



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

- PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL -

06-126877

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO CRISTAL ESTABLE DE COMPUESTO 4-OXOQUINOLINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE JAPAN TOBACCO INC.

DOMICILIO 2-1, Toranomon 2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8422. JAPON

74. APODERADO DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

72. BOGOTÁ, D. C.,

19 DIC. 2006

SS

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE

①



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I



Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre JAPAN TOBACCO INC

Dirección 2-1 Toranomon 2-chome Minato
ku, Tokyo 106-8422 - JAPON

Nacionalidad o Domicilio Tokyo JAPON

Lugar de Constitución JAPON

Teléfono Fax

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C C



NIT



C E



Otro



Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono 610 7420 Fax 610 0706

E mail info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C C



NIT



C E



Otro



Cual

Número 39 779 654 TPA 70 819 CSJ

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre VER ANEXO # 1

Dirección

Nacionalidad o Domicilio

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No

PCT/JP2006/009604

Fecha

19/05/2006

Publicación Internacional No

WO 2006/115508

Fecha

01/12/2006

⑥

Título (84)

CRISTAL ESTABLE DE COMPUESTO 4-OXOQUINOLINA

⑦

Clasificación Internacional (51)

C07D 215/56 A81K 31/47 A81P 31/18

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI



NO



JP

20/06/2004

2004-150979

⑨

Comprobante de pago No

08-92,362

Fecha

Diciembre 1 de 2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

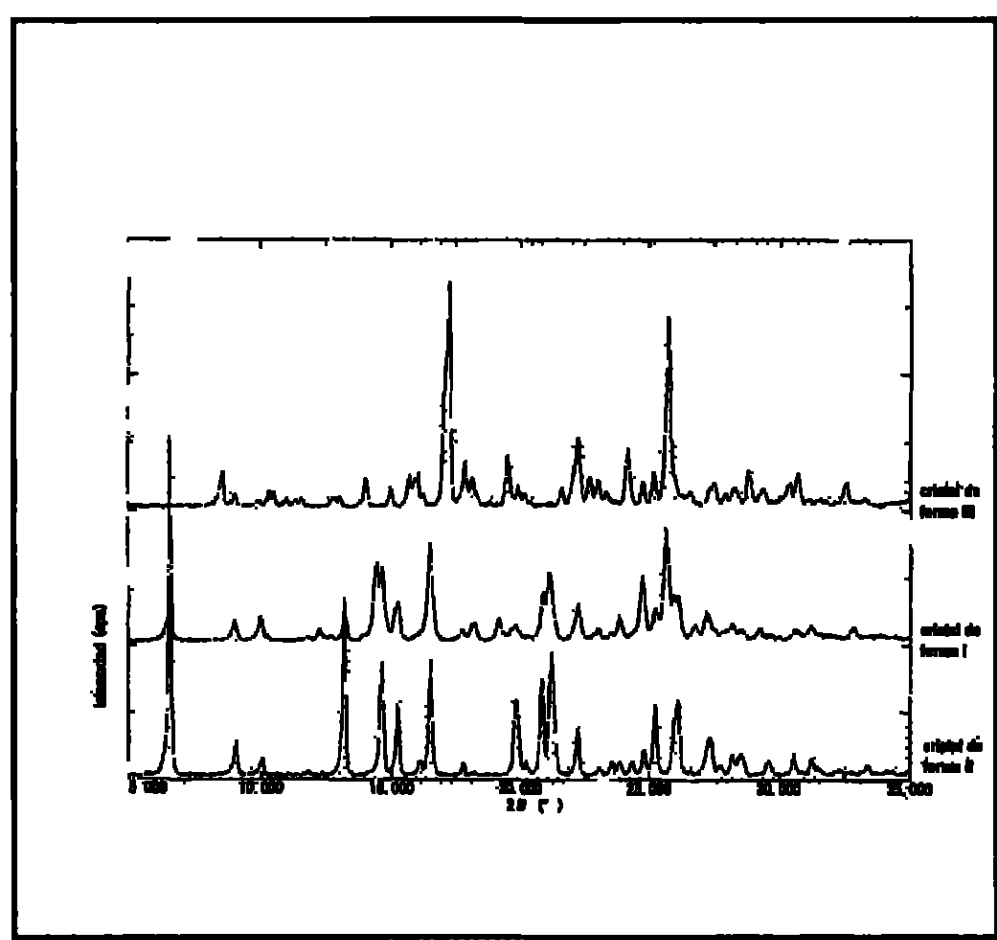
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes si fuere el caso junto con la sustitución del mismo a mí favor
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen descripción reivindicaciones dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen descripción reivindicaciones dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros Tarjeta Propietario Tarjeta Temática y Extracto para la Publicación , Formato PCT/BI/304

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
 FIRMA *Margarita Castellanos*
 C.C. No. 38.779.654 Usaquén TPA 70 819 C.S.J.

49 DIC. 2006

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
 Calle 94 A No. 7 A-09
 Bogotá, D.C. - COLOMBIA

ANEXO # 1
INVENTOR(ES) (72)

	NOMBRE	DIRECCION	NACI NALIDAD O DOMICILIO
1	MOTOHIDE SATOH /	c/o Central Pharmaceutical Research Institute of Japan Tobacco Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka, 5691125, JAPON	JAPONES
2	TAKAHISA MOTOMURA /	c/o Central Pharmaceutical Research Institute of Japan Tobacco Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka, 5691125, JAPON	JAPONES
3	TAKASHI MATSUDA /	c/o Central Pharmaceutical Research Institute of Japan Tobacco Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka, 5691125, JAPON	JAPONES
4	KENTARO KONDO /	c/o Central Pharmaceutical Research Institute of Japan Tobacco Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka, 5691125, JAPON	JAPONES
5	~ KOJI ANDO /	c/o Central Pharmaceutical Research Institute of Japan Tobacco Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka, 5691125, JAPON	JAPONES
6	KOJI MATSUDA /	c/o Central Pharmaceutical Research Institute of Japan Tobacco Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka, 5691125, JAPON	JAPONES
7	SHUJI MIYAKE /	c/o Central Pharmaceutical Research Institute of Japan Tobacco Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka, 5691125, JAPON	JAPONES
8	HIDETO UEHARA /	c/o Central Pharmaceutical Research Institute of Japan Tobacco Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka, 5691125, JAPON	JAPONES

1421
4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-128877- -00000-0000
Fec: 2008-12-19 14:42:54 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tm. 11 PATENTEYU
Evo: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 147

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 92,362
FECHA : DICIEMBRE 1 DE 2006

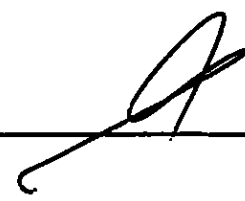
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	50962583	01/12/2006	3,296,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

87
ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A-09
Apartado 6348
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo, Industria y Turismo

E. S. D.

Ref.: PODER conferido por la sociedad JAPAN TOBACCO INC.

Yo, XIMENA CASTELLANOS ABONDANO, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente manifiesto a Uds. que sustituyo en la Dra. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO, el poder que me confirió la sociedad JAPAN TOBACCO INC., con domicilio en 2-1, Toranomom 2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8422, JAPÓN debidamente legalizado por Apostilla, bajo los Nos. 02041 y 02042 el día 14 de Junio de 2004, con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de Patente PCT Entrada en Fase Nacional en Colombia, para: CRISTAL ESTABLE - DE COMPUESTO 4-OXOQUINOLINA.-

Del Señor Jefe,

Acepto


Ximena Castellanos Abondano
C.C. No. 39.773.330 de Usaquén
T.P.A. No. 58.236 del C.S.J.
Calle 94A No. 7A-09 - Bogotá, D.C.
Teléfonos: 6107420 - 6107480


Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. 39.779.654 de Usaquén
T.P.A. No. 70.819 del C.S.J.
Calle 94A No. 7A-09 - Bogotá, D.C.
Teléfonos: 6107420 - 6107480

Bogotá, D.C.
XCA/MCA/1421

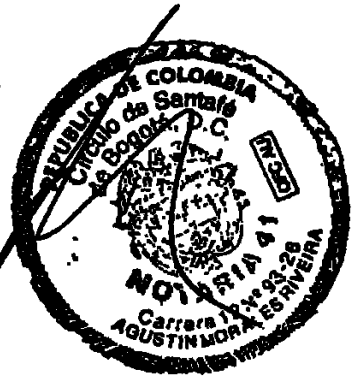
**AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL**
(Art. 84 C.R.C. mod. Decr. 2282 de 1988, art. 1 mod. 36)

Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo de esta ciudad compareció personalmente:
 [Redacted Name]
 identificado con C.C. [Redacted ID] y tarjeta profesional de abogado(a) No. [Redacted No.] del Consejo Superior de la Judicatura, con documento dirigido a [Redacted Recipient] y declaró que la firma puesta en este escrito es suya.

[Handwritten Signature]
 Firma del declarante

En Bogotá D.C. a 04 DIC. 2006

AUTORIZO ESTA DILIGENCIA EL SUSCH.



**AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL**
(Art. 84 C.R.C. mod. Decr. 2282 de 1988, art. 1 mod. 36)

Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo de esta ciudad compareció personalmente:
 [Redacted Name]
 identificado con C.C. [Redacted ID] y tarjeta profesional de abogado(a) No. [Redacted No.] del Consejo Superior de la Judicatura, con documento dirigido a [Redacted Recipient] y declaró que la firma puesta en este escrito es suya.

[Handwritten Signature]
 Firma del declarante

En Bogotá D.C. a 04 DIC. 2006

AUTORIZO ESTA DILIGENCIA EL SUSCH.



PODEREl (los) suscrito (s) JAPAN TOBACCO INC.domiciliado (s) en 2-1, Toranomon 2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8422 - JAPON

nombra(n) por el presente a XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A. abogadas con oficinas en la Carrera 9 No. 93-09, Bogotá - Colombia para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso-administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen; depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Para la obtención de Registros Sanitarios; c) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos que promovamos o se nos promuevan, pudiendo en todos los actos y gestiones arriba determinados suscribir este mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado hoy 7 de Junio de 2004en Tokyo, JAPONPor Teruo DAITO

(Notary should execute on other side)
(Consular legalization necessary)

POWER OF ATTORNEYI (we) the undersigned Japan Tobacco Inc.of 2-1, Toranomon 2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8422 Japan

hereby grants Power of Attorney to XIMENA CASTELLANOS A. and/or MARGARITA CASTELLANOS A. attorneys residing at Carrera 9 No. 93-09 Bogotá - COLOMBIA to

and to obtain the protection of my (our) industrial property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities or persons, specially those, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtention of patents, models and designs; registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of commercial names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) For the obtention of Sanitary Registrations; c) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us; and that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of Court.

Given and signed this June 7, 2004In Tokyo - JAPANby Japan Tobacco Inc.


Teruo DAITO, Patent Attorney
General Manager,
Patent Information Dept.

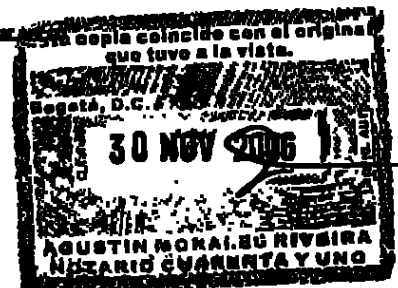
(Notary should execute on other side)
(Consular legalization necessary)

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.

ABOGADOS COLOMBIA

Carrera 9 No. 93-09 - P.O. Box 8349 - Bogotá, Colombia.

Tels.: (571) 610 7420 / 60 / 80 - Fax: (571) 610 0704 - e-mail: acastellanos@mpsa.com.co





7

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN

This public document

2. has been signed by Katsuyuki YAMAGUCHI

3. acting in the capacity of Notary Public of the Osaka
Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of Katsuyuki YAMAGUCHI, Notary Public

Certified

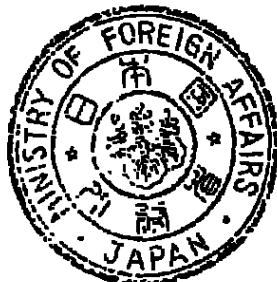
5. at Osaka

6. JUN. 14. 2004

7. by the Ministry of Foreign Affairs

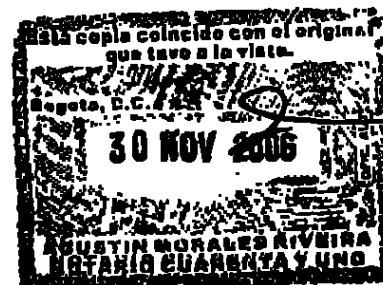
8. No. 02041

9. Seal/stamp:



10. Signature:

Tadamasa HIGUCHI
For the Minister for Foreign Affairs



認証登簿平成16年第100号

嘱託人大東輝雄は、本公証人の面前で、別紙編綴の書面に署名した。

よって、これを認証する。



平成16年3月31日、本職の役場において。

大阪府高槻市芥川町1丁目15番18号(ミドリ芥川ビル内)

大阪法務局所属

公証人

山口勝之



Registered No100(2004)

NOTARIAL CERTIFICATE

This is to certify that Teruo DAITO signed the attached document in my very presence on this 31st day of March 2004.

Katsuyuki Yamaguchi

Katsuyuki Yamaguchi

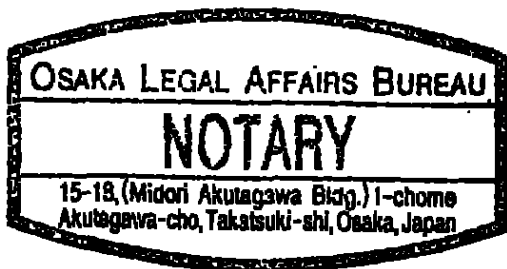


Notary, attached to

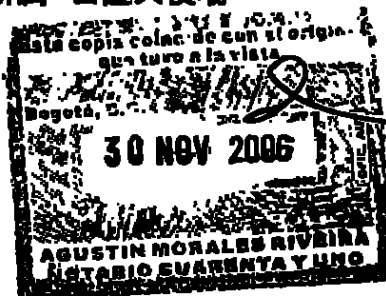
Osaka Legal affairs Bureau

15-18,1-chome,Akutagawa-cho,

Takatsuki-shi,Osaka,Japan.



大阪法務局所属 公証人役場





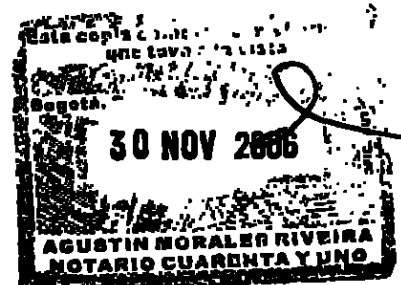
証明書

東京都港区虎ノ門二丁目2番1号を本店所在地とする日本国法人
日本たばこ産業株式会社の代表取締役社長である私 本田勝彦 は、
該法人を代表して知的財産権に係わる書類を署名作成する権限を
有するものであることをここに宣言し、これをもって、2004年
3月31日当時、該法人の医薬総合研究所特許情報室長職にあった
大東輝雄 氏が、代理人に指名され、該法人名義にて外国に提出す
る特許、実用新案登録の出願等手続に要する願書、委任状、譲渡書、
授權書、申請書、請求書、その他を含む関係書類について該法人を
代表して署名、押印、作成する権限を有していたものであることを
証明する。

2004年6月7日

日本たばこ産業株式会社

代表取締役社長 本田 勝彦





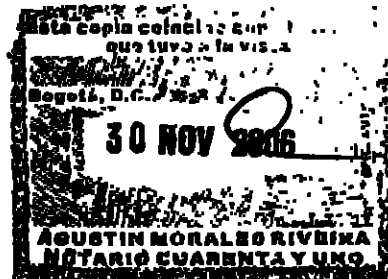
CERTIFICATE

I, KATSUHIKO HONDA, President and Chief Executive Officer of JAPAN TOBACCO INC., a Japanese corporation located at 2-1, TORANOMON 2-CHOME, MINATO-KU, TOKYO 105-8422, JAPAN, hereby declare that I am authorized to sign and execute documents relating to intellectual property rights on behalf of the said corporation, and hereby certify that, as of March 31, 2004, Mr. TERUO DATTO was Director of Patent Information Dept. of Central Pharmaceutical Research Institute of the said corporation, was my proxy, and was authorized to sign and execute documents relating to intellectual property rights on behalf of the said corporation. Said documents include, but are not limited to, applications, powers of attorney, assignments, authorizations of agents, petitions and the like in connection with patent and utility model filed in foreign countries with the name of the said corporation.

