaciones del ARN del HCV en plasma se realizaron mediante el uso de un ensayo comercial validado. El valor de la línea de base se definió como la media del día -1 y el día 1 (antes de la dosis). Una dosis única de 300 mg del Compuesto 2 (equivalente a 270 mg del Compuesto 1) resultó en una actividad antiviral significativa en sujetos infectados con GT1b-HCV. La reducción máxima media del ARN del HCV 24 horas después de una dosis única de 300 mg fue de 1.7 log₁₀ IU/mL y esto se compara con una reducción de -2 log₁₀ IU/mL después de 1 día de 400 mg de monoterapia con sofosbuvir en sujetos infectados con HCV GT1a. La reducción máxima media del ARN del HCV 24 horas después de una dosis única de 100 mg fue de 0.8 log₁₀ IU/mL. La reducción máxima media del ARN del HCV fue de 2.2 log₁₀ IU/mL después de una dosis única de 400 mg. Los análisis farmacocinéticos/farmacodinámicos individuales de los sujetos individuales de la Parte B del estudio se muestran en las Figuras 23A-23F. La concentración del Metabolito 1-7 se grafica frente a la concentración de la reducción del ARN del HCV, como se muestra en las Figuras 23A-23F, la reducción del ARN del HCV en plasma se correlaciona con la exposición del metabolito 1-7 plasmático. La respuesta viral se mantiene con las concentraciones plasmáticas del metabolito 1-7 que son superiores al valor de EC₉₅ contra GT1b. La correlación entre la concentración plasmática y los niveles de reducción del ARN del HCV indica que se podrá lograr una respuesta más profunda con dosis más altas del Compuesto 2.

Ejemplo 25. Los niveles mínimos en estado estacionario previstos del metabolito 1-7 superan los valores de EC₉₅ del Compuesto 1 frente a aislados clínicos del HCV GT 1-4

Como se muestra en la Figura 24, se predijeron los niveles plasmáticos mínimos en estado estacionario (C_{24,ss}) del metabolito 1-7 después de la dosificación del Compuesto 2 en humanos (600 mg QD (equivalente de base libre de 550 mg) y 450 mg QD (equivalente de base libre de 400 mg)) y se compararon con la EC₉₅ del Compuesto 1 *in vitro* en todos los aislados clínicos analizados para determinar si la concentración plasmática en estado estacionario es consistentemente superior a la EC₉₅, lo que daría como resultado una alta eficacia contra cualquiera o todos los aislados clínicos probados *in vivo*. La EC₉₅ para el Compuesto 1 es la misma que la EC₉₅ del Compuesto 2. Para que el Compuesto 2 sea eficaz, el nivel plasmático mínimo en estado estacionario del metabolito 1-7 debe superar la EC₉₅.

Como se muestra en la Figura 24, la EC₉₅ del Compuesto 2 contra todos los aislados clínicos analizados varió de aproximadamente 18 a 24 nM.

Como se muestra en la Figura 24, el Compuesto 2 en una dosis de 450 mg QD (equivalente de base libre de 400 mg) en humanos proporciona una concentración plasmática mínima en estado estacionario (C_{24,ss}) prevista de aproximadamente 40 ng/mL. El Compuesto 2 en una dosis de 600 mg QD (equivalente de base libre de 550 mg) en humanos proporciona una concentración plasmática mínima en estado estacionario (C_{24,ss}) prevista de aproximadamente 50 ng/mL.

Por lo tanto, la concentración plasmática en estado estacionario prevista del metabolito 1-7 sustituto es casi el doble de la EC₉₅ contra todos los aislados clínicos probados (incluso el difícil de tratar GT3a), lo cual indica un rendimiento superior.

Por el contrario, la concentración de EC₉₅ del nucleótido sofosbuvir del estándar de atención varía de 50 a 265 nM en todos los aislados clínicos del HCV analizados, con una EC₉₅ menor que la concentración en estado estacionario prevista en la dosis comercial de 400 mg para solo dos aislados, GT2a y GT2b. La EC₉₅ para la dosis comercial de 400 mg de sofosbuvir es mayor que la concentración en estado estacionario prevista para otros aislados clínicos, GT1a, GT1b, GT3a, GT4a y GT4d.

La concentración plasmática mínima en estado estacionario (C_{24,ss}) del Compuesto 2 de 450 mg se predijo utilizando la concentración plasmática mínima en estado estacionario (C_{24,ss}) de 300 mg. La concentración plasmática mínima media en estado estacionario (C_{24,ss}) a 300 mg fue 26.4 ng/mL y, por lo tanto, el cálculo fue 26.4*450/300=39.6 ng/mL.

La concentración plasmática mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) de 600 mg se predijo utilizando tres aproximaciones: 1) La media de 600 mg de C_{24} Día 1 fue de 25.8 ng/mL y se asumió un aumento del 60% para alcanzar el estado estacionario. Por lo tanto, el cálculo fue $25.8 \times 1.6 = 41.3$ ng/mL; 2) La media de 400 mg de C_{24} Día 1 fue de 22.5 ng/mL y se asumió un aumento del 60% para alcanzar el estado estacionario. Teniendo en cuenta la PK proporcional a la dosis, el cálculo fue $22.5 \times 1.6 \times 600 / 400 = 54$ ng/mL; y 3) La concentración plasmática mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) de 300 mg fue 26.4 ng/mL y se asumió una PK proporcional. Por lo tanto, el cálculo fue $26.4 \times 2 = 52.8$ ng/mL. La concentración plasmática mínima en estado estacionario ($C_{24,ss}$) de 600 mg es el promedio de los 3 puntos de datos ($(41.3 + 54 + 52.8) / 3 = 49.3$ ng/mL). Generalmente hay un aumento de alrededor del 60% en C_{24} en estado estacionario en comparación con C_{24} después de una dosis única.

Los datos que comparan la eficacia y los parámetros farmacocinéticos del estado estacionario en la Figura 24 demuestran claramente la importancia terapéutica inesperada del Compuesto 2 para el tratamiento de la hepatitis C. De hecho, el nivel plasmático en estado estacionario previsto después de la administración del Compuesto 2, se predice que sea al menos dos veces mayor que la EC_{95} para todos los genotipos analizados y es de 3 a 5 veces más potente contra GT2. Estos datos indican que el Compuesto 2 tiene una potente actividad antiviral pangenotípica en humanos. Como se muestra en la Figura 24, la EC_{95} de sofosbuvir en GT1, GT3 y GT4 es superior a 100 ng/mL. De esta manera, sorprendentemente, el Compuesto 2 es activo contra el HCV en una forma de dosificación que administra una concentración mínima en estado estacionario más baja (40-50 ng/mL) que la concentración mínima en estado estacionario más (aproximadamente 100 ng/mL) alcanzada por una forma de dosificación similar de sofosbuvir.

Ejemplo 26. Descripción de la formulación y fabricación del Compuesto 2

Una fórmula de lote representativa no limitante para los comprimidos del Compuesto 2 (50 mg y 100 mg) se presenta en la Tabla 36. Los comprimidos se produjeron a partir de una mezcla común utilizando un proceso de compresión directa como se muestra en la Figura 25. El ingrediente farmacéutico activo (API) se ajusta con base en el ensayo tal cual, y el ajuste se realiza en el porcentaje de celulosa microcristalina. Se tamizaron el API y los excipientes (celulosa microcristalina, lactosa monohidrato y croscarmelosa de sodio), se colocaron en una licuadora en V (PK Blendmaster, recipiente de 0.5 L) y se mezclaron durante 5 minutos a 25 rpm. Posteriormente se cribó el estearato de magnesio, se agregó y la mezcla se mezcló durante 2 minutos más. La mezcla común se dividió para uso en la producción de comprimidos de 50 mg y 100 mg. Posteriormente, la mezcla lubricada se comprimió a una velocidad de 10 comprimidos/minuto utilizando una prensa de comprimidos de investigación de un solo punzón (Korsch XP1) y un alimentador de polvo por gravedad. Los 50 comprimidos se produjeron utilizando herramientas cóncavas redondas estándar de 6 mm y fuerzas de 3.5 kN. Los comprimidos de 100 mg se produjeron utilizando herramientas cóncavas estándar redondas de 8 mm y fuerzas de 3.9-4.2 kN.

Tabla 36. Formulación de comprimidos del Compuesto 2 de 50 mg y 100 mg

Material crudo	% p/p	g/lote	Mg/unidad	
			Comprimido de 50 mg	Comprimido de 100 mg
Compuesto 2	50.0	180.0	50.0	100.0
Celulosa microcristalina, USP/NF, EP	20.0	72.0	20.0	40.0
Lactosa monohidrato, USP/NF, BP, EP, JP	24.0	86.4	24.0	48.0
Croscarmelosa de sodio, USP/NF, EP	5.0	18.0	5.0	10.0
Estearato de magnesio, USP/NF, BP, EP JP	1.0	3.6	1.0	2.0
Total			100.0	200.0

Se ajustó el Compuesto 2 en función del ensayo tal cual, y el ajuste se realizó en el porcentaje de celulosa microcristalina. Se cribaron el Compuesto 2 y los excipientes (celulosa microcristalina, lactosa monohidrato y croscarmelosa de sodio), se colocaron en una licuadora en V (PK Blendmaster, recipiente de 0.5 L) y se mezclaron durante 5 minutos a 25 rpm. Posteriormente se cribó el estearato de magnesio, se agregó y la mezcla se mezcló durante 2 minutos más. La mezcla común se dividió para uso en la producción de comprimidos de 50 mg y 100 mg. Posteriormente, la mezcla lubricada se comprimió a una velocidad de 10 comprimidos/minuto utilizando una prensa de comprimidos de investigación de un solo punzón (Korsch XP1) y

un alimentador de polvo por gravedad. Los comprimidos de 50 mg se produjeron utilizando herramientas cóncavas redondas estándar de 6 mm y fuerzas de 3.5 kN. Los comprimidos de 100 mg se produjeron utilizando herramientas cóncavas estándar redondas de 8 mm y fuerzas de 3.9-4.2 kN. Las especificaciones de los comprimidos de 50 mg y 100 mg se muestran en la Tabla 37.

5 Tabla 37. Especificaciones de comprimidos del Compuesto 2 de 50 mg y 100 mg

	Comprimidos de 50 mg	Comprimidos de 100 mg
Peso promedio (n=10)	100 ± 5 mg	200 ± 10 mg
Peso individual	100 ± 10 mg	200 ± 20 mg
Dureza	5.3 kp	8.3 kp
Desintegración	< 15 minutos	< 15 minutos
Friabilidad	NMT al 0.5%	NMT al 0.5%

Los comprimidos producidos de 50 mg y 100 mg como se describe anteriormente se sometieron a estudios de estabilidad de 6 meses bajo tres condiciones: 5 °C (refrigeración), 25 °C/RH al 60% (ambiente) y 40 °C/RH al 75% (acelerado). Tanto los comprimidos de 50 mg como los de 100 mg fueron químicamente estables bajo las tres condiciones probadas.

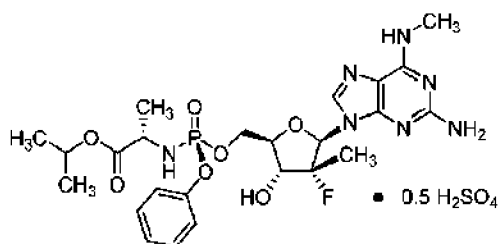
10 Bajo condiciones de refrigeración (5 °C), tanto los comprimidos de 50 mg como los de 100 mg permanecieron sólidos blancos que no cambiaron su apariencia desde T=0 hasta T=6 meses. Durante el estudio de 6 meses, no se reportaron impurezas mayores al 0.05% ni para los comprimidos de 50 mg ni para los comprimidos de 100 mg. El contenido de agua después de 6 meses también fue inferior al 3.0% p/p para ambos comprimidos. 15 Se reportaron resultados similares cuando los comprimidos se sometieron a condiciones ambientales (25 °C/RH al 60%); no se reportaron impurezas mayores a 0.05% durante los 6 meses para ambos comprimidos y el contenido de agua no excedió el 3.0% p/p en la marca de los 6 meses. Cuando los comprimidos se sometieron a condiciones aceleradas (40 °C/RH al 75%), la apariencia de los comprimidos de 50 mg y 100 mg no cambió de un comprimido blanco y redondo. Se reportó una impureza después de 3 meses, pero la impureza 20 fue solo del 0.09%. Se reportó una segunda impureza después de 6 meses, pero el porcentaje total de impurezas fue solo del 0.21% tanto para los comprimidos de 50 mg como para los de 100 mg. El contenido de agua fue del 3.4% p/p a los 6 meses para los comprimidos de 50 mg y del 3.2% p/p para los comprimidos de 100 mg.

25 En un estudio separado, se midió la estabilidad de los comprimidos del Compuesto 2 de 50 mg y 100 mg en condiciones ambientales (25 °C/RH al 60%) durante 9 meses. La apariencia de los comprimidos de 50 mg y 100 mg no cambió de un comprimido redondo blanco en el transcurso de 9 meses. Las impurezas en el comprimido de 50 mg fueron inferiores al 0.10% después de 9 meses y las impurezas en el comprimido de 100 mg fueron inferiores al 0.05%. El contenido de agua del comprimido de 50 mg y del comprimido de 100 mg después de 9 meses fue solo del 2.7% p/p y del 2.6% p/p, respectivamente.

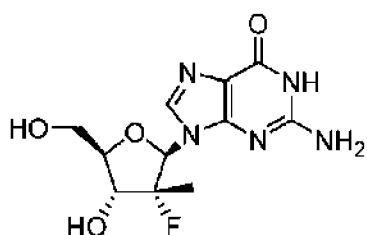
30 Esta memoria descriptiva se ha descrito con referencia a realizaciones de la invención. Sin embargo, una persona con habilidades ordinarias en la técnica apreciará que se pueden realizar diversas modificaciones y cambios sin alejarse del alcance de la invención tal como se establece en las reivindicaciones a continuación. Por consiguiente, esta memoria descriptiva debe de considerarse en un sentido ilustrativo más que restrictivo, y todas esas modificaciones están destinadas a estar incluidas dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:

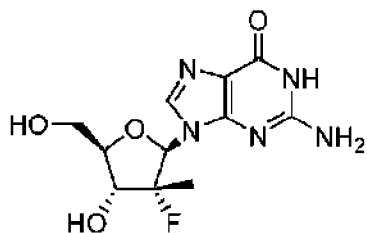


2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está al menos 90% libre del enantiómero R de fósforo opuesto.
3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está al menos 98% libre del enantiómero R de fósforo opuesto.
4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está al menos 99% libre del enantiómero R de fósforo opuesto.
5. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en una forma de dosificación oral.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que la forma de dosificación oral es una forma de dosificación sólida.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la forma de dosificación sólida es un comprimido o una cápsula.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que la forma de dosificación oral es una forma de dosificación líquida.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la forma de dosificación líquida es una suspensión o solución.
11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 5-10 que proporciona un nivel plasmático mínimo en estado estacionario ($C_{24,ss}$) del metabolito



de entre aproximadamente 20-60 ng/mL.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que el área bajo la curva del metabolito



es de entre aproximadamente 1,500 ng*h/mL y 3,000 ng*h/mL.

13. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de una infección de hepatitis C en un humano con necesidad del mismo.
14. El compuesto para uso de la reivindicación 13, en el que el compuesto se administra por vía oral.
- 5 15. El compuesto para uso de la reivindicación 13, en el que el compuesto se administra por vía intravenosa.
16. El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13 -15, en el que se administra una forma de dosificación que administra al menos 500 mg de la forma de sal de hemisulfato.
17. El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que se administra una forma de dosificación que administra al menos 600 mg de la forma de sal de hemisulfato.
- 10 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en una formulación intravenosa.
19. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en una formulación parenteral.

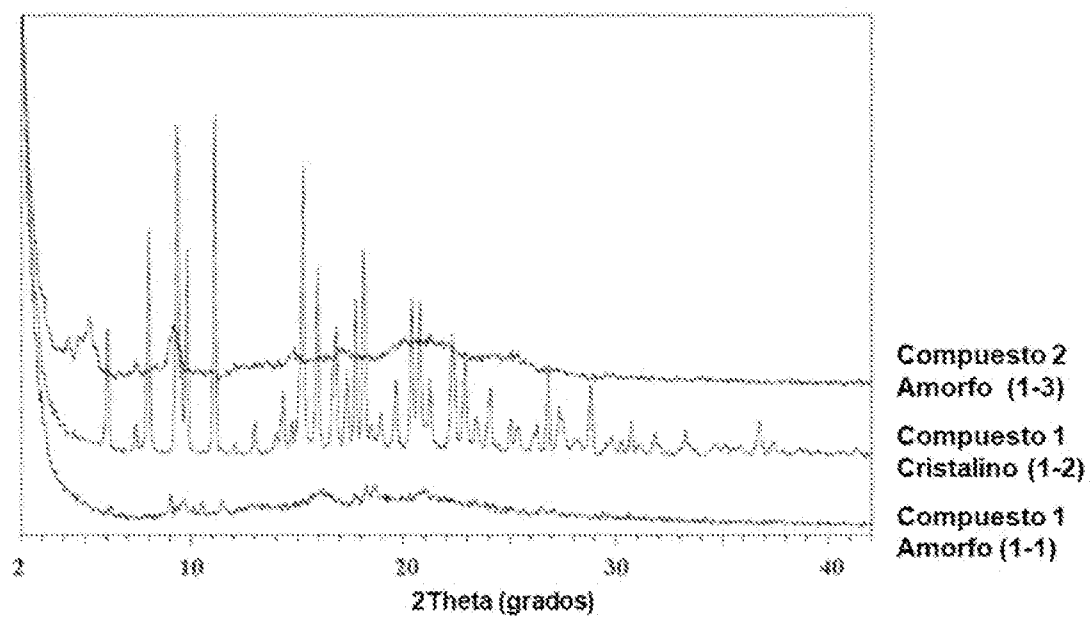


FIG. 1A

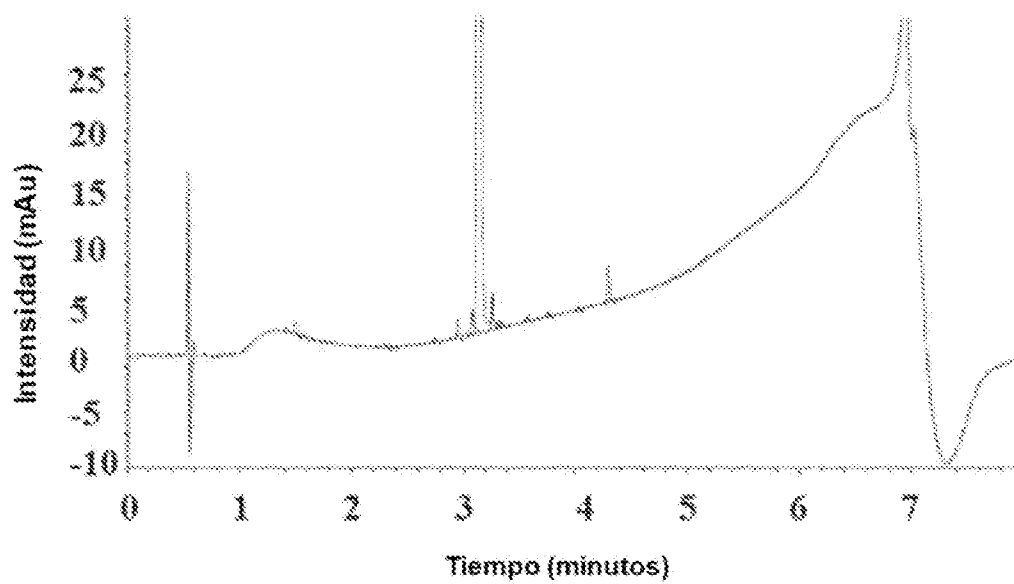


FIG. 1B

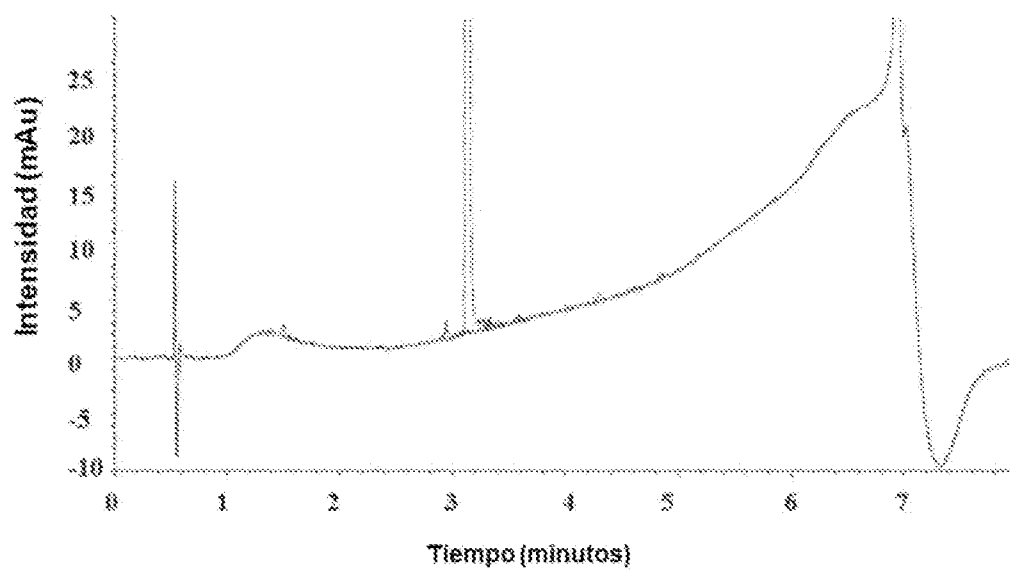


FIG. 2A

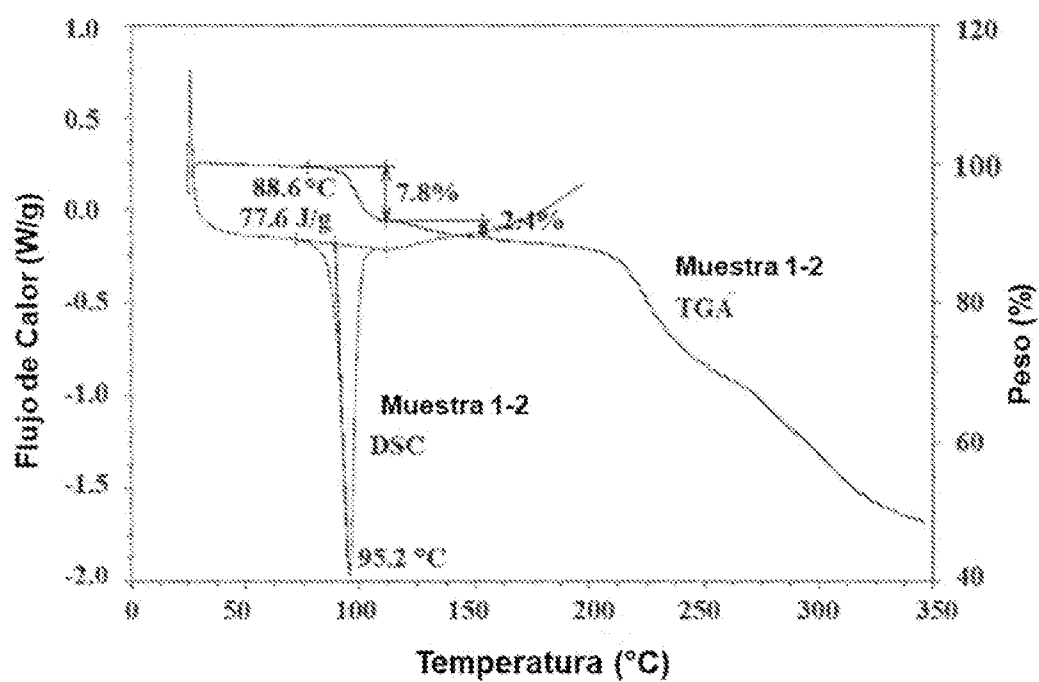
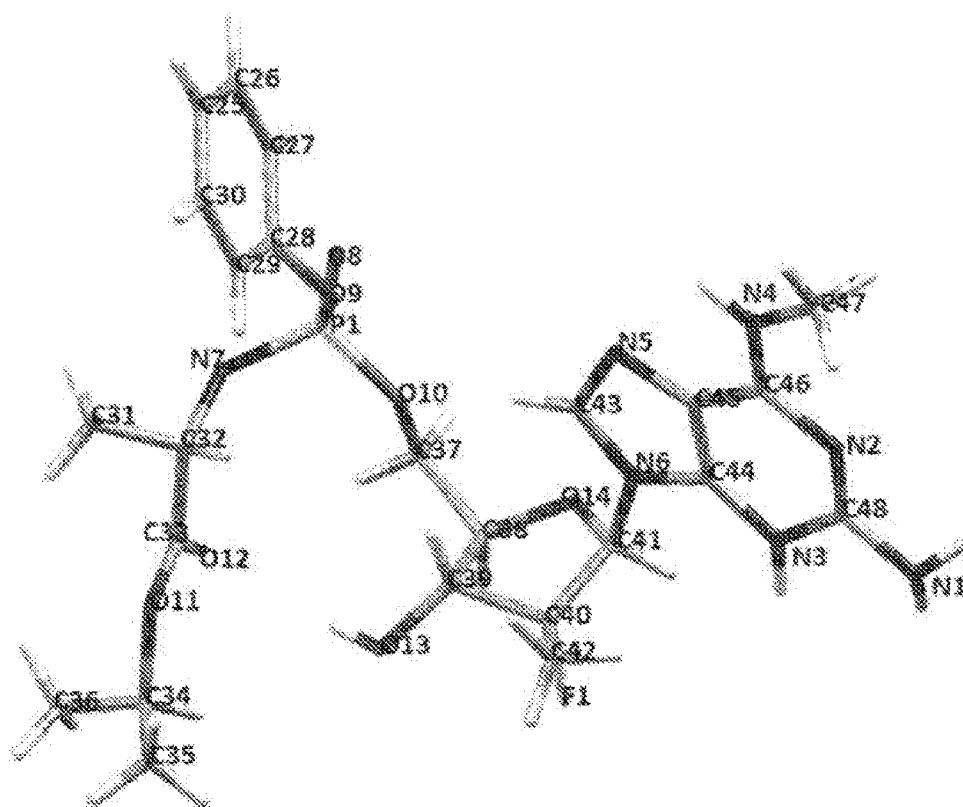


