

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 478**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/20** (2006.01)

**A61K 31/7072** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

**A61K 31/4184** (2006.01)

**C07H 19/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2015 E 20212270 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2023 EP 3845221**

54 Título: **Formas en estado sólido de sofosbuvir**

30 Prioridad:

**13.06.2014 IN 1610DE2014 03.07.2014 EP  
14002279 07.08.2014 EP 14180278  
08.08.2014 IN 2268DE2014  
23.02.2015 US 201562119599 P  
05.05.2015 US 201562157043 P 11.05.2015 EP  
15167228 13.05.2015 EP 15167683  
14.05.2015 IN 1348DE2015 29.05.2015 EP  
15169888**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**05.06.2024**

73 Titular/es:

**RATIOPHARM GMBH (50.0%)  
Graf-Arco-Strasse 3  
89079 Ulm, DE y  
TEVA PHARMACEUTICALS INTERNATIONAL  
GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ALBRECHT, WOLFGANG;  
ARONHIME, JUDITH;  
CHAURASIA, BRIJNATH, P.;  
GEIER, JENS;  
GUSERLE, RICHARD;  
HRAKOVSKY, JULIA;  
LAUER, CLAUDIA;  
PRAJAPATI, RAMKARAN;  
KANSAL, VINOD, K.;  
KUMAR, PAVAN, V.;  
MIKA, HANS-JUERGEN;  
MUPPALLA, SIVA, RAMA KRISHNA;  
RATKAJ, MARINA;  
SAFONOV, ROMAN;  
SCHENK, DIRK;  
SRIVASTAV, NAVEEN, C.;  
STEFAN, RALPH y  
TRIPATHI, ASHISH**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 971 478 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

Formas en estado sólido de sofosbuvir

5 Campo de la invención

La presente invención abarca composiciones farmacéuticas que comprenden una forma en estado sólido de sofosbuvir.

10 Antecedentes de la invención

El sofosbuvir, L-Alanina, *N*-[[*P*(*S*),2'*R*]-2'-desoxi-2'-fluoro-2'-metil-*P*-fenil-5'-uridilil]-, éster 1-metiletilico, o 2-((((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2*H*)-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofurano-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)amino)propanoato de (2*S*)-isopropilo, con la siguiente fórmula



15

es un análogo de nucleósido de uridina de segunda generación disponible por vía oral que inhibe la proteína NS-5 del virus de la hepatitis C (HCV, por sus siglas en inglés). El sofosbuvir y su isómero actúan como profármacos y se convierten a través de una serie de transformaciones *in vivo* en un metabolito de trifosfato activo.

20

El sofosbuvir se comercializa bajo la marca registrada SOVALDI®. SOVALDI® está disponible en comprimidos de liberación inmediata. Cada comprimido contiene 400 mg de sofosbuvir. La carga de principio activo en los comprimidos de SOVALDI® es de aproximadamente el 30 % y los comprimidos también contienen un deslizante. Más específicamente, los comprimidos de SOVALDI® incluyen los siguientes ingredientes inactivos: dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa de sodio, estearato de magnesio, manitol y celulosa microcristalina. Los comprimidos están recubiertos con una película que contiene los siguientes ingredientes inactivos: polietilenglicol, alcohol polivinílico, talco, dióxido de titanio y óxido de hierro amarillo. WO 2013/082003 y WO 2014/120981 también describen comprimidos que contienen sofosbuvir.

25

30

El sofosbuvir se describe en US 7,964,580 y US 8,334,270. Las formas en estado sólido de sofosbuvir se describen en WO 2010/135569, US 2011/251152, WO 2011/123645 y CN 104130302. CN 104277088 y CN 104447924 también describen formas cristalinas de sofosbuvir.

35

El polimorfismo, la aparición de diferentes formas cristalinas, es una propiedad de algunas moléculas y complejos moleculares. Una única molécula puede tener una variedad de polimorfos con estructuras cristalinas y propiedades físicas distintas, tales como el punto de fusión, los comportamientos térmicos (por ejemplo, medidos por análisis termogravimétrico, "TGA" (por sus siglas en inglés), o calorimetría diferencial de barrido, "DSC", por sus siglas en inglés), el patrón de difracción de rayos X, la huella de absorción de infrarrojos y el espectro de (<sup>13</sup>C)-NMR (por sus siglas en inglés) de estado sólido. Una o varias de estas técnicas se pueden usar para distinguir diferentes formas polimórficas de un compuesto.

40

US 2011/251152 describe varias formas cristalinas de sofosbuvir, es decir, las Formas 1, 2, 3, 4, 5 y 6, que se caracterizan por picos de difracción de rayos X en polvo (XRPD, por sus siglas en inglés), así como una forma amorfa. De acuerdo con esta publicación, las Formas cristalinas 2, 3, 4 y 5 de sofosbuvir se preparan por cristalización a partir de diclorometano, cloroformo, acetonitrilo y anisol. Sin embargo, tras la filtración y/o el secado, estas formas cristalinas se convierten en la Forma 1.

45

50

CN 104130302 describe la Forma cristalina A de sofosbuvir caracterizada por su XRPD. La Forma A se describe como una forma no disuelta y no hidratada. La Forma A se prepara al disolver sofosbuvir en un disolvente y al adicionar un antisolvente y reposar la mezcla en un recipiente sellado por 15-24 horas bajo ciertas condiciones. Las combinaciones de disolvente/antisolvente incluyen etanol anhidro y uno de los siguientes: éter isopropílico, ciclohexano, *n*-pentano o tolueno, o bien el disolvente/antisolvente puede ser acetona/*n*-pentano, acetona/éter de petróleo o acetato de etilo/éter de petróleo.

55

Las distintas sales y formas en estado sólido (incluidas las formas solvatadas) de un principio activo farmacéutico pueden poseer propiedades diferentes. Tales variaciones en las propiedades de las diferentes sales y formas en estado sólido y solvatos pueden proporcionar una base para mejorar la formulación, por ejemplo, al facilitar mejores características de procesamiento o manipulación, al cambiar el perfil de disolución en una dirección favorable, o al mejorar la estabilidad (polimorfa, así como la estabilidad química) y la vida útil. Estas variaciones en las propiedades de las diferentes sales y formas en estado sólido también pueden ofrecer mejoras a la forma farmacéutica final, por ejemplo, si sirven para mejorar la biodisponibilidad. Diferentes sales y formas en estado sólido y solvatos de un principio activo farmacéutico también pueden tener una variedad de polimorfos o formas cristalinas, que a su vez pueden proporcionar oportunidades adicionales para valorar las variaciones en las propiedades y características de un principio activo farmacéutico sólido.

60

El descubrimiento de nuevas formas en estado sólido y solvatos de un producto farmacéutico puede brindar materiales con propiedades de procesamiento deseables, tales como facilidad de manipulación, facilidad de procesamiento, estabilidad de almacenamiento y facilidad de purificación, o como formas cristalinas intermedias deseables que facilitan la conversión a otras formas polimórficas. Las nuevas formas en estado sólido de un compuesto farmacéuticamente útil también pueden proporcionar la oportunidad de mejorar las características de rendimiento de un producto farmacéutico. Esto amplía el repertorio de materiales de que dispone un científico de la formulación para la optimización de la formulación, por ejemplo, al proporcionar un producto con propiedades diferentes, tales como un hábito cristalino diferente, mayor cristalinidad o estabilidad polimórfica que puede ofrecer mejores características de procesamiento o manipulación, un perfil de disolución mejorado o una vida útil mejorada (estabilidad química/física). Por ejemplo, ahora se ha descubierto que la Forma 6 de sofosbuvir tiene una alta propensión a cargarse electrostáticamente. Los principios activos farmacéuticos cargados electrostáticamente pueden mostrar una fluidez deficiente y/o una tendencia a pegarse, por lo que en última instancia pueden resultar en dificultades durante las operaciones del proceso de fabricación de una composición farmacéutica basada en tal principio activo farmacéutico cargado electrostáticamente. Asimismo, se puede observar una escasa uniformidad del contenido en la forma farmacéutica final cuando se usa un proceso en seco, tal como, por ejemplo, la compresión en seco para elaborar una composición farmacéutica con un principio activo cargado electrostáticamente. Al menos por estas razones, existe la necesidad de formas adicionales en estado sólido (incluyendo formas solvatadas) de sofosbuvir.

Adicionalmente, los procesos del estado de la técnica para producir formas cristalinas de sofosbuvir, como los descritos anteriormente, son generalmente poco prácticos para la preparación a mediana o gran escala. Asimismo, los productos resultantes pueden experimentar transformaciones polimórficas, lo que puede llevar a materiales polimórficamente impuros. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de proporcionar procesos adicionales para preparar formas en estado sólido de sofosbuvir.

La presente invención tiene por objeto proporcionar una composición farmacéutica que comprende una forma cristalina de sofosbuvir.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la Forma E de sofosbuvir, en donde la Forma E de sofosbuvir se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X que tiene picos a 8,1, 12,1, 12,4, 13,5, 16,2 y 17,2 grados dos theta  $\pm 0,1$  grados dos theta, o en donde la Forma E de sofosbuvir se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X con picos a 8,1, 10,4, 13,5, 18,0 y 18,7 grados dos theta  $\pm 0,1$  grados dos theta.

La presente invención comprende procesos para preparar las composiciones farmacéuticas antes mencionadas. Los procesos comprenden la combinación de la forma en estado sólido de sofosbuvir con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de sofosbuvir de la presente invención se pueden usar como medicamentos, en particular para el tratamiento de la Hepatitis C.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica como se define en la presente para el tratamiento de la Hepatitis C.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un difractograma de rayos X en polvo de la Forma E de sofosbuvir.

La Figura 2 muestra un difractograma de rayos X en polvo de la Forma 1 de sofosbuvir.

La Figura 3 muestra un difractograma de rayos X en polvo de la Forma 6 de sofosbuvir.

La Figura 4 muestra la gráfica isotérmica de DVS de la Forma 1 de sofosbuvir.

La Figura 5 muestra la gráfica isotérmica de DVS de la Forma 6 de sofosbuvir.

La Figura 6 muestra la gráfica isotérmica de DVS de la Forma 7 de sofosbuvir., preparada de acuerdo con el Ejemplo 7.

La Figura 7 muestra el XRPD de la Forma E de sofosbuvir en el rango 2-30 grados 2-theta.

La Figura 8 muestra un difractograma de rayos X en polvo de la Forma 7 de sofosbuvir.

La Figura 9 muestra los picos del difractograma de rayos X de la Forma 7 de sofosbuvir.

La Figura 10 muestra un difractograma de rayos X en polvo de la Forma 7 de sofosbuvir (Ejemplo 1) medido usando

radiación  $K\alpha_1/K\alpha_2$  de cobre con una mediana ponderada de las longitudes de onda de 1,54187 Å.

La Figura 11 muestra los picos de difracción de rayos X en polvo para el sofosbuvir de la Forma 7 (Ejemplo 1) y las intensidades relativas medidas usando radiación  $K\alpha_1/K\alpha_2$  de cobre con una mediana ponderada de las longitudes de onda de 1,54187 Å. En esta tabla, los valores 2-theta se indican con una exactitud de  $\pm 0,2$  grados 2-theta.

La Figura 12 muestra los picos de difracción de rayos X del sofosbuvir de la Forma 1 y las intensidades relativas. En esta tabla, los valores 2-theta se indican con una exactitud de  $\pm 0,2$  grados 2-theta.

La Figura 13 muestra las curvas de disolución de la Forma 7 frente a la Forma 6 medidas en amortiguador de fosfatos a 50 mM (pH 6,8, 900 mL) a 37 °C, usando el aparato tipo USP II, método de paleta de acuerdo con el ejemplo descrito a continuación.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención abarca una composición farmacéutica que comprende la Forma E de sofosbuvir. Las propiedades en estado sólido del sofosbuvir se pueden ver influidas por el control de las condiciones en las cuales se obtiene el sofosbuvir en forma sólida.

La forma cristalina de sofosbuvir puede estar sustancialmente libre de cualquier otra forma de sofosbuvir, o de formas polimórficas específicas de sofosbuvir, respectivamente.

Como se usa en la presente, "sustancialmente libre" significa que las formas en estado sólido de la presente invención divulgadas en la presente contienen 20 % (p/p) o menos, 10 % o menos, 5 % o menos, 2 % o menos, o 1 % o menos de cualquier otra forma del compuesto en cuestión, o de un polimorfo específico de sofosbuvir medido, por ejemplo, por XRPD. De acuerdo con algunas realizaciones, las sales y formas en estado sólido contienen 10 % (p/p) o menos, 5 % (p/p) o menos, 2 % (p/p) o menos, 1 % (p/p) o menos, 0,5 % (p/p) o menos, o 0,2 % (p/p) o menos de polimorfos, o de un polimorfo específico de sofosbuvir. En otras realizaciones, la forma en estado sólido de sofosbuvir contiene del 1 % al 20 % (p/p), del 5 % al 20 % (p/p), o del 5 % al 10 % (p/p) de cualquier forma en estado sólido o de un polimorfo específico de sofosbuvir.

Dependiendo de con qué otras formas en estado sólido se haga la comparación, la forma en estado sólido/cristalino de sofosbuvir divulgada en la presente tiene propiedades ventajosas seleccionadas de al menos una de las siguientes: pureza química, fluidez, solubilidad, velocidad de disolución, morfología o hábito cristalino, estabilidad, tal como estabilidad química así como estabilidad térmica y mecánica con respecto a la conversión polimórfica, estabilidad frente a la hidratación y/o estabilidad de almacenamiento, bajo contenido de disolvente residual, un menor grado de higroscopicidad, fluidez, y características ventajosas de procesamiento y manipulación como compresibilidad, y densidad aparente.

Una forma en estado sólido, tal como una forma cristalina o amorfa, se puede denominar en la presente como caracterizada por datos gráficos "como se representa en" o "como se representa sustancialmente en" una Figura. Tales datos incluyen, por ejemplo, difractogramas de rayos X en polvo. Como es bien sabido en la técnica, los datos gráficos proporcionan potencialmente información técnica adicional para definir mejor la forma de estado sólido respectiva (una denominada "huella dactilar") que no se puede describir necesariamente por referencia a valores numéricos o posiciones de pico por sí solos. En cualquier caso, el experto comprenderá que tales representaciones gráficas de los datos pueden estar sujetas a pequeñas variaciones, por ejemplo, en las intensidades relativas de los picos y en las posiciones de los picos debido a ciertos factores, tales como, pero no limitados a, variaciones en la respuesta del instrumento y variaciones en la concentración y pureza de la muestra, que son bien conocidos por el experto. No obstante, el experto sería capaz de comparar los datos gráficos de las figuras con los datos gráficos generados para un estado sólido/forma de cristal desconocido y confirmar si los dos conjuntos de datos gráficos caracterizan el mismo estado sólido/forma de cristal o dos estados sólidos/formas de cristal diferentes. Una forma de estado sólido/cristal de un sofosbuvir a la que se hace referencia en la presente como caracterizada por datos gráficos "como se representa en" o "como se representa sustancialmente en" una figura se entenderá que incluye cualquier forma de estado sólido/cristal de sofosbuvir caracterizada con los datos gráficos que tienen variaciones tan pequeñas, como son bien conocidas por el experto, en comparación con la figura.

Como se usa en la presente, y a menos que se indique lo contrario, el término "anhidro" en relación con las formas en estado sólido/cristalinas de sofosbuvir, se refiere a una forma en estado sólido/cristalina de sofosbuvir que no incluye agua (u otros disolventes) en una cantidad definida y estequiométrica dentro del cristal. Además, una forma "anhidra" típicamente no contendría más del 1 % (p/p) de agua o disolventes orgánicos, medido, por ejemplo, por TGA.

Como se usa en la presente, el término "aislado" en referencia a las formas de sofosbuvir en estado sólido corresponde a una forma de sofosbuvir en estado sólido que se separa físicamente de la mezcla de reacción en la cual se forma.

Como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, las mediciones de XRPD se toman usando una radiación de cobre  $K\alpha$  de longitud de onda 1,5418 Å. A menos que se indique lo contrario, los valores XRPD 2-theta se presentan con un error de  $\pm 0,2$  grados 2-theta.