Dated this 7 day of June, 2004,
JAPAN TOBACCO INC.



KATSUHIKO HONDA
President and Chief Executive Officer





APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN

This public document

2. has been signed by Katsuyuki YAMAGUCHI

3. acting in the capacity of Notary Public of the Osaka
Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of Katsuyuki YAMAGUCHI, Notary Public

Certified

5. at Osaka

6. JUN. 14, 2004

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. No. 02042

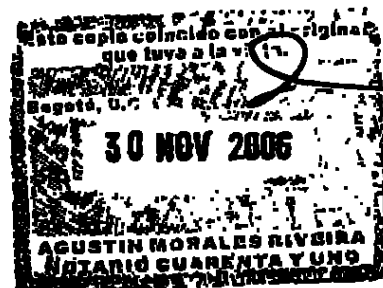
9. Seal/stamp:



10. Signature:

Tsutomu HIGUCHI

For the Minister for Foreign Affairs

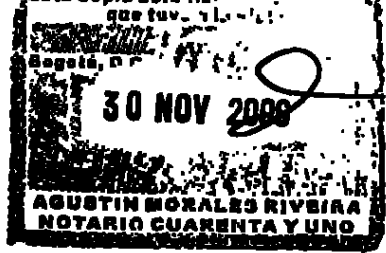




2004

登簿番号平成16年第168号
日本国法律に従い設立され、日本国東京都港区虎ノ門
二丁目2番1号に所在する日本たばこ産業株式会社に
おいて、2004年3月31日当時、医薬総合研究所
特許情報室長職にあった大東輝雄氏が、該法人名義で
知的財産関係書類について該法人を代表して署名押
印、作成する権限を有していたこと及び同氏が200
4年3月31日、本職の面前で別紙書類に署名したこ
とを証明する。
よって、ここにこれを認証する。
平成16年6月8日、本職の役場において。
大阪府高槻市芥川町1丁目15番18号（ミドリ芥川ビル）
大阪法務局所属（高槻公証役場）
公証人 山口勝之

大阪法務局新居公証人役場





Registration Book No.168 (2004)

NOTARIAL CERTIFICATE

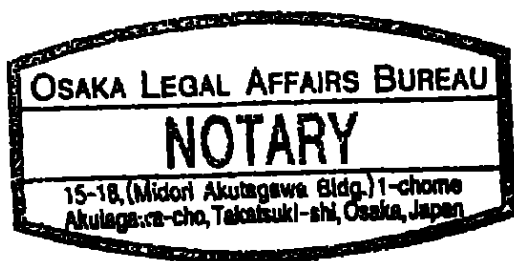
This is to certify that :

1) Teruo Daito was Director of Patent Information Dept. of Central Pharmaceutical Research Institute of JAPAN TOBACCO INC. ,a Japanese corporation of being legally constituted and in existence in accordance with the laws of Japan ,located at 2-1, Toranomom2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8422 Japan ,as of March 31,2004 and was authorized to sign and execute documents relating to intellectual property rights on behalf of the said corporation.

2)said Teruo Daito signed the attaced document in my presence on 31st day of March,2004.

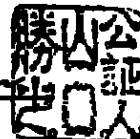
IN TESTIMONY WHEREOF,I have hereto subscribed my name and affixed my seal of office.

On the 8th day of June,2004
at the Office of Notary Katsuyuki Yamaguchi

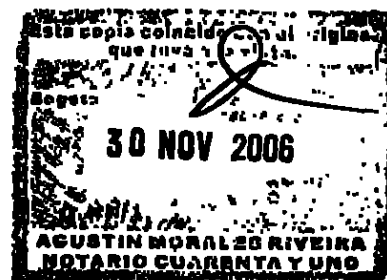


Katsuyuki Yamaguchi

Katsuyuki Yamaguchi



Notary,attached to
Osaka Legal affairs Bureau,
15-18,1-chome,Akutagawacho,
Takatsuki-shi, Osaka,Japan.





第 1558 号



証明

大阪法務局所属公証人

山口勝之

平成 16 年 3 月 31 日付

平成 16 年 登録 第 100 号

この認証の付与は、在職中の公証人が
その権限に基づいてしたものであり、
かつ、その押印は、真実のものであること
を証明する。

平成 16 年 6 月 14 日

平成 年 月 日

大阪法務局長 梅津和

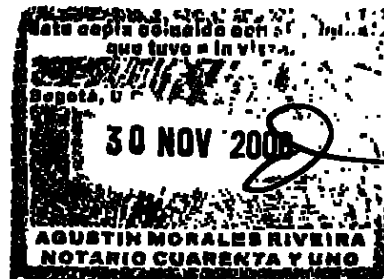


CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has
been executed by Notary, duly authorized and practising in Osaka,
Japan, and that the Official seal appearing on the same is genuine.

Date 04. 6. 14

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau





第 1559 号



証 明

大阪法務局所属公証人 山口勝之

平成 16 年 6 月 8 日付

平成 16 年 登録 第 168 号

この認証の付与は、在職中の公証人が
その権限に基づいてしたものであり、
かつ、その押印は、真実のものであること
を証明する。

平成 16 年 6 月 14 日
平成 年 月 日

大阪法務局長 梅津和



CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has
been executed by Notary, duly authorized and practising in Osaka,
Japan, and that the Official seal appearing on the same is genuine.

Date 04. 6. 14

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau



-----TRADUCCION OFICIAL No. 04-0616-----

de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia, al igual que la presente.-----

(Anexo a un documento de poder otorgado por Japan Tobacco Inc.)

Registro No. 100 (2004)

CERTIFICADO NOTARIAL

La presente es para certificar que Teruo DAITO firmó el documento adjunto en mi propia presencia hoy día 31 de marzo de 2004.

(fdo) ilegible

Katsuyuki Yamaguchi

Notario adjunto a la Oficina de Asuntos Legales de

Osaka - 15-18, 1-chome, Akutagawa-cho,

Takatsuki-shi, Osaka, Japón

(Sello) Oficina de Asuntos Legales de Osaka

NOTARIO - 15-18 (Midori Akutagawa Bldg) 1-chome

Akutagawa-cho, Takatsuki-shi, Osaka, Japón

APOSTILLA

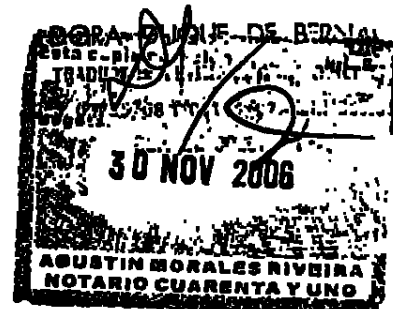
(Convención e La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: JAPON

Este documento público

2. ha sido firmado por Katsuyuki YAMAGUCHI

3. actuando en su carácter de Director de la Oficina de Asuntos legales
de Osaka



4. lleva el sello de Katsuyuki YAMAGUCHI, Notario Público

Certificado

5. en Osaka

6. el 14 de Junio 2004

7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores

8. No. 02041

9. Sello:

10: Firma

(fdo) ilegible

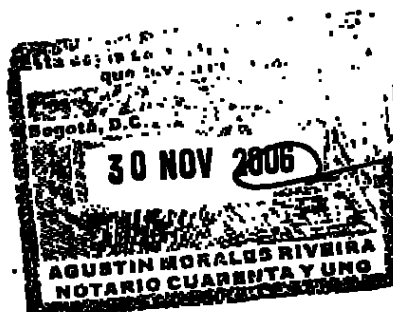
Tsutomu HIGUCHI

Por el Ministro de Relaciones Exteriores.

(Sello del Ministerio de Relaciones Exteriores de Japón)

CERTIFICADO

Yo, KATSUHIKO HONDA, Presidente y Funcionario jefe Ejecutivo de JAPAN TOBACCO INC., una sociedad japonesa situada en 2-1, TORANOMON 2-CHOME, MINATO-KU, TOKYO 105-8422, JAPON, declaro por medio del presente que estoy autorizado para firmar y otorgar documentos relacionados con derechos de propiedad intelectual en nombre de dicha sociedad, y por medio del presente certifico que, a Marzo 31 de 2004, el señor TERUO DAITO era el Director del Departamento de Información de Patentes del Instituto Central de Investigaciones Farmacéuticas de dicha sociedad, era mi apoderado y estaba autorizad para firmar y otorgar documentos relacionados con derechos de propiedad intelectual en nombre de dicha sociedad. Dichos documentos incluyen, pero no se limitan a, solicitudes, poderes, cesiones, autorizaciones de agentes, peticiones y similar en relación con



DORA DI...
S. 007...
2006 11 30

patentes y modelos de utilidad presentados en países extranjeros con el nombre de dicha sociedad.

Dado hoy día 7 de Junio de 2004

JAPAN TOBACCO INC.

KATSUHIKO HONDA

Presidente y Funcionario Jefe Ejecutivo

Libro de Registro No. 168 (2004)

CERTIFICADO NOTARIAL

La presente es para certificar que:

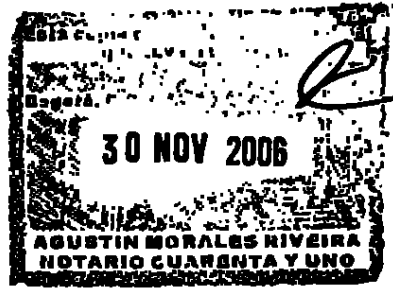
- 1) Teruo Daito era el Director del departamento de Información de Patentes del Instituto Central de Investigaciones Farmacéuticas de JAPAN TOBACCO INC., una sociedad japonesa que están legalmente constituida y existe de acuerdo con las leyes del Japón, situada en 2-1, Toranomom 2-chome, Minato-ku, Tokio 105-8422 Japón, a Marzo 31 de 2004, y estaba autorizado para firmar y otorgar documentos relacionados con derechos de propiedad intelectual en nombre de dicha sociedad.
- 2) Dicho Tereuo Daito firmó el documento adjunto en mi propia presencia el día 31 de Marzo de 2004.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he suscrito aquí mi nombre y he fijado mi sello de oficio.

El día 8 de Junio de 2004

En la Oficina del Notario Katsuyuki Yamaguchi

(fdo) ilegible



DORA DORQUE DE BERNAL
TRADUCTORA DE LENGUAJE
CER. 0275644 Y 01111/77 - MEXICO, D.F.
SEP. DE EDUCACION

Katsuyuki Yamaguchi

Notario adjunto a la Oficina de Asuntos Legales

De Osaka, 15-18, 1-chome, Akutagawacho

Takatsuki-shi, Osaka, Japón

(Sello) Oficina de Asuntos Legales de Osaka

NOTARIO – 15-18 (Midori Akutagawa Bldg) 1-chome

Akutagawa-cho, Takatsuki-shi, Osaka, Japón

CERTIFICADO

1558

La presente es para certificar que la firma que aparece anteriormente ha sido
impuesta por Notario, debidamente autorizado y en ejercicio en Osaka, Japón y
que el sello oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha: 04.6.14

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

CERTIFICADO

1559

La presente es para certificar que la firma que aparece anteriormente ha sido
impuesta por Notario, debidamente autorizado y en ejercicio en Osaka, Japón y
que el sello oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha: 04.6.14

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

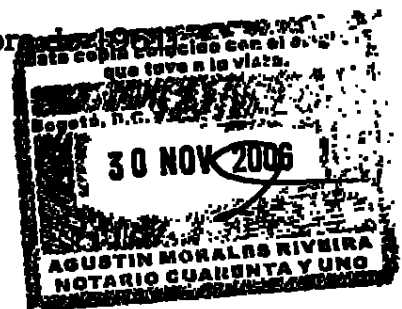
APOSTILLA

(Convención e La Haya del 5 de Octubre)

5. País: JAPON

Este documento público

6. ha sido firmado por Katsuyuki YAMAGUCHI



DORA AGUI DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE GIGIAL
HSA. 02/5708 Y 0814/97 - JUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

7. actuando en su carácter de Director de la Oficina de Asuntos legales
de Osaka

8. lleva el sello de Katsuyuki YAMAGUCHI, Notario Público

Certificado

5. en Osaka

6. el 14 de Junio 2004

7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores

8. No. 02042

9. Sello:

10: Firma

(fdo) ilegible

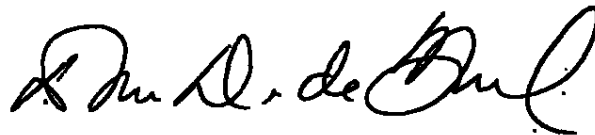
Tsutomu HIGUCHI

Por el Ministro de Relaciones Exteriores.

(Sello del Ministerio de Relaciones Exteriores de Japón)

Es traducción fiel y completa, a la cual me remito,

Bogotá, Junio 22, 2004.

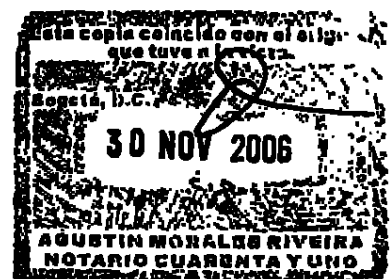


DORA DUQUE DE BERNAL

TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL

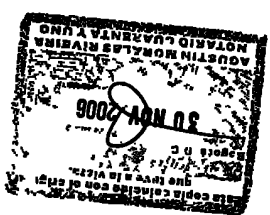
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTIA

REP. DE COLOMBIA



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
2004 JUN 24
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D C

23
DIES
A.B.C.



EXCELENTE
41035
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2004 JUN 24 A 11 23
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D C

P A T E N T S

CESION

ASSIGNMENT

El (los) suscrito (s)

Motohide SATOH, Takahisa MOTOMURA,
Takashi MATSUDA, Kentaro KONDO, Koji
ANDO, Koji MATSUDA, Shuji MIYAKE
y Hideto UEHARA

The undersigned

Motohide SATOH, Takahisa MOTOMURA, Takashi MATSUDA,
Kentaro KONDO, Koji ANDO, Koji MATSUDA, Shuji MIYAKE
and Hideto UEHARA

en consideración al pago de la suma de
(.....US\$ 1.00.....), que he(mos)
recibido, por el presente documento cedo
(cedemos) a
JAPAN TOBACCO INC.