FIG. 2B



110 3

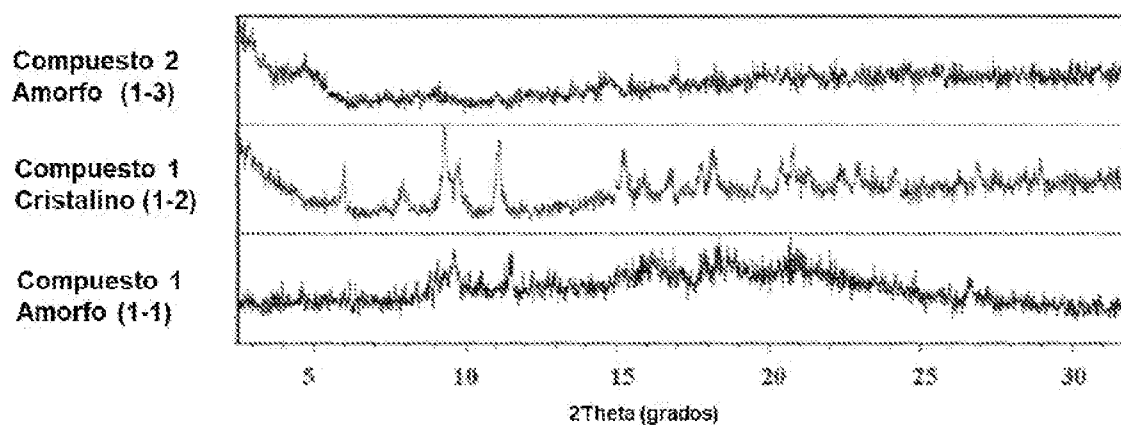


FIG. 4A

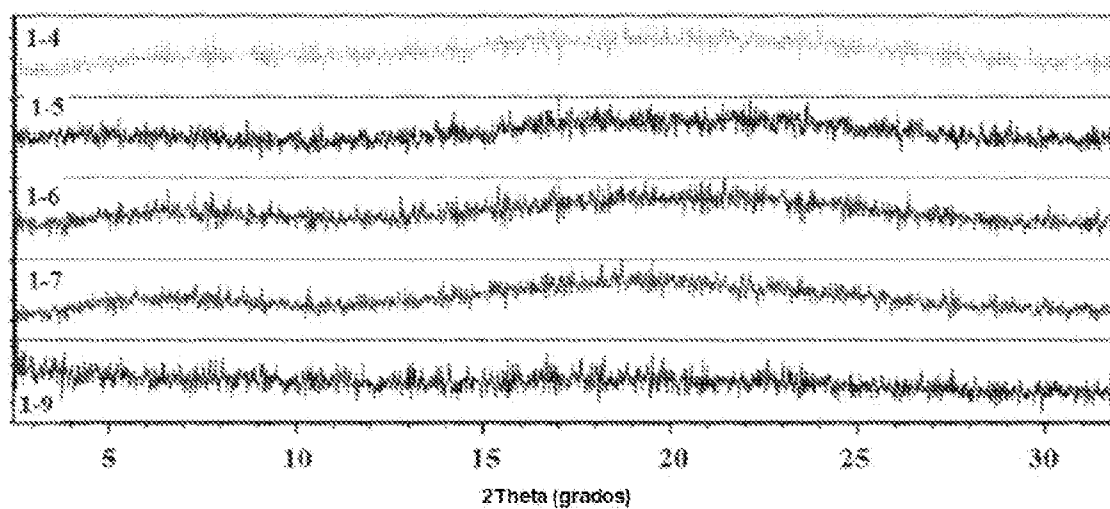


FIG. 4B

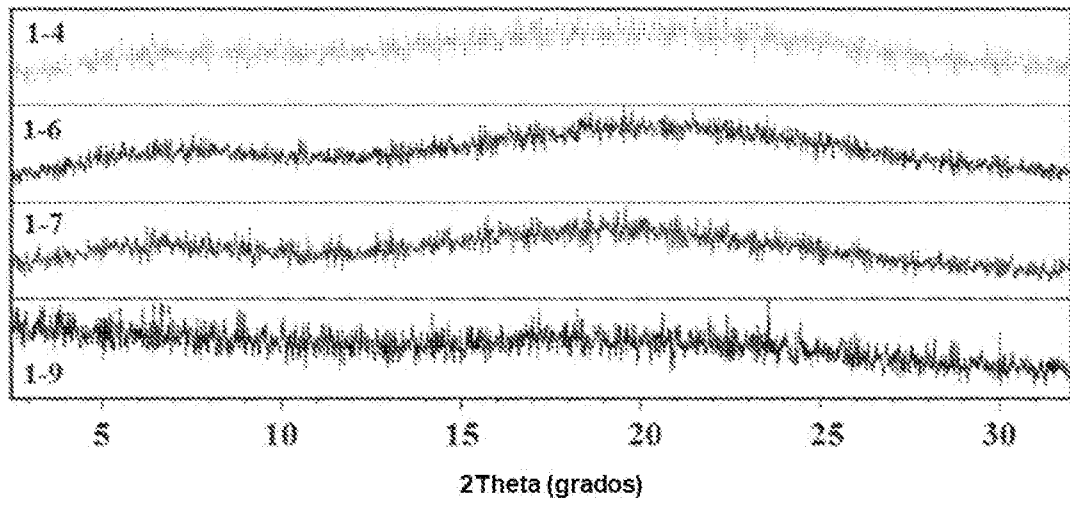


FIG. 5A

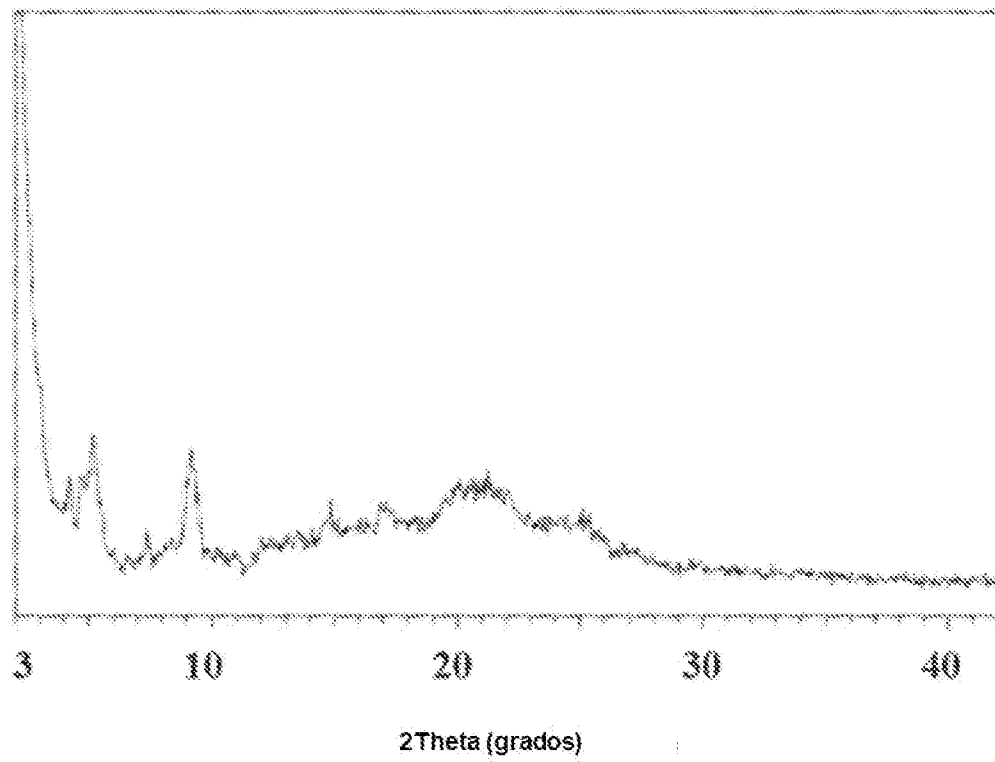


FIG. 5B

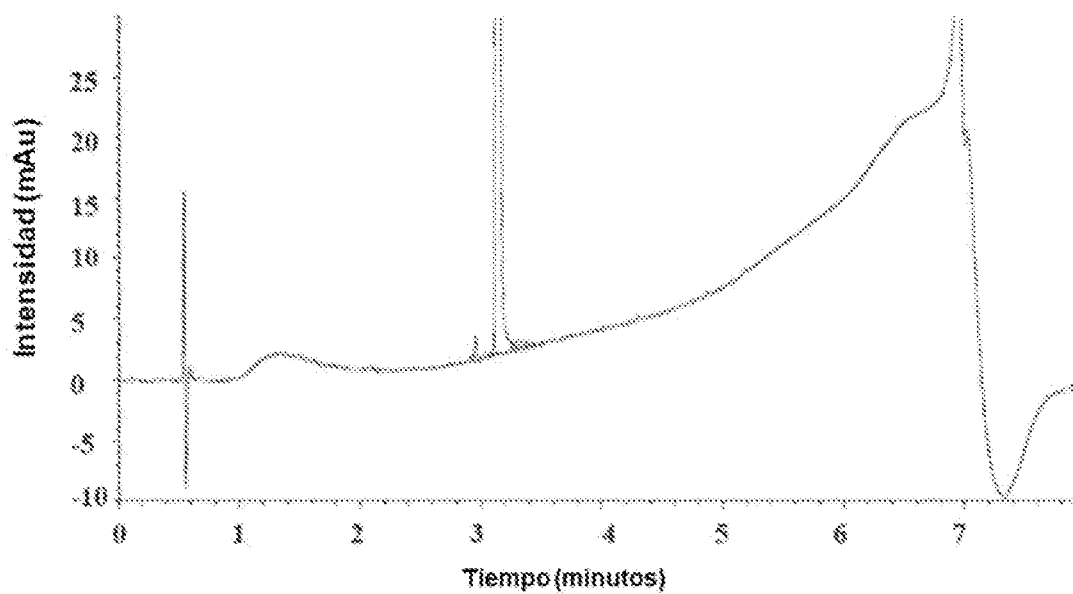


FIG. 6A

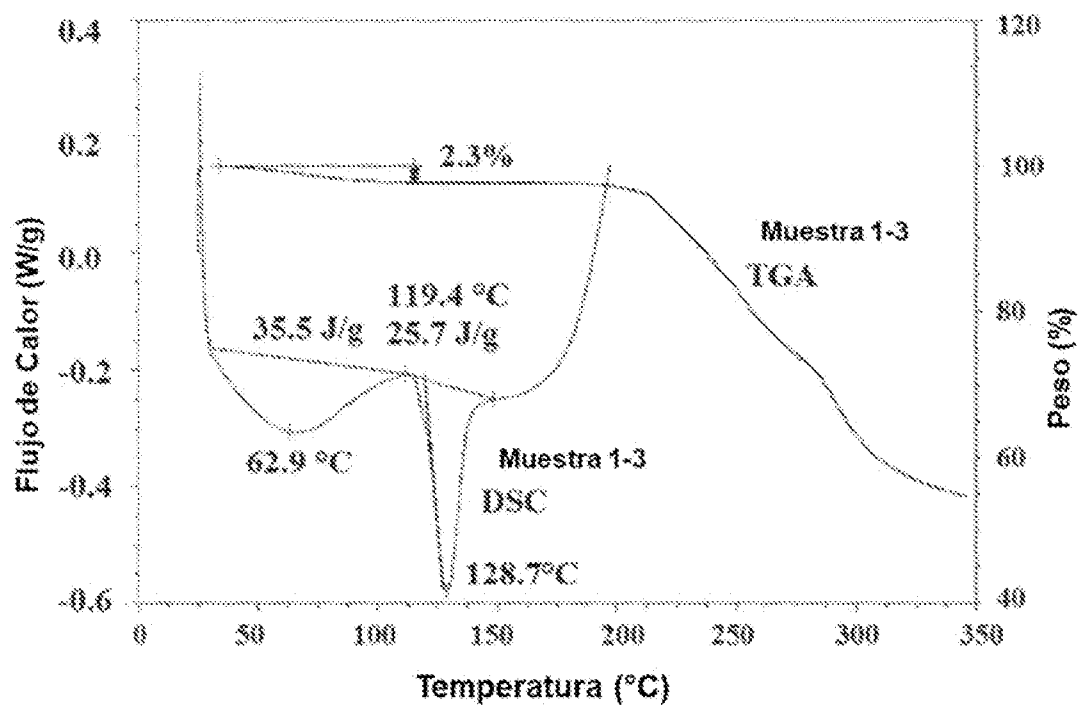


FIG. 6B

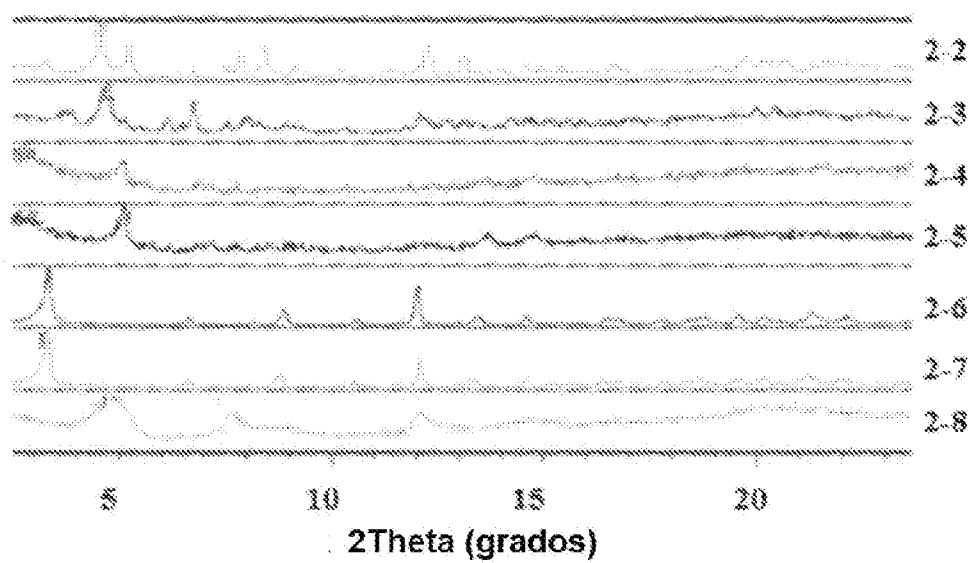