- Las partículas individuales de una muestra o alícuota de la partícula sólida que comprende la Forma cristalina E de sofosbuvir no son de tamaño uniforme. Más bien, una muestra o alícuota de una partícula sólida que comprende la Forma cristalina E de sofosbuvir se compone de partículas de diferentes tamaños que se pueden clasificar por tamaño o distribuir en una disposición de intervalos discretos y adyacentes de tamaño de partícula. Si el tamaño de los intervalos es suficientemente pequeño, el conjunto de tamaños de partículas se aproxima a un continuo de tamaños de partículas. Esta colección de intervalos discretos de tamaño de partícula junto con su población se denomina distribución granulométrica (PSD, por sus siglas en inglés).
- La medición y caracterización de las distribuciones del tamaño de las partículas es conocida en la técnica. Es posible comparar muestras de partículas que comprenden la Forma cristalina E de sofosbuvir sobre la base de puntos individuales en una curva de distribución acumulativa del tamaño de las partículas. Las mediciones se representan como  $d(0,X) = Y$  (en donde X e Y son números arábigos), cada "d" describe un punto individual en una curva de PSD acumulativa. El número "X" representa el porcentaje (número, volumen o peso) de partículas de la población que tienen un tamaño nominal hasta "Y" inclusive. Así,  $d(0,9) = 250 \mu\text{m}$  es una característica de una PSD en donde el 90 % (número, volumen o peso) de las partículas de una población tienen un tamaño nominal de aproximadamente  $250 \mu\text{m}$  o menor (al menos algunas partículas tienen una dimensión nominal de  $250 \mu\text{m}$ ) y así sucesivamente. Cuando la PSD se determina por el conocido método de difracción láser descrito en la presente, la medición  $d(0,X)$  representa una media de volumen.
- El experto sabe que los resultados de la determinación de PSD por una técnica se pueden correlacionar con los resultados de otra técnica sobre una base empírica por la experimentación rutinaria.
- Como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, "tamaño medio de las partículas" se refiere al valor  $D_{50}$  de la distribución del tamaño de las partículas. Como se usa en la presente, la distribución del tamaño de las partículas se determina por difracción láser. Más específicamente, a menos que se indique lo contrario, el tamaño de las partículas se determinó usando un Mastersizer 2000 de Malvern Instruments; la determinación del tamaño de las partículas se puede realizar como una medición en húmedo o en seco, dependiendo de la muestra.
- El tamaño medio de las partículas ( $D_{50}$ ), que también se denomina valor  $D_{50}$  de la distribución integral de volumen, se define en el contexto de la presente divulgación como el diámetro de las partículas en donde el 50 por ciento en volumen de las partículas tienen un diámetro menor que el diámetro correspondiente al valor  $D_{50}$ . Asimismo, el 50 % en volumen de las partículas tiene un diámetro mayor al valor  $D_{50}$ . Análogamente, el valor  $D_{90}$  de la distribución de volumen integral se define como el diámetro de partícula, en donde el 90 por ciento en volumen de las partículas tienen un diámetro menor que el diámetro, que corresponde al valor  $D_{90}$ . Correspondientemente, el valor  $D_{10}$  de la distribución de volumen integral se define como el diámetro de partícula, en donde el 10 por ciento en volumen de las partículas tienen un diámetro menor que el diámetro, que corresponde al valor  $D_{10}$ .
- De acuerdo con la divulgación, por "diámetro de partícula" o "tamaño de partícula" de una partícula a determinar se entiende el diámetro de una partícula equivalente que se supone esférica y con el mismo patrón de dispersión de luz que la partícula a determinar.
- Un objeto, por ejemplo, una mezcla de reacción, se puede caracterizar en la presente por estar a "temperatura ambiente", a menudo abreviada como "RT" (por sus siglas en inglés). Esto significa que la temperatura del objeto es similar o igual a la del espacio en el cual se encuentra, por ejemplo, la habitación o la campana de extracción. Típicamente, la temperatura ambiente es de aproximadamente  $20^\circ\text{C}$  a aproximadamente  $30^\circ\text{C}$ , o de aproximadamente  $22^\circ\text{C}$  a aproximadamente  $27^\circ\text{C}$ , o de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .
- La cantidad de disolvente empleada en un proceso químico, por ejemplo, una reacción o una cristalización, se puede denominar en la presente como un número de "volúmenes" o "vol" o "V". Por ejemplo, se puede decir que un material está suspendido en 10 volúmenes (o 10 vol o 10 V) de un disolvente. En este contexto, esta expresión significa mililitros de disolvente por gramo de material en suspensión, de modo que suspender 5 gramos de material en 10 volúmenes de disolvente significa que el disolvente se usa en una cantidad de 10 mililitros de disolvente por gramo de material en suspensión o, en este ejemplo, 50 mL de disolvente. En otro contexto, el término "v/v" se puede usar para indicar el número de volúmenes de un disolvente que se adicionan a una mezcla líquida en función del volumen de dicha mezcla. Por ejemplo, adicionar disolvente X (1,5 v/v) a una mezcla de reacción de 100 mL indicaría que se han adicionado 150 mL del disolvente X.
- Un proceso o paso puede ser referido en la presente como llevado a cabo "durante la noche". Se refiere a un intervalo de tiempo, por ejemplo, para el proceso o paso, que abarca el tiempo durante la noche, cuando ese proceso o paso no puede ser observado activamente. Este intervalo de tiempo es de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 horas, o de aproximadamente 10-18 horas, típicamente aproximadamente 16 horas.
- En la presente, el término "presión reducida" se refiere a una presión menor a la atmosférica. Por ejemplo, la presión reducida es de aproximadamente 1 kPa [10 mbar] a aproximadamente 5 kPa [50 mbar].
- Como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, el término "al vacío" se refiere a una presión de

aproximadamente 0,02 kPa [0,2 mbar] a aproximadamente 1 kPa [10 mbar], de aproximadamente 0,02 kPa [0,2 mbar] a aproximadamente 0,5 kPa [5 mbar], de aproximadamente 0,05 kPa [0,5] a aproximadamente 0,4 kPa [4 mbar], de aproximadamente 0,1 kPa [1 mbar] a aproximadamente 0,3 kPa [3 mbar], y preferiblemente de aproximadamente 0,2 kPa [2 mbar].

Como se usa en la presente, un "antisolvente" es un líquido que cuando se combina con una composición que comprende un disolvente y sofosbuvir, induce la precipitación de sofosbuvir cristalino.

Como se usa en la presente, y a menos que se indique lo contrario, el término "compresibilidad" se expresa como la densidad máxima a una presión constante de 0,2 MPa.

Como se usa en la presente, la Forma cristalina 1 de sofosbuvir se refiere a una forma cristalina que se puede caracterizar por el patrón de difracción de rayos X como se muestra en la Figura 2. La Forma cristalina 1 de sofosbuvir se puede caracterizar por picos XRPD o el difractograma de rayos X en polvo divulgado en US 2011/0251152 o WO2011/123645. Como se usa en la presente, la Forma cristalina 6 de sofosbuvir se refiere a una forma cristalina tal como se describe en US 2011/0251152, que se puede caracterizar por el patrón de difracción de rayos X en polvo como se muestra en la Figura 3. Así, la Forma cristalina 6 de sofosbuvir se puede caracterizar por un patrón de difracción de rayos X que tiene picos como los descritos en US 2011/0251152 o WO2011/123645, que se muestra en la Figura 3.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una forma cristalina de sofosbuvir, designada como Forma E, caracterizada por datos seleccionados de uno o más de los siguientes: un patrón de difracción de polvo de rayos X como se representa en la Figura 1 o en la Figura 7; un patrón de difracción de polvo de rayos X que tiene picos en: 12,4, 16,2, 17,2, 25,0 y 25,3 grados dos theta  $\pm$  0,1 grados dos theta; un patrón de difracción de polvo de rayos X con picos a: 12,4, 16,2, 17,2, 25,0 y 25,3 grados dos theta  $\pm$  0,1 grados dos theta y ausencia de picos en: 10,9 y 14,2 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta; y combinaciones de estos datos.

La Forma cristalina E de sofosbuvir, se puede caracterizar además por datos seleccionados de uno o más de los siguientes: Un patrón de difracción de polvos de rayos X con picos a 12,4, 16,2, 17,2, 25,0 y 25,3 grados dos theta  $\pm$  0,1 grados dos theta y también con uno, dos, tres o cuatro picos seleccionados de: 8,1, 19,4, 22,0 y 23,3 grados dos theta  $\pm$  0,1 grados dos theta; un patrón de difracción de polvo de rayos X con picos a: 12,4, 16,2, 17,2, 25,0 y 25,3 grados dos theta  $\pm$  0,1 grados dos theta, ausencia de picos en: 10,9 y 14,2 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta y que además tengan uno, dos, tres o cuatro picos seleccionados de: 8,1, 19,4, 22,0 y 23,3 grados dos theta  $\pm$  0,1 grados dos theta.

La Forma cristalina E de sofosbuvir se puede caracterizar por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 8,1, 12,4, 16,2, 17,2, 19,4, 22,0, 23,3, 25,0 y 25,3 grados dos theta  $\pm$  0,1 grados dos theta. Alternativamente, la Forma cristalina E de sofosbuvir se puede caracterizar por un patrón de difracción de polvo de rayos X que tiene picos a 8,1, 12,4, 16,2, 17,2, 19,4, 22,0, 23,3, 25,0 y 25,3 grados dos theta  $\pm$  0,1 grados dos theta y una ausencia de picos a 10,9 y 14,2 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta.

La Forma cristalina E de sofosbuvir se puede caracterizar además por los datos que se exponen en la Tabla siguiente.

Tabla 1 Picos de difracción de rayos X de la Forma E de sofosbuvir:

| Ángulo (grados dos theta $\pm$ 0,1 grados dos theta). |
|-------------------------------------------------------|
| 8,1                                                   |
| 10,4                                                  |
| 12,1                                                  |
| 12,4                                                  |
| 13,5                                                  |
| 16,2                                                  |
| 16,8                                                  |
| 17,2                                                  |
| 18,0                                                  |
| 18,7                                                  |
| 19,4                                                  |
| 20,1                                                  |
| 20,9                                                  |
| 22,0                                                  |
| 23,3                                                  |

| Ángulo (grados dos theta $\pm$ 0,1 grados dos theta. |
|------------------------------------------------------|
| 23,7                                                 |
| 24,4                                                 |

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la Forma E de sofosbuvir, en donde la Forma E se caracteriza por un patrón de difracción de polvo de rayos X que tiene picos en: 8,1, 12,1, 12,4, 13,5, 16,2 y 17,2 grados dos theta  $\pm$  0,1 grados dos theta.

La Forma E se puede caracterizar por un patrón de difracción de polvo de rayos X con picos a: 8,1, 12,1, 12,4, 13,5, 16,2 y 17,2 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta, y ausencia de picos en: 10,9 y 14,2 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta. En una realización preferida, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la Forma E de sofosbuvir, en donde la Forma E se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X con picos a 8,1, 12,1, 12,4, 13,5, 16,2 y 17,2 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta, y ausencia de picos a: 10,9 y 14,2 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta.

En otra realización, la composición farmacéutica puede comprender la Forma E de sofosbuvir, en donde la Forma E se caracteriza por un patrón de difracción de polvo de rayos X con picos en: 8,1, 10,4, 13,5, 18,0 y 18,7 grados dos theta  $\pm$  0,1 grados dos theta.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la Forma E de sofosbuvir, en donde la Forma E se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X con picos a 8,1, 10,4, 13,5, 18,0 y 18,7 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta, y ausencia de picos a: 10,9 y 14,2 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta.

Se divulga en la presente una forma cristalina monoclínica de sofosbuvir, grupo espacial  $P2_1$ , con los siguientes parámetros de celda unitaria  $a \sim 14,47$  Å,  $b \sim 17,02$  Å,  $c \sim 5,22$  Å,  $\alpha$  90,00°,  $\beta$  100,30° y  $\gamma$  90,00°, preferiblemente obtenidos por radiación sincrotrón a una longitud de onda de 0,40003(1) Å. Se puede entender que los parámetros de celda unitaria anteriores se pueden obtener por indexación a partir de patrones de polvo de alta resolución obtenidos en radiación sincrotrón a una longitud de onda de 0,40003(1) Å.

En una realización, la Forma E es anhidra.

La Forma E tiene ventajas, como ya se ha comentado. En particular, la Forma E es estable por al menos 3 meses a 40 grados y a 25 grados.

La Forma cristalina E de sofosbuvir se puede aislar.

Las composiciones que comprenden la Forma cristalina E de la presente invención son preferiblemente polimórficamente puras, es decir, están sustancialmente libres de cualquier otra forma de sofosbuvir. Por ejemplo, la Forma cristalina E de la presente invención está sustancialmente libre de la Forma 6 de sofosbuvir. Específicamente, la Forma cristalina E de la presente invención contiene 20 % o menos, 10 % o menos, 5 % o menos, 2 % o menos, 1 % o menos, de la Forma 6 de sofosbuvir como se mide por XRPD. Por consiguiente, el contenido de la Forma cristalina 6 de sofosbuvir en la Forma cristalina E de sofosbuvir se medirá al detectar y cuantificar los picos característicos descritos de la Forma 6. Los picos característicos de la Forma cristalina 6 de sofosbuvir usados para la medición descrita anteriormente pueden ser uno cualquiera o ambos picos a: 6,08 y 10,85 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta. En un aspecto preferido, la presente invención abarca formas sólidas de sofosbuvir que comprenden la Forma cristalina E de sofosbuvir que tiene propiedades higroscópicas preferidas, es decir, es menos higroscópica en comparación con la Forma 1 y la Forma 6 de sofosbuvir. Esta propiedad se puede comprobar en los datos de DVS presentados en las Figuras 4, 5 y 6 y en la Tabla siguiente:

Tabla 2

| Humedad relativa | Cambio de masa (%) |         |         |
|------------------|--------------------|---------|---------|
|                  | Forma 1            | Forma 6 | Forma E |
| 70 %             | 0,13               | 0,14    | 0,07    |
| 90 %             | 5,57               | 1,08    | 0,12    |

Las formas sólidas de la Forma cristalina E con baja higroscopicidad se pueden manipular, procesar y almacenar fácilmente, sin necesidad de condiciones especialmente controladas, por lo que se pueden usar ventajosamente para la preparación de composiciones y formulaciones farmacéuticas.

Las propiedades higroscópicas mejoradas comentadas anteriormente en la presente se pueden expresar por la absorción dinámica de agua controlada por el instrumento DVS. El perfil de la curva dinámica obtenida puede proporcionar información sobre la tendencia de la sustancia a la deliquesencia. Esto se expresa por un cambio brusco en la pendiente

de la curva (punto de inflexión) que indica que, a partir de una determinada humedad relativa crítica, la sustancia empieza a absorber cantidades significativas de agua. Este comportamiento indica una posibilidad a largo plazo de que el polvo almacenado se pegue y forme grumos.

5 La curva de DVS de la Forma 1 de sofobuvir (mostrada en la Figura 4) muestra una humedad relativa crítica en la curva de sorción en torno al 80 % de RH (humedad relativa, por sus siglas en inglés) en donde cambia la velocidad de absorción de agua (punto de inflexión). Se observa una absorción de agua significativa por encima del 80 % de RH (aproximadamente 5 %). Esto indica que la muestra se puede licuar parcialmente durante el almacenamiento a largo plazo o durante la exposición a una humedad elevada.

10 La curva de DVS de la Forma 6 (mostrada en la Figura 5) de sofobuvir muestra una humedad relativa crítica en la curva de sorción en torno al 70 % de RH en donde cambia la velocidad de absorción de agua (punto de inflexión). Se observa una absorción de agua significativa por encima del 70 % de RH (aproximadamente 1 %). Esto indica que también esta muestra puede licuar parcialmente durante el almacenamiento a largo plazo o durante la exposición a una humedad elevada.

15 Sorprendentemente se encontró que el sofobuvir que comprende la Forma E de baja higroscopicidad no muestra este punto de inflexión. Además, esta Forma E no presenta ninguna histéresis entre la isoterma de desorción y la de absorción. La histéresis entre la absorción y la desorción se define como el bucle que aparece en la figura como resultado del hueco que se forma entre el valor de aumento del peso de absorción y el valor de disminución del peso de desorción a una humedad relativa dada. En la Tabla 2 se comparan los valores de contenido de agua medidos por DVS.

20 La Forma cristalina E de sofobuvir se puede caracterizar por una isoterma de sorción de vapor de agua que muestra una absorción de agua no mayor al 0,15-0,25 % en peso, preferiblemente no mayor al 0,15 % en peso, a una humedad relativa de hasta el 90 %.

25 La Forma cristalina E de sofobuvir se puede caracterizar opcionalmente por una isoterma de sorción de vapor de agua que muestra una absorción de agua no mayor al 0,10 % en peso, a una humedad relativa (RH) de hasta el 70 % y/o una absorción de agua no mayor al 0,15-0,25 % en peso, preferiblemente no mayor al 0,15 % en peso, a una humedad relativa de hasta el 90 %.

30 La Forma cristalina E de sofobuvir puede tener una baja higroscopicidad caracterizada por una isoterma de sorción de vapor de agua que muestra una absorción de agua no mayor al 0,15-0,25 % en peso, preferiblemente no mayor al 0,15 % en peso, a una humedad relativa de hasta el 90 %.