In consideration of the sum of
(.....US\$ 1.00.....), the receipt of which
is hereby acknowledged, by these presents do sell,
assign and transfer unto
Japan Tobacco Inc.

una compañía constituida de conformidad con las
leyes de JAPON

a corporation organized under the laws of
Japan

con oficinas en
2-1, Toranomon 2-chome, Minato-ku,
Tokyo 105-8422, JAPON
todos los derechos y títulos sobre la invención
denominada
CRISTAL ESTABLE DE COMPUESTO
4-OXOQUINOLINA

having a place of business at
2-1, Toranomon 2-chome,
Minato-ku, Tokyo 105-8422 Japan
all rights and title to the invention related to

STABLE CRYSTAL OF 4-OXOQUINOLINE COMPOUND

EL CESIONARIO firma también el presente y
declara que acepta dicha cesión

THE ASSIGNEE signs these presents and declares
that accepts the aforesaid assignment

Dado y firmado hoy 16 de Noviembre de 2006
en OSAKA

Given and signed this November 16. 2006
In Osaka

Inventors

Motohide Satoh
Motohide SATOH
Takahisa Motomura
Takahisa MOTOMURA
Takashi Matsuda
Takashi MATSUDA

Kentaro Kondo
Kentaro KONDO
Koji Ando
Koji ANDO
Koji Matsuda
Koji MATSUDA

S. Miyake
Shuji MIYAKE
Hideto Uehara
Hideto UEHARA

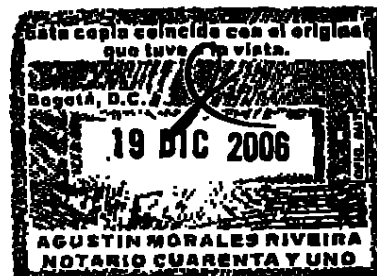
Assignee

Japan Tobacco Inc.

Y. Inubushi
Yoshinori INUBUSHI
Vice President, Intellectual Property

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.

ABOGADOS COLOMBIA.



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: **JAPAN**

This public document

2. has been signed by **Katsuyuki YAMAGUCHI**

3. acting in the capacity of **Notary Public of the Osaka
Legal Affairs Bureau**

4. bears the seal/stamp of **Katsuyuki YAMAGUCHI, Notary Public**

Certified

5. at **Osaka**

6. **NOV. 16. 2006**

7. by the **Ministry of Foreign Affairs**

8. No. **4533**

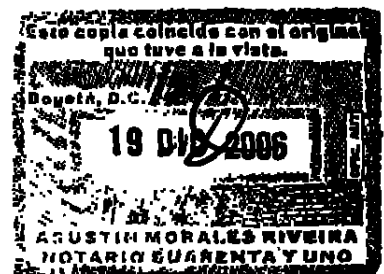
9. Seal/stamp:



10. Signature:

Toshiko TANAKI

For the Minister for Foreign Affairs



認証登簿平成18年第342号

囑託人犬伏吉則、同佐藤元秀、同近藤健太郎、同三宅修司、同本村隆尚、同安藤公司、同植原秀人、同松田隆及び同松田浩二は、本公証人の前で、別紙編綴の書面に署名した。

よって、これを認証する。

平成18年11月13日、本職の役場において。

大阪府高槻市芥川町1丁目15番18号（ミドリ芥川ビル内）

大阪法務局所属

公証人

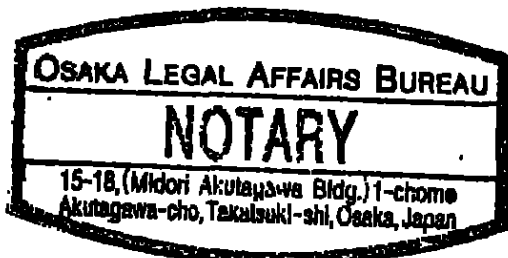
山口勝之

Registered No.342 (2006)

NOTARIAL CERTIFICATE

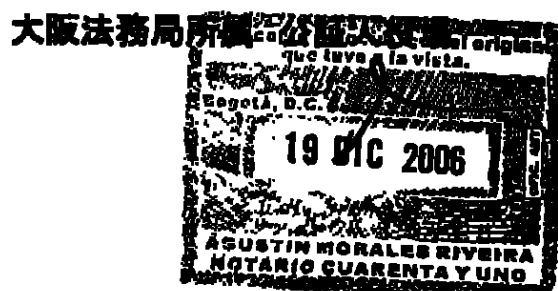
This is to certify that Yoshinori Inubushi, Motohide Sato, Kentaro Kondo, Shuji Miyake, Takahisa Motomura, Koji Ando, Hideto Uehara, Takashi Matsuda and Koji Matsuda signed to the attached document in my very presence.

Dated this 13th day of November, 2006.



Katsuyuki Yamaguchi
Katsuyuki Yamaguchi

Notary, attached to
Osaka Legal Affairs Bureau
15-18, 1-chome, Akutagawa-cho,
Takatsuki-shi, Osaka, Japan.



総 第 4182 号

証 明

大阪法務局所属公証人 山口勝之

平成 18 年 11 月 13 日付

平成 18 年 登簿 第 372 号

この認証の付与は、在職中の公証人が
その権限に基づいてしたものであり、
かつ、その押印は、真実のものであること
を証明する。

平成 18 年 11 月 16 日
平成 年 月 日

大阪法務局長 山 垣 清 正

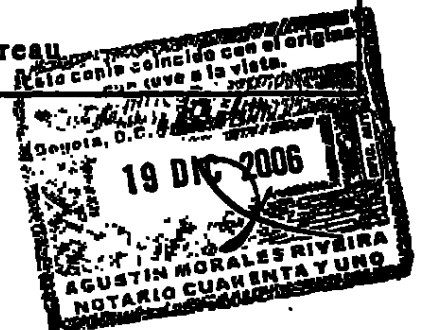


CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has
been executed by Notary, duly authorized and practising in Osaka,
Japan, and that the Official Seal appearing on the same is genuine.

Date 06.11.16

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau



-----TRADUCCION OFICIAL No. 06-12-01-----

De un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello y firma de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia.-----

(Anexos a un documento de cesión de Motohide SATOH, Takahisa MOTOMURA, Takashi MATSUDA, Kentaro KONDO, Koji ANDO, Koji MATSUDA, Shuji MIYAKE e Hideo UEHARA a favor de Japan Tobacco Inc.)

Registro No. 342 / 2006

CERTIFICADO NOTARIAL

Certifico por la presente que Yoshinori Inubushi, Motohide Sato, Kentaro Kondo, Shuji Miyake, Takahisa Motomura, Koji Ando, Hideto Uehara, Takashi Matsuda y Koji Matsuda firmaron el documento adjunto en mi propia presencia.

Dado hoy día 13 de Noviembre de 2006.

(fdo) Katsuyuki Yamaguchi

Katsuyuki Yamaguchi

Notario adjunto a la

Oficina de Asuntos Legales de Osaka

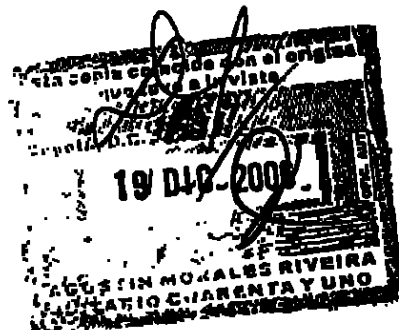
15-18-, 1-chome, Akutagawa-cho,

Takatsuki-shi, Osaka, Japón

(Sello) Oficina de Asuntos Legales de Osaka

NOTARIO - 15-18 (Midori Akutagawa Bldg.) 1-chome

Akutagawa-cho, Takatsuki-shi, Osaka, Japón



CERTIFICADO

Certifico por la presente que el Certificado Notarial anexo ha sido otorgado por Notario debidamente autorizado y en ejercicio en Osaka, Japón, y que el sello oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha: 06-11.16

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

APOSTILLA

(Convención de La Haya de Octubre 5, 1961)

1. País: JAPON

Este documento público

2. ha sido firmado por: Katsuyuki YAMAGUCHI

3. actuando en su carácter de: Notario Público de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

4. lleva el sello de Katsuyuki YAMAGUCHI, Notario Público

CERTIFICADO:

5. en Osaka

6. el día 16 de Noviembre de 2006

7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores

8. No. 4533

9. Sello

10. Firma:

(fdo) ilegible

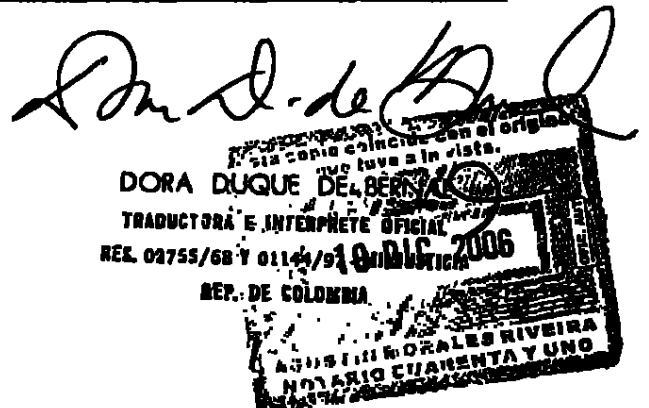
Toshihiko TANAKI

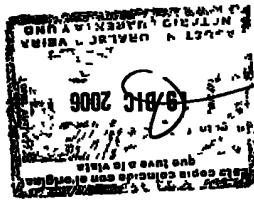
Por el Ministerio de Relaciones Exteriores

(Sello)

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Diciembre 5, 2006





MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

539557
Dora Duque
COTA TIPIA APARECE EN EL
DOCUMENTO QUE SE MUESTRA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 DIC 11 A 10:05

LOS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 December 2005 (01.12.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/113508 A1

(51) International Patent Classification⁷: C07D 215/56,
A61K 31/47, A61P 31/18

(21) International Application Number:
PCT/JP2005/009604

(22) International Filing Date: 19 May 2005 (19.05.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
2004-150979 20 May 2004 (20.05.2004) JP

(71) Applicant (for all designated States except US): JAPAN
TOBACCO INC. [JP/JP]; 2-1, Toranomon 2-chome, Mi-
nato-ku, Tokyo, 1058422 (JP).

(72) Inventors; and

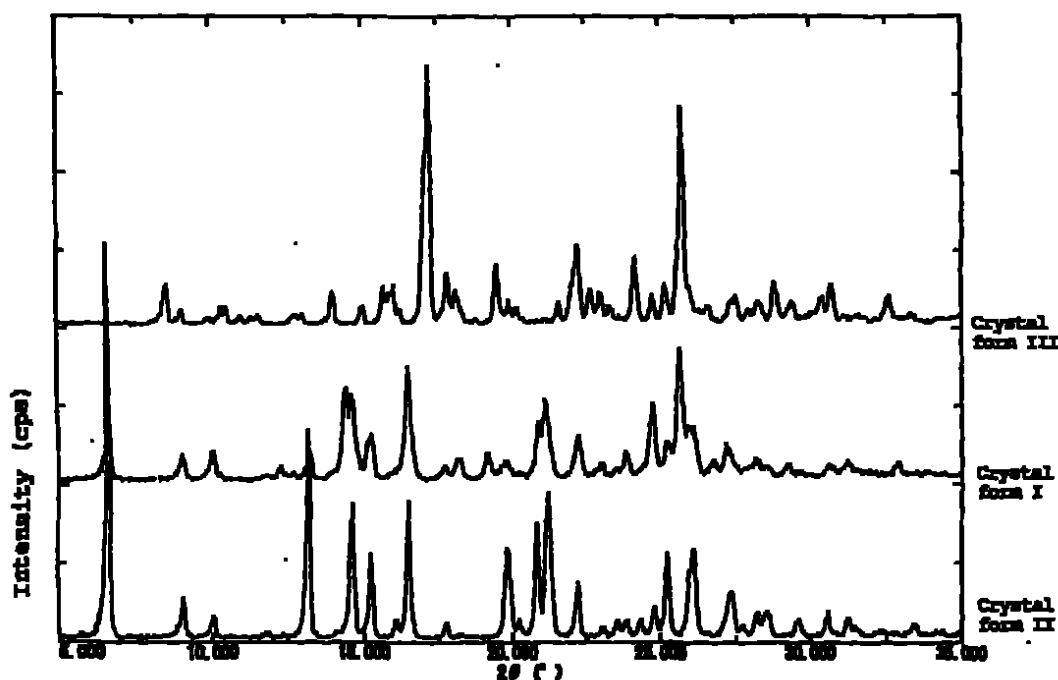
(75) Inventors/Applicants (for US only): SATOH, Motohide
[JP/JP]; c/o Central Pharmaceutical Research Institute of
Japan Tobacco Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi,

Osaka, 5691125 (JP). MOTOMURA, Takahisa [JP/JP];
c/o Central Pharmaceutical Research Institute of Japan
Tobacco Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Os-
aka, 5691125 (JP). MATSUDA, Takashi [JP/JP]; c/o
Central Pharmaceutical Research Institute of Japan To-
bacco Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka,
5691125 (JP). KONDO, Kentaro [JP/JP]; c/o Central
Pharmaceutical Research Institute of Japan Tobacco Inc.,
1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka, 5691125 (JP).
ANDO, Keiji [JP/JP]; c/o Central Pharmaceutical Re-
search Institute of Japan Tobacco Inc., 1-1, Murasaki-cho,
Takatsuki-shi, Osaka, 5691125 (JP). MATSUDA, Keiji
[JP/JP]; c/o Central Pharmaceutical Research Institute of
Japan Tobacco Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi,
Osaka, 5691125 (JP). MIYAKE, Shuji [JP/JP]; c/o Cen-
tral Pharmaceutical Research Institute of Japan Tobacco
Inc., 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka, 5691125
(JP). UEHARA, Hideto [JP/JP]; c/o Central Pharma-
ceutical Research Institute of Japan Tobacco Inc., 1-1,
Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka, 5691125 (JP).

(74) Agent: TAKASHIMA, Hajime; Meiji Yasuda Seimei Os-
aka Midoriji Bldg., 1-1, Fushimimachi 4-chome, Chuo-ku,
Osaka-shi, Osaka 5410044 (JP).

[Continued on next page]

(54) Title: STABLE CRYSTAL OF 4-OXOQUINOLINE COMPOUND



(57) Abstract: The present invention provides a crystal of 6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-1-[(S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl]-7-methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid, which shows a particular powder X-ray diffraction pattern of a characteristic diffraction peaks at diffraction angles 2θ (°) as measured by powder X-ray diffractometry. The crystal of the present invention is superior in physical and chemical stability.



(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

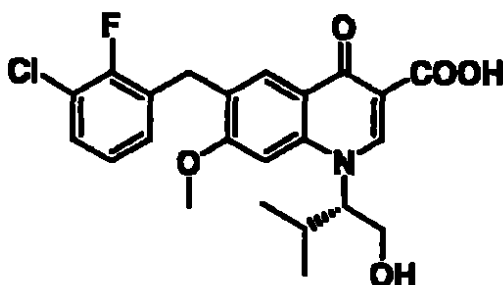
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

DESCRIPTION

STABLE CRYSTAL OF 4-OXOQUINOLINE COMPOUND

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to a stable crystal of 6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-1-[(S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl]-7-methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid



(hereinafter sometimes to be compound A) and a mixed crystal thereof. The present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising the crystal or the mixed crystal.

BACKGROUND OF THE ART

The present Applicant has disclosed in Japanese Patent Application No. 2003-293117 filed by the same Applicant that the above-mentioned compound A has an inhibitory action on integrase that is an essential enzyme for the growth of HIV (Human Immunodeficiency Virus), which is a causative virus of AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), and shows an anti-HIV effect (particularly Example 4-32 and Experimental Example).

In general, when a compound is used as a pharmaceutical product, chemical and physical stability of the compound is required so as to maintain quality and/or facilitate preservation. Not only the final pharmaceutical composition but also a compound as a synthetic starting material is desirably chemically and physically stable for the same reasons.

Therefore, such compound is preferably a crystal, particularly preferably a stable crystal. When the compound has crystal polymorphism, the most stable crystal is generally selected.

While the above-mentioned application describes compound A, no concrete description relating to the crystal form of compound A is found.

SUMMARY OF THE INVENTION

5 Thus, the present inventors have studied various crystal forms of compound A in an attempt to find a stable crystal of compound A. As a result, they have found that compound A has crystal polymorphism, and a crystal of compound A having a particular crystal form is useful as a stable crystal, and based
10 on which findings, they have completed the present invention.