FIG. 7A

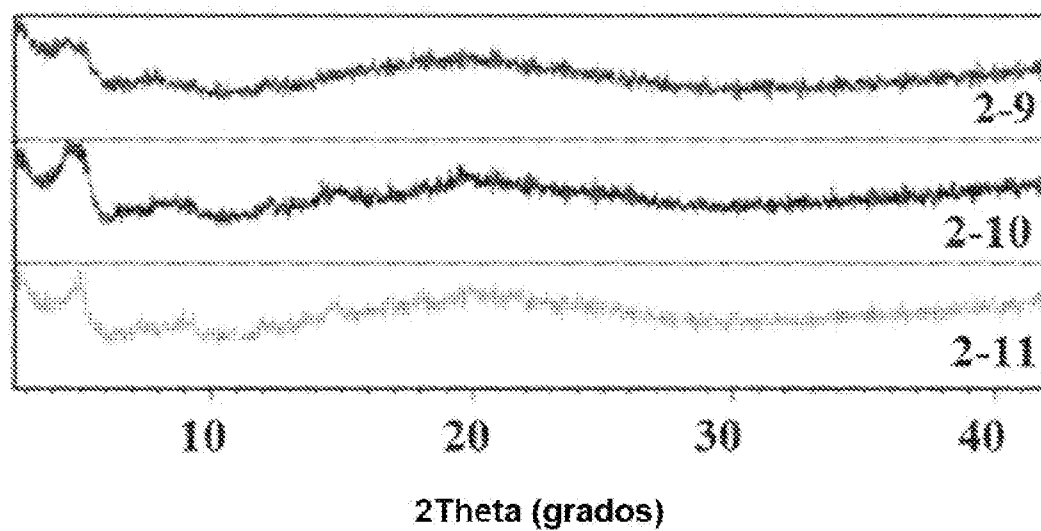


FIG. 7B

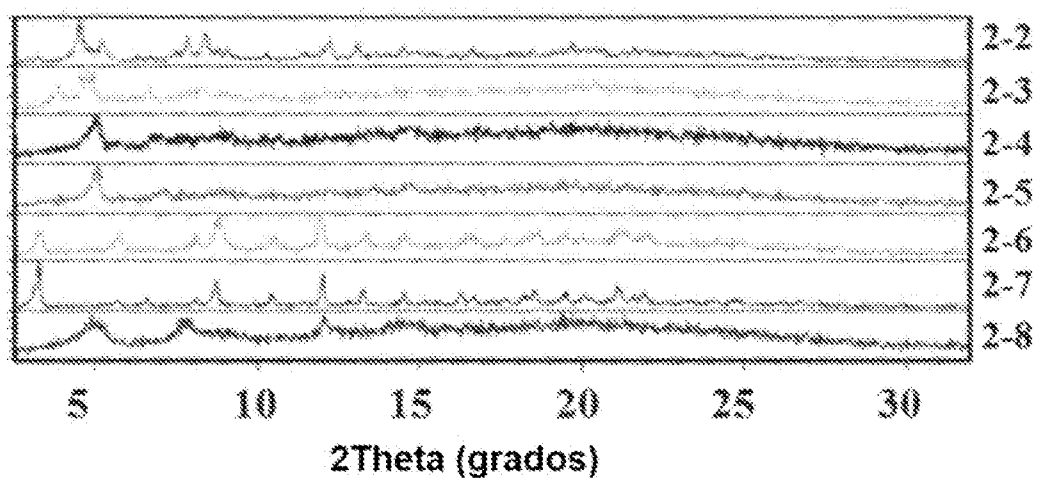


FIG. 8A

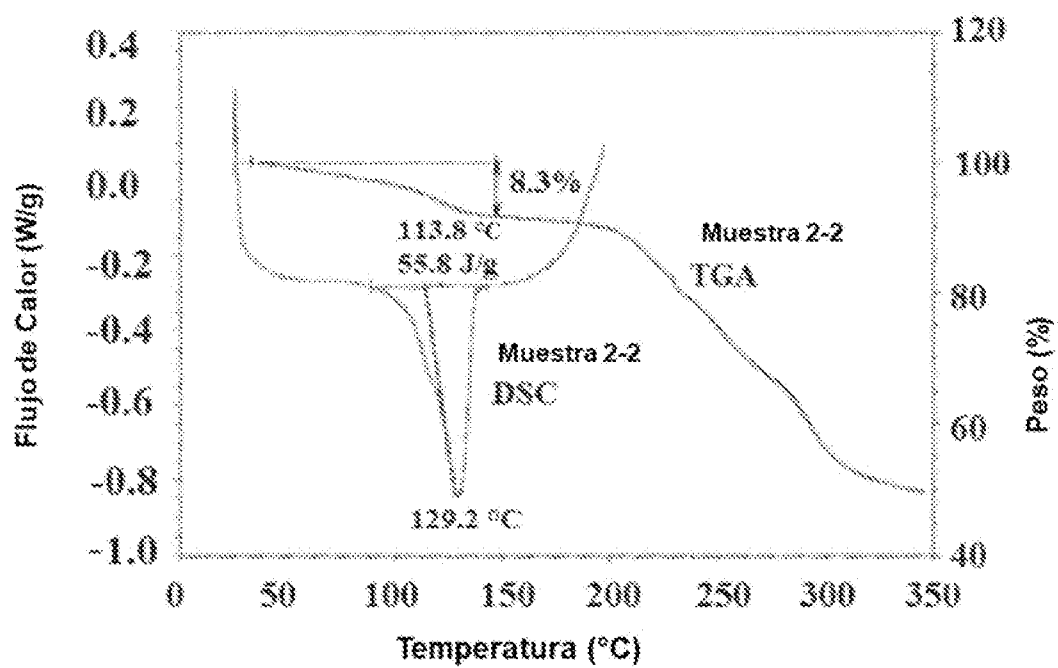


FIG. 8B

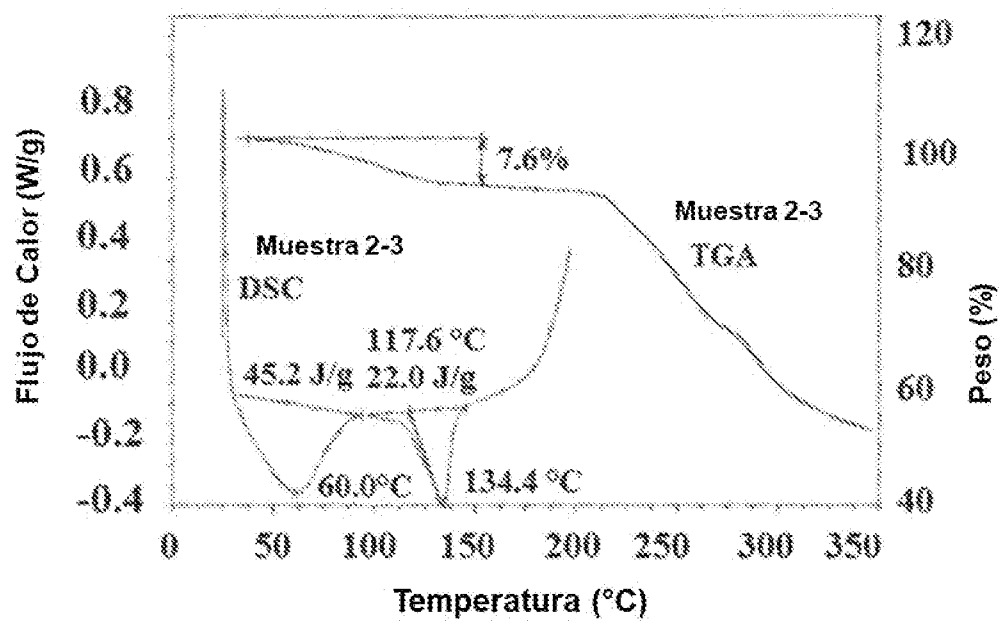


FIG. 9A

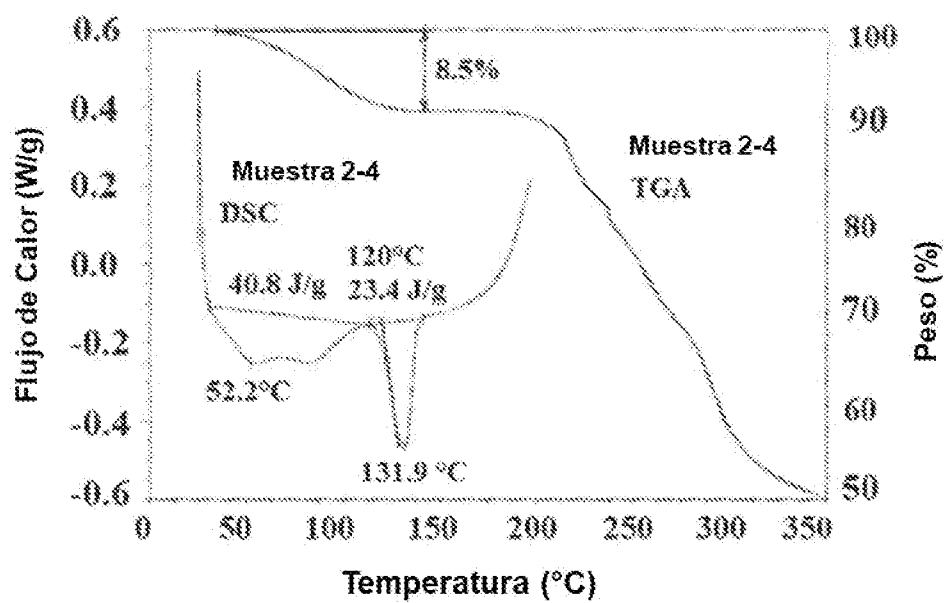


FIG. 9B

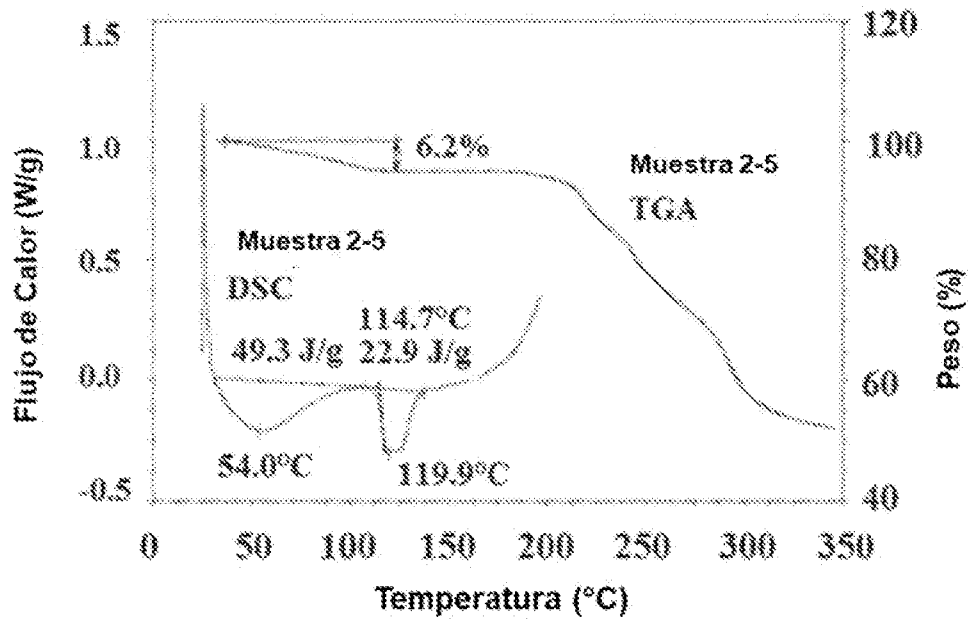


FIG. 10A

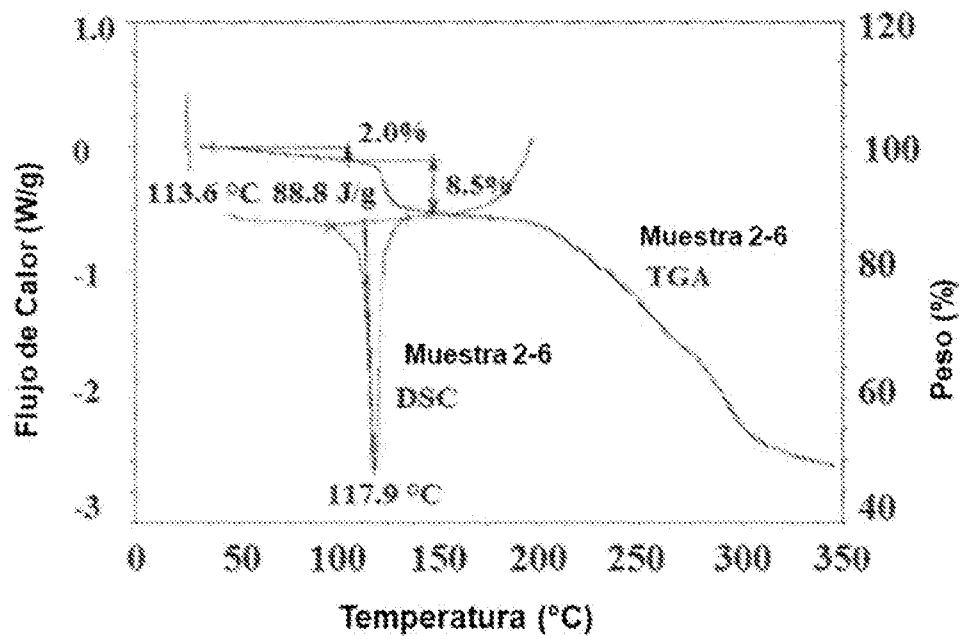