35 La Forma cristalina E de sofobuvir de baja higroscopicidad se puede caracterizar por una isoterma de sorción de vapor de agua que muestra una absorción de agua no mayor al 0,10 % en peso, a una humedad relativa (RH) de hasta el 70 % y/o una absorción de agua no mayor al 0,15-0,25 % en peso, preferiblemente no mayor al 0,15 % en peso, a una humedad relativa de hasta el 90 %.

40 La Forma cristalina E de sofobuvir se puede preparar por un proceso que comprende (a) combinar sofobuvir con un sistema disolvente que comprende un disolvente orgánico y opcionalmente agua (b) opcionalmente sembrar con los cristales de la Forma E (c) adicionar un antisolvente (d) opcionalmente aislar la Forma cristalina E y (e) opcionalmente moler o micronizar para obtener la Forma cristalina E de sofobuvir que tiene un tamaño de partícula más pequeño. El proceso también puede comprender pasos de filtración y secado.

45 Los disolventes orgánicos preferidos en el paso (a) se pueden seleccionar de un grupo que consiste en éteres alifáticos, preferiblemente éteres de C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>, éteres cíclicos, cetonas, preferiblemente cetonas de C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, alcoholes preferiblemente alcoholes de C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>. Más preferiblemente los disolventes orgánicos se pueden seleccionar de un grupo que consiste en éter metil-*t*-butílico, *t*-butanol, acetona, metilisobutilcetona. Lo más preferible es que el disolvente orgánico sea metilisobutilcetona.

50 El disolvente preferido usado como antisolvente en el paso (c) se puede seleccionar del grupo que consiste en éteres alifáticos, preferiblemente éteres de C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>, alcanos, preferiblemente alcanos de C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, y cicloalcanos. Más preferiblemente, los antisolventes se pueden seleccionar del grupo que consiste en éter diisopropílico, *n*-heptano, ciclohexano. Lo más preferible es que el antisolvente sea ciclohexano.

55 En una realización preferida, el paso (a) se realiza en un sistema de disolventes que comprende un disolvente orgánico y agua. Más preferiblemente, la cantidad de agua puede estar en el rango del 0 %-2 % en volumen.

60 Preferiblemente, la mezcla de reacción del paso (a) incluye de aproximadamente 10 % a aproximadamente 50 % de sofobuvir, en volumen. Preferiblemente, el proceso de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo a temperaturas entre 0 y 20 °C, más preferiblemente entre 0-15 °C, más preferiblemente 6-12 °C.

65 La solución obtenida en el paso (a) se puede filtrar, si se desea, para eliminar las partículas extrañas, manteniendo la solución filtrada y el filtrado prácticamente a la misma temperatura. Preferiblemente el proceso de la presente invención



se realiza con agitación

Típicamente, la cantidad de Forma cristalina E de sofobuvir usada para la siembra de cristales en el paso (b) es de aproximadamente 0,1 % a 0,5 % en peso del sofobuvir.

La Forma cristalina E de sofobuvir se puede aislar por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la Forma cristalina E de sofobuvir se puede separar al filtrar la suspensión o al decantar el disolvente de la suspensión. El método de aislamiento puede comprender además el lavado y secado de la Forma cristalina E de sofobuvir. Preferiblemente, la Forma cristalina E de sofobuvir se seca a una temperatura de aproximadamente 30° C a aproximadamente 60° C, más preferiblemente, a una temperatura de aproximadamente 40° C a aproximadamente 50° C a presión reducida.

La Forma cristalina E de sofobuvir, se puede moler o micronizar para obtener sofobuvir con un tamaño de partícula menor en un proceso adaptado al tamaño de partícula deseado. Por ejemplo, la micronización se puede realizar usando un micronizador de chorro de aire con placa de 100 mm.

La Forma cristalina E de sofobuvir también se puede preparar por un proceso que comprende: (a) combinar sofobuvir con metilisobutilcetona y agua, (b) sembrar con los cristales de Forma E, (c) adicionar ciclohexano (d) opcionalmente aislar la Forma E y (e) opcionalmente moler o micronizar para obtener la Forma cristalina E de sofobuvir con un tamaño de partícula deseado. El proceso también puede comprender pasos de filtración y secado.

El material de partida usado en el proceso descrito anteriormente puede ser la Forma cristalina 1 de sofobuvir.

La cantidad de agua en el paso (a) puede estar en el rango de 0,5 a 2 % (en volumen), y se agita la mezcla de reacción. Preferiblemente, la cantidad de agua es del 1 % (en volumen) y la reacción se agita a 50-200 rpm. La mezcla de reacción se puede filtrar de nuevo.

El paso (a) se puede realizar a una temperatura en el rango de 0 a 20 °C, preferiblemente a  $9 \pm 3$  °C.

La Forma cristalina E de sofobuvir se puede preparar por un proceso que comprende: (a) combinar sofobuvir con metilisobutilcetona y agua, en donde la cantidad de agua es 1 % en volumen y la temperatura es  $9 \pm 3$  °C, (b) sembrar con los cristales de la Forma E, (c) adicionar ciclohexano, (d) aislar la Forma E, y (e) opcionalmente micronizar. El proceso también puede comprender pasos de filtración y secado.

Preferiblemente, el paso (a) se puede realizar con agitación a una velocidad de 50-200 rpm. En una realización preferida, la solución se agita después de la siembra, la velocidad de agitación puede estar en el rango de 50-200 rpm.

Preferiblemente, la Forma cristalina 1 de sofobuvir se combina con MIBK (por sus siglas en inglés) y agua (1 % en volumen) a  $9 \pm 3$  °C. La suspensión resultante se agita a 50-200 rpm hasta que la solución se aclara. La solución se filtra para eliminar cualquier partícula extraña. Se carga la solución filtrada, se agita a  $9 \pm 3$  °C, se siembra con los cristales de la Forma E y se agita como tal por  $4 \pm 0,5$  h. Posteriormente, se adiciona ciclohexano y se agita la solución por  $1 \pm 0,5$  h a  $9 \pm 3$  °C. La suspensión se filtra y la torta se lava con ciclohexano. El sólido obtenido se secó al vacío por 12 h a  $T_j$  (por sus siglas en inglés) 40-50 °C para obtener sofobuvir Forma E.

La Forma cristalina E de sofobuvir se puede micronizar o tener un tamaño de partícula pequeño, y puede tener una PSD deseada que sea adecuada para la preparación de composiciones y formulaciones farmacéuticas, por ejemplo d(0,1) 0,4-0,6 µm, d(0,5) 1,0-2,0 µm y d(0,9) 3,2-5,0 µm.

El sofobuvir de pequeño tamaño de partícula se puede obtener directamente por diferentes procesos, por ejemplo, se puede obtener por síntesis química o por técnicas de micronización, opcionalmente usando técnicas de desbordamiento.

La micronización es una técnica conocida por el experto. Por ejemplo, por la molienda como técnica de micronización comúnmente conocida, se pueden conseguir partículas de pequeño tamaño.

Es generalmente conocido en la técnica que el material micronizado o de tamaño de partícula pequeño puede llevar a problemas de procesamiento posteriores relacionados con propiedades de flujo y dispersión pobres. Se descubrió sorprendentemente que el sofobuvir micronizado o de tamaño de partícula pequeño que comprende la Forma cristalina E presenta una buena fluidez y compresibilidad y una higroscopicidad reducida, por lo que se puede usar ventajosamente para la preparación de composiciones y formulaciones farmacéuticas.

Los atributos físicos del API (por sus siglas en inglés) son especialmente críticos para la reproducibilidad de la preparación de formas de dosificación con alto contenido del API. Una carga elevada de fármaco puede plantear problemas de flujo ([http://en.wikipedia.org/wiki/Power\\_flow](http://en.wikipedia.org/wiki/Power_flow)) o "Power flow" o requerir formas farmacéuticas de gran tamaño si el compuesto tiene baja compresibilidad. Por lo tanto, la Forma cristalina E micronizada o de pequeño tamaño de partícula de sofobuvir es adecuada para su uso en la preparación de formulaciones que contengan una alta carga de sofobuvir, por ejemplo que contengan más del 35 % de sofobuvir. Además, la Forma cristalina E micronizada o de pequeño tamaño de partícula de sofobuvir es particularmente adecuada para su uso en la preparación de formulaciones secas que contienen altas

dosis de sofosbuvir como único API o en combinación con otro principio farmacéutico activo, por ejemplo, ledipasvir.

El sofosbuvir micronizado o de tamaño de partícula pequeño que comprende la Forma cristalina E de sofosbuvir puede tener propiedades de fluidez preferidas, es decir, presentar una velocidad de flujo no mayor a 100 s/100 g, más preferido no mayor a 80 s/100 g, más preferido no mayor a 65 s/100 g, medido por flujo-a-orificio en el sistema automatizado de ensayo de polvo Pharma-Test 41-03300.

La Forma cristalina E micronizada o de pequeño tamaño de partícula del sofosbuvir puede tener propiedades de compresibilidad ventajosas, es decir, presentar una densidad constante no menor a 0,40 g/mL, preferiblemente no menor a 0,43 g/mL, más preferiblemente no menor a 0,48 g/mL medida a 0,2 MPa.

La Forma cristalina E micronizada o de pequeño tamaño de partícula del sofosbuvir se puede caracterizar por una sorción de agua no mayor al 0,5 %, más preferiblemente no mayor al 0,3 %, medida por DVS y contenido de agua tras el equilibrio a 90 % de RH.

La Forma cristalina E micronizada o de tamaño de partícula pequeño de sofosbuvir se puede caracterizar por cualquiera de los aspectos anteriores o cualquier combinación de los mismos.

La forma cristalina micronizada o de tamaño de partícula pequeño E se puede caracterizar por una PSD de d(0,1) 0,4-0,6  $\mu\text{m}$ , d(0,5) 1,0-2,0  $\mu\text{m}$  y d(0,9) 3,2-5,0  $\mu\text{m}$ ; una velocidad de flujo no mayor a 100 s/100 g, más preferiblemente no mayor a 80 s/100 g, más preferiblemente no mayor a 65 s/100 g; una densidad constante no menor a 0,40 g/mL, preferiblemente no menor a 0,48 g/mL medida a 0,2 MPa; y una sorción de agua no mayor al 0,5 %, más preferiblemente no mayor al 0,3 % medida por DVS y contenido de agua tras el equilibrio a 90 % de RH.

Preferiblemente, la forma cristalina micronizada o de tamaño de partícula pequeño E se puede caracterizar por una PSD de d(0,1) 0,4-0,6  $\mu\text{m}$ , d(0,5) 1,0-2,0  $\mu\text{m}$  y d(0,9) 3,2-5,0  $\mu\text{m}$ ; una velocidad de flujo no mayor a 65 s/100 g; una densidad constante no menor a 0,48 g/mL medida a 0,2 MPa; y una sorción de agua mayor al 0,3 % medida por DVS y contenido de agua tras el equilibrio a 90 % de RH.

La forma micronizada o de tamaño de partícula pequeño de sofosbuvir descrita anteriormente se puede usar para preparar composiciones y formulaciones farmacéuticas.

La presente invención comprende composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden la Forma cristalina E de sofosbuvir de la presente invención, en particular formulaciones que contienen una alta carga de sofosbuvir, por ejemplo que contienen más del 35 % de sofosbuvir. Típicamente, la composición farmacéutica es una composición sólida y el sofosbuvir conserva su forma en estado sólido. La composición farmacéutica puede incluir sofosbuvir como principio activo único o en combinación con otro principio activo, por ejemplo, ledipasvir. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar por un proceso que comprende la combinación de la forma cristalina de sofosbuvir divulgada en la presente con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas sólidas de acuerdo con la presente invención son, por ejemplo, polvos, gránulos, pellets, cápsulas o comprimidos.

La composición farmacéutica de la presente invención se presenta preferiblemente en forma de comprimido que comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El comprimido es de uso oral.

Las composiciones farmacéuticas en forma de comprimido de acuerdo con la presente invención son preferiblemente para su uso en el tratamiento de infecciones por el virus de la hepatitis C, como es conocido en la técnica. Como se ha indicado anteriormente, en tal uso las composiciones en forma de comprimido de acuerdo con la presente invención se pueden usar solas o en forma de terapia combinada como se conoce en la técnica.

Los procesos para preparar las composiciones farmacéuticas en forma de comprimido de acuerdo con la invención son conocidos en la técnica. El sofosbuvir se puede granular en seco o en húmedo antes de comprimirlo, o las mezclas de comprimidos se pueden comprimir directamente. Para la preparación de comprimidos de sofosbuvir se prefiere la granulación, y sobre todo la granulación en seco. Los comprimidos de acuerdo con la invención pueden estar recubiertos para facilitar la deglución y/o mejorar el aspecto del comprimido.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en forma de comprimido o preparar por granulación en seco. Se prefiere que en el método de granulación en seco se forme primero un comprimido, que posteriormente se tritura para obtener partículas más fáciles de manipular que la mezcla original. Las partículas trituradas se tamizan, se mezclan opcionalmente en una mezcladora como una mezcladora de tambor y, a continuación, se prensan para obtener la composición farmacéutica en forma de comprimido como se describe en la presente.

Preferiblemente, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende sofosbuvir de tamaño de partícula pequeño, preferiblemente el sofosbuvir cristalino de tamaño de partícula pequeño es sofosbuvir E cristalino de tamaño de partícula pequeño. La composición farmacéutica puede comprender sofosbuvir de pequeño tamaño de

partícula y sin deslizantes.

Los deslizantes son conocidos por los expertos. Reducen la fricción y la cohesión entre partículas y, por tanto, aumentan la fluidez de las partículas o mezclas. El dióxido de silicio coloidal es el deslizante más conocido. A diferencia de los deslizantes, los lubricantes evitan que los ingredientes se adhieran, por ejemplo, a los punzones de las pastillas. El estearato de magnesio es un lubricante típico (no un deslizante).

La composición que comprende sofobuvir de tamaño de partícula pequeño comprende preferiblemente no más del 1,5 % de lubricantes basados en el peso de la composición total. En particular, la composición de la presente invención comprende preferiblemente no más del 1,5 % de estearato de magnesio, más preferiblemente no más del 1 %, preferiblemente no más del 0,6 % de estearato de magnesio en peso de la composición total. Para las composiciones farmacéuticas que comprenden sofobuvir de pequeño tamaño de partícula y sin deslizantes, la distribución del tamaño de partícula se mide por difracción láser, y preferiblemente se refiere a una distribución de volumen. Preferiblemente, la distribución del tamaño de las partículas se mide con el Malvern Mastersizer 2000. El sofobuvir de tamaño de partícula pequeño tiene preferiblemente un  $d(0,5)$  menor a 20  $\mu\text{m}$ , preferiblemente menor a 10  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente menor a 5  $\mu\text{m}$  y más preferiblemente entre 1-2  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, el sofobuvir de tamaño de partícula pequeño tiene un  $d(0,1)$  de 0,4-0,6  $\mu\text{m}$ , un  $d(0,5)$  de 1,0-2,0  $\mu\text{m}$  y un  $d(0,9)$  de 3,2-5,0  $\mu\text{m}$ . Los valores  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$  y  $d(0,9)$  se basan en una distribución de volumen. Para la medición del tamaño de partícula del sofobuvir se remite también al Ejemplo 22.

Habiendo descrito así la invención con referencia a realizaciones particulares preferidas y ejemplos ilustrativos, los expertos en la técnica pueden apreciar modificaciones a la invención como se describe e ilustra que no se apartan del alcance de las reivindicaciones. Los Ejemplos se exponen para ayudar a comprender la invención, pero no pretenden ni se deben interpretar como una limitación de su alcance.

## 25 Métodos

Difracción de rayos X en polvo (Ejemplos 1-13)

Los análisis de difracción de polvo de rayos X se realizaron en difractómetro de polvo de rayos X Bruker D8 Advance; radiación de  $\text{Cu K}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ); detector tipo Lynx eye; temperatura de laboratorio 22-25 °C; anillo portamuestras de PMMA (por sus siglas en inglés). Antes del análisis, las muestras se molieron suavemente con un mortero para obtener un polvo fino. La muestra triturada se ajustó en una cavidad del portamuestras y la superficie de la muestra se alisó por medio de un cubreobjetos.

35 Parámetros de medición:

Rango de barrido: 2-40 grados 2-theta;  
Modo de barrido: continuo;  
Tamaño de paso: 0,05 grados;  
40 Tiempo por paso: 0.5 s;  
Giro de muestra: 30 rpm;  
Portamuestras: Anillo portamuestras de PMMA.

Las posiciones de los picos descritas se determinaron usando polvo de silicio como patrón interno en una mezcla con la muestra medida. La posición del pico de silicio (Si) se corrigió con respecto al pico teórico de silicón: 28,45 grados dos-theta, y las posiciones de los picos medidos se corrigieron respectivamente.