Accordingly, the present invention provides the following.

- 15 [1] A crystal (crystal form II) of 6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-1-[(S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl]-7-methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid, which has an X-ray powder diffraction pattern having characteristic diffraction peaks at diffraction angles $2\theta(^{\circ})$ of 6.56, 13.20, 19.86, 20.84, 21.22, 25.22° as measured by X-ray powder diffractometer;
- 20 [2] a crystal (crystal form III) of 6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-1-[(S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl]-7-methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid, which has an X-ray powder diffraction pattern having characteristic diffraction peaks at diffraction angles $2\theta(^{\circ})$ of 8.54, 14.02, 15.68, 17.06, 17.24, 24.16, 25.74° as measured by X-ray powder diffractometer;
- 25 [3] a crystal (crystal form III) of 6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-1-[(S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl]-7-methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid, having an extrapolated onset temperature of $162.1 \pm 5.0^{\circ}\text{C}$;
- [4] the crystal of any of the above-mentioned [1] to [3], which has a purity of crystal of not less than 70%;
- 30 [5] a mixed crystal comprising the crystal of the above-mentioned 1 and the crystal of the above-mentioned [2] or [3];
- [6] the mixed crystal of the above-mentioned [5], wherein the purity of crystal is not less than 70%;
- [7] a pharmaceutical composition comprising the crystal of any

f th above-mentioned [1] to [4] or the mixed crystal of the above-mentioned [5] or [6], and a pharmaceutically acceptable carrier;

[8] an integrase inhibitor comprising the crystal of any of the
5 above-mentioned [1] to [4] or the mixed crystal of the above-mentioned [5] or [6] as an active ingredient;

[9] an antiviral agent comprising the crystal of any of the above-mentioned [1] to [4] or the mixed crystal of the above-mentioned [5] or [6] as an active ingredient;

10 [10] an anti-HIV agent comprising the crystal of any of the above-mentioned [1] to [4] or the mixed crystal of the above-mentioned [5] or [6] as an active ingredient;

[11] an anti-HIV composition comprising the crystal of any of the above-mentioned [1] to [4] or the mixed crystal of the
15 above-mentioned [5] or [6] and one or more kinds of other anti-HIV active substances as active ingredients; and

[12] an anti-HIV agent for a multiple drug therapy with other anti-HIV agent, which comprises the crystal of any of the above-mentioned [1] to [4] or the mixed crystal of the above-mentioned
20 [5] or [6] as an active ingredient.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 shows multiple records of X-ray powder diffraction patterns, wherein the upper line shows the diffraction pattern of crystal form III, the middle line shows the diffraction
25 pattern of crystal form I, the lower line shows the diffraction pattern of crystal form II, the vertical axis shows diffraction intensity (cps: counts per second: intervals of scale is 2500 cps) and the transverse axis shows diffraction angle $2\theta(^{\circ})$.

Fig. 2 shows multiple records of X-ray powder diffraction
30 pattern obtained from the sample after 3-day preservation of the stability test of crystal form I. For comparison, the uppermost line shows the diffraction pattern (initial conditions) of crystal form II, and the lowermost line shows the diffraction pattern (initial conditions) of crystal form I. Shown from the

second line are diffraction patterns under preservation condition #6 (60°C/75% R.H., open container, 3 weeks preservation), preservation condition #4 (60°C, container with stopper, 3 weeks preservation), preservation condition #5 (60°C, open container, 3 weeks preservation), preservation condition #3 (80°C, open container, 3 days preservation) and preservation condition #2 (80°C, container with stopper, 3 days preservation). The vertical axis shows diffraction intensity (cps: counts per second: intervals of scale is 2500 cps) and the transverse axis shows diffraction angle $2\theta(^{\circ})$.

EFFECT OF THE INVENTION

The crystal or mixed crystal of compound A of the present invention has the above-mentioned particular crystal form and is superior in physical and chemical stability; which in turn has advantage that maintenance of the quality of compound A for a long-term becomes possible, which facilitates preservation. In addition, they have advantage that handling during production of various pharmaceutical compositions and bulk is easy, which reduces the production cost.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is explained in detail in the following.

In the present invention, the "crystal form II" of compound A means a crystal of compound A, which has an X-ray powder diffraction pattern having characteristic diffraction peaks at diffraction angles $2\theta(^{\circ})$ of 6.56, 13.20, 19.86, 20.84, 21.22, 25.22° as measured by X-ray powder diffractometer.

In the present invention, the "crystal form III" of compound A means a crystal of compound A, which has an X-ray powder diffraction pattern having characteristic diffraction peaks at diffraction angles $2\theta(^{\circ})$ of 8.54, 14.02, 15.68, 17.06, 17.24, 24.16, 25.74° as measured by X-ray powder diffractometer.

The diffraction peak value at the above-mentioned diffraction angle $2\theta(^{\circ})$ may show slight measurement error due to

the measurement instruments or measurement conditions and the like. To be specific, the measurement error may be within the range of ± 0.2 , preferably ± 0.1 , more preferably ± 0.06 .

The crystal of compound A of the present invention is also characterized by thermal analysis. For example, when the crystal form III of compound A of the present invention is subjected to Differential Scanning Calorimetry (DSC), the enthalpy of endothermic peak is about 81 J/g, and extrapolated onset temperature is $162.1 \pm 5.0^\circ\text{C}$, preferably $162.1 \pm 3.0^\circ\text{C}$, more preferably $162.1 \pm 1.0^\circ\text{C}$, wherein the "extrapolated onset temperature" means, as defined by JIS K 7121 (measurement method of transfer temperature of plastic), the temperature at an intersection of the extrapolated baseline of the lower temperature side toward the higher temperature side with the tangent line drawn at the point showing the greatest slope on the leading edge of the melting peak on a lower temperature side in a DSC curve. When the enthalpy and extrapolated onset temperature of the endothermic peak is within the above-mentioned range, the crystal of compound A is stable.

The crystal of compound A of the present invention may be either a crystal form II or a crystal form III, or a mixed crystal of a crystal form II and a crystal form III. For use in a pharmaceutical product of compound A and the like, the crystal form II or crystal form III is preferable because they are stable crystals, and a crystal form III is more preferable because it is the most stable crystal. In addition, a crystal form II is preferable in view of the absorbability by living organisms upon administration as a pharmaceutical composition.

In the present invention, the "purity of crystal" means the purity of the crystal form II or crystal form III of compound A. In the case of a mixed crystal of a crystal form II and a crystal form III, it means the ratio of crystal relative to the total amount of substance of a crystal form II and a crystal form III. The purity of the crystal of the present

invention can be determined by, for example, known methods such as X-ray powder diffractometry, thermal analysis and the like. The purity of the crystal or mixed crystal of the present invention does not need to be 100%, and may be not less than 70%,
5 preferably not less than 80%, more preferably not less than 90%, more preferably not less than 95%, and most preferably not less than 98%. Purity within this range is preferable for guaranteeing the quality.

The crystal or mixed crystal of compound A of the present
10 invention can be administered to a mammal (human, mouse, rat, hamster, rabbit, cat, dog, bovine, sheep, monkey etc.) and the like as various pharmaceutical compositions such as anti-HIV agents, HIV integrase inhibitors, antiviral agents and the like used for, for example, the prophylaxis and/or treatment of AIDS.

15 When the crystal or mixed crystal of compound A of the present invention is used as a pharmaceutical composition, it is admixed with pharmaceutically acceptable carriers, excipients, diluents, extending agents, disintegrants, stabilizers, preservatives, buffers, emulsifiers, flavoring agents, coloring
20 agents, sweetening agents, thickeners, correctives, dissolution aids, and other additives, that are generally known per se, such as water, vegetable oil, alcohol (e.g., ethanol or benzyl alcohol etc.), polyethylene glycol, glycerol triacetate, gelatin, carbohydrate (e.g., lactose, starch etc.), magnesium
25 stearate, talc, lanolin, petrolatum and the like, formed into tablet, pill, powder, granule, suppository, injection, eye drop, liquid, capsule, troche, aerosol, elixir, suspension, emulsion, syrup and the like by a conventional method, and administered systemically or topically, and orally or parenterally.

30 While the dose varies depending on age, body weight, symptom, treatment effect, administration method and the like, it is generally 0.01 mg to 1 g per administration for an adult, which is given once to several times a day orally or in a dosage form of an injection such as intravenous injection and the like.

An anti-HIV agent is generally required to sustain its effect for a long time, so that it can be effective not only for temporal suppression of viral growth but also for the prohibition of viral re-growth. This means that a prolonged administration is necessary and that a high single dose may be frequently inevitable to sustain the effect for a longer period during night and the like. Such prolonged and high dose administration increases the risk of side effects.

In view of this, one of the preferable modes of the present invention is such compound permitting high absorption by oral administration, and such compound capable of maintaining blood concentration of the administered compound for an extended period of time.

By the "prophylaxis of AIDS" is meant, for example, administration of a pharmaceutical agent to an individual who tested HIV positive but has not yet developed the disease state of AIDS, administration of a pharmaceutical agent to an individual who shows an improved disease state of AIDS after treatment but who carries HIV still to be eradicated and whose relapse of AIDS is worried, and administration of a pharmaceutical agent out of a fear of possible infection.

The anti-HIV composition of the present invention is used for, for example, a multiple drug combination therapy of AIDS. Examples of the "other anti-HIV active substance" to be used for the anti-HIV composition include an anti-HIV antibody, an HIV vaccine, immunostimulants such as interferon and the like, an HIV ribozyme, an HIV antisense drug, an HIV reverse transcriptase inhibitor, an HIV protease inhibitor, an inhibitor of bond between a bond receptor (CD4, CXCR4, CCR5 and the like) of a host cell recognized by virus and the virus, and the like.

Specific examples of the HIV reverse transcriptase inhibitor include Retrovir(R) (zidovudine), Epivir(R) (lamivudine), Zerit(R) (zalcitabine), Videx(R) (didanosine), Hivid(R) (zalcitabine), Ziagen(R) (abacavir sulfate),

Viramune(R) (nevirapine), Stocrin(R) (efavirenz), Rescriptor(R) (delavirdine mesylate), Combivir(R) (zidovudine+lamivudine), Trizivir(R) (abacavir sulfate+lamivudine+zidovudine), Coactinon(R) (emivirine), Phosphonovir(R), Coviracil(R),
 5 alovudine (3'-fluoro-3'-deoxythymidine), Thiovir (thiophosphonoformic acid), Capravirin (5-[(3,5-dichlorophenyl)thio]-4-isopropyl-1-(4-pyridylmethyl)imidazole-2-methanol carbamic acid), Tenofovir disoproxil fumarate ((R)-[[2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-1-methylethoxy]methyl]phosphonic acid
 10 bis(isopropoxycarbonyloxymethyl)ester fumarate), DPC-083 ((4S)-6-chloro-4-[(1E)-cyclopropylethenyl]-3,4-dihydro-4-trifluoromethyl-2(1H)-quinazolinone), DPC-961 ((4S)-6-chloro-4-(cyclopropylethynyl)-3,4-dihydro-4-(trifluoromethyl)-2(1H)-quinazolinone), DAPD ((-)- β -D-2,6-diaminopurine dioxolane),
 15 Immunocal, MSK-055, MSA-254, MSH-143, NV-01, TMC-120, DPC-817, GS-7340, TMC-125, SPD-754, D-A4FC, capravirine, UC-781, emtricitabine, alovudine, Phosphazid, UC-781, BCH-10618, DPC-083, Etravirine, BCH-13520, MIV-210, Abacavir sulfate/lamivudine, GS-7340, GW-5634, GW-695634 and the like,
 20 wherein (R) means a registered trademark (hereinafter the same) and the names of other pharmaceutical agents are general names.

Specific examples of the HIV protease inhibitor include Crixivan(R) (indinavir sulfate ethanolate), saquinavir, Invirase(R) (saquinavir mesylate), Norvir(R) (ritonavir),
 25 Viracept(R) (nelfinavir mesylate), lopinavir, Prozei(R) (amprenavir), Kaletra(R) (ritonavir+lopinavir), mozenavir dimesylate ([4R-(4 α ,5 α ,6 β)]-1,3-bis[(3-aminophenyl)methyl]-hexahydro-5,6-dihydroxy-4,7-bis(phenylmethyl)-2H-1,3-diazepin-2-one dimethanesulfonate), tipranavir (3'-[(1R)-1-[(6R)-5,6-
 30 dihydro-4-hydroxy-2-oxo-6-phenylethyl-6-propyl-2H-pyran-3-yl]propyl]-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinesulfonamide), lasinavir (N-[5(S)-(tert-butoxycarbonylamino)-4(S)-hydroxy-6-phenyl-2(R)-(2,3,4-trimethoxybenzyl)hexanoyl]-L-valine 2-methoxyethylenamide), KNI-272 ((R)-N-tert-butyl-3-[(2S,3S)-2-

hydroxy-3-N-[(R)-2-N-(isoquinolin-5-yloxyacetyl)amino-3-methylthiopropionyl]amino-4-phenylbutanoyl]-5,5-dimethyl-1,3-thiazolidine-4-carboxamide), GW-433908, TMC-126, DPC-681, buckminsterfullerene, MK-944A (MK944 (N-(2(R)-hydroxy-1(S)-indanyl)-2(R)-phenylmethyl-4(S)-hydroxy-5-[4-(2-benzo[b]furanylmethyl)-2(S)-(tert-butylcarbamoyl)piperazin-1-yl]pentanamide)+indinavir sulfate), JE-2147 ([2(S)-oxo-4-phenylmethyl-3(S)-[(2-methyl-3-oxo)phenylcarbonylamino]-1-oxabutyl]-4-[(2-methylphenyl)methylamino]carbonyl-4(R)-5,5-dimethyl-1,3-thiazole), BMS-232632 ((3S,8S,9S,12S)-3,12-bis(1,1-dimethylethyl)-8-hydroxy-4,11-dioxo-9-(phenylmethyl)-6-[[4-(2-pyridinyl)phenyl]methyl]-2,5,6,10,13-pentaazatetradecanedicarboxylic acid dimethyl ester), DMP-850 ((4R,5S,6S,7R)-1-(3-amino-1H-indazol-5-ylmethyl)-4,7-dibenzyl-3-butyl-5,6-dihydroxyperhydro-1,3-diazepin-2-one), DMP-851, RO-0334649, Nar-DG-35, R-944, VX-385, TMC-114, Tipranavir, Fosamprenavir sodium, Fosamprenavir calcium, Darunavir, GW-0385, R-944, RO-033-4649, AG-1859 and the like.