FIG. 10B

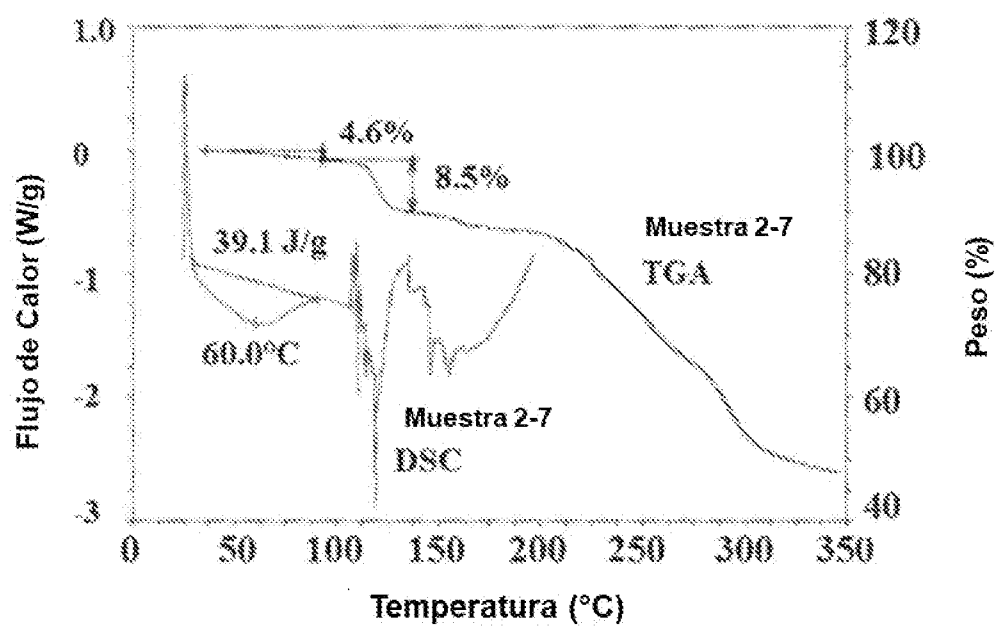


FIG. 11A

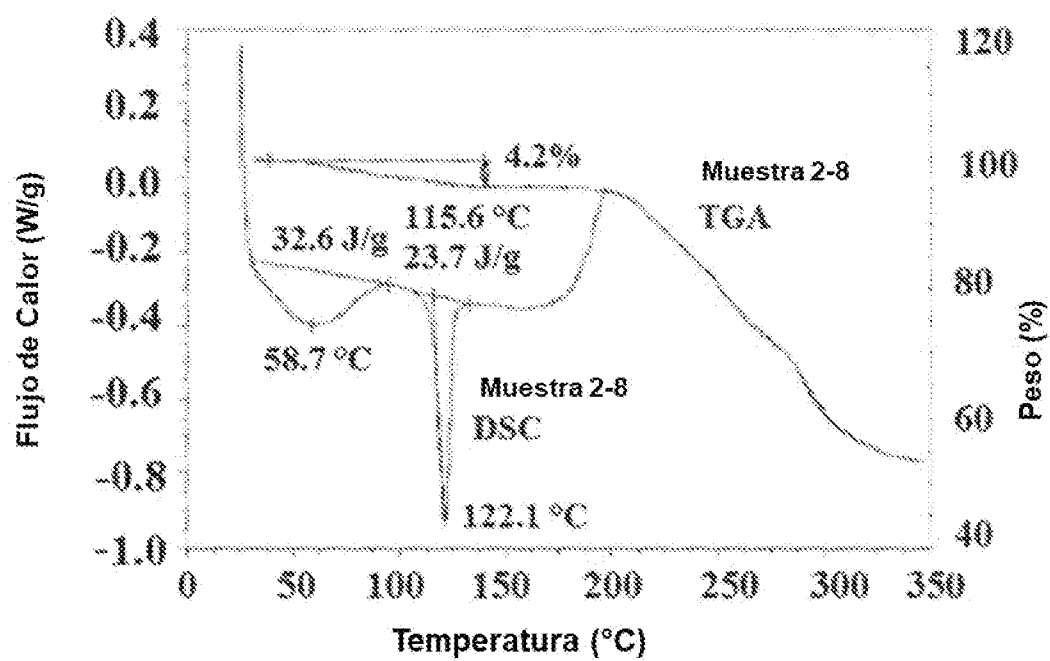


FIG. 11B

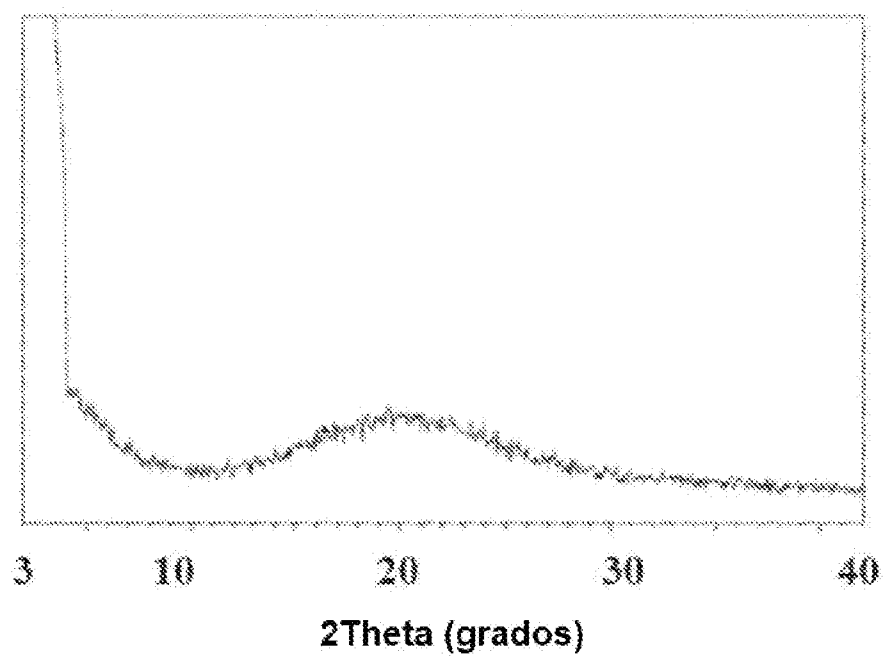


FIG. 12A

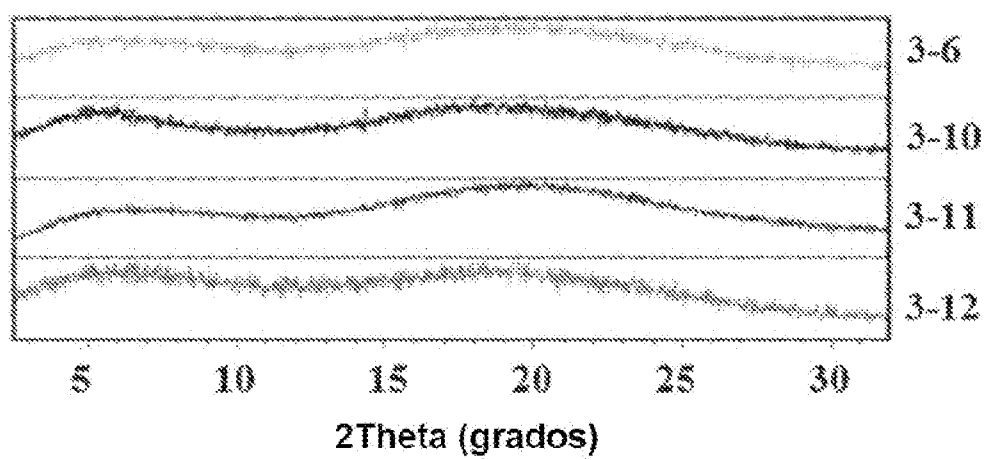


FIG. 12B

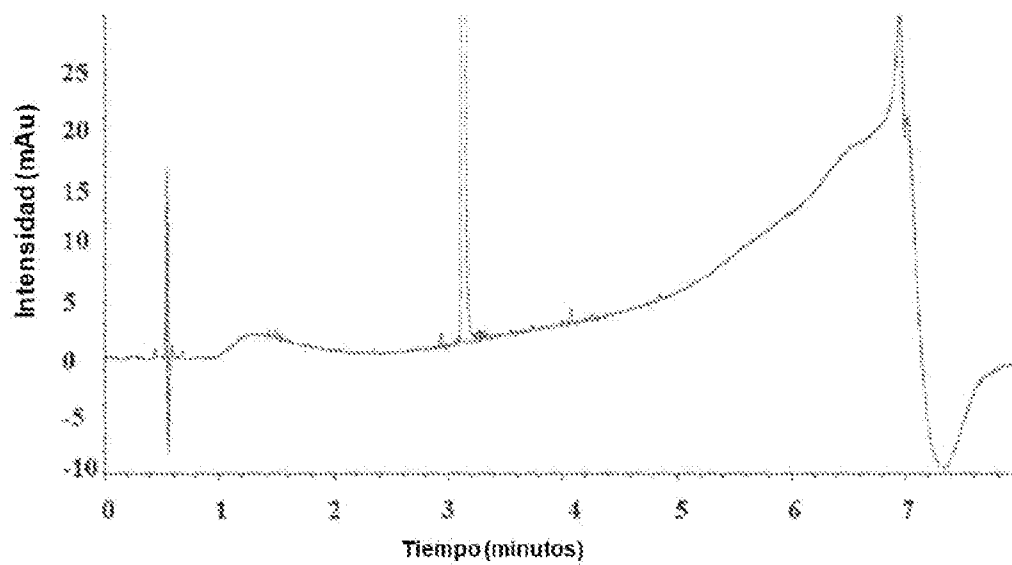


FIG 13A

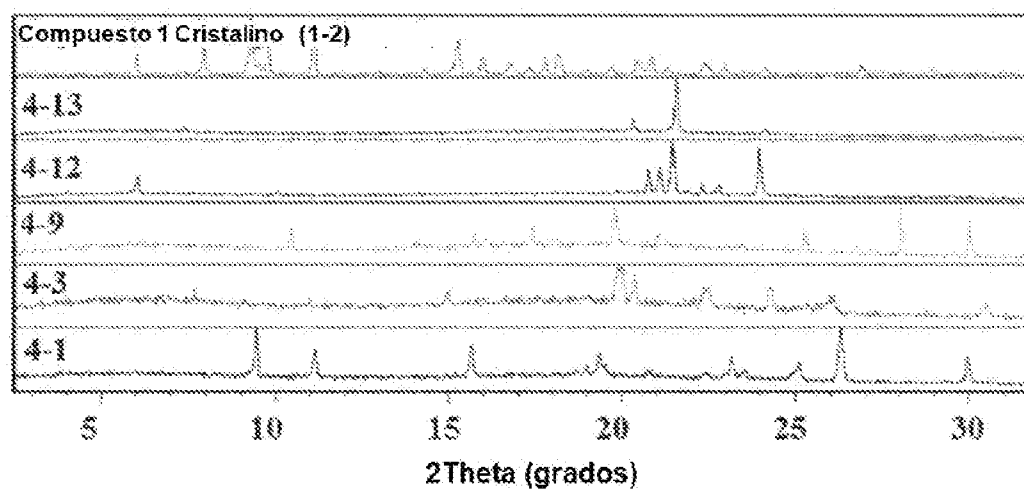


FIG 13B

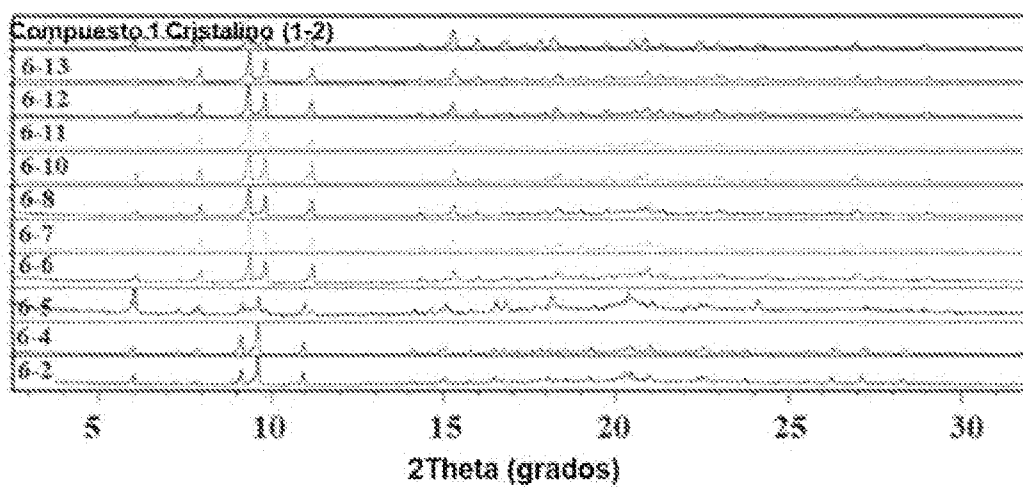


FIG. 14A