Medidas de DVS

50 Las mediciones de DVS se realizaron con el instrumento SMS DVS

Parámetros de análisis:

Masa: 20-30 mg  
55 Temperatura: 25 °C  
Rango de humedad: Ciclo de 0 %-90 %-0 %.  
Tamaño de paso: 10 % de RH  
Dm/dt: 0,002 %/min  
Duración mínima del paso: 60 min  
60 Duración máxima del paso: 720 min

Fluidez

La velocidad de flujo (s/100 g polvo) se midió en la velocidad de flujoímetro Pharma-Test 41-03300. El aparato consiste en un embudo de polvo cónico de acero inoxidable en la parte mayor del aparato equipado con una pala de agitación automatizada y una boquilla de vertido de 15 mm debajo del embudo. El método consiste en verter una cantidad de polvo

en régimen de agitación a través de una boquilla de tamaño determinado, y pesar el peso del polvo que pasó por la boquilla y el tiempo que tardó. Los resultados se expresan en s/100 g.

#### Método de medición de la PSD de la Forma 7

Si se usa una medición en húmedo, las partículas que se van a medir se dispersan en un dispersante, preferiblemente un dispersante con un índice de refracción (RI, por sus siglas en inglés) de 1,403, y la medición se realiza a 2000 rpm y ultrasónicos por 120 s antes de la medición. Preferiblemente, a menos que se indique lo contrario, la distribución del tamaño de las partículas se determina usando una medición en húmedo usando un Mastersizer 2000 de Malvern Instruments y la unidad de dispersión de muestras en húmedo Hydro 2000S de Malvern y aceite de silicona como dispersante. A menos que se indique lo contrario, es preferible usar los siguientes ajustes:

|                                     |                            |
|-------------------------------------|----------------------------|
| Número de ciclos de medición        | 3                          |
| Modelo de análisis                  | Fraunhofer                 |
| Oscurecimiento                      | 5-15 %                     |
| Tiempo de medición de la muestra    | 10 segundos                |
| Tiempo de sonicación                | 120 s antes de la medición |
| Velocidad del agitador              | 2000 rpm                   |
| Dispersante RI (aceite de silicona) | 1,403                      |

#### Método de medición de PSD de la Forma E -

Medición de celdas secas

Mastersizer 2000

Modelo de análisis: Uso general

Polvo RI: 1,573

Absorción: 0,5

Nombre del dispersante: Dispersión en seco (aire)

Dispersante RI: 1,0

Sensibilidad: Normal (polvo fino)

Filtrado del oscurecimiento: Encendido (0,5-3 %)

Tiempo de medición: 5 segundos (5000 instantáneas)

Tiempo de medición de fondo: 5 segundos (5000 instantáneas)

Repetición de alícuotas: 1

Repetición de medidas: 1

Presión: 250 kPa [2,5 bar]

Velocidad de alimentación de la célula de flujo: 30 %

Hueco del embudo: 5 mm

Alimentador con tamiz pequeño lleno de bolas (2/3 por volumen)

Entre muestreo y muestreo, limpiar la cubeta con aire por 30 segundos.

Antes de cada medición se debe realizar una medición de fondo. Adicionar aproximadamente 0,5 g de sofobuvir en polvo con una espátula directamente en el alimentador. Iniciar el trabajo del alimentador. El oscurecimiento se debe situar entre el 0,5 y el 3 %.

#### Ejemplos

Los Ejemplos 1-13 describen métodos para preparar la Forma cristalina E de sofobuvir que se usa para preparar las composiciones farmacéuticas de la invención, y el análisis de la Forma cristalina E. Para los Ejemplos 1-13, el sofobuvir se preparó de acuerdo con el método descrito en B. S. Ross, P. G. Reddy, H.-R. Zhang, S. Rachakonda, M. J. Sofia, *J. Org. Chem.* 2011, 76, 8311. La Forma 1 de sofobuvir se puede obtener de acuerdo con el proceso descrito en WO 2010/135569.

#### Ejemplo 1: Preparación de la Forma cristalina E de sofobuvir

El sofobuvir (1 g, Forma 1) se disolvió en acetona (3 mL) agitando a  $25 \pm 5$  °C. Posteriormente se adicionó diisopropiléter (DIPE, por sus siglas en inglés) (10 mL) agitando para obtener turbidez. La masa se agitó por 2 h a  $25 \pm 5$  °C para dar un sólido blanco. A esta masa se le adicionó DIPE (15 mL) y la masa se agitó por 48 h a  $25 \pm 5$  °C. La masa se filtró y el sólido obtenido se secó a 50 °C al vacío por 12 h para proporcionar la Forma E de sofobuvir (como se confirmó por XRPD).

**Ejemplo 2: Preparación de la Forma cristalina E de sofosbuvir**

Se cargó metilisobutilcetona (MIBK) (3 mL) en un matraz de vidrio de fondo redondo de 100 mL equipado con un agitador mecánico. Se enfrió a 0-5 °C bajo agitación y se adicionó sofosbuvir (1 g, Forma 1) a 0-5 °C. Esta masa se aclaró lentamente después de 15 min a 0 a 5 °C. En este punto, se adicionaron cristales de semilla de sofosbuvir Forma E (10 mg) a la misma temperatura. Tras 10 min de agitación a la misma temperatura, se observó la formación de precipitado. La masa se agitó por 1 h de 0 a 5 °C. Se adicionó ciclohexano (10 mL, preenfriado a 15 °C) y se agitó de 2 a 5 min. El precipitado se filtró y se lavó con ciclohexano (10 mL, preenfriado a 15 °C). El sólido se secó a 33 °C al vacío por 12 h, para proporcionar la Forma E de sofosbuvir (como se confirmó por XRPD).

**Ejemplo 3: Preparación de la Forma cristalina E de sofosbuvir**

Se cargó MIBK (60 mL) en un matraz de vidrio de fondo redondo de 250 mL equipado con un agitador mecánico. Esto se enfrió a 10-15 °C bajo agitación y se adicionó sofosbuvir (20 g, Forma 1) a 10-15 °C. Esta masa se aclaró lentamente después de 20 min a 10 a 15 °C. En este punto, se adicionaron cristales de semilla de sofosbuvir Forma E (100 mg) a la misma temperatura. Tras 10 min de agitación a la misma temperatura, se observó la formación de precipitado. La masa se agitó por 1 h a 10-15 °C. Se adicionó lentamente ciclohexano (60 mL, preenfriado a 15 °C) y se agitó de 2 a 5 min. El precipitado se filtró y se lavó con ciclohexano (60 mL, preenfriado a 15 °C). El sólido obtenido se secó a 33 °C al vacío por 12 h, para proporcionar la Forma E de sofosbuvir (como se confirmó por XRPD).

**Ejemplo 4: Preparación de la Forma cristalina E de sofosbuvir**

Se cargó MIBK (3 mL) en un matraz de vidrio de fondo redondo de 100 mL equipado con un agitador mecánico. Esto se enfrió a 10-15 °C bajo agitación y se adicionó sofosbuvir (1 g, Forma 1) a 10-15 °C. Esta masa se aclaró lentamente después de 15 min a 10 a 15 °C. En este punto, se adicionaron cristales de semilla de sofosbuvir Forma E (10 mg) a la misma temperatura. Tras 10 min de agitación a la misma temperatura, se observó la formación de precipitado. La masa obtenida se agitó por 1 h a 10-15 °C. Se adicionó ciclohexano (10 mL, preenfriado a 15 °C) y se agitó de 2 a 5 min. El precipitado obtenido se filtró y se lavó con ciclohexano (10 mL, preenfriado a 15 °C). El sólido se secó a 33 °C al vacío por 12 h, para proporcionar la Forma E de sofosbuvir (como se confirmó por XRPD).

**Ejemplo 5: Cristalografía de rayos X monocristalina de la Forma E**

La Forma E de sofosbuvir se selló en capilares de 1 mm (1257-67A), vidrio No. 50. El patrón de difracción del polvo se midió usando radiación de sincrotrón a una longitud de onda de 0,40003(1) Å. Las posiciones de reflexión se determinaron en el software DASH y la indexación se realizó en el software DICVOL91. La estructura se resolvió con el programa DASH 3.2. El refinamiento de la estructura a partir del polvo se realizó en el software JANA2006. No se detectó la presencia de ningún disolvente.

Parámetros de red para sofosbuvir, Forma E:

|                                        |                 |
|----------------------------------------|-----------------|
| longitud_celda_a                       | 14,4723(2) Å    |
| longitud_celda_b                       | 17,0212(2) Å    |
| longitud_celda_c                       | 5,22862(6) Å    |
| ángulo_celda_alfa                      | 90,0000°        |
| ángulo_celda_beta                      | 100,297(1)°     |
| ángulo_celda_gamma                     | 90,0000°        |
| celda_volumen 1267,3                   | Å <sup>3</sup>  |
| nombre_del_grupo_espacial_de_simetría: | P2 <sub>1</sub> |
| simetría_celda_configuración           | monoclínica     |
| temperatura_medida_célula              | 293 K           |

**Ejemplo 6: Preparación de la Forma cristalina E de sofosbuvir**

El sofosbuvir de la Forma 1 (100 g) junto con MIBK (500 mL) se cargó en un matraz de fondo redondo de 4 boquillas equipado con un agitador mecánico. El contenido de humedad de la reacción se ajustó a 0,5-2,0 % en volumen y el material se disolvió bajo agitación a 10 + 5 °C. Se adicionaron los cristales de sofosbuvir de la Forma E (1 g) al matraz de reacción y se continuó agitando a la misma temperatura. Durante este intervalo, el sólido blanco precipitó lentamente de la mezcla de reacción. Tras 4-7 horas, se adicionó ciclohexano (1000 mL) y se filtró la suspensión resultante. El sólido blanco obtenido se lavó con ciclohexano (2 X 200 mL) y se secó a 45 °C al vacío por 12 h para producir la Forma E de sofosbuvir (como se confirmó por XRPD).

**Ejemplo 7: Preparación de la Forma cristalina E de sofobuvir**

Se adicionaron MIBK (5 L) y agua (1 % de MIBK) a el sofobuvir de la Forma 1 (1 kg) a  $9 \pm 3$  °C. La suspensión resultante se agitó a 50-200 rpm hasta que la solución se aclaró. La solución se filtró para eliminar cualquier partícula extraña. Se lavó con MIBK (0,5 L). La solución filtrada se cargó, se agitó a  $9 \pm 3$  °C, se sembró con los cristales de la Forma E y la solución se agitó como tal por  $4 \pm 0,5$  h a 50-200 rpm. Posteriormente se adicionó ciclohexano (10 L) y la solución se agitó por  $1 \pm 0,5$  h a  $9 \pm 3$  °C. La suspensión se filtró y la torta se lavó con ciclohexano (2 X 2 L). El sólido se secó al vacío por 12 h a una Tj 40-50 °C para obtener sofobuvir Forma E en un rendimiento del 80 al 90 %.

**Ejemplo 8: Preparación de la Forma cristalina E micronizada de sofobuvir**

La Forma cristalina micronizada E de sofobuvir se preparó usando un micronizador de chorro de aire con placa de 100 mm, velocidad de alimentación de 0,5 Kg/h, presión de alimentación de 650 kPa +/- 50 kPa [6,5 bares +/- 0,5 bares], presión de molienda de 600 kPa +/- 50 kPa [6 bares +/- 0,5 bares].

**Ejemplo 9: Fluidez de la Forma cristalina micronizada E de sofobuvir**

Se vertieron en el embudo 70 g del polvo de Forma cristalina micronizada E de sofobuvir obtenido de acuerdo con el Ejemplo 8. Se inició la agitación a 20 rpm, se abrió la boquilla de vertido y el polvo empezó a fluir por la boquilla. Al cabo de aproximadamente 30 segundos se interrumpió el flujo. El peso exacto del polvo que pasó por el orificio y el tiempo exacto en segundos se registraron automáticamente. La velocidad de flujo resultante, medida en análisis duplicados, fue: 63 s/100 g y 62 s/100 mg.

**Ejemplo 10: Compresibilidad de la Forma cristalina micronizada E de sofobuvir**

Los perfiles de compresión se obtuvieron usando una matriz y un punzón de cara plana montados en un analizador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Reino Unido).

200 mg de la Forma cristalina micronizada E de sofobuvir obtenida de acuerdo con el Ejemplo 8 se comprimen en un molde de acero (con una velocidad de desplazamiento de 0,03 mm/s). Se realizó un procedimiento cíclico (similar al golpeteo): compresión, posteriormente retracción, relajación por 15 s y, a continuación, repetición de los pasos de compresión (en total 10 pasos). Cada paso ejerce una presión de 0,2 MPa sobre la muestra. La densidad de la muestra se calcula al dividir el peso por el volumen de la muestra para cada ciclo. La densidad máxima se alcanza en 10 pasos. El desplazamiento máximo de compresión fue de 0,5 mm. La densidad resultante fue: 0,48 g/mL.

**Ejemplo 11: Preparación de la Forma cristalina E de sofobuvir**

El sofobuvir (Forma 1, 1 g) se suspendió en éter metil-*terc*-butílico (MTBE, por sus siglas en inglés) (20 mL) y se agitó por 2 h a  $25 \pm 5$  °C. La masa se calentó a 50 °C por 3 h y posteriormente se llevó a  $25 \pm 5$  °C. Se adicionó *n*-heptano (10 mL) y la mezcla de reacción se agitó por 72 h a  $25 \pm 5$  °C. Posteriormente, se filtró la masa y el sólido obtenido se secó a 50 °C al vacío por 12 h, para proporcionar la Forma E de sofobuvir (como se confirmó por XRPD).

**Ejemplo 12: Preparación de la Forma cristalina E de sofobuvir**

El sofobuvir (Forma 1, 1 g) se disolvió en *t*-butanol (3 mL). Después se adicionó *n*-hexano (8 mL), la masa se agitó por 24 h a  $25 \pm 5$  °C para proporcionar un sólido blanco. La masa se filtró y el sólido obtenido se secó a 50 °C al vacío por 12 h para proporcionar la Forma E de sofobuvir (como se confirmó por XRPD).

**Ejemplo 13: Preparación de la Forma cristalina E de sofobuvir**

El sofobuvir (Forma 1, 1 g) se disolvió en metilisobutilcetona (MIBK) (4 mL). Después se adicionó ciclohexano (4 mL), y la masa obtenida se agitó por 24 h a  $25 \pm 5$  °C para proporcionar un sólido blanco. La masa se filtró y el sólido obtenido se secó a 50 °C al vacío por 12 h para proporcionar la Forma E de sofobuvir (como se confirmó por XRPD, Figura 1 y Figura 7).

Difracción de rayos X en polvo (Ejemplos 14 y 15)

Las muestras se midieron en un difractómetro de rayos X de polvo D8 Advance (Bruker AXS, Karlsruhe, Alemania) en un portamuestras giratorio de PMMA (diámetro: 25 mm; profundidad: 1 mm) en modo de reflexión (geometría de Bragg-Brentano). Los datos brutos se analizaron con el programa EVA (Bruker AXS, Karlsruhe, Alemania). La sustracción de fondo y la eliminación de K $\alpha$ 2 no se realizaron con los difractogramas mostrados en la Figura 2 y la Figura 8. Las intensidades de los picos (Figura 9) se determinaron tras la sustracción del fondo.

Condiciones de medición:

Radiación  
Fuente

Cu K $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2  
34 kV/40 mA

|                                             |                                    |
|---------------------------------------------|------------------------------------|
| Detector                                    | Vantec-1 (ventana electrónica: 3°) |
| Filtro K $\beta$                            | Ni (haz difractado)                |
| Medir el diámetro del círculo               | 435 mm                             |
| Ranura de la ventana del detector           | 12 mm                              |
| Ranura antidispersión (haz difractado)      | 8 mm                               |
| Ranura de divergencia                       | V6,00 (variable)                   |
| Ranura de Soller (haz incidente/difractado) | 2.5°                               |
| Alcance 2 $\theta$                          | 2° ≤ 2 $\theta$ ≤ 55°              |
| Tamaño de paso                              | 0,016                              |
| Tiempo de paso                              | 0,2 s                              |

Los Ejemplos 14-21 no se refieren a la Forma E de sofobuvir y describen la preparación y el análisis de la Forma 7 de sofobuvir. Para los Ejemplos 14 y 15, el sofobuvir se preparó de acuerdo con el método descrito en B. S. Ross, P. G. Reddy, H.-R. Zhang, S. Rachakonda, M. J. Sofia, *J. Org. Chem.* 2011, 76, 8311. La Forma 1, descrita en US 2011/251152, se obtuvo por cristalización del producto a partir de una solución de diclorometano a temperatura ambiente.