The HIV integrase inhibitor is exemplified by S-1360, L-870810 and the like, the DNA polymerase inhibitor or DNA synthesis inhibitor is exemplified by Foscavir(R), ACH-126443 (L-2',3'-didehydro-dideoxy-5-fluorocytidine), entecavir ((1S,3S,4S)-9-[4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-methylenecyclopentyl]guanine), calanolide A ([10R-(10 α ,11 β ,12 α)]-11,12-dihydro-12-hydroxy-6,6,10,11-tetramethyl-4-propyl-2H,6H,10H-benzo[1,2-b:3,4-b':5,6-b'']tripyrans-2-one), calanolide B, NSC-674447 (1,1'-azobisformamide), Iscador (viscum album extract), Rubitecan and the like, the HIV antisense drug is exemplified by HGTV-43, GEM-92 and the like, the anti-HIV antibody or other antibody is exemplified by NM-01, PRO-367, KD-247, Cytolin(R), TNX-355 (CD4 antibody), AGT-1, PRO-140 (CCR5 antibody), Anti-CTLA-4MAb and the like, the HIV vaccine or other vaccine is exemplified by ALVAC(R), AIDSVAX(R), Remune(R), HIVgp41 vaccine, HIVgp120 vaccine, HIVgp140 vaccine, HIVgp160

- vaccine, HIVp17 vaccine, HIVp24 vaccine, HIVp55 vaccine, AlphaVax Vector System, canarypox gp160 vaccine, AntiTat, MVA-F6 Nef vaccine, HIVrev vaccine, C4-V3 peptide, p2249f, VIR-201, HGP-30W, TBC-3B, PARTICLE-3B and the like, Antiferon
- 5 (interferon- α vaccine) and the like, the interferon or interferon agonist is exemplified by Sumiferon(R), MultiFeron(R), interferon- γ , Reticulose, human leukocyte interferon α and the like, the CCR5 antagonist is exemplified by SCH-351125 and the like, the pharmaceutical agent acting on HIV p24 is exemplified
- 10 by GPG-NH2 (glycyl-prolyl-glycinamide) and the like, the HIV fusion inhibitor is exemplified by FP-21399 (1,4-bis[3-[(2,4-dichlorophenyl)carbonylamino]-2-oxo-5,8-disodium sulfonyl]naphthyl-2,5-dimethoxyphenyl-1,4-dihydrazone), T-1249, Synthetic Polymeric Construction No3, pentafuside, FP-21399,
- 15 PRO-542, Enfuvirtide and the like, the IL-2 agonist or antagonist is exemplified by interleukin-2, Immunace(R), Proleukin(R), Multikine(R), Ontak(R) and the like, the TNF- α antagonist is exemplified by Thalomid(R) (thalidomide), Remicade(R) (infliximab), curdlan sulfate, the α -glucosidase
- 20 inhibitor is exemplified by Bucast(R) and the like, the purine nucleoside phosphorylase inhibitor is exemplified by peldesine (2-amino-4-oxo-3H,5H-7-[(3-pyridyl)methyl]pyrrolo[3,2-d]pyrimidine) and the like, the apoptosis agonist or inhibitor is exemplified by Arkin Z(R), Panavir(R), Coenzyme Q10 (2-
- 25 deca(3-methyl-2-butenylene)-5,6-dimethoxy-3-methyl-p-benzoquinone) and the like, the cholinesterase inhibitor is exemplified by Cognex(R) and the like, and the immunomodulator is exemplified by Immunox(R), Prokine(R), Met-enkephalin (6-de-L-arginine-7-de-L-arginine-8-de-L-valinamide-adrenorphin), WF-10
- 30 (10-fold dilute tetrachlorodecaoxide solution), Perthon, PRO-542, SCH-D, UK-427857, AMD-070, AK-602 and the like.

In addition, Neurotropin(R), Lidakol(R), Ancer 20(R), Ampligen(R), Anticort(R), Inactivin(R) and the like, PRO-2000, Rev M10 gene, HIV specific cytotoxic T cell (CTL immunotherapy,

ACTG protocol 080 therapy, CD4-ζ gene therapy), SCA binding protein, RBC-CD4 complex, Motexafin gadolinium, GEM-92, CNI-1493, (±)-FTC, UsherCell, D2S, BufferGel(R), VivaGel(R), Glyminox vaginal gel, sodium lauryl sulfate, 2F5, 2F5/2G12, VRX-
 5 496, Ad5gag2, BG-777, IGIV-C, BILR-255 and the like are exemplified.

As the "other anti-HIV activity substance" to be used for the anti-HIV composition of the present invention in the multiple drug combination therapy, preferred are an HIV reverse
 10 transcriptase inhibitor and an HIV protease inhibitor. Two or three, or even a greater number of pharmaceutical agents can be used in combination, wherein a combination of pharmaceutical agents having different action mechanisms is one of the preferable embodiments. In addition, selection of
 15 pharmaceutical agents free of side effect duplication is preferable.

Specific examples of the combination of pharmaceutical agents include a combination of a group consisting of efavirenz, tenofovir, emtricitabine, indinavir, nelfinavir, atazanavir,
 20 ritonavir + indinavir, ritonavir + lopinavir and ritonavir + saquinavir, didanosine + lamivudine, zidovudine + didanosine, stavudine + didanosine, zidovudine + lamivudine, stavudine + lamivudine and emtriva, and the crystal or mixed crystal of the present invention (Guidelines for the Use of Antiretroviral
 25 Agents in HIV-Infected Adults and Adolescents. August 13, 2001). Particularly preferred is a combined use of two agents of the crystal or mixed crystal of the present invention with efavirenz, indinavir, nelfinavir, tenofovir, emtricitabine, zidovudine or lamivudine, and a combined use of three agents of the crystal or
 30 mixed crystal of the present invention with zidovudine + lamivudine, tenofovir + lamivudine, tenofovir + zidovudine, tenofovir + efavirenz, tenofovir + nelfinavir, tenofovir + indinavir, tenofovir + emtricitabine, emtricitabine + lamivudine, emtricitabine + zidovudine, emtricitabine + efavirenz,

emtricitabine + nelfinavir, emtricitabine + indinavir, nelfinavir + lamivudine, nelfinavir + zidovudine, nelfinavir + efavirenz, nelfinavir + indinavir, efavirenz + lamivudine, efavirenz + zidovudine or efavirenz + indinavir.

5 The production method of the crystal or mixed crystal of compound A of the present invention is not particularly limited, and the crystal can be produced by a method known per se or methods shown in the following Examples and the like.

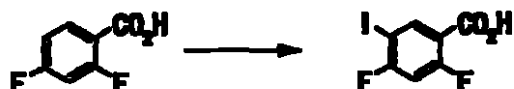
Examples

10 While the production method of the crystal of compound A of the present invention is explained in the following by referring to Examples, which are mere examples and do not limit the present invention in any way.

Reference Example 1: Production of crystal form I of the

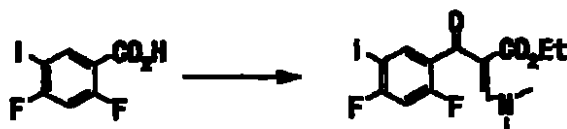
15 compound A

Step 1

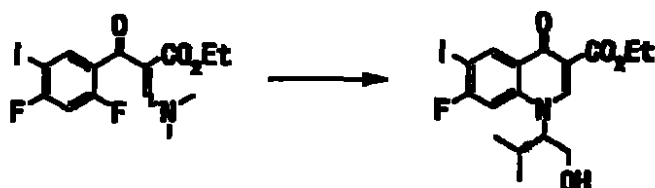


2,4-Difluorobenzoic acid (50 g, 316 mmol) was dissolved in concentrated sulfuric acid (200 ml), and N-iodosuccinimide (68 g, 300 mmol) was added by portions at not more than 5°C. After the completion of the addition, the mixture was stirred at the same temperature for 4.5 hr. The reaction mixture was poured into ice water (ca. 600 ml), then 10% aqueous sodium sulfite solution was added, and the mixture was stirred. The precipitated solid was collected by filtration, washed with water, and vacuum dried to give crude crystals (85 g). The crude crystals obtained in the same manner were combined (total amount 205 g), and recrystallized from 50% aqueous ethanol (820 ml) to give 2,4-difluoro-5-iodobenzoic acid (148 g, yield 73%) as a white solid.

30 ¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) (σ) ppm: 6.94(1H, dd, J=10.3, 10.3Hz), 8.46(1H, d, J=7.5Hz)

Step 2

The compound (148 g, 521 mmol) obtained in Step 1 was dissolved in toluene (750 ml), thionyl chloride (76 ml, 1.04 mol) and dimethylformamide (catalytic amount) were added, and the mixture was heated under reflux for 2 hr. The insoluble material was filtered off at 60°C, and the filtrate was concentrated under reduced pressure and azeotroped with toluene (330 ml). The residue was dissolved in tetrahydrofuran (400 ml), and this solution was added dropwise to a solution of ethyl 3,3-dimethylaminoacrylate (82 g, 573 mmol) and triethylamine (87 ml, 625 mmol) in tetrahydrofuran (400 ml), and the mixture was heated under reflux for 7 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, and concentrated under reduced pressure. Water (700 ml) and ethyl acetate (800 ml) were added for partitioning. The organic layer was washed successively with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (250 ml, X2), water (300 ml) and saturated brine (300 ml), and dried over sodium sulfate. After filtration of insoluble material, the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a crude product (210 g) of 2-(2,4-difluoro-5-iodobenzoyl)-3-dimethylaminoacrylic acid ethyl ester as a brown solid.

Step 3

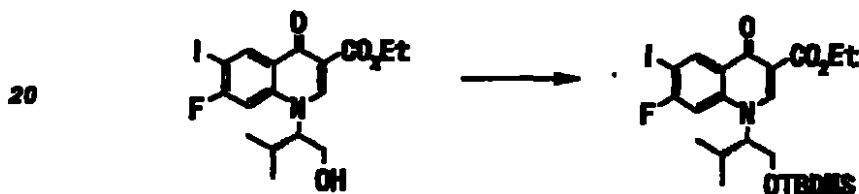
The crude product (210 g) obtained in Step 2 was dissolved in tetrahydrofuran (500 ml), (S)-(+)-valinol (54 g, 521 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for

30 min. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, and the residue was dissolved in dimethylformamide (600 ml). Potassium carbonate (144 g, 1.04 mol) was added and the mixture was stirred with heating at 70°C for 2 hr. The reaction mixture was allowed to cool, and added to water (1500 ml) and stirred. The precipitated solid was collected by filtration and the obtained solid was washed successively with 30% aqueous ethanol (500 ml) and a mixed solvent of diethyl ether (150 ml) and hexane (150 ml) and vacuum dried to give 7-fluoro-1-((8)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl)-6-iodo-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (178 g, yield 76%) as a beige solid.

¹H NMR(DMSO-d₆, 300MHz) (δ) ppm: 0.72(3H, d, J=6.6Hz), 1.10 (3H, d, J=6.6Hz), 1.28(3H, t, J=7.0Hz), 2.27 (1H, br), 3.77 (1H, br), 3.86(1H, br), 4.23 (2H, q, J=7.0Hz), 4.56(1H, br), 5.12 (1H, t, J=4.9Hz), 8.09(1H, d, J=11.1Hz), 8.62 (1H, d, J=7.5Hz), 8.68(1H, s)

MS(ESI): M+ 448

Step 4



wherein TBDMS means a tert-butyldimethylsilyl group.

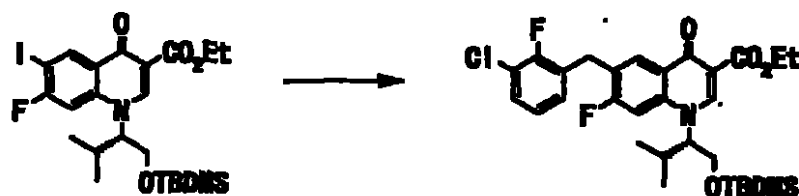
The compound (80 g, 179 mmol) obtained in Step 3 was dissolved in dimethylformamide (320 ml), imidazole (16 g, 233 mmol) and tert-butyldimethylsilyl chloride (30 g, 197 mmol) were added, and the mixture was stirred at room temperature for 1.5 hr. Water was added to the reaction mixture and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed successively with saturated aqueous ammonium chloride solution and saturated brine, and dried over sodium sulfate. The organic layer was filtered and the filtrate was concentrated under

reduced pressure. The obtained residue was purified by silica gel chromatography (ethyl acetate:hexane=1:3 to 1:2) to give 1-((S)-1-tart-butyldimethylsilyloxymethyl-2-methylpropyl)-7-fluoro-6-iodo-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (77 g, yield 77%) as a colorless amorphous form.

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) (δ) ppm: -0.07(3H, s), -0.05(3H, s), 0.77(9H, s), 0.84(3H, d, J=6.5Hz), 1.18(3H, d, J=6.5Hz), 1.40(3H, t, J=7.2Hz), 2.35-2.50(1H, m), 3.85-3.95(1H, m), 3.98-4.10(2H, m), 4.30-4.40(2H, m), 7.26(1H, s), 8.64(1H, s), 8.94(1H, d, J=7.2Hz)

MS(ESI): M+ 562

Step 5



(Preparation of a solution of 3-chloro-2-fluorobenzylzinc bromide in tetrahydrofuran)

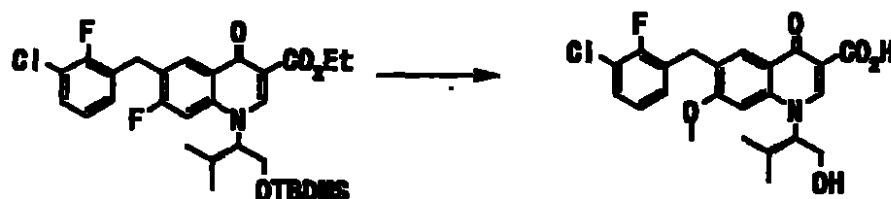
Under an argon stream, zinc powder (11 g, 267 mmol) was suspended in tetrahydrofuran (30 ml), 1,2-dibromoethane (0.15 ml, 1.8 mmol) and trimethylsilyl chloride (0.45 ml, 3.6 mmol) were added at 65°C, and the mixture was stirred with heating for 30 min. A solution of 3-chloro-2-fluorobenzyl bromide (41 g, 178 mmol) in tetrahydrofuran (100 ml) was added dropwise at 65°C, and the mixture was stirred with heating for 2 hr and allowed to cool to room temperature to give a solution of 1M 3-chloro-2-fluorobenzylzinc bromide in tetrahydrofuran. This was used in the next main step.

(Main step)

The compound (76 g, 136 mmol) obtained in Step 4 was dissolved in tetrahydrofuran (600 ml) and, under an argon stream, dibenzylidenacetonepalladium(II) (3.2 g, 5.5 mmol) and trifurylphosphine (2.6 g, 11.0 mmol) were added, and a solution

f the aforementioned 1M 3-chloro-2-fluorobenzylzinc bromide in tetrahydrofuran (178 ml, 178 mmol) was added dropwise at 60°C. After the completion of the dropwise addition, the mixture was stirred with heating at the same temperature for 2 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, saturated aqueous ammonium chloride solution was added, and the mixture was filtered through celite. The filtrate was extracted twice with ethyl acetate. The organic layer was washed successively with water (twice) and saturated brine, and dried over magnesium sulfate. The organic layer was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure, and the obtained residue was purified by silica gel chromatography (chloroform:acetone=40:1) to give 1-((S)-1-tert-butyl-2-methylpropyl)-6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (68 g, yield 84%) as a colorless amorphous form. ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) (8) ppm: -0.09(3H, s), -0.05(3H, s), 0.75(9H, s), 0.85(3H, d, J=6.7Hz), 1.18(3H, d, 6.7Hz), 1.39(3H, t, J=7.1Hz), 2.45(1H, br), 3.89-3.92(1H, m), 3.98-4.02(1H, m), 4.07-4.12(1H, m), 4.12(2H, s), 4.34-4.41(2H, m), 6.96-7.00(1H, m), 7.03-7.05(1H, m), 7.21-7.24(1H, m), 7.26-7.29(1H, m), 8.39(1H, d, J=8.8Hz), 8.63(1H, s)

Step 6



The compound (48 g, 86 mmol) obtained in Step 5 was dissolved in methanol (300 ml), water (5 ml) and 28% sodium methoxide methanol solution (176 ml, 862 mmol) were added, and the mixture was heated under reflux for 24 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and the mixture was neutralized by adding 6N hydrochloric acid. Methanol was

evaporated under reduced pressure. Water was added to the
 obtained solution and the mixture was stirred. The precipitated
 solid was collected by filtration and the obtained solid was
 dissolved in ethyl acetate. The mixture was washed with water
 5 and dried over sodium sulfate. The solution was filtered and
 the filtrate was concentrated under reduced pressure. The
 obtained residue was recrystallized from ethyl acetate-hexane to
 give a compound (32 g, yield 86%) as a white solid. The
 obtained compound (32 g) was dissolved in butyl acetate (160 ml)
 10 by heating under reflux, and crystal form II was seeded at 75°C.
 The mixture was stirred for 3.5 hr while allowing to cool as it
 was. The precipitated solid was collected by filtration, washed
 with butyl acetate (25 ml) and vacuum dried to give a compound
 (25 g, yield 77%) as a white solid. The obtained compound (4.0
 15 g) was dissolved in methanol (40 ml) by heating under reflux at
 50°C, and added dropwise to water (40 ml) at room temperature.
 The mixture was stirred at room temperature for 16 hr, filtered,
 and the remaining solid was washed with 66% aqueous methanol,
 and vacuum dried to give a crystal of compound A (crystal form
 20 I) (3.9 g, yield 97%) as a white solid.