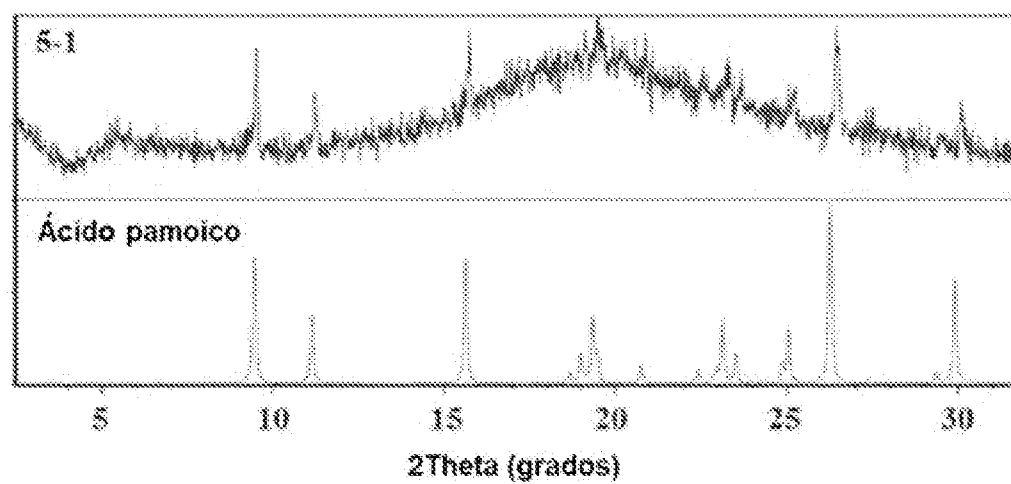


FIG. 14B

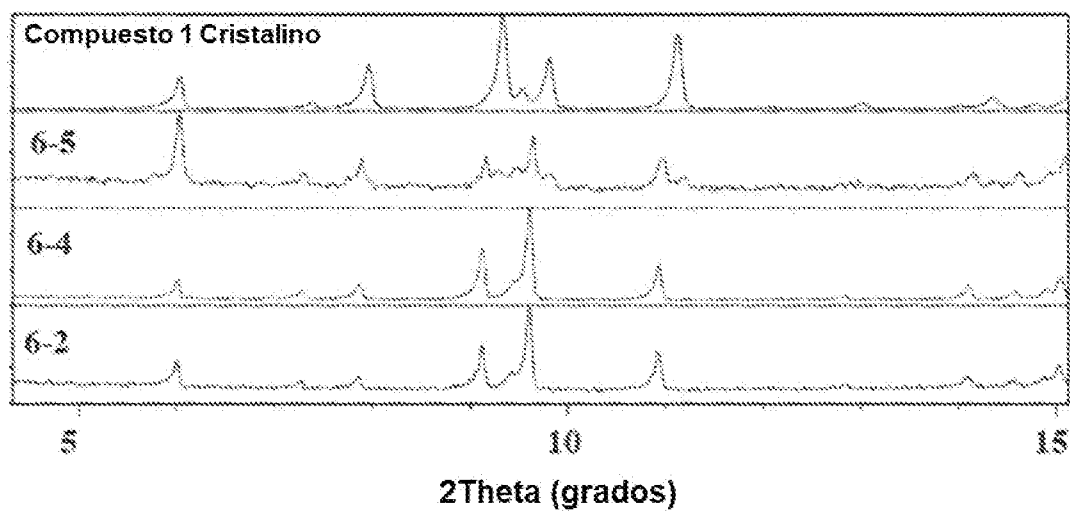


FIG. 15A

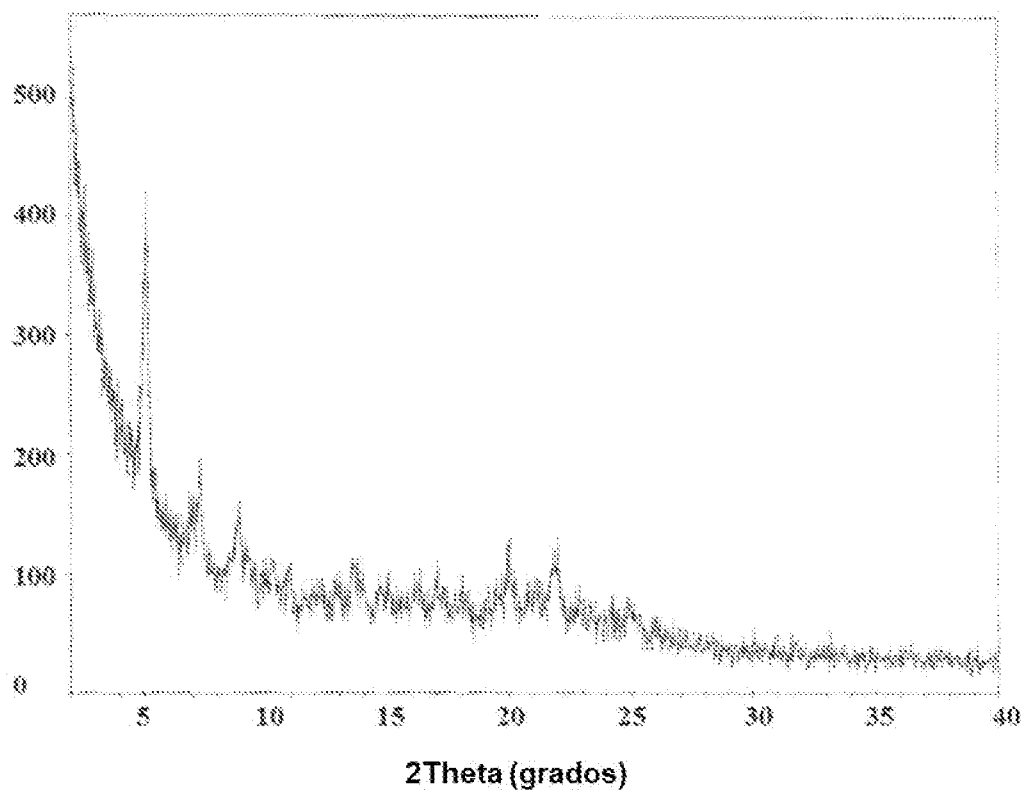


FIG. 15B

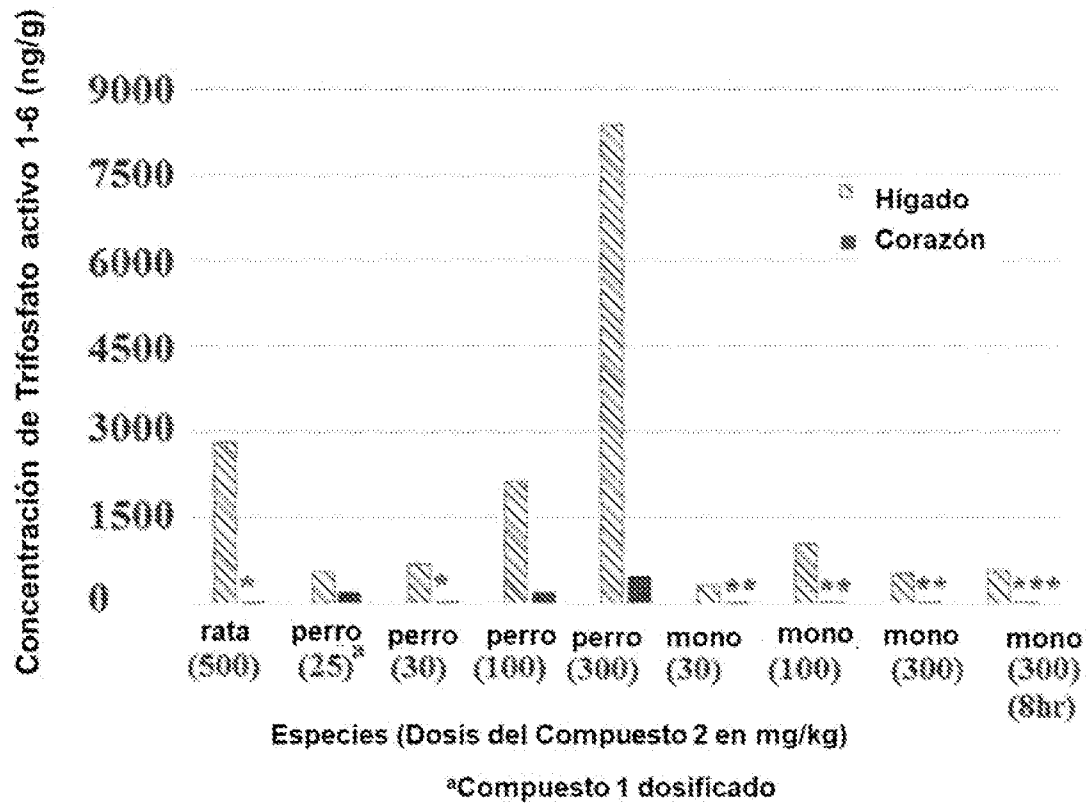


FIG. 16A

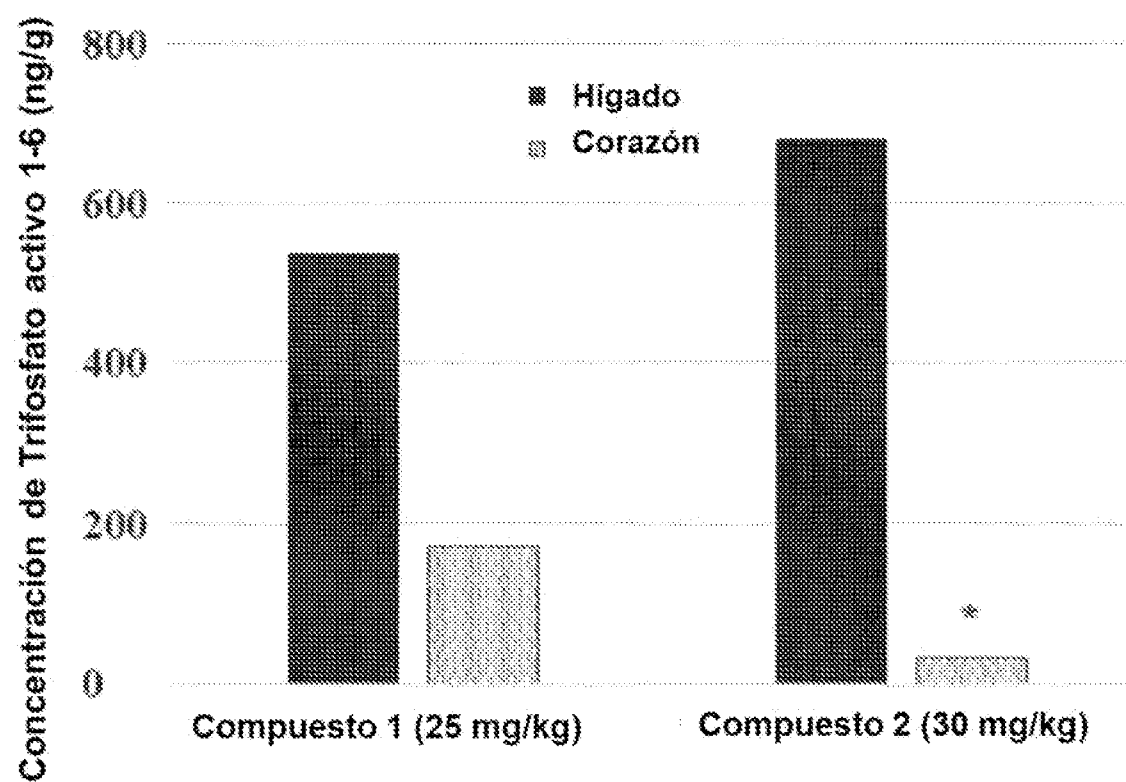


FIG. 16B

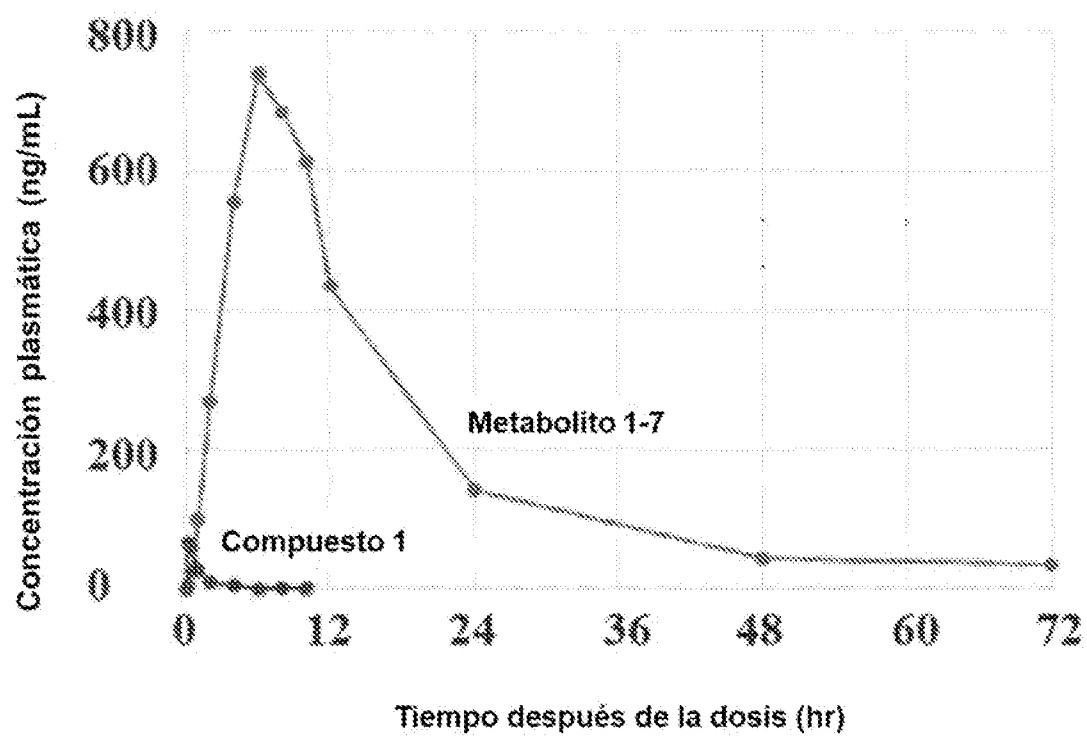


FIG. 17

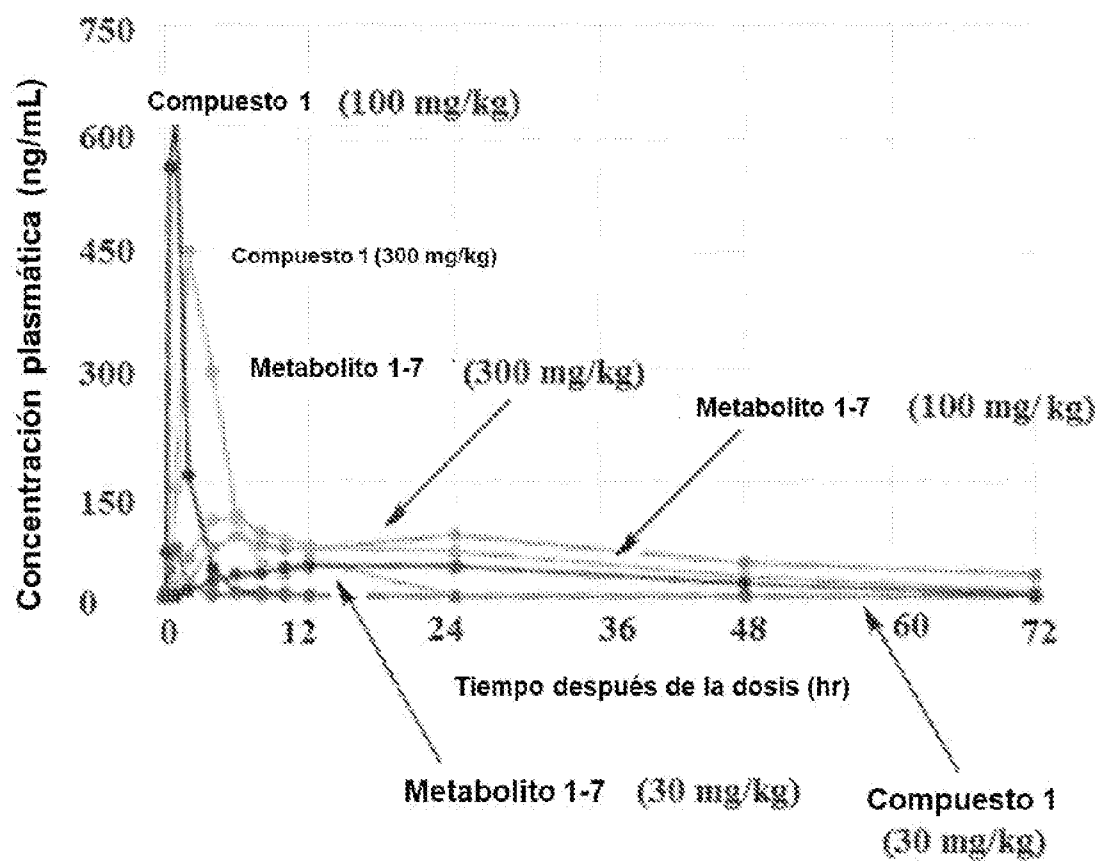


FIG. 18