#### Ejemplo 14: Preparación de la Forma cristalina 7 de sofobuvir

La Forma 1 de sofobuvir (200 mg) se almacenó como polvo en un vial de vidrio abierto a 40 °C/75 % de humedad relativa. Al cabo de 4 semanas se había formado un sólido amorfo. Este sólido cristalizó durante el almacenamiento continuo a 40 °C/75 % de humedad relativa tras un periodo adicional de 4 semanas. La Forma 7 se obtuvo como un sólido incoloro en rendimiento cuantitativo.

La Figura 8 muestra el difractograma de rayos X de la Forma 7.

#### Ejemplo 15: Preparación de la Forma cristalina 7 de sofobuvir

La Forma 1 de sofobuvir (1,04 g) se calentó en agua desionizada (40 mL) a 50 °C por 2 horas con agitación. Se produjo una disolución parcial y el sólido restante se transformó en una masa pegajosa. No se observó cristalización. Se adicionaron aproximadamente 10 mg de Forma 7 (obtenida por el procedimiento del Ejemplo 14) y la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. La cristalización de la Forma 7 se produjo durante el almacenamiento en la noche. Quedó una pequeña cantidad de masa pegajosa en la barra agitadora, que se retiró mecánicamente. La Forma 7 se aisló por filtración y se secó en un desecador al vacío sobre gel de sílice.

Difracción de rayos X en polvo (Ejemplos 16-20)

Las muestras se midieron en un difractómetro de rayos X de polvo D8 Advance (Bruker AXS, Karlsruhe, Alemania) en un portamuestras giratorio de PMMA (diámetro: 25 mm; profundidad: 1 mm) en modo de reflexión (geometría de Bragg-Brentano). Las condiciones de las mediciones se resumen en la Tabla siguiente. Los datos brutos se analizaron con el programa EVA (Bruker AXS, Karlsruhe, Alemania). La sustracción de fondo y la eliminación de K $\alpha$ 2 no se realizaron con el difractograma mostrado en la Figura 10. Las intensidades de los picos se determinaron tras la sustracción del fondo.

|                                             |                                                       |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Radiación                                   | Cu K $\alpha$ 1/K $\alpha$ 2 ( $\lambda$ = 1,54187 Å) |
| Fuente                                      | 34 kV/40 mA                                           |
| Detector                                    | Vantec-1 (ventana electrónica: 3°)                    |
| Filtro K $\beta$                            | Ni (haz difractado)                                   |
| Medición del diámetro del círculo           | 435 mm                                                |
| Ranura de la ventana del detector           | 12 mm                                                 |
| Ranura antidispersión (haz difractado)      | 8 mm                                                  |
| Ranura de divergencia                       | V6,00 (variable)                                      |
| Ranura de Soller (incidente/haz difractado) | 2.5°                                                  |
| rango de 2 $\theta$                         | 2° ≤ 2 $\theta$ ≤ 55°                                 |
| Tamaño de paso                              | 0,016                                                 |
| Tiempo de paso                              | 0,2 s                                                 |

**Ejemplos de referencia A-C para los Ejemplos 16-21:****A. Material de partida del sofosbuvir (Forma 1)**

La Forma 1 de sofosbuvir se preparó por cristalización de sofosbuvir a partir de diclorometano de acuerdo con el método descrito en B. S. Ross, P. G. Reddy, H.-R. Zhang, S. Rachakonda, M. J. Sofia, *J. Org. Chem.* 2011, 76, 8311 (p. 8311). La Forma 1 de sofosbuvir se caracteriza por picos XRPD en aproximadamente 5,0, 7,3, 9,4, 18,1  $\pm$  0,2 grados 2-theta. La Forma 1 se puede caracterizar además por picos XRPD adicionales en aproximadamente 8,8, 10,0, 11,4, 15,0 y 22,3 grados 2-theta  $\pm$  0,2 grados 2-theta.

**B. Preparación de cristales de semilla de sofosbuvir de Forma 7**

(i) Pequeñas cantidades de la Forma 7 de sofosbuvir, que se usaron como cristales de semilla, se prepararon de la siguiente manera: La Forma 1 de sofosbuvir (200 mg) se almacenó como polvo en un vial de vidrio abierto a 40 °C/75 % de humedad relativa. Tras 8 semanas de almacenamiento a 40 °C/75 % de humedad relativa, la Forma 7 se obtuvo como un sólido incoloro en rendimiento cuantitativo.

(ii) La Forma 7 se preparó calentando la Forma 1 de sofosbuvir (1,04 g) en agua desionizada (40 mL) a 50 °C por 2 horas con agitación. Se produjo una disolución parcial y el sólido restante se transformó en una masa pegajosa. No se observó cristalización. Se adicionaron aproximadamente 10 mg de Forma 7 [obtenida de (i)] y la mezcla se enfrió a temperatura ambiente.

La cristalización de la Forma 7 se produjo durante el almacenamiento en la noche. Quedó una pequeña cantidad de masa pegajosa en la barra agitadora, que se retiró mecánicamente. La Forma cristalina 7 se aisló por filtración y se secó en un desecador evacuado sobre gel de sílice.

**C. Preparación de MTBE (éter metil-terc-butílico) saturado de agua**

El MTBE saturado de agua se preparó agitando enérgicamente (500 rpm) el MTBE con agua desionizada en una proporción de volumen de 10:1 por 30 minutos a temperatura ambiente y posterior separación de fases para eliminar la capa acuosa. La fase orgánica se preparó en fresco antes de su uso. Alternativamente, la fase orgánica se puede almacenar en un contenedor sellado a temperatura ambiente.

**Ejemplo 16: Preparación de la Forma 7 de sofosbuvir**

El sofosbuvir (50 g) se disolvió casi por completo en MTBE saturado de agua (800 mL) a temperatura ambiente. La solución se filtró a través de un filtro doblado. Se adicionaron cristales de semilla de la Forma 7 de sofosbuvir (150 mg) y la solución se almacenó por dos días en un matraz cerrado a temperatura ambiente sin agitación. Los cristales formados (Forma 7) se aislaron por filtración, se lavaron con una pequeña cantidad de MTBE y se secaron a temperatura ambiente al vacío (0,2 kPa [2 mbar]) durante la noche. El rendimiento fue de 23,9 g. El licor madre se concentró hasta un volumen de 350 mL en un evaporador rotatorio y después se almacenó por dos días en un matraz cerrado a temperatura ambiente sin agitación. Durante este tiempo, el aceite inicialmente separado cristalizó. El sólido formado (Forma 7) se aisló por filtración, se lavó con una pequeña cantidad de MTBE y se secó a temperatura ambiente al vacío (0,2 kPa [2 mbar]) durante la noche. El peso del sólido (Forma 7) fue de 15,7 g. Por tanto, el rendimiento combinado de la Forma 7 fue de 39,7 g (79 %).

**Ejemplo 17: Preparación de la Forma 6 de sofosbuvir, pequeña escala**

El sofosbuvir (2 g) se disolvió casi por completo en MTBE saturado de agua (30 mL) a temperatura ambiente. La solución se filtró a través de un filtro doblado y se agitó magnéticamente (400 rpm) por 12 h en un matraz cerrado a temperatura ambiente. Los cristales formados (consistentes en la Forma 6) se aislaron por filtración, se lavaron con una pequeña cantidad de MTBE y se secaron a temperatura ambiente al vacío (0,2 kPa [2 mbar]) durante la noche. El rendimiento fue de 1,2 g (60 %).

**Ejemplo 18: Preparación de la Forma 6 de sofosbuvir**

El sofosbuvir (40 g) se disolvió casi por completo en MTBE saturado de agua (600 mL) a temperatura ambiente. La solución se filtró a través de un filtro doblado. Se adicionaron cristales de semilla de sofosbuvir Forma 6 (100 mg, obtenidos del Ejemplo 17) y la solución se agitó mecánicamente (300 rpm) por 12 h en un matraz cerrado a temperatura ambiente. Los cristales formados (Forma 6) se aislaron por filtración, se lavaron con una pequeña cantidad de MTBE y se secaron a temperatura ambiente al vacío (0,2 kPa [2 mbar]) durante la noche. El rendimiento fue de 29,6 g (74 %).

**Ejemplo 19: Disolución de la Forma 6 y Forma 7 de sofosbuvir**

Se usó la Forma 6 de sofosbuvir preparada de acuerdo con el Ejemplo 18 anterior y la Forma 7 de sofosbuvir preparada de acuerdo con el Ejemplo 16 anterior. La disolución de la Forma 7 de sofosbuvir y Forma 6 se midió (por triplicado) en un amortiguador de fosfatos a 50 mM a 37 °C (pH 6,8, 900 mL), usando el aparato USP II, método de la paleta. Cada 5



minutos, se tomó una sonda y se midió por UV/VIS a 260 nm y longitud de trayecto de 0,1 cm; la UV/VIS se midió en un Agilent modelo 8453 con Chem Station Dissolution Software. Para la prueba se usaron 400 mg de la Forma 6 o Forma 7 de sofobuvir, y los porcentajes se dan en relación con 400 mg del API. Los resultados se representan gráficamente en la Figura 13.

#### Ejemplo 20: Solubilidad y tamaño de las partículas de la Forma 6 o Forma 7 de sofobuvir

Se usó la Forma 6 de sofobuvir preparada de acuerdo con el Ejemplo 18 anterior y la Forma 7 de sofobuvir preparada de acuerdo con el Ejemplo 16 anterior.

La distribución del tamaño de las partículas se determinó usando una medición en húmedo usando un Mastersizer 2000 de Malvern Instruments y la unidad de dispersión de muestras en húmedo Hydro 2000S de Malvern y aceite de silicona como dispersante. Se usan los siguientes ajustes:

|                                     |                            |
|-------------------------------------|----------------------------|
| Número de ciclos de medición        | 3                          |
| Modelo de análisis                  | Fraunhofer                 |
| Oscurecimiento                      | 5-15 %                     |
| Tiempo de medición de la muestra    | 10 segundos                |
| Tiempo de sonicación                | 120 s antes de la medición |
| Velocidad del agitador              | 2000 rpm                   |
| Dispersante RI (aceite de silicona) | 1,403                      |

Los resultados figuran en la Tabla siguiente:

Tabla 3 Tamaño de las partículas (µm) de la Forma 7 y la Forma 6

|         | D <sub>10</sub> | D <sub>50</sub> | D <sub>90</sub> |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Forma 7 | 4,9             | 31,3            | 100,6           |
| Forma 6 | 2,0             | 8,2             | 22,9            |

La solubilidad se determinó de la siguiente manera: Se pesaron 100 mg de sustancia de prueba en un vial de vidrio, seguidos de la adición de 4 mL de disolvente (agua, HCl a 0,01 M, acetato de sodio/ácido acético a 20 mM [pH 4,5], KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 50 mM [pH 6,8]). Se adicionó una barra de agitación, se fijó el vial en un placa de calentamiento a 37 °C y se agitó la suspensión a 250 rpm. Después de 15 min y 1 h, se retiraron las muestras y se filtraron a través de un filtro de PTFE (por sus siglas en inglés) de 0,2 µm. 100 µL del filtrado claro se diluyeron con 900 µL de mezcla de acetonitrilo/agua (1:1) y 1 µL del mismo se analizó por UHPLC/UV (por sus siglas en inglés):

|                       |                                                                           |                  |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Instrumento:          | Agilent 1290 Infinity                                                     |                  |
| Longitud de onda:     | 260 nm                                                                    |                  |
| Columna:              | Phenomenex Kinetex XB-C18, 1,7 µm, 50 × 3 mm                              |                  |
| Temp. de columna:     | 40,0 °C                                                                   |                  |
| Flujo [mL/min]:       | 0,4                                                                       |                  |
| Volumen de inyección: | 1 µL                                                                      |                  |
| Disolvente A:         | Agua + 0,2 % de ácido fórmico + 0,1 % de HFBA (ácido heptafluorobutírico) |                  |
| Disolvente B:         | Acetonitrilo                                                              |                  |
| Gradiente             | Tiempo [min]                                                              | Disolvente B [%] |
|                       | 0,00                                                                      | 30,0             |
|                       | 7,00                                                                      | 70,0             |
|                       | 7,10                                                                      | 30,0             |
|                       | 10,00                                                                     | 30,0             |

Los resultados figuran en la Tabla siguiente:

Tabla 4 Solubilidades [mg/mL] de la Forma 6 o Forma 7 de sofobuvir después de 15 min y 1 h a 37 °C

|                                                   | Forma 7 |     | Forma 6 |     |
|---------------------------------------------------|---------|-----|---------|-----|
|                                                   | 15 min  | 1 h | 15 min  | 1 h |
| agua                                              | 3,1     | 3,1 | 2,4     | 2,3 |
| 0,01 M de HCl                                     | 3,2     | 3,2 | 2,5     | 2,4 |
| 20 mM de NaOAc/HOAc (pH 4,5)                      | 3,1     | 3,1 | 2,4     | 2,5 |
| 50 mM de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,8) | 3,2     | 3,0 | 2,3     | 2,3 |

La solubilidad de la Forma 7 medida en disolventes fisiológicamente relevantes a 37 °C después de 15 min y después de 1 hora es aproximadamente un tercio mayor que la solubilidad de la Forma 6. Este resultado es especialmente sorprendente si se tiene en cuenta que el tamaño de las partículas del lote examinado de la Forma 7 es claramente mayor al de la Forma 6. De ahí que la Forma 7 ofrezca una ventaja significativa en cuanto a su comportamiento de solubilidad.

#### Ejemplo 21: Datos de cristal único para la Forma 7 de sofobuvir

Los cristales de la Forma 7 de sofobuvir se obtuvieron por el procedimiento del Ejemplo 16.

Se seleccionó un pequeño prisma como cristal hermanado adecuado, ya que no se pudo encontrar un cristal único de volumen suficiente. Los datos se recogieron en un difractómetro CCD Gemini Atlas (Cu K $\alpha$ ) usando barridos  $\omega$ . Las ejecuciones de recolección de datos se optimizaron para el análisis de la configuración absoluta. Se refinaron los parámetros térmicos posicionales y anisotrópicos de todos los átomos distintos del hidrógeno. Los átomos de H unidos al carbono se colocaron geoméricamente. Las posiciones de los átomos de H se refinaron con restricciones suaves en las longitudes y ángulos de enlace para regularizar su geometría (C-H en el rango de 0,93-0,98). Las posiciones de los átomos de hidrógeno unidos al nitrógeno y al oxígeno se refinaron inicialmente con longitudes de enlace restringidas y después con restricciones de equitación.  $U_{iso}(H)$  se fijó en el rango de 1,2-1,5 veces  $U_{eq}$  del átomo padre. Las contribuciones de la componente gemela 1, la componente gemela 2, la componente invertida 1 y la componente invertida 2 se ajustaron a 0,60(4), 0,42(3), 0,00(4) y 0,03 (3), por lo que la asignación de la configuración absoluta es correcta. La rutina de cálculo de huecos Platon no informó de huecos residuales accesibles con disolvente.