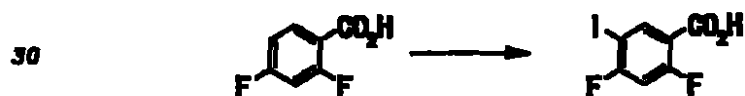
m.p. 151-152°C

¹H NMR (DMSO-d₆ 300MHz) (δ) ppm: 0.72 (3H, d, J=6.5Hz), 1.16 (3H,
 d, J=6.5Hz), 2.30-2.50 (1H, m), 3.70-3.90 (1H, m), 3.90-4.00 (1H,
 m), 4.03 (3H, s), 4.12 (2H, s), 4.80-4.90 (1H, m), 5.19 (1H, t),
 25 7.19-7.25 (2H, m), 7.46-7.51 (2H, m), 8.04 (1H, s), 8.88 (1H, s),
 15.44 (1H, s)

MS (ESI) : M+ 448

Example 1: Production of crystal form II of the compound A

Step 1

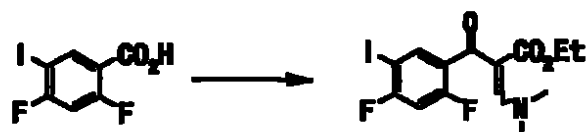


2,4-Difluorobenzoic acid (50 g, 0.316 mmol) was dissolved

in concentrated sulfuric acid (200 ml), and N-iodosuccinimide (68 g, 300 mmol) was added by portions at not more than 5°C. After the completion of the addition, the mixture was stirred at the same temperature for 4.5 hr. The reaction mixture was
5 poured into ice water (ca. 600 ml), then 10% aqueous sodium sulfite solution was added, and the mixture was stirred. The precipitated solid was collected by filtration, washed with water, and vacuum dried to give crude crystals (85 g). The crude crystals obtained in the same manner were combined (total
10 amount 205 g), and recrystallized from 50% aqueous ethanol (820 ml) to give 2,4-difluoro-5-iodobenzoic acid (148 g, yield 73%) as a white solid.

^1H NMR(CDCl_3 , 300MHz) (σ) ppm: 6.94(1H, dd, $J=10.3$, 10.3Hz), 8.46 (1H, d, $J=7.5\text{Hz}$)

15 Step 2

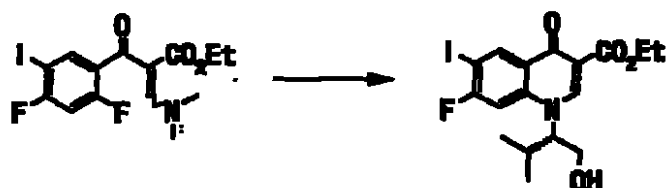


The compound (148 g, 521 mmol) obtained in Step 1 was dissolved in toluene (750 ml), thionyl chloride (76 ml, 1.04 mol) and dimethylformamide (catalytic amount) were added, and
20 the mixture was heated under reflux for 2 hr. The insoluble material was filtered off at 60°C, and the filtrate was concentrated under reduced pressure and azeotropeed with toluene (330 ml). The residue was dissolved in tetrahydrofuran (400 ml) and this solution was added dropwise to a solution of ethyl 3,3-
25 dimethylaminoacrylate (82 g, 573 mmol) and triethylamine (87 ml, 625 mmol) in tetrahydrofuran (400 ml), and the mixture was heated under reflux for 7 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and concentrated under reduced
pressure. Water (700 ml) and ethyl acetate (800 ml) were added
30 to allow partitioning. The organic layer was washed successively with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate

(250 ml) twice, water (300 ml) and saturated brine (300 ml), and dried over sodium sulfate. The mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a crude product (210 g) of 2-(2,4-difluoro-5-iodobenzoyl)-3-

5 dimethylaminoacrylic acid ethyl ester as a brown solid.

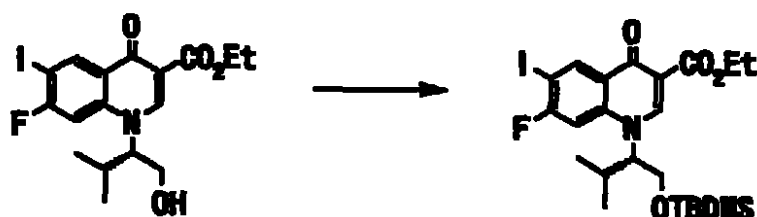
Step 3



The crude product (210 g) obtained in Step 2 was dissolved
 10 in tetrahydrofuran (500 ml), (S)-(+)-valinol (54 g, 0.521 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, and the residue was dissolved in dimethylformamide (600 ml). Potassium carbonate (144 g, 1.04 mol) was added, and
 15 the mixture was stirred with heating at 70°C for 2 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, added to water (1500 ml) and the mixture was stirred. The precipitated solid was collected by filtration. The obtained solid was washed successively with 30% aqueous ethanol (500 ml)
 20 and a mixed solvent of diethyl ether (150 ml) and hexane (150 ml), and vacuum dried to give 7-fluoro-1-((S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl)-6-iodo-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (178 g, yield 76% (relative to Step 2)) as a beige solid.

25 ¹H NMR(DMSO-d₆, 300MHz) (δ) ppm: 0.72(3H, d, J=6.6Hz), 1.10 (3H, d, J=6.6Hz), 1.28(3H, t, J=7.0Hz), 2.27 (1H, br), 3.77 (1H, br), 3.86(1H, br), 4.23 (2H, q, J=7.0Hz), 4.56(1H, br), 5.12 (1H, t, J=4.9Hz), 8.09(1H, d, J=11.1Hz), 8.62 (1H, d, J=7.5Hz), 8.68(1H, s)

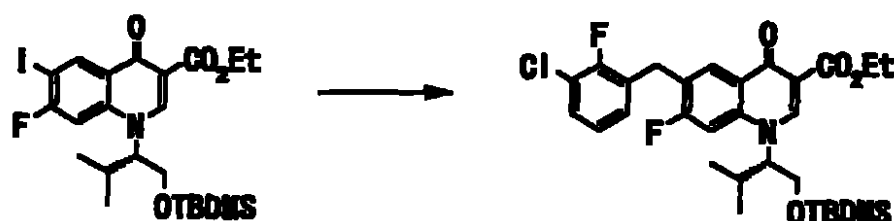
30 MS(ESI): M⁺ 448

Step 4

The compound (150 g, 335 mmol) obtained in Step 3 was dissolved in dimethylformamide (500 ml), imidazole (30 g, 0.436 mmol) and tert-butyldimethylsilyl chloride (56 g, 369 mmol) were added, and the mixture was stirred at room temperature for 1.5 hr. Water was added to the reaction mixture and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed successively with water, saturated aqueous ammonium chloride solution and saturated brine, and dried over sodium sulfate. The organic layer was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure, and the obtained residue was purified by silica gel chromatography (ethyl acetate:hexane=1:3 to 1:2) to give 1-((S)-1-tert-butyldimethylsilyloxymethyl-2-methylpropyl)-7-fluoro-6-iodo-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (173 g, yield 92%) as a colorless amorphous form.

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) (δ) ppm: -0.07(3H, s), -0.05(3H, s), 0.77(9H, s), 0.84(3H, d, J=6.5Hz), 1.18(3H, d, J=6.5Hz), 1.40(3H, t, J=7.2Hz), 2.35-2.50(1H, m), 3.85-3.95(1H, m), 3.98-4.10(2H, m), 4.30-4.40(2H, m), 7.26(1H, s), 8.64(1H, s), 8.94(1H, d, J=7.2Hz)

MS(ESI): M⁺ 562

Step 5

(Preparation of a solution of 3-chloro-2-fluorobenzylzinc

bromide in tetrahydrofuran)

Under an argon stream, zinc powder (11 g, 175 mmol) was suspended in tetrahydrofuran (30 ml), 1,2-dibromoethane (0.1 ml, 1.20 mmol) and trimethylsilyl chloride (0.29 ml, 2.4 mmol) were added at 60°C, and the mixture was stirred with heating for 30 min. A solution of 3-chloro-2-fluorobenzyl bromide (27 g, 119 mmol) in tetrahydrofuran (60 ml) was added dropwise at 60°C. The mixture was stirred with heating for 1 hr and allowed to cool to room temperature to give a solution of 1M 3-chloro-2-fluorobenzylzinc bromide in tetrahydrofuran. This was used in the next main step.

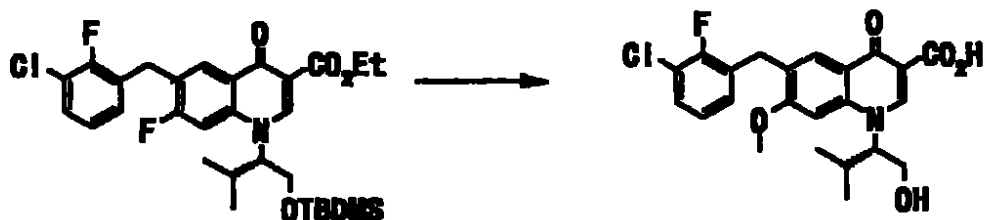
(Main step)

The compound (50 g, 89 mmol) obtained in Step 4 was dissolved in tetrahydrofuran (400 ml) and, under an argon stream, dichlorobis(triphenylphosphine)palladium(II) (2.1 g, 3.6 mmol) was added and a solution of the above-mentioned 1M 3-chloro-2-fluorobenzylzinc bromide in tetrahydrofuran was added dropwise at 60°C. After the completion of the dropwise addition, the mixture was stirred with heating at the same temperature for 1.5 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, 1N hydrochloric acid was added and the mixture was extracted 3 times with ethyl acetate. The organic layer was washed successively with water and saturated brine, and dried over magnesium sulfate. The organic layer was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure, and the obtained residue was purified by silica gel chromatography (ethyl acetate:hexane=1:2 to 1:1) to give 1-((S)-1-tart-butyltrimethylsilyloxymethyl-2-methylpropyl)-6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (43 g, yield 83%) as a brown amorphous f rm.

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) (δ) ppm: -0.09(3H, s), -0.05(3H, s), 0.75(9H, s), 0.85(3H,d, J=6.7Hz), 1.18(3H, d, 6.7Hz), 1.39(3H, t, J=7.1Hz), 2.45(1H, br), 3.89-3.92(1H, m), 3.98-4.02(1H, m), 4.07-4.12(1H, m), 4.12(2H, s), 4.34-4.41(2H, m), 6.96-7.00(1H,

m), 7.03–7.05 (1H, m), 7.21–7.24 (1H, m), 7.26–7.29 (1H, m), 8.39 (1H, d, J=8.8Hz), 8.63 (1H, s)

Step 6



5 The compound (43 g, 74 mmol) obtained in Step 5 was dissolved in methanol (280 ml), 28% sodium methoxide methanol solution (151 ml, 742 mmol) and water (4.3 ml) were added, and the mixture was heated under reflux for 20 hr. The reaction mixture was filtered through celite. The filtrate was
 10 concentrated under reduced pressure. Water (400 ml) was added to the residue, and the mixture was washed with hexane (100 ml). The aqueous layer was acidified by adding concentrated hydrochloric acid (65 ml), and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed successively with
 15 water and saturated brine, and dried over sodium sulfate. The solution was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The obtained crude product (35 g, brown oil) was dissolved in ethyl acetate (49 ml) by heating under reflux, hexane (30 ml) was added while allowing to cool, and the mixture
 20 was stirred for 18.5 hr. The precipitated solid was collected by filtration, washed with a mixed solvent of ethyl acetate and hexane (1:1), and vacuum dried to give a crystal of compound A (crystal form II) (27 g, yield 82%) as a white solid.

m.p. 153.7–153.9°C

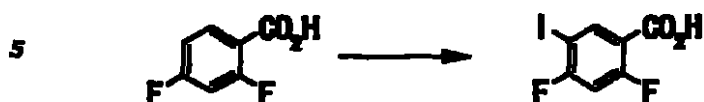
25 ¹H NMR (DMSO-d₆ 300MHz) (δ) ppm: 0.72 (3H, d, J=6.5Hz), 1.16 (3H, d, J=6.5Hz), 2.30–2.50 (1H, m), 3.70–3.90 (1H, m), 3.90–4.00 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.12 (2H, s), 4.80–4.90 (1H, m), 5.19 (1H, t), 7.19–7.25 (2H, m), 7.46–7.51 (2H, m), 8.04 (1H, s), 8.88 (1H, s), 15.44 (1H, s)

MS (ESI) : M+ 448

Example 2: Production of crystal form II of the compound A

Example 2-1: Production of crystal form II of the compound A

Step 1



2,4-Difluorobenzoic acid (100 g, 633 mmol) was dissolved in concentrated sulfuric acid (400 ml), and N-iodosuccinimide (142 g, 601 mol) was added by portions at not more than 5°C. After the completion of the addition, the mixture was stirred at the same temperature for 6 hr. The reaction mixture was poured into ice water (ca. 2400 ml), then saturated aqueous sodium sulfite solution was added, and the mixture was stirred. The precipitated solid was collected by filtration, washed with water, and vacuum dried to give crude crystals (188 g). The crude crystals obtained in the same manner were combined (total amount 568 g), and recrystallized from 50% aqueous ethanol (2600 ml) to give 2,4-difluoro-5-iodobenzoic acid (388 g, yield 68%) as a white solid.

¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) (σ) ppm: 6.94(1H, dd, J=10.3, 10.3Hz), 8.46(1H, d, J=7.5Hz)

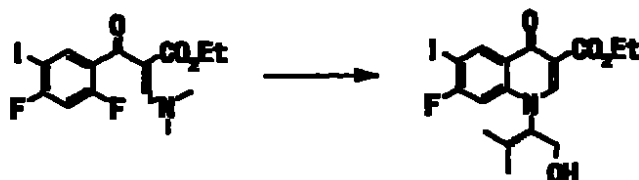
Step 2



The compound (200 g, 704 mmol) obtained in Step 1 was dissolved in toluene (1000 ml), thionyl chloride (103 ml, 408 mmol) and dimethylformamide (catalytic amount) were added, and the mixture was heated under reflux for 2 hr. The insoluble material was filtered off, and the filtrate was concentrated under reduced pressure and azeotroped with toluene. The residue

was dissolved in tetrahydrofuran (500 ml), this solution was added dropwise to a solution of ethyl 3,3-dimethylaminoacrylate (111 g, 775 mmol) and triethylamine (118 ml, 845 mmol) in tetrahydrofuran (500 ml), and the mixture was heated under
5 reflux for 3 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. Water (500 ml) and ethyl acetate (800 ml) were added to allow partitioning. The organic layer was washed successively with saturated aqueous sodium hydrogen
10 carbonate (200 ml), water (200 ml) and saturated brine, and dried over sodium sulfate. The organic layer was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a crude product (273 g) of 2-(2,4-difluoro-5-iodobenzoyl)-3-dimethylaminoacrylic acid ethyl ester as a brown solid.