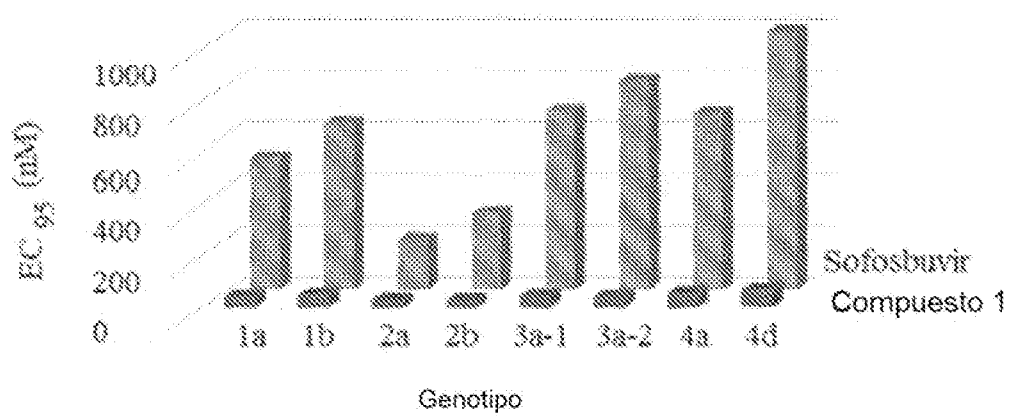


FIG. 19

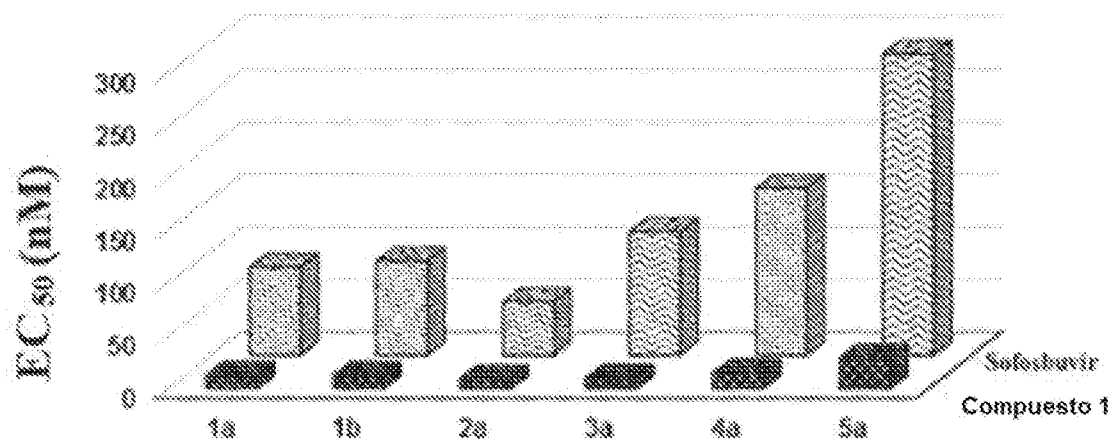


FIG. 20

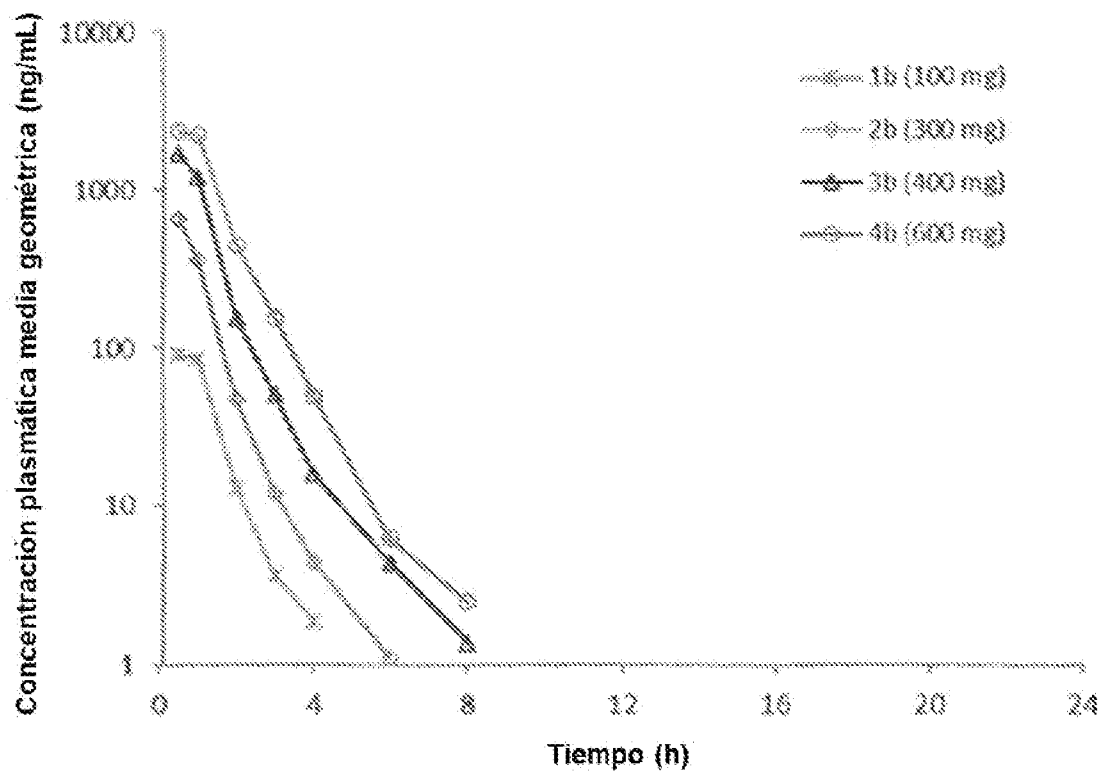
PK plasmática del Compuesto 1

FIG. 21

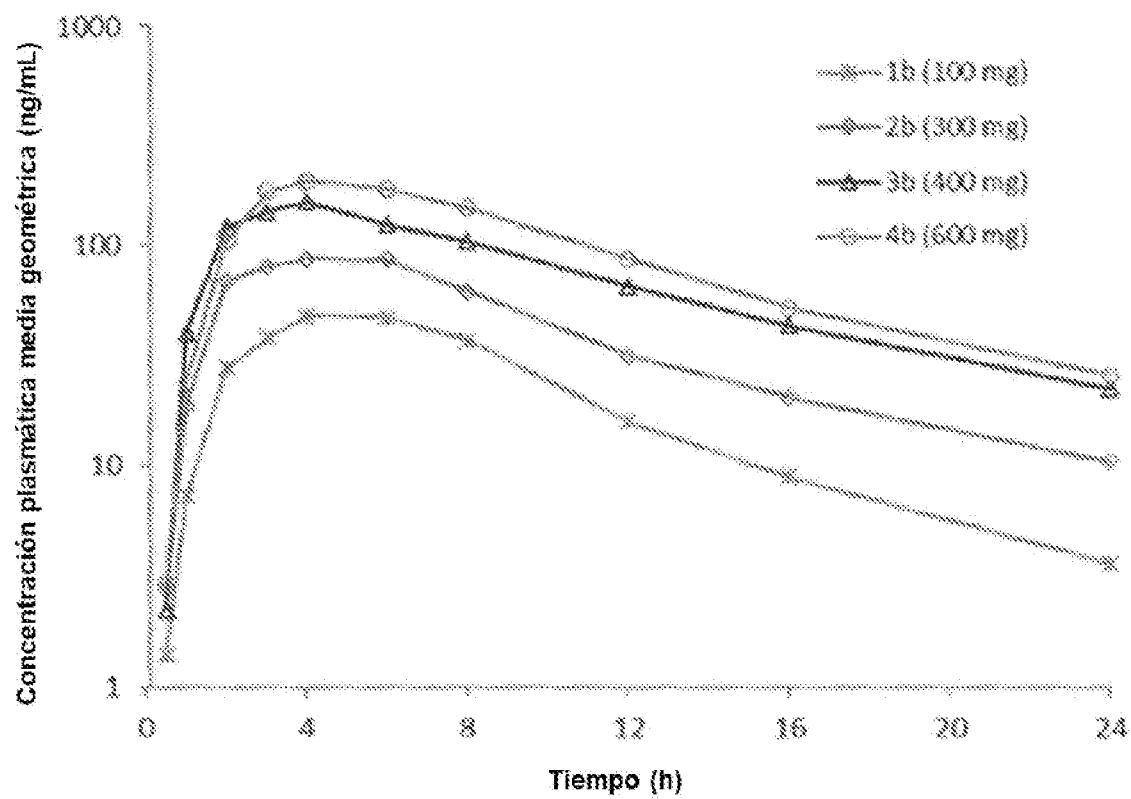
PK plasmática del Metabolito 1-7

FIG. 22

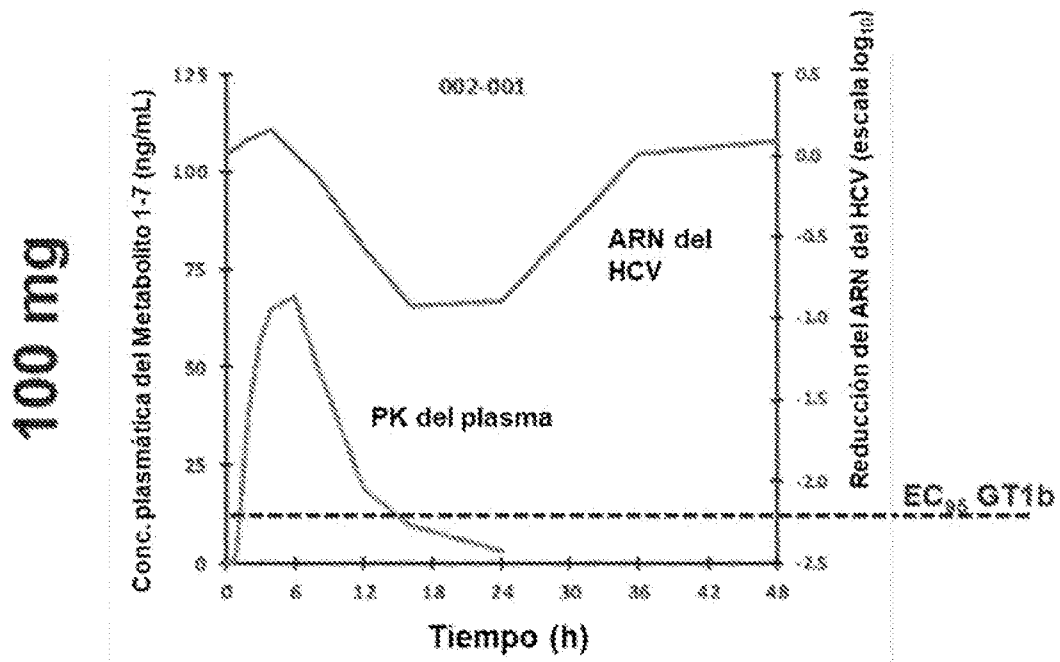


FIG. 23A

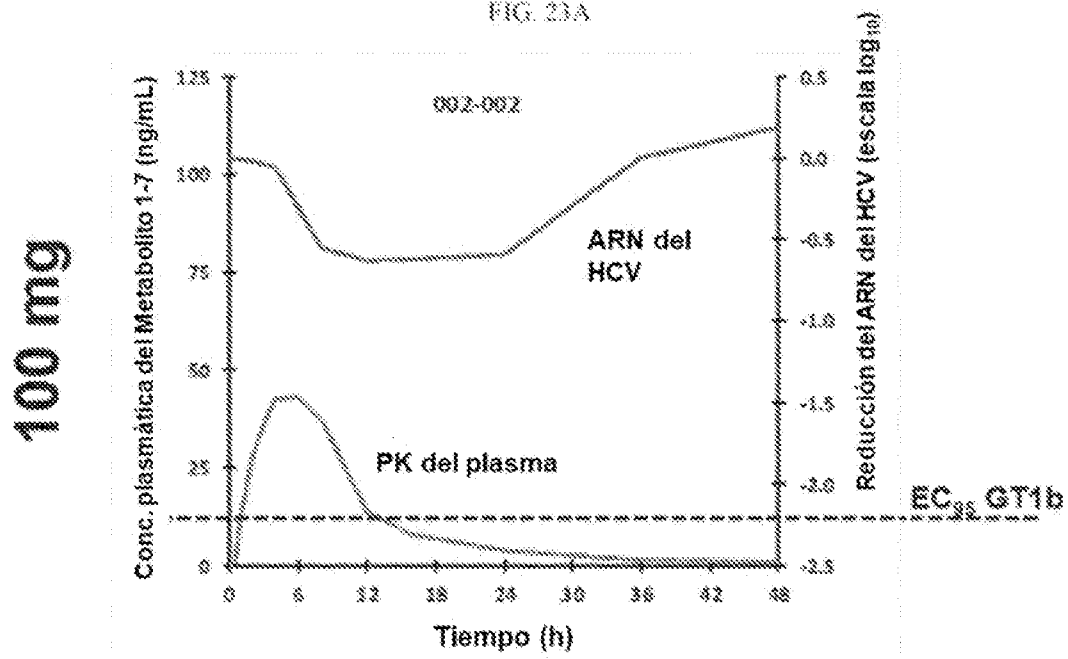