Programas informáticos usados: Recolección de datos: CrysAlisPro CCD (Oxford Diffraction Ltd, 68 Milton Park, Abingdon, Oxfordshire OX14 4RX, Inglaterra, Versión 171.31.7, 2002); refinamiento de celdas: CrysAlisPro RED; reducción de datos: CrysAlisPro RED; programa usado para resolver la estructura: Superflip [Palatinus L. & Chapuis G. (2007). *J. Appl. Cryst.* 40, 786-790]; programa usado para refinar la estructura y el análisis de la configuración absoluta: Crystals [Betteridge, P.W., Carruthers, J.R., Cooper, R.I., Prout, K. & Watkin, D.J. (2003). *J. Appl. Cryst.* 36, 1487]; Gráficos moleculares: Mercury; el cálculo de vacíos fue realizado por Platon [Spek, A.L. (2003). PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool, Universidad de Utrecht, Utrecht, Países Bajos].

|                                               |                                                           |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Temperatura                                   | 120 K                                                     |
| Longitud de onda                              | Cu K $\alpha$                                             |
| Sistema de cristales                          | monoclínico                                               |
| Grupo espacial                                | P2 <sub>1</sub>                                           |
| Dimensiones de la celda unitaria              |                                                           |
| <i>a</i> [Å]                                  | 5,1667 (10)                                               |
| <i>b</i> [Å]                                  | 16,8545 (10)                                              |
| <i>c</i> [Å]                                  | 14,440 (10)                                               |
| $\beta$ [°]                                   | 100,189 (10)                                              |
| Volumen [Å <sup>3</sup> ]                     | 1237,6 (3)                                                |
| Z                                             | 2                                                         |
| Densidad (calculada) [g·cm <sup>-3</sup> ]    | 1,418                                                     |
| Coefficiente de absorción [mm <sup>-1</sup> ] | 1,56                                                      |
| <i>F</i> (000)                                | 554                                                       |
| Tamaño del cristal [mm]                       | 0,40 × 0,06 × 0,04                                        |
| Rango theta para la recolección de datos      | 4,1 a 67,0                                                |
| Rangos de índices                             | -6 ≤ <i>h</i> ≤ 6, -19 ≤ <i>k</i> ≤ 19, 0 ≤ <i>l</i> ≤ 17 |
| Reflexiones recolectadas                      | 4269                                                      |

|                                                                  |                                               |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Reflexiones independientes ( $R_{int}$ )                         | 4269 (0,049)                                  |
| Compleitud a $\Theta = 67,0^\circ$                               | 98,7 %                                        |
| Corrección de la absorción                                       | Semiempírica a partir de equivalentes         |
| $T_{min}$ , $T_{max}$                                            | 0,61, 0,94                                    |
| Método de refinamiento                                           | Mínimos cuadrados de matriz completa en $F^2$ |
| Datos / parámetros / restricciones                               | 4254 / 328 / 1                                |
| Calidad del ajuste en $F^2$                                      | 0,9228                                        |
| Índices $R$ finales [ $I > 2\sigma(I)$ ]                         | $R_1 = 0,0525$ , $wR_2 = 0,1375$              |
| Índices $R$ finales [todos los datos]                            | $R_1 = 0,0549$ , $wR_2 = 0,1458$              |
| Pico y agujero de mayor diferencia [ $e \cdot \text{\AA}^{-3}$ ] | 0,76, -0,50                                   |

**Ejemplo 22: Composiciones farmacéuticas (por ejemplo, comprimidos) de sofosbuvir**

| Ingredientes intragranulares (mg)      |                                      |                                      |
|----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                                        | Formulación de Forma E de sofosbuvir | Formulación de Forma 6 de sofosbuvir |
| <i>Parte I</i>                         |                                      |                                      |
| Tamaño de partícula pequeño sofosbuvir | 400                                  | 400                                  |
| Celulosa microcristalina               | 215                                  | 215                                  |
| Croscarmelosa de sodio                 | 30                                   | 30                                   |
| Manitol                                | 270                                  | 270                                  |
| Dióxido de silicio                     | -                                    | -                                    |
| <i>Parte II</i>                        |                                      |                                      |
| Estearato de magnesio                  | 5                                    | 5                                    |
| <b>Ingredientes extragranulares</b>    |                                      |                                      |
| <i>Parte III</i>                       |                                      |                                      |
| Celulosa microcristalina               | 45                                   | 45                                   |
| Croscarmelosa de sodio                 | 30                                   | 30                                   |
| <i>Parte IV</i>                        |                                      |                                      |
| Estearato de magnesio                  | 5                                    | 5                                    |
| Dióxido de silicio                     | -                                    | -                                    |
| Peso total del núcleo                  | 1000                                 | 1000                                 |

## 5 Método de preparación:

Los lotes se prepararon por un método de granulación en seco. Los ingredientes intragranulares de la Parte I se mezclaron por 10 minutos, el Estearato de Magnesio de la Parte II se adicionó a la mezcla y se mezcló por 5 minutos más. La mezcla obtenida se granuló con el rodillo compactador y se molió a través de un tamiz de 0,8 mm y se mezcló con los excipientes extragranulares de la Parte III por 10 minutos. El Estearato de Magnesio de la Parte IV adicionado a la mezcla y mezclado por 5 minutos más. La mezcla final se comprimió en comprimidos.

10

## Resultados físicos

|                                | Formulación de Forma E de sofosbuvir | Formulación de Forma 6 de sofosbuvir |
|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Factor de Hausner              | 1,22                                 | 1,22                                 |
| Índice de Carr                 | 18                                   | 18                                   |
| Peso del comprimido (mg)       | 1000                                 | 1000                                 |
| Dureza del comprimido (scu)    | 41                                   | 40                                   |
| Tiempo de desintegración (min) | 1:21                                 | 1:37                                 |

5 El factor de Hausner y el índice de Carr se usan frecuentemente como indicación de la fluidez de un polvo. El factor de Hausner es la relación entre el volumen a granel y el volumen compactado, calculada por la fórmula densidad a granel/densidad compactada. Las densidades aparente y aparente se miden de acuerdo con el método general de la Farmacopea. Un factor de Hausner  $< 1,25$  indica un polvo que fluye libremente. Un índice de Carr  $> 23$  indica un flujo deficiente.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende la Forma E de sofosbuvir, en donde la Forma E de sofosbuvir se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X con picos a 8,1, 12,1, 12,4, 13,5, 16,2 y 17,2 grados dos theta  $\pm$  0,1 grados dos theta, o en donde la Forma E de sofosbuvir se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X con picos a 8,1, 10,4, 13,5, 18,0 y 18,7 grados dos theta  $\pm$  0,1 grados dos theta.
- 10 2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la Forma E de sofosbuvir se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X con picos a 8,1, 12,1, 12,4, 13,5, 16,2 y 17,2 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta y ausencia de picos a: 10,9 y 14,2 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta.
- 15 3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la Forma E de sofosbuvir se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X con picos a 8,1, 10,4, 13,5, 18,0 y 18,7 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta y ausencia de picos a: 10,9 y 14,2 grados dos theta  $\pm$  0,2 grados dos theta.
- 20 4. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso como medicamento.
5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso como medicamento para el tratamiento de la hepatitis C.
6. Un proceso para preparar una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende combinar la forma cristalina de sofosbuvir con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