15 Step 3



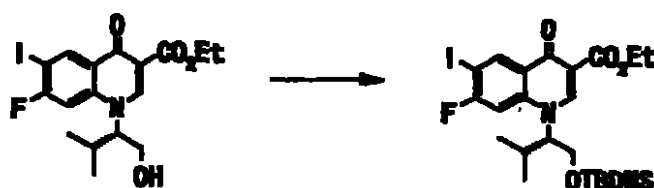
The crude product (273 g) obtained in Step 2 was dissolved in tetrahydrofuran (650 ml), (S)-(+)-valinol (73 g, 708 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 2
20 hr. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was dissolved in dimethylformamide (800 ml). Potassium carbonate (195 g 1.41 mol) was added, and the mixture was stirred with heating at 70°C for 2.5 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, added
25 to water (2000 ml) and the mixture was stirred. The precipitated solid was collected by filtration. The obtained solid was subject to slurry washing successively with water and 30% aqueous ethanol (650 ml) and vacuum dried to give a crude product (217 g). The obtained crude product (217 g) was subject
30 to slurry washing with a mixed solvent of ethyl acetate (650 ml)

and hexane (440 ml) with heating under reflux. The mixture was filtered, and the remaining solid was vacuum dried to give 7-fluoro-1-((S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl)-6-iodo-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (207 g, yield 66% (relative to Step 2)) as a pale-brown solid.

¹H NMR (DMSO-d₆, 300MHz) (δ) ppm: 0.72 (3H, d, J=6.6Hz), 1.10 (3H, d, J=6.6Hz), 1.28 (3H, t, J=7.0Hz), 2.27 (1H, br), 3.77 (1H, br), 3.86 (1H, br), 4.23 (2H, q, J=7.0Hz), 4.56 (1H, br), 5.12 (1H, t, J=4.9Hz), 8.09 (1H, d, J=11.1Hz), 8.62 (1H, d, J=7.5Hz), 8.68 (1H, s)

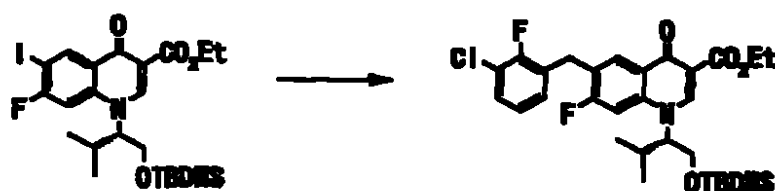
MS (ESI): M+ 448

Step 4



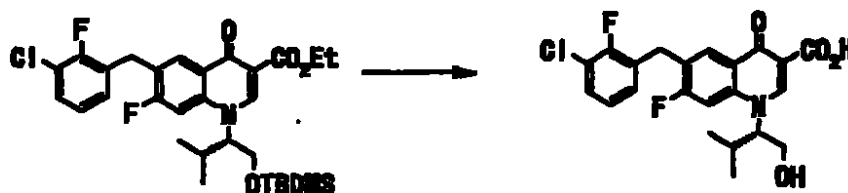
The compound (150 g, 335 mmol) obtained in Step 3 was dissolved in dimethylformamide (450 ml), imidazole (27 g, 397 mmol) and tert-butyldimethylsilyl chloride (58 g, 385 mmol) were added, and the mixture was stirred overnight at room temperature. Water (900 ml) was added to the reaction mixture, and the mixture was extracted with ethyl acetate (680 ml). The organic layer was washed successively with water (450 ml, 3 times) and saturated brine (200 ml), and dried over sodium sulfate. The organic layer was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a crude product (192 g) of 1-((S)-1-tert-butyldimethylsilyloxymethyl-2-methylpropyl)-7-fluoro-6-iodo-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester as a pale-yellow amorphous form.

Step 5



The crude product (162 g) obtained in Step 4 was dissolved in tetrahydrofuran (160 ml) and, under an argon stream, dibenzylidenacetone palladium(II) (1.7 g, 2.9 mmol) and trifurylphosphine (1.3 g, 5.8 mmol) were added. To this mixture was added dropwise at 60°C a solution of (375 ml, 375 mmol) of 1M 3-chloro-2-fluorobenzylzinc bromide in tetrahydrofuran obtained in the same manner as in Example 1, Step 5 and, after the completion of the dropwise addition, the mixture was stirred with heating at the same temperature for 3.5 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, ethyl acetate (640 ml) and 10% aqueous citric acid solution (400 ml) were added, and the mixture was filtered through Celite, and the filtrate was partitioned. The organic layer was washed successively with water (200 ml), saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (400 ml) and saturated brine (200 ml), and dried over sodium sulfate. The organic layer was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a crude product (186 g) of 1-((S)-1-tert-butylidimethylsilyloxymethyl-2-methylpropyl)-6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester as a brown oil.

Step 6



The crude product (193 g) obtained in Step 5 was dissolved in isopropanol (650 ml), 1N aqueous sodium hydroxide solution

(1290 ml, 1.29 mol) was added, and the mixture was heated under reflux for 2 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, and filtered through Celite. The filtrate was acidified by adding concentrated hydrochloric acid and the mixture was stirred. The precipitated solid was collected by filtration, and vacuum dried to give a crude product (132 g) as a pale-yellow solid. The crude products obtained in the same manner were combined (total amount 143 g), suspended in butyl acetate (430 ml) and subject to slurry stirring with heating under reflux for 1 hr. The suspension was allowed to cool to room temperature and filtered and vacuum dried to give 6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-7-fluoro-1-((S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid (99 g, yield 74% (relative to Step 3)) as a gray solid.

¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz) (δ) ppm: 0.71 (3H, d, J=6.5Hz), 1.13 (3H, d, J=6.5Hz), 2.36 (1H, br), 3.77(1H, br), 3.94 (1H, br), 4.25 (2H, s), 4.77(1H, br), 5.16 (1H, t, J=2.4Hz), 7.19-7.23(1H, m), 7.32-7.35 (1H, m), 7.48-7.52(1H, m), 8.24-8.28 (2H, m), 9.00 (1H, s), 15.00 (1H, s)

MS(ESI): M+ 436

Step 7



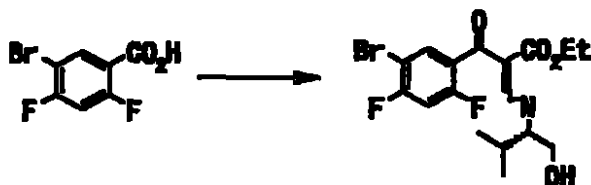
The compound (99 g, 227 mmol) obtained in Step 6 was dissolved in methanol (530 ml), 28% sodium methoxide methanol solution (465 ml, 2.28 mol) was added, and the mixture was heated under reflux for 20 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and filtered through Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was acidified by adding water (200 ml) and concentrated

hydrochloric acid (190 ml), and extracted with ethyl acetate (500 ml). The organic layer was washed twice with water (200 ml), and dried over sodium sulfate. The mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a crude product (108 g). The obtained crude product (108 g) was dissolved in isobutyl acetate (330 ml) with heating and the mixture was stirred while allowing to cool for 24 hr. The precipitated solid was collected by filtration, and vacuum dried to give compound A (71 g, yield 69%) as a white solid. The crude crystals obtained in the same manner were combined (total amount 233 g), dissolved in isobutyl acetate (470 ml) by heating under reflux, and the mixture was stirred overnight while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration, and vacuum dried to give a crystal of compound A (crystal form II) (206 g, yield 88%) as a white solid.

¹H NMR (DMSO-d₆, 300MHz) (δ) ppm: 0.72 (3H, d, J=6.5Hz), 1.16 (3H, d, J=6.5Hz), 2.30-2.50 (1H, m), 3.70-3.90 (1H, m), 3.90-4.00 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.12 (2H, s), 4.80-4.90 (1H, m), 5.19 (1H, t), 7.19-7.25 (2H, m), 7.46-7.51 (2H, m), 8.04 (1H, s), 8.88 (1H, s), 15.44 (1H, s)

MS (ESI) : M+ 448

Example 2-2: Production of crystal form II of the compound A
Step 1



5-Bromo-2,4-difluorobenzoic acid (82.7 kg, 349 mol) was dissolved in toluene (420 L), thionyl chloride (62.3 kg, 523 mol) and dimethylformamide (catalytic amount) were added, and the mixture was stirred at 70°C for 6 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, concentrated under reduced pressure, and azeotroped again with toluene (420 L).

The residue was dissolved in toluene (220 L), this solution was added dropwise to a solution of ethyl 3,3-dimethylaminoacrylate (55.0 kg, 384 mol) and diisopropylethylamine (58.6 kg, 523 mol) in toluene (220 L), and the mixture was stirred with heating at 70°C for 21 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, (S)-(+)-valinol (36.0 kg, 349 mol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 1.5 hr. Water (420 L) was added to the reaction mixture to allow partitioning, and the organic layer was washed successively with 1N hydrochloric acid (250 L, twice), water (420 L), 5% aqueous sodium hydrogen carbonate (250 L, twice), water (420 L) and 10% brine (250 L). The extract was concentrated under reduced pressure and azeotroped with dimethylformamide (420 L) to give a concentration residue (330 L) containing a crude product of 2-(5-bromo-2,4-difluorobenzoyl)-3-((S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropylmethylamino)acrylic acid ethyl ester.

Step 2



To a solution (330 L) of the crude product obtained in Step 1 in dimethylformamide was added 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undecane (105 kg, 349 mol) and the mixture was stirred at room temperature for 23 hr. To the reaction mixture were added dimethylformamide (330 L), and then water (170 L) and, after stirring for 2 hr, water (170 L) was added dropwise. The precipitated solid was collected by filtration and washed with dimethylformamide (170 L)-water (170 L) mixture, and then with ethanol (460 L)-water (200 L) mixed solution. The obtained solid was vacuum dried, suspended in an ethyl acetate (330 L) - n-heptane (330 L) mixture and subject to slurry washing. The suspension was filtered, and the remaining solid

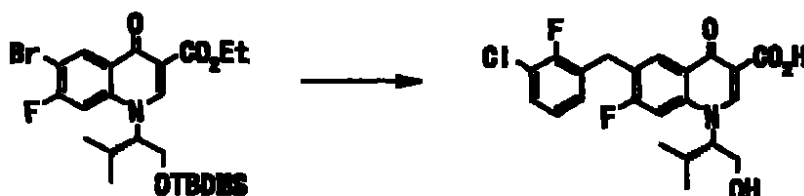
was vacuum dried to give 6-bromo-7-fluoro-1-((S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (102 kg, yield 73%) as a yellow white solid. This compound was confirmed to be equivalent to the standard product of the compound by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

Step 3



The compound (45.0 kg, 112 mol) obtained in Step 2 and imidazole (9.95 kg, 146 mol) were suspended in toluene (180 L), a solution of tert-butyldimethylsilyl chloride (17.8 kg, 118 mol) in toluene (45 L) was added at 50°C, and the mixture was stirred at the same temperature for 3 hr. Toluene (230 L) was added to the reaction mixture, and washed successively with water (450 L, twice) and 20% brine (450 L). The extract was concentrated under reduced pressure and azeotroped with tetrahydrofuran (320 L) to give a concentration residue (390 L) containing a crude product of 6-bromo-1-((S)-1-tert-butyldimethylsilyloxymethyl-2-methylpropyl)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.

Step 4



(Preparation of a solution of 3-chloro-2-fluorobenzylzinc bromide in tetrahydrofuran)

Under a nitrogen stream, zinc powder (18.8 kg, 287 mol) was suspended in tetrahydrofuran (130 L), 1,2-dibromoethane (470

g, 2.50 mol) was added at 60°C, and the mixture was stirred at the same temperature for 30 min. Trimethylsilyl chloride (560 g, 3.10 mol) was added to this suspension at room temperature, and the mixture was stirred with heating for 30 min. A solution of 3-chloro-2-fluorobenzyl bromide (54.0 kg, 242 mol) in tetrahydrofuran (65 L) was added dropwise at 0°C, and the mixture was stirred at 20°C for 3 hr. The remaining zinc was filtered off to give a solution of 1M 3-chloro-2-fluorobenzylzinc bromide in tetrahydrofuran. This was used in the next main step.

10 (Main step)

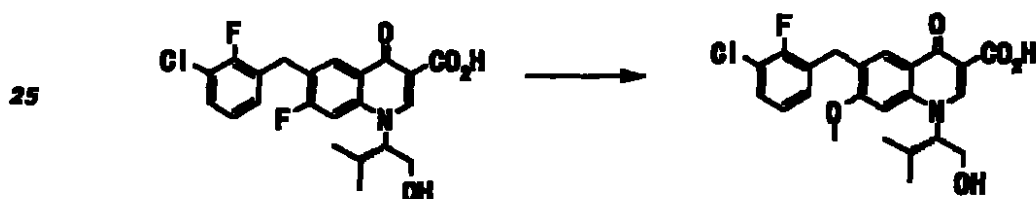
Under a nitrogen stream, tris(dibenzylidenacetone)dipalladium(0) (1.96 kg, 3.36 mol) and triphenylphosphine (1.77 kg, 6.72 mol) were dissolved in tetrahydrofuran (180 L), and the mixture was stirred at room temperature for 1 hr. A solution (390 L) of the crude product obtained in Step 3 in tetrahydrofuran was added dropwise at room temperature and washed with tetrahydrofuran (45 L). A solution (164 kg, 157 mol) of the above-mentioned 1M 3-chloro-2-fluorobenzylzinc bromide in tetrahydrofuran prepared in advance was added dropwise at room temperature, and the mixture was stirred with heating at 55°C for 5 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, toluene (230 L) and 25% aqueous ammonium chloride solution (230 L) were added and the mixture was stirred. After filtration, the mixture was partitioned. The organic layer was washed successively with 25% aqueous ammonium chloride solution (230 L), water (230 L), 5% aqueous sodium hydrogen carbonate (230 L, 3 times) and 10% brine (230 L). The extract was concentrated under reduced pressure to give a crude product (80 L) of 6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-7-fluoro-1-((8)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid as a brown oil.

25 Step 5

The crude product (80 L) obtained in Step 4 was dissolved in isopropanol (180 L), 1N aqueous sodium hydroxide solution

(180 L, 180 mol) was added, and the mixture was stirred with heating at 50°C for 9 hr. Activated carbon (4.5 kg) was added to the reaction mixture. The mixture was stirred at room temperature for 30 min, filtered through cellulose powder and thoroughly washed with an isopropanol (45 L) - water (45 L) mixture. Water (180 L) and n-heptane (230 L) were added to the filtrate and, after stirring, the mixture was partitioned. The aqueous layer was washed again with n-heptane (230 L). 4N Hydrochloric acid (45 L, 180 mol) and methyl isopropyl ketone (450 L) were added to the organic layer and, after stirring, the mixture was partitioned. The organic layer was washed successively with 10% brine (230 L), twice with 8.5% aqueous sodium hydrogen carbonate (230 L), 0.5N hydrochloric acid (230 L) and water (230 L). The extract was concentrated under reduced pressure, azeotroped 3 times with toluene (230 L). The residue was stirred at 100°C for 1.5 hr, allowed to cool to room temperature and stirred for 3 hr. The precipitated solid was collected by filtration and the obtained solid was washed with toluene (45 L) and vacuum dried to give 6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-7-fluoro-1-[(S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid (42.5 kg, yield 87%) as a pale-yellow solid. This compound was confirmed to be equivalent to the standard product by HPLC analysis.