FIG. 23B

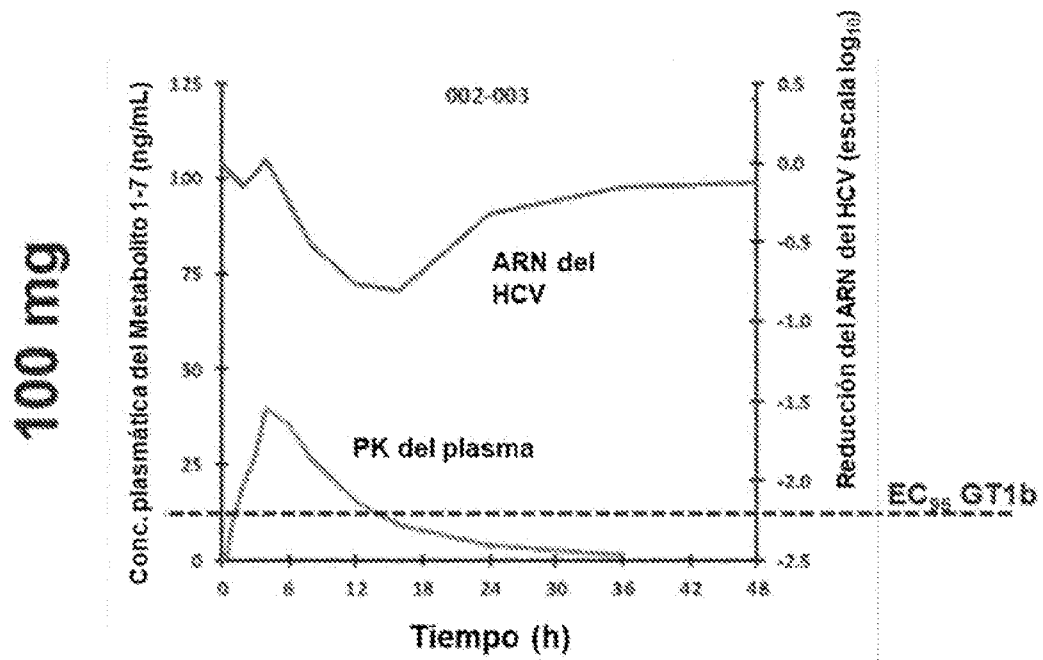


FIG. 23C

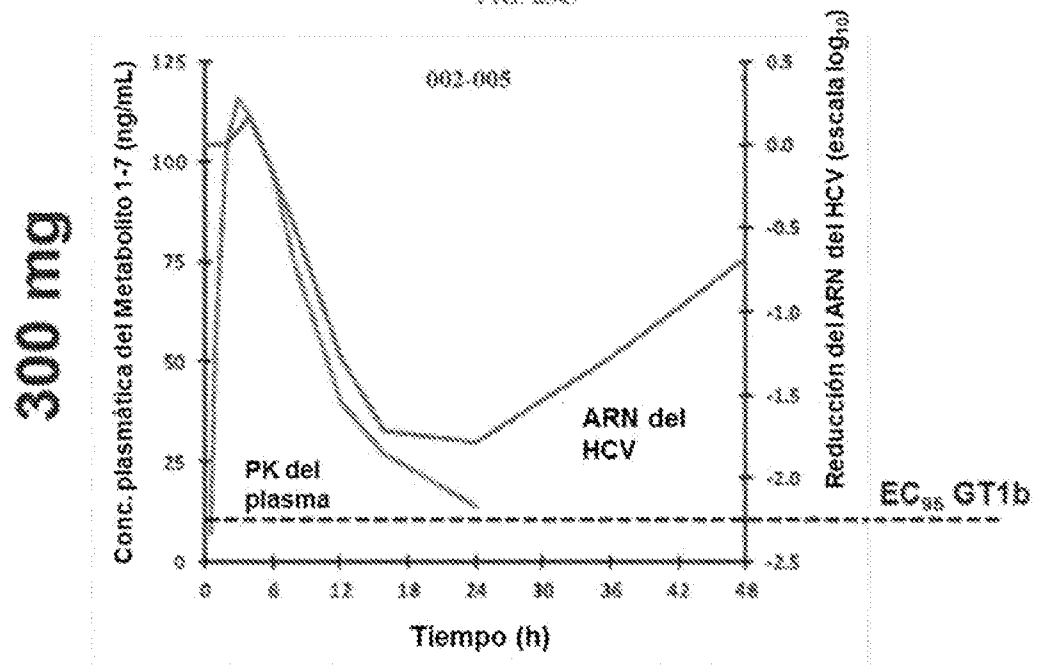


FIG. 23D

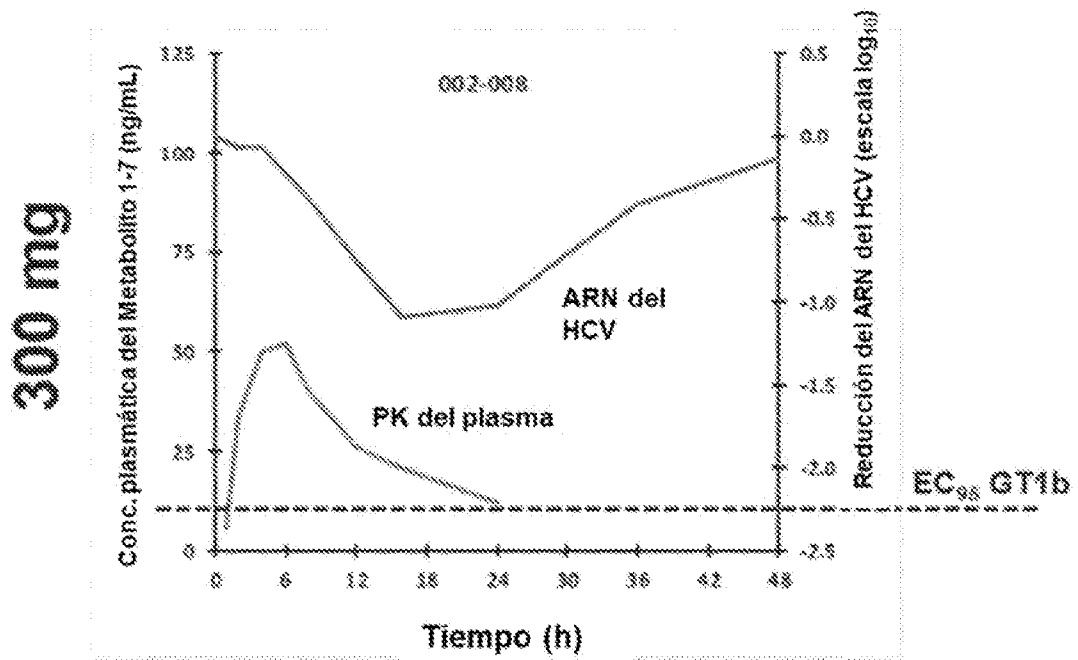


FIG. 23E

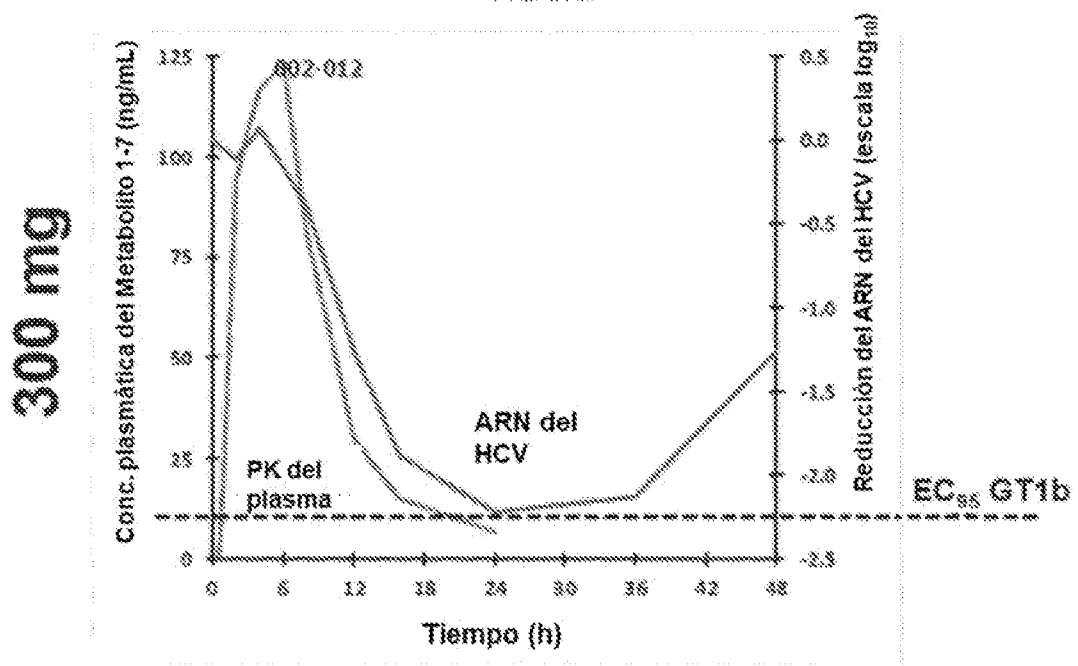


FIG. 23F

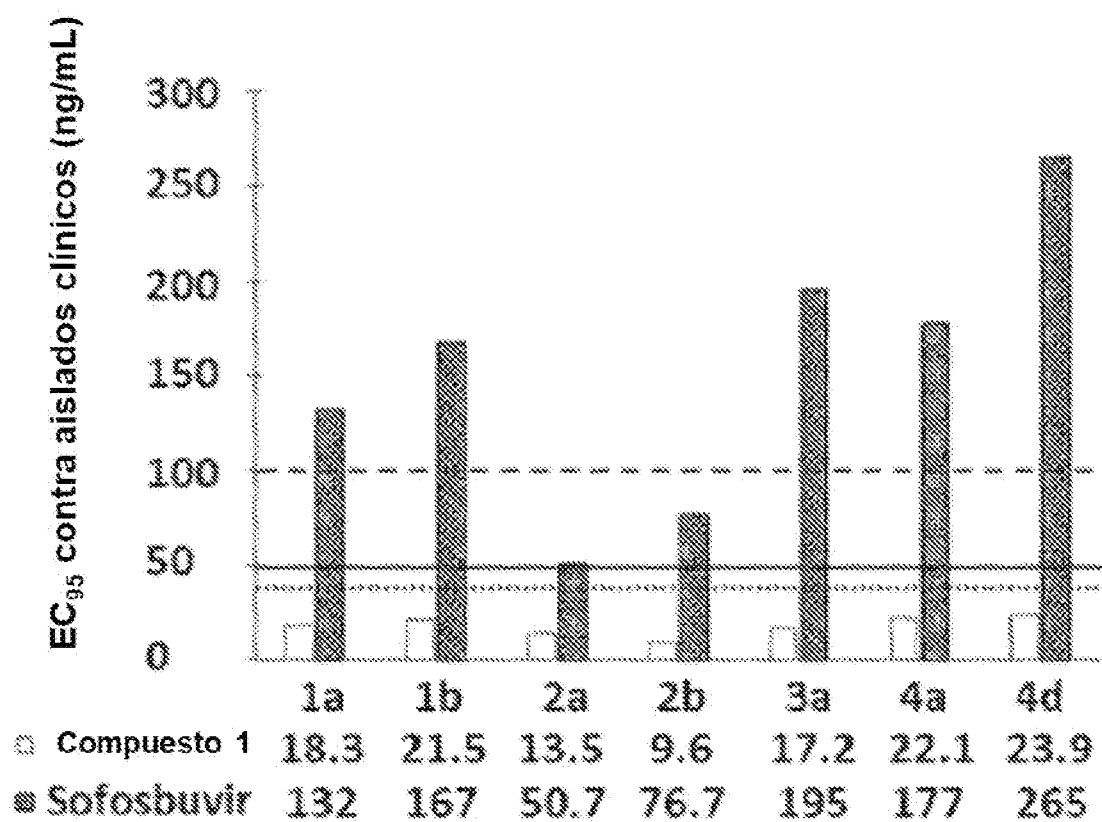


FIG. 24

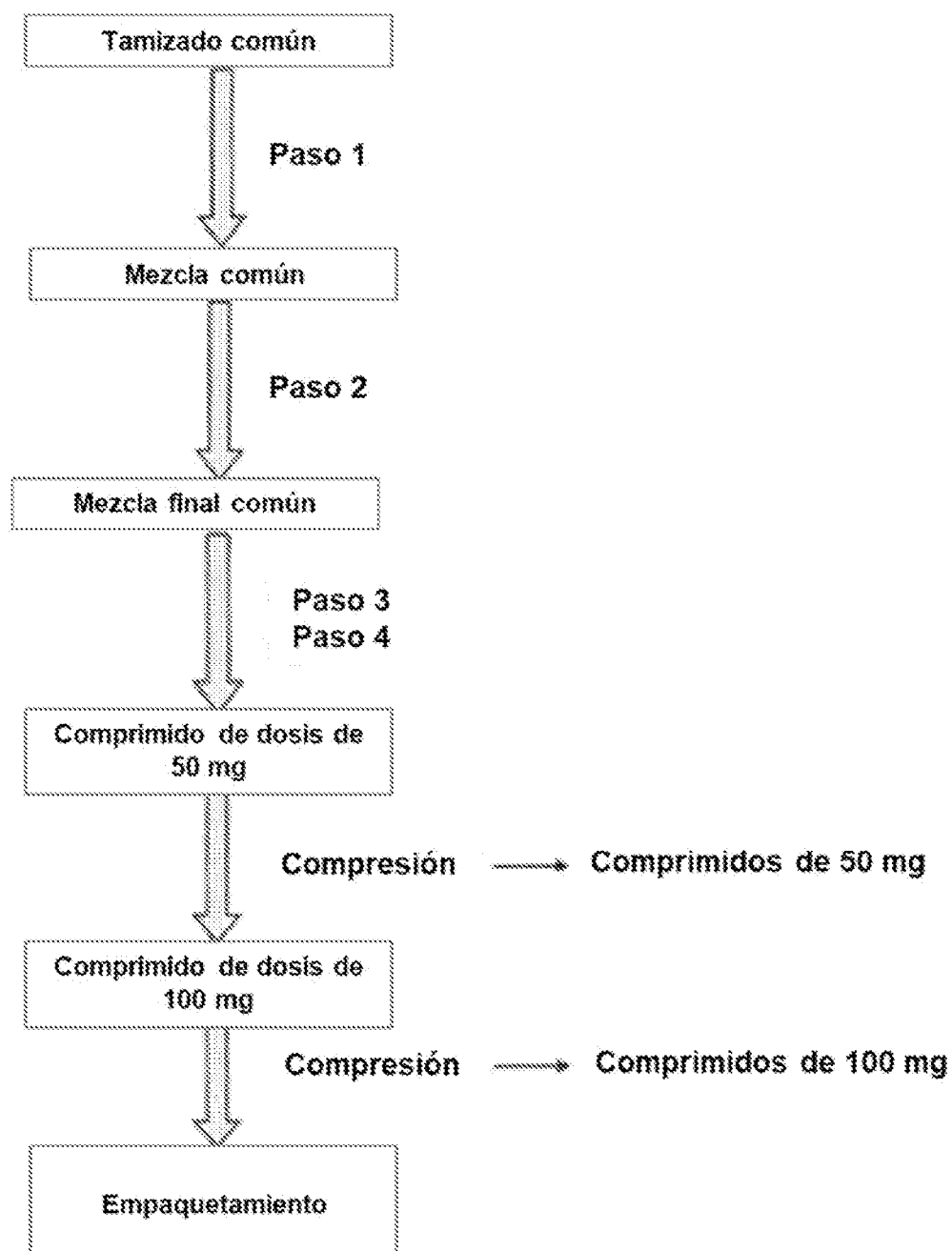


FIG. 25

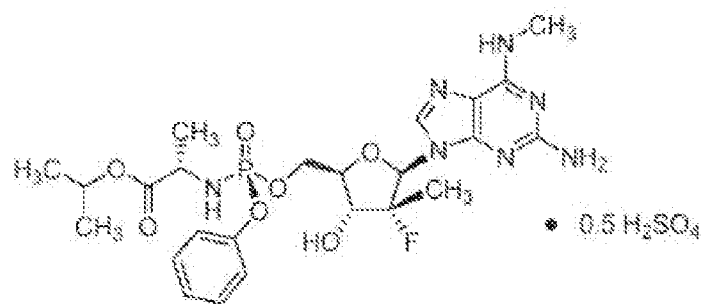


FIG. 26