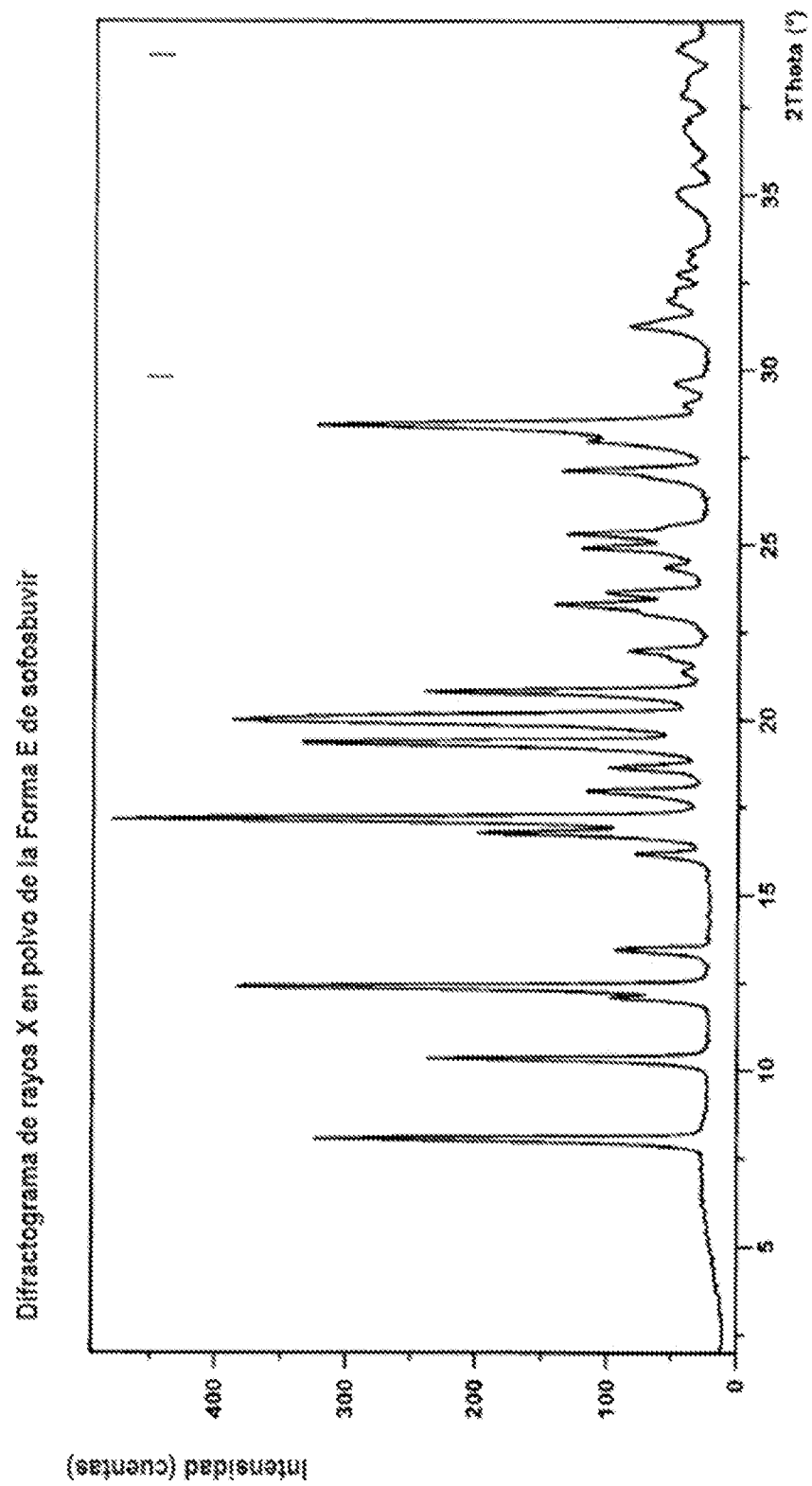


Figura 1

Difractograma de rayos X en polvo de la Forma 1 de sofobuvir

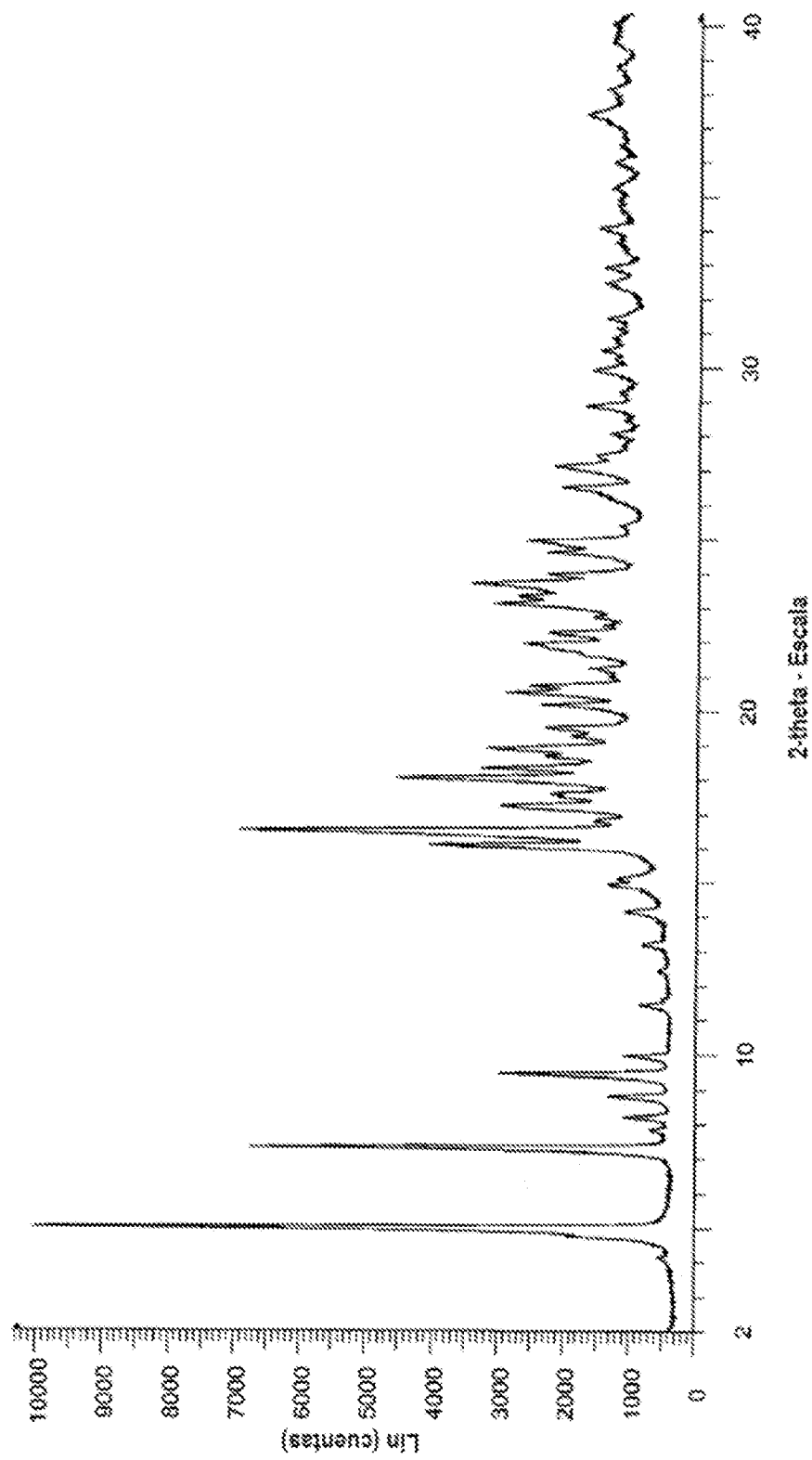


Figura 2

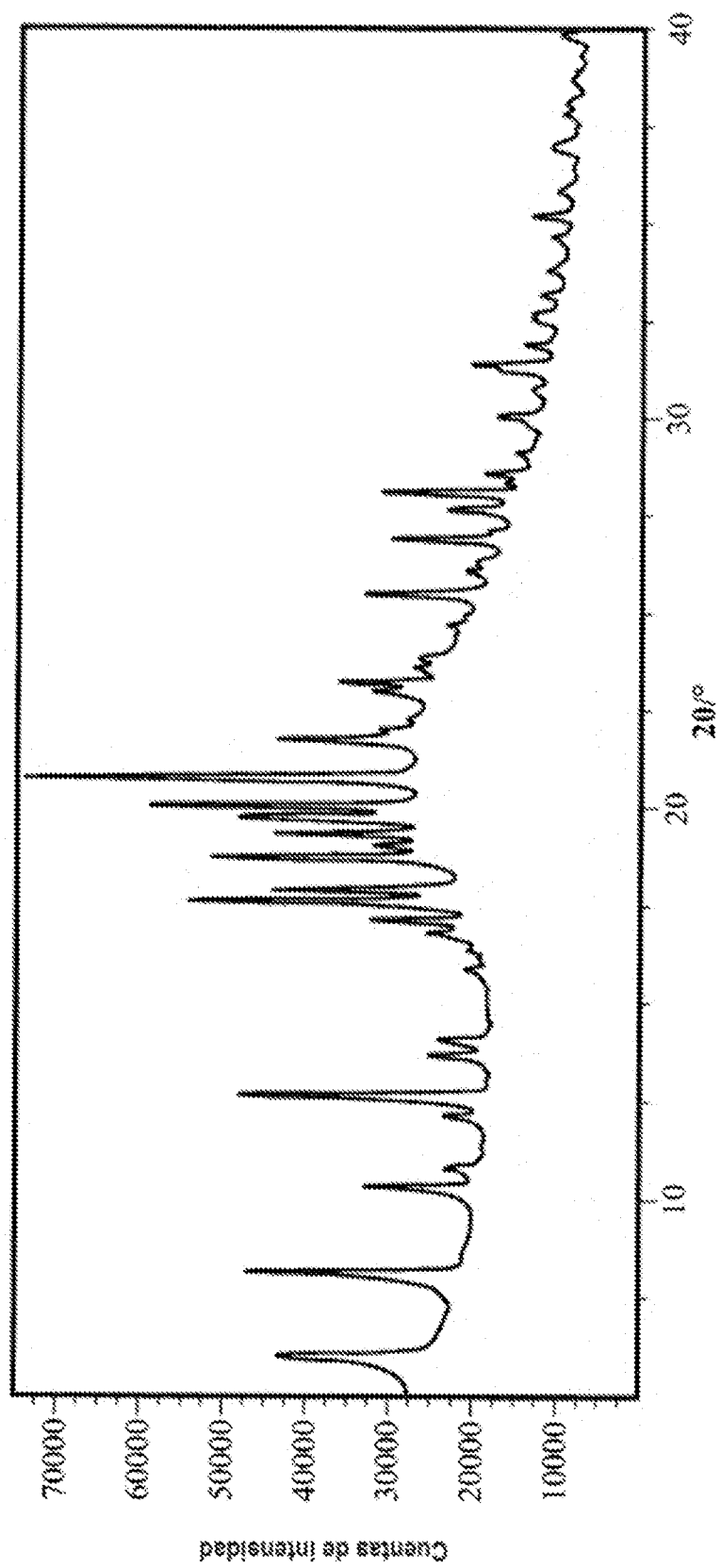


Figura 3



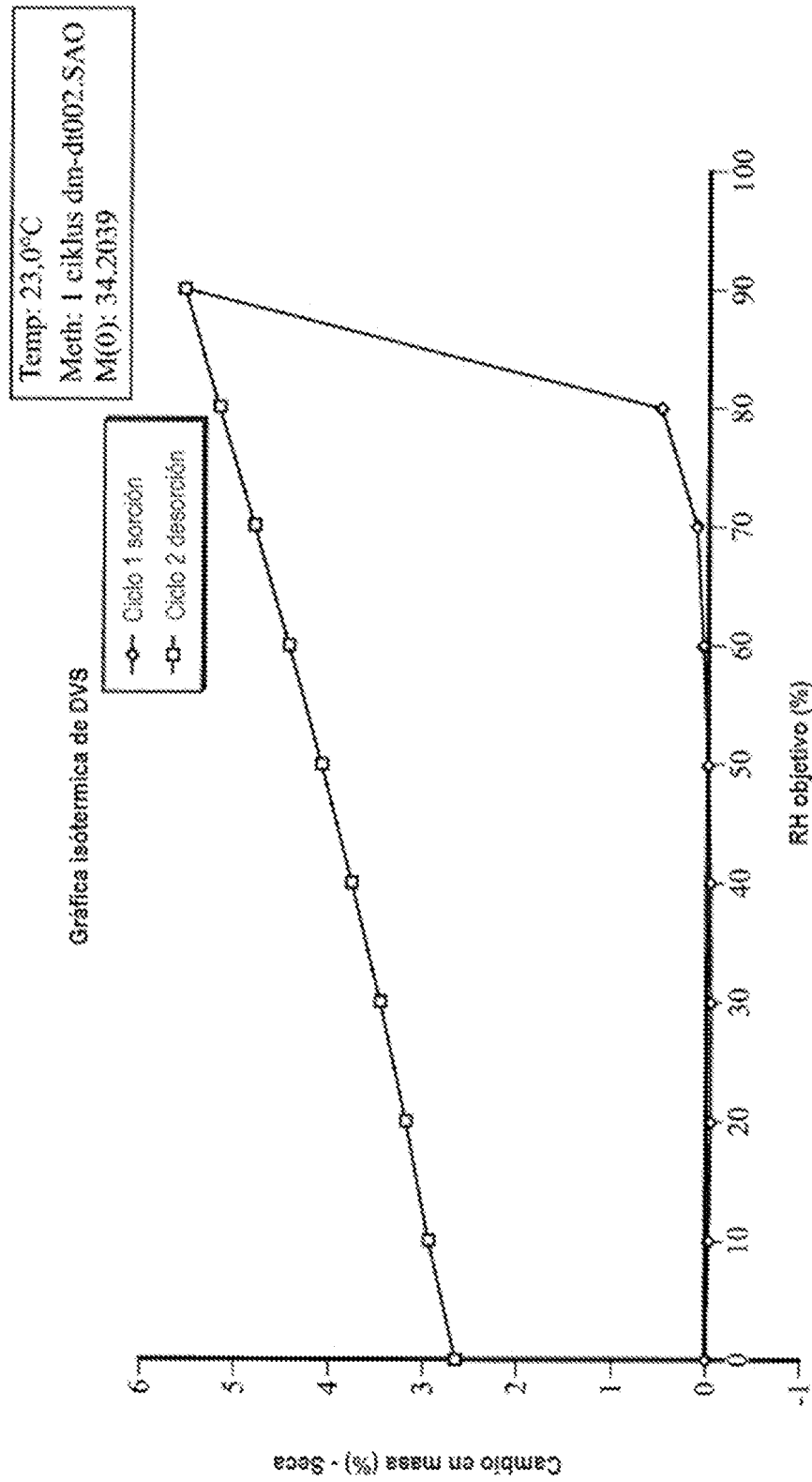


Figura 4

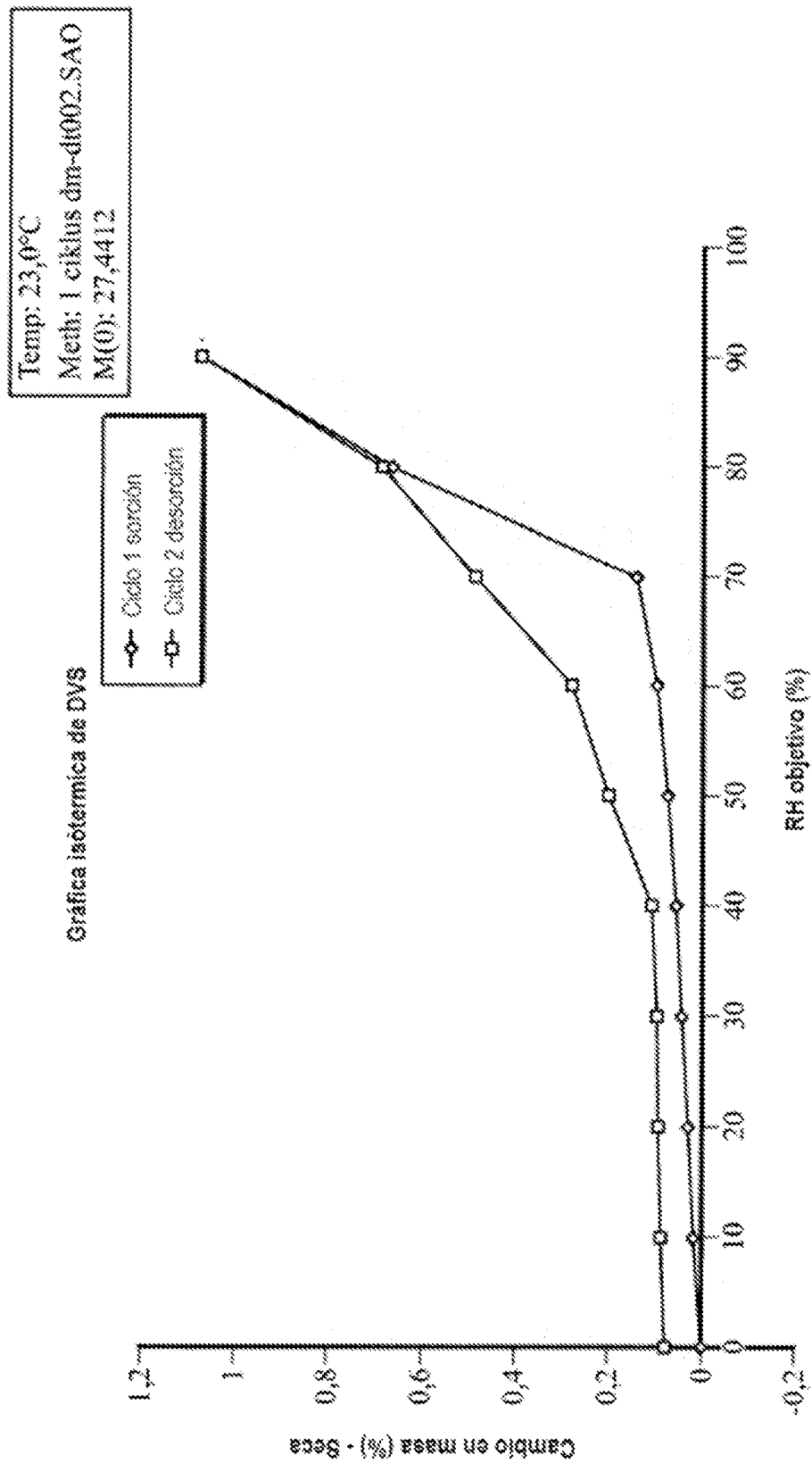


Figura 5

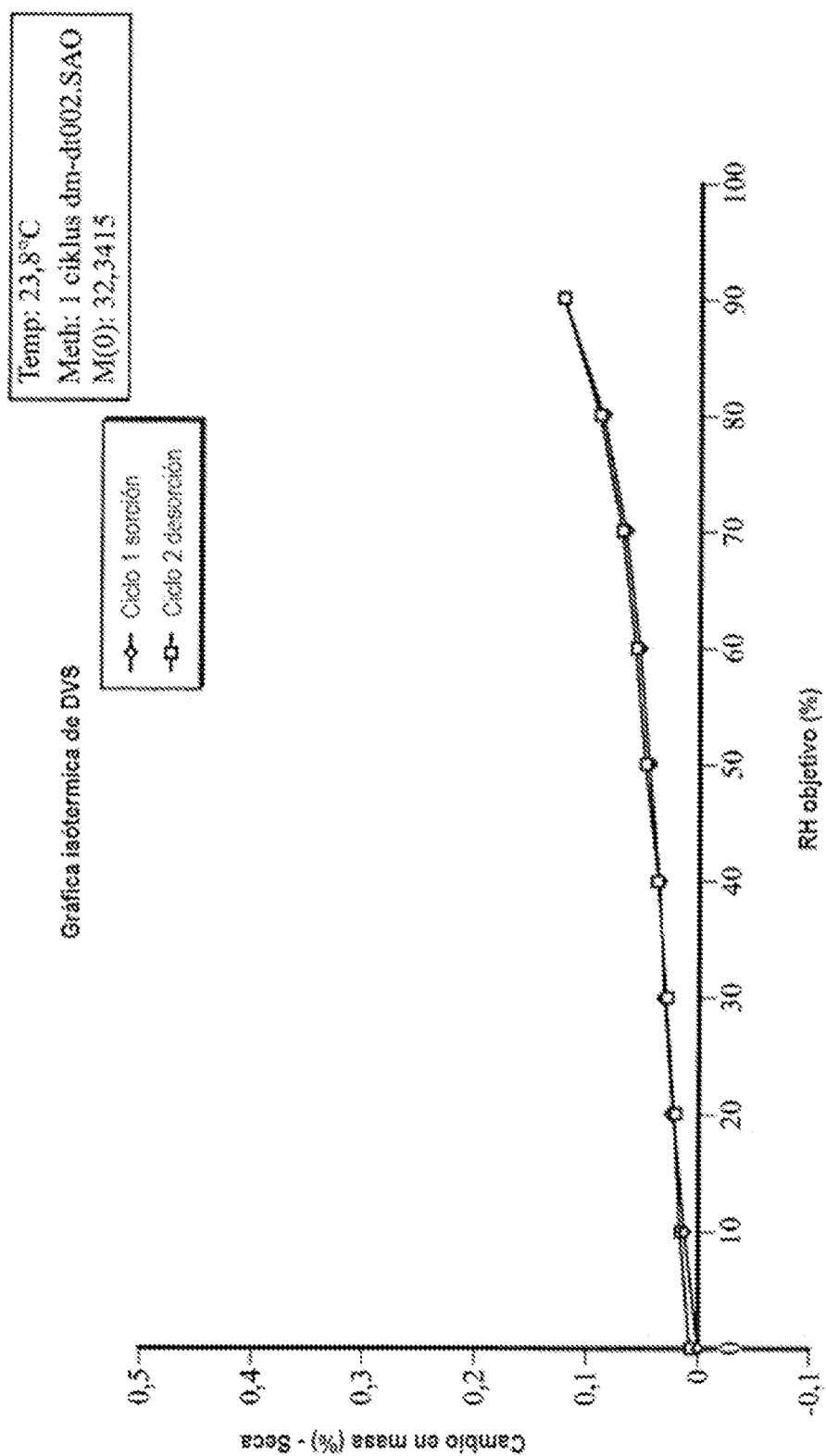


Figura 6

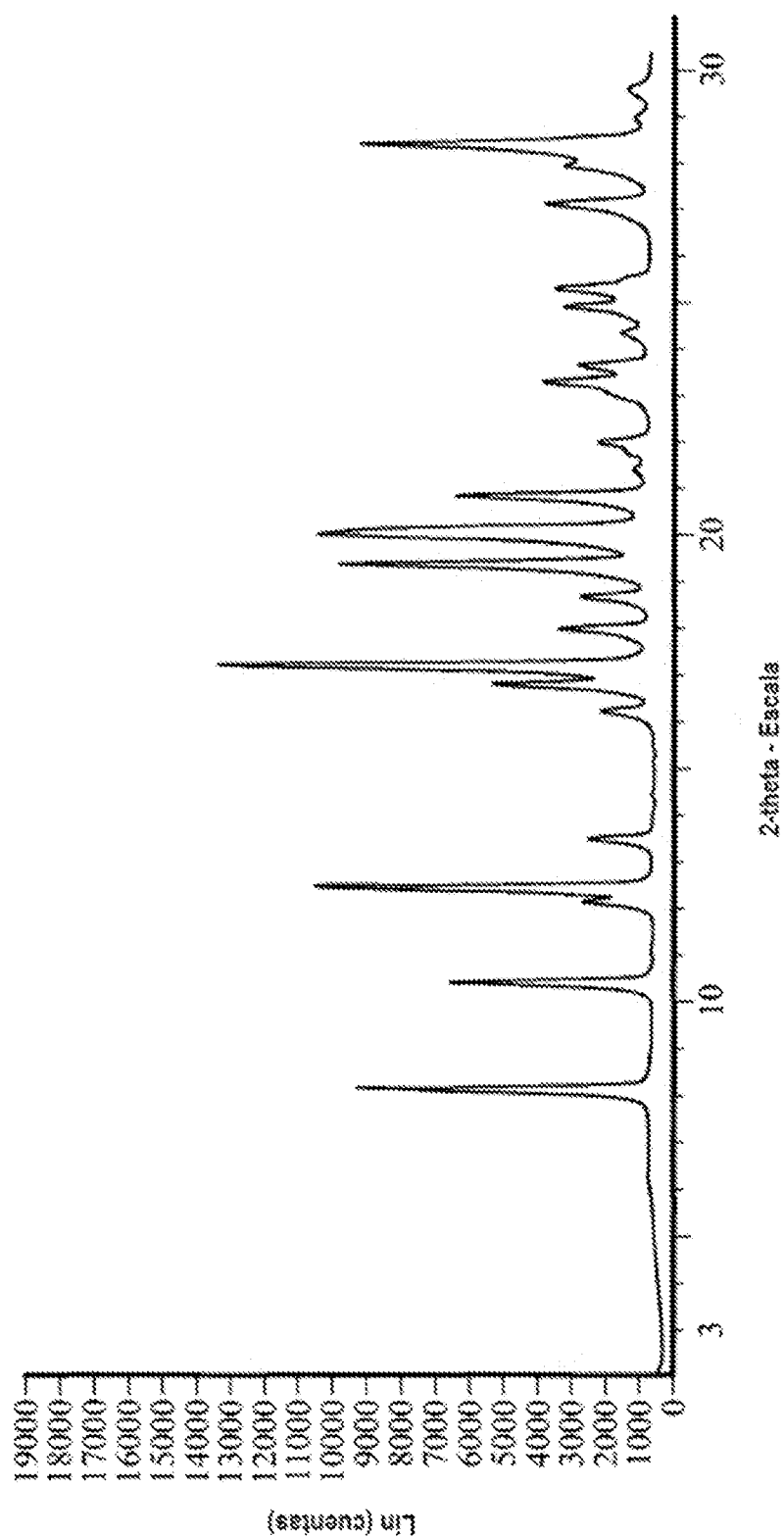


Figura 7

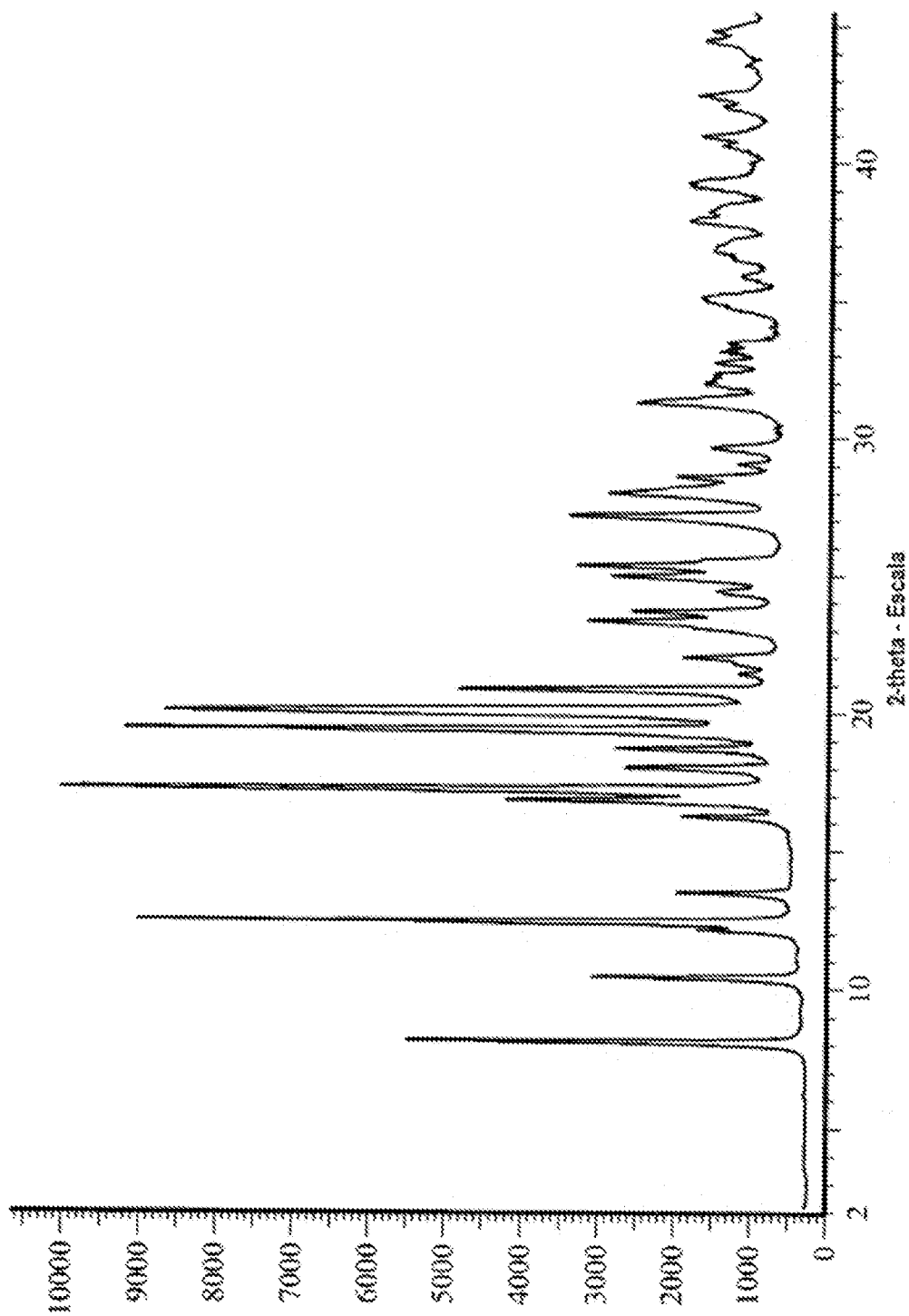


Figura 8

## Patrón de rayos X en polvo de la Forma 7 de sofosbuvir

| Ángulo<br>° (2 $\theta$ ) | Valor d<br>Ångstrom | % de<br>Intensidad |
|---------------------------|---------------------|--------------------|
| 8,10                      | 10,90138            | 53,4               |
| 10,39                     | 8,50521             | 29,2               |
| 12,11                     | 7,39055             | 13,8               |
| 12,44                     | 7,11131             | 91,6               |
| 13,48                     | 6,56585             | 16,5               |
| 16,22                     | 5,45921             | 14,5               |
| 16,82                     | 5,26578             | 38,4               |
| 17,22                     | 5,14499             | 100                |
| 18,01                     | 4,92142             | 21,1               |
| 18,69                     | 4,74427             | 22,4               |
| 19,40                     | 4,57274             | 90,3               |
| 20,02                     | 4,42616             | 85,1               |
| 20,85                     | 4,25772             | 43,7               |
| 21,41                     | 4,14654             | 5                  |
| 21,84                     | 4,06646             | 6                  |
| 22,02                     | 4,03407             | 13,2               |
| 23,32                     | 3,81201             | 26,2               |
| 23,66                     | 3,75736             | 19,8               |
| 24,39                     | 3,64701             | 8,2                |
| 24,94                     | 3,56688             | 22,9               |
| 25,33                     | 3,51338             | 28                 |
| 27,15                     | 3,28186             | 28,8               |
| 27,99                     | 3,18501             | 23,5               |
| 28,58                     | 3,12131             | 13,8               |
| 29,04                     | 3,07199             | 5,3                |
| 29,64                     | 3,01165             | 9,2                |
| 31,29                     | 2,85663             | 19,3               |
| 32,00                     | 2,79485             | 9,5                |
| 32,75                     | 2,7325              | 8,4                |
| 33,16                     | 2,69957             | 7,7                |
| 33,44                     | 2,67786             | 6,5                |
| 35,07                     | 2,55668             | 9,6                |
| 35,89                     | 2,50039             | 3,6                |
| 36,83                     | 2,43842             | 6,8                |
| 37,90                     | 2,37192             | 10,2               |
| 38,25                     | 2,35126             | 7,1                |
| 39,21                     | 2,29598             | 9,9                |
| 40,98                     | 2,20064             | 8,7                |
| 42,05                     | 2,14706             | 5,5                |
| 42,45                     | 2,12796             | 9,1                |
| 44,47                     | 2,03552             | 7,7                |
| 44,83                     | 2,01994             | 7,2                |
| 46,12                     | 1,96674             | 2,9                |
| 48,87                     | 1,86228             | 2,7                |
| 49,63                     | 1,83553             | 3                  |
| 51,41                     | 1,77591             | 6,2                |
| 52,31                     | 1,74755             | 6                  |
| 53,76                     | 1,70382             | 5,4                |

Figura9

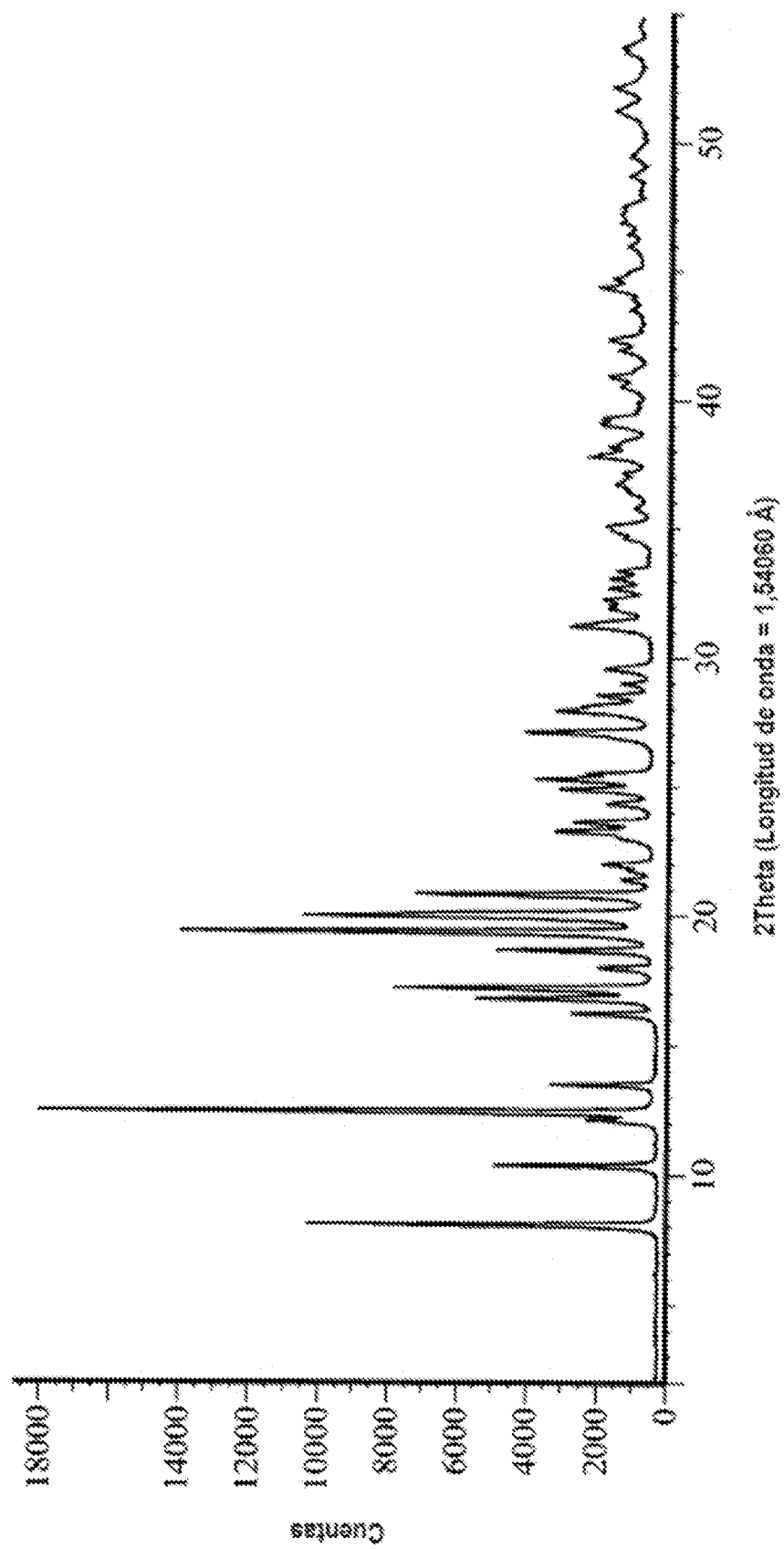


Figura 10

## Listado de difracción de rayos X en polvo para la Forma 7

| Angulo (°2 $\theta$ ) | Intensidad Relativa |
|-----------------------|---------------------|
| 6,2                   | 0,5%                |
| 8,1                   | 56%                 |
| 10,4                  | 26%                 |
| 12,1                  | 11%                 |
| 12,4                  | 100%                |
| 13,5                  | 16%                 |
| 16,2                  | 13%                 |
| 16,8                  | 28%                 |
| 17,2                  | 41%                 |
| 18,0                  | 8%                  |
| 18,7                  | 24%                 |
| 19,4                  | 75%                 |
| 20,0                  | 55%                 |
| 20,9                  | 37%                 |
| 21,4                  | 5%                  |
| 21,8                  | 3%                  |
| 22,0                  | 8%                  |
| 23,1                  | 5%                  |
| 23,3                  | 15%                 |
| 23,6                  | 12%                 |
| 24,4                  | 6%                  |
| 24,9                  | 14%                 |
| 25,3                  | 18%                 |
| 25,5                  | 18%                 |
| 27,2                  | 20%                 |
| 28,0                  | 15%                 |
| 28,1                  | 11%                 |
| 28,6                  | 8%                  |
| 29,0                  | 5%                  |
| 29,6                  | 7%                  |
| 31,3                  | 12%                 |
| 32,0                  | 6%                  |
| 32,3                  | 7%                  |
| 32,8                  | 6%                  |
| 33,1                  | 6%                  |
| 33,4                  | 5%                  |
| 34,7                  | 4%                  |
| 35,1                  | 6%                  |
| 35,9                  | 1%                  |
| 36,8                  | 4%                  |
| 37,2                  | 3%                  |
| 37,9                  | 8%                  |
| 38,2                  | 5%                  |
| 39,2                  | 6%                  |
| 39,4                  | 6%                  |
| 40,6                  | 4%                  |
| 41,0                  | 6%                  |
| 42,0                  | 4%                  |
| 42,4                  | 6%                  |
| 43,6                  | 2%                  |
| 44,5                  | 6%                  |
| 44,8                  | 4%                  |

Figura 11



## Listado de difracción de rayos X en polvo para la Forma 1

| Angulo $2\theta$ | Intensidad Relativa |
|------------------|---------------------|
| 4.1              | 1%                  |
| 4.8              | 8%                  |
| 5.0              | 100%                |
| 7.3              | 65%                 |
| 7.8              | 2%                  |
| 8.2              | 5%                  |
| 8.8              | 5%                  |
| 9.4              | 15%                 |
| 10.0             | 8%                  |
| 11.4             | 3%                  |
| 11.6             | 1%                  |
| 12.4             | 1%                  |
| 13.2             | 2%                  |
| 14.2             | 4%                  |
| 14.7             | 1%                  |
| 15.9             | 4%                  |
| 15.1             | 1%                  |
| 16.1             | 5%                  |
| 16.4             | 10%                 |
| 16.5             | 10%                 |
| 16.8             | 1%                  |
| 17.9             | 14%                 |
| 17.6             | 6%                  |
| 18.1             | 24%                 |
| 18.4             | 6%                  |
| 18.7             | 10%                 |
| 18.9             | 5%                  |
| 19.3             | 7%                  |
| 19.5             | 2%                  |
| 20.2             | 6%                  |
| 20.5             | 10%                 |
| 20.7             | 3%                  |
| 21.2             | 1%                  |
| 21.8             | 5%                  |
| 22.0             | 11%                 |
| 22.3             | 8%                  |
| 22.8             | 2%                  |
| 23.2             | 5%                  |
| 23.3             | 6%                  |
| 23.5             | 5%                  |
| 23.7             | 6%                  |
| 24.0             | 3%                  |
| 24.7             | 3%                  |
| 25.0             | 12%                 |
| 25.5             | 2%                  |
| 26.5             | 4%                  |
| 27.1             | 4%                  |
| 27.1             | 4%                  |
| 27.2             | 3%                  |
| 27.4             | 2%                  |
| 28.1             | 3%                  |
| 28.5             | 1%                  |
| 28.9             | 2%                  |
| 29.3             | 1%                  |
| 30.0             | 2%                  |
| 30.5             | 1%                  |
| 31.0             | 2%                  |
| 31.5             | 2%                  |

Figura 12

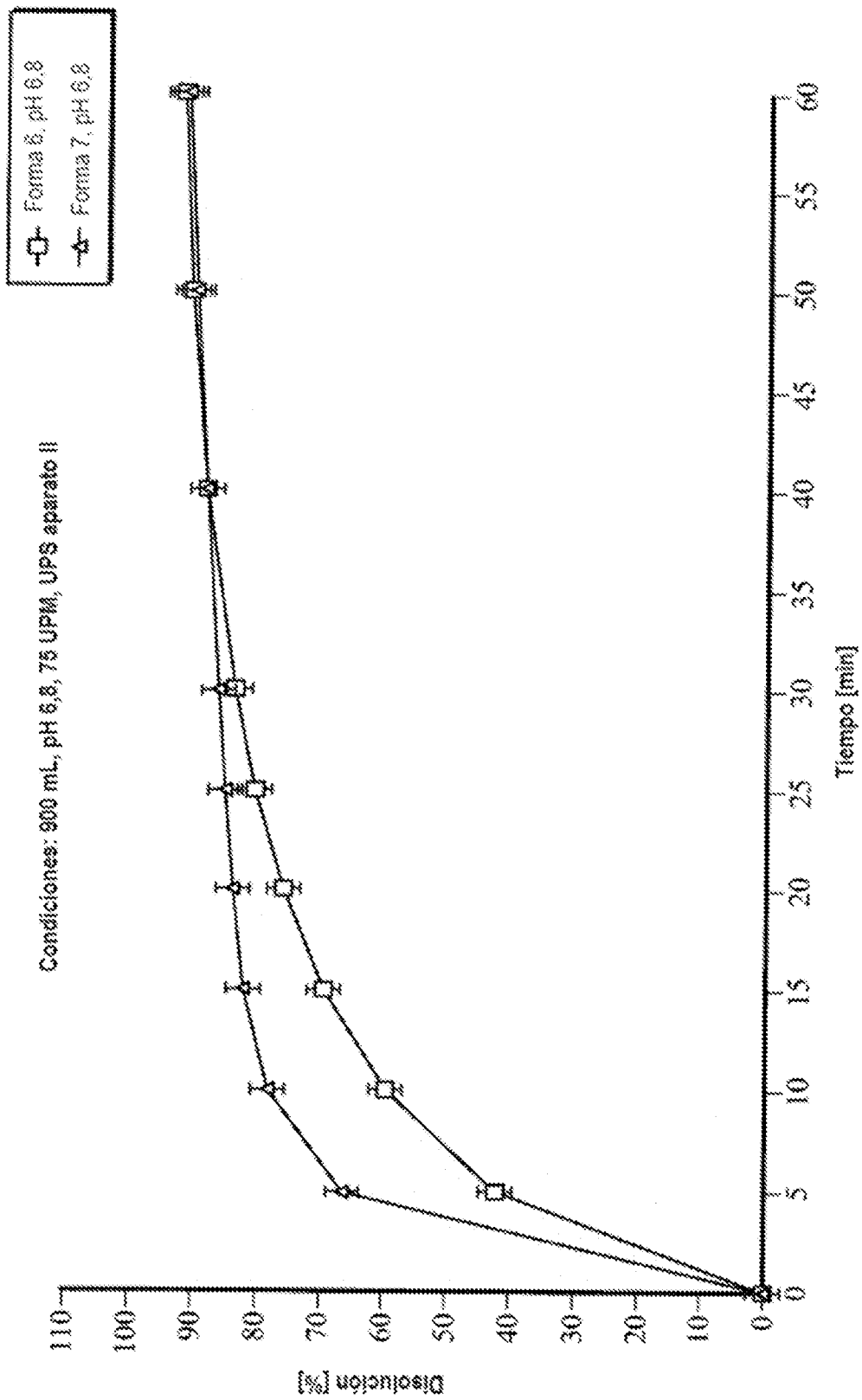


Figura 13