Step 6



The compound (39.2 kg, 89.9 mol) obtained in Step 5 was dissolved in methanol (240 L), 28% sodium methoxide methanol solution (173 kg, 899 mol) was added dropwise at 10°C, and the mixture was stirred with heating at 70°C for 21 hr. Activated carbon (3.9 kg) was added to the reaction mixture. The mixture

was stirred at room temperature for 1 hr, filtered through cellulose powder and thoroughly washed with methanol (80 L). Water (29 kg, 1620 mol) was added to the filtrate and the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue
 5 was azeotroped twice with isopropanol (240 L, 120 L). To the residue were added 15% brine (200 L) and toluene (200 L) and, after stirring, the mixture was partitioned. The organic layer was washed successively with 20% brine (200 L, 3 times), 0.5N hydrochloric acid (200 L) containing sodium chloride (10 kg) and
 10 20% brine (200 L). The organic layer was concentrated under reduced pressure and azeotroped with ethyl acetate (200 L). Ethyl acetate (320 L) and water (200 L) were added to the residue and, after stirring, the mixture was partitioned. The organic layer was concentrated under reduced pressure and
 15 azeotroped twice with isobutyl acetate (200 L). The residue was dissolved by heating filtered while it was hot, and thoroughly washed with isobutyl acetate (20 L). A seed crystal (crystal form II of compound A, 39 g) was added to the filtrate at 60°C, and the mixture was stirred at the same temperature for 1.5 hr.
 20 The mixture was stirred with heating at 80°C for 2 hr, allowed to cool to room temperature and further stirred for 6 hr. The precipitated solid was collected by filtration. The obtained solid was washed with isobutyl acetate (40 L) and vacuum dried to give a crystal of compound A (crystal form II) (29.0 kg,
 25 yield 72%) as a white solid. This crystal was confirmed to be equivalent to the standard product of the crystal (crystal form II of compound A obtained in Example 2-1) by HPLC and X ray powder diffraction (XRPD) analysis.

Example 2-3: Production of crystal form II of the compound A

30 The crystal form II can be also produced by crystallization according to the methods described in Examples 2-3-1 to 2-3-26.

Example 2-3-1

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was

dissolved in 1-butanol (2 ml) with heating under reflux. The mixture was stirred for 17 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (125 mg, yield 63%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-2

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in butyl acetate (2 ml) with heating under reflux. The mixture was stirred for 17 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (102 mg, yield 51%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-3

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in methyl isobutyl ketone (2 ml) with heating under reflux. Heptane (2 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 6 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (168 mg, yield 84%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-4

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in ethanol (2 ml) with heating under reflux. The mixture was stirred for 17 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (56 mg, yield 28%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-5

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in ethyl acetate (2 ml) with heating under reflux. Heptane (1.6 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 6 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (166 mg, yield 83%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-6

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in methyl ethyl ketone (2 ml) with heating under reflux. Heptane (4 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 6 hr while allowing to cool. The precipitated solid
5 was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (123 mg, yield 62%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-7

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in 1-propanol (2 ml) with heating under reflux. The
10 mixture was stirred for 17 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (91 mg, yield 46%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-8

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in isopropanol (2 ml) with heating under reflux. The
15 mixture was stirred for 17 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (88 mg, yield 44%) of compound A as a
20 white solid.

Example 2-3-9

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in cumene (2 ml) with heating under reflux. The
mixture was stirred for 17 hr while allowing to cool. The
25 precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (188 mg, yield 94%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-10

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was
30 dissolved in anisole (2 ml) with heating under reflux. The mixture was stirred for 17 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (107 mg, yield 54%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-11

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in acetone (2 ml) with heating under reflux. Heptane (2 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 16.5 hr while allowing to cool. Heptane (4 ml) was further added, and the mixture was further stirred for 24 hr. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (134 mg, yield 67%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-12

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in ethanol (2 ml) with heating under reflux. Heptane (4 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 19 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (129 mg, yield 65%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-13

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in isopropanol (2 ml) with heating under reflux. Heptane (4 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 19 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (166 mg, yield 83%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-14

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in 1-propanol (2 ml) with heating under reflux. Heptane (4 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 19 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (158 mg, yield 79%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-15

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in isobutanol (2 ml) with heating under reflux. The mixture was stirred for 21 hr while allowing to cool. The

precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (131 mg, yield 66%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-16

5 The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in toluene (2 ml) with heating at 100°C. The mixture was stirred for 37 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (190 mg, yield 95%) of compound A as a white
10 solid.

Example 2-3-17

 The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in methyl butyl ketone (2 ml) with heating at 60°C. Heptane (1.8 ml) was added dropwise and the mixture was stirred
15 for 37 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (191 mg, yield 96%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-18

 The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was
20 dissolved in chloroform (1 ml) with heating at 60°C. Isopropyl ether (1.8 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 37 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (184 mg, yield 92%) of compound A as a white solid.

25 Example 2-3-19

 The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in tetrahydrofuran (1 ml) by heating at 60°C. Isopropyl ether (2 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 41 hr while allowing to cool. The precipitated
30 solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (144 mg, yield 72%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-20

 The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was

dissolved in isobutanol (2 ml) with heating under reflux.

Heptane (2 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 21 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (160 mg, yield 80%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-21

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in butanol (2 ml) with heating under reflux. Heptane (2 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 21 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (152 mg, yield 76%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-22

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in isobutyl acetate (2 ml) with heating under reflux. The mixture was stirred for 21 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (140 mg, yield 70%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-23

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in isobutyl acetate (2 ml) with heating under reflux. Heptane (2 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 21 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (178 mg, yield 89%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-24

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in butyl acetate (2 ml) with heating under reflux. Heptane (1.5 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 21 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (158 mg, yield 78%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-25

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in anisole (2 ml) by heating at 110°C. Heptane (2 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 21 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by
5 filtration and vacuum dried to give crystal form II (187 mg, yield 89%) of compound A as a white solid.

Example 2-3-26

The compound A (200 mg) obtained in Example 1 was dissolved in butyl acetate (2 ml) with heating under reflux.
10 After rapid cooling, the mixture was stirred for 2 hr. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (131 mg, yield 66%) of compound A as a white solid.

Example 2-4: Production of crystal form II of the compound A

15 Step 1

1-((S)-1-tert-butyldimethylsilyloxymethyl-2-methylpropyl)-6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (48 g, 86 mmol) obtained in
20 Example 1, Step 5 was dissolved in methanol (300 ml), water (5 ml) and 28% sodium methoxide methanol solution (176 ml, 862 mmol) were added, and the mixture was heated under reflux for 24 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, neutralized with 6N hydrochloric acid and methanol was evaporated under reduced pressure. Water was added to the
25 obtained solution and, after stirring, the precipitated solid was collected by filtration. The obtained solid was dissolved in ethyl acetate, washed with water, and dried over sodium sulfate. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The obtained residue was
30 recrystallized from ethyl acetate-hexane to give compound A (primary crystal 29.5 g, secondary crystal 2.8 g, in total 32.3 g, yield 86%) as a white solid.

m.p. 151-152°C

¹H NMR (DMSO-d₆, 300MHz) (δ) ppm: 0.72 (3H, d, J=6.5Hz), 1.16 (3H,

d, $J=6.5\text{Hz}$), 2.30–2.50 (1H, m), 3.70–3.90 (1H, m), 3.90–4.00 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.12 (2H, s), 4.80–4.90 (1H, m), 5.19 (1H, t), 7.19–7.25 (2H, m), 7.46–7.51 (2H, m), 8.04 (1H, s), 8.88 (1H, s), 15.44 (1H, s)

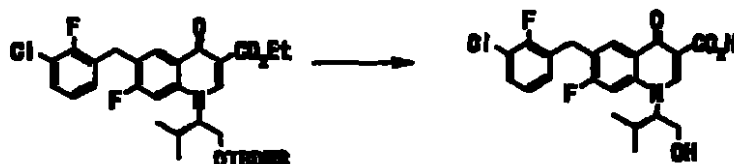
5 MS (ESI) : M^+ 448

Step 2

Compound A (32.3 g) obtained in Step 1 was dissolved in butyl acetate (160 ml) with heating under reflux. The crystal form II of Example 2 was seeded at 63°C and the mixture was stirred for 3 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give the crystal of compound A (crystal form II) (24.79 g, yield 77%) as a white solid.

Example 2-5: Production of crystal form II of the compound A

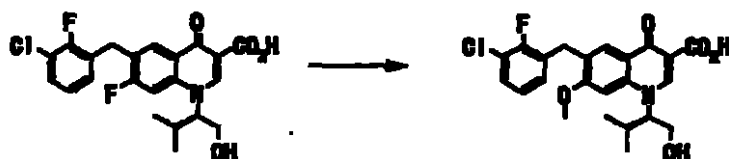
15 Step 1



1-((S)-1-tert-butyldimethylsilyloxymethyl-2-methylpropyl)-6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (19 g, 33 mmol) obtained in Example 1, Step 5 was dissolved in isopropanol (100 ml), 1N aqueous sodium hydroxide solution (200 ml, 200 mmol) was added, and the mixture was heated under reflux for 2.5 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, and the mixture was filtered through Celite. The filtrate was acidified by adding concentrated hydrochloric acid, and stirred at room temperature for 2 hr. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give 1-((S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl)-6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid (12 g, yield 82%) as a pale-yellow solid.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) (δ) ppm: 0.71 (3H, d, J=6.5Hz), 1.13 (3H, d, J=6.5Hz), 2.36 (1H, br), 3.77 (1H, br), 3.94 (1H, br), 4.25 (2H, s), 4.77 (1H, br), 5.16 (1H, t, J=2.4Hz), 7.19–7.23 (1H, m), 7.32–7.35 (1H, m), 7.48–7.52 (1H, m), 8.24–8.28 (2H, m), 9.00 (1H, s),
 15.00 (1H, s)

Step 2



The compound (12 g, 27 mmol) obtained in Step 1 was
 dissolved in methanol (64 ml), 28% sodium methoxide methanol
 solution (52 ml, 256 mmol) was added, and the mixture was heated
 under reflux for 24 hr. The reaction mixture was allowed to
 cool to room temperature and filtered through Celite. The
 filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue
 was acidified by adding water (360 ml) and concentrated
 hydrochloric acid, and extracted with ethyl acetate. The
 organic layer was washed successively with water and saturated
 brine and dried over sodium sulfate. The mixture was filtered,
 and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give
 a crude product (13 g) as a brown oil. The obtained crude
 product (13 g) was dissolved in isobutyl acetate (60 ml) by
 heating and, after seeding, the mixture was stirred for 23 hr
 while allowing to cool. The precipitated solid was collected by
 filtration, and vacuum dried to give compound A (9.2 g, yield
 75%) as a white solid.

¹H NMR (DMSO-d₆, 300MHz) (δ) ppm: 0.72 (3H, d, J=6.5Hz), 1.16 (3H, d, J=6.5Hz), 2.30–2.50 (1H, m), 3.70–3.90 (1H, m), 3.90–4.00 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.12 (2H, s), 4.80–4.90 (1H, m), 5.19 (1H, t), 7.19–7.25 (2H, m), 7.46–7.51 (2H, m), 8.04 (1H, s), 8.88 (1H, s),
 15.44 (1H, s)

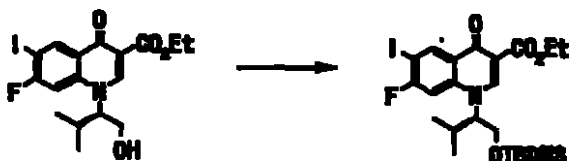
MS (ESI): M⁺ 448

Step 3

2-(2,4-Difluoro-5-iodobenzoyl)-3-dimethylaminoacrylic acid ethyl ester (20 g) obtained in Example 1, Step 2 was subject to
 5 slurry washing with a mixed solvent of ethyl acetate (60 ml) and hexane (40 ml) and heated under reflux. The mixture was filtered, and the remaining solid was vacuum dried to give 7-fluoro-1-((S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl)-6-iodo-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (18 g, yield 94%)
 10 as a beige solid.

¹H NMR(DMSO-d₆, 300MHz) (δ) ppm: 0.72 (3H, d, J=6.6Hz), 1.10 (3H, d, J=6.6Hz), 1.28 (3H, t, J=7.0Hz), 2.27 (1H, br), 3.77 (1H, br), 3.86 (1H, br), 4.23 (2H, q, J=7.0Hz), 4.56 (1H, br), 5.12 (1H, t, J=4.9Hz), 8.09 (1H, d, J=11.1Hz), 8.62 (1H, d, J=7.5Hz), 8.68
 15 (1H, s)

MS(ESI): M+ 448

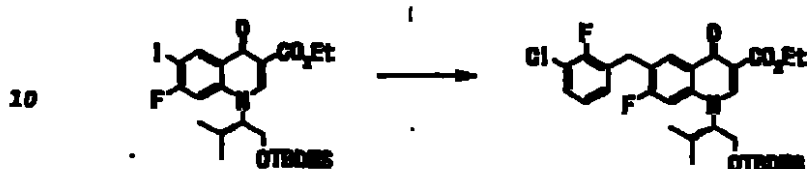
Step 4

The compound (19 g, 42 mmol) obtained in Step 3 was
 20 dissolved in dimethylformamide (65 ml), imidazole (3.4 g, 49.9 mmol) and tert-butyldimethylsilyl chloride (7.2 g, 47.8 mmol) were added, and the mixture was stirred at room temperature for 1.5 hr. Water was added to the reaction mixture, and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was
 25 washed successively with water, saturated aqueous ammonium chloride solution and saturated brine, and dried over sodium sulfate. The organic layer was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a crude product (24

g) of 1-((S)-1-tert-butyldimethylsilyloxymethyl-2-methylpropyl)-7-fluoro-6-iodo-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester as a beige amorphous form.

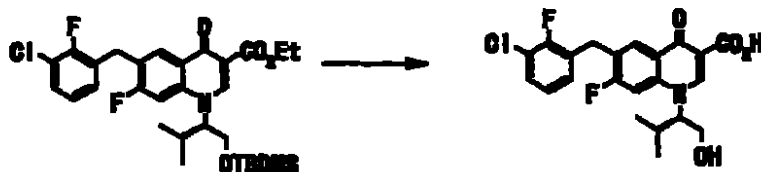
¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) (δ) ppm: -0.07(3H, s), -0.05(3H, s), 0.77(9H, s), 0.84(3H, d, J=6.5Hz), 1.18(3H, d, J=6.5Hz), 1.40(3H, t, J=7.2Hz), 2.35-2.50(1H, m), 3.85-3.95(1H, m), 3.98-4.10(2H, m), 4.30-4.40(2H, m), 7.26(1H, s), 8.64(1H, s), 8.94(1H, d, J=7.2Hz)
MS(ESI): M+ 562

Step 5



The crude product (24 g) obtained in Step 4 was dissolved in tetrahydrofuran (200 ml) and, under an argon stream, dibenzylideneacetonepalladium(II) (984 mg, 1.7 mmol) and trifurylphosphine (795 mg, 3.4 mmol) were added, and a solution
15 (56 ml, 56 mmol) of 1M 3-chloro-2-fluorobenzylzinc bromide obtained in the same manner as in Example 1, Step 5 in tetrahydrofuran was added dropwise at 60°C. After the completion of the dropwise addition, the mixture was stirred with heating at the same temperature for 2 hr. The reaction mixture was
20 allowed to cool to room temperature, saturated aqueous ammonium chloride solution was added, and filtered through Celite, and the filtrate was extracted twice with ethyl acetate. The organic layer was washed successively with water (twice) and saturated brine, and dried over magnesium sulfate. The organic
25 layer was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a crude product (30 g) of 1-((S)-1-tert-butyldimethylsilyloxymethyl-2-methylpropyl)-6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester as a brown paste.

30 Step 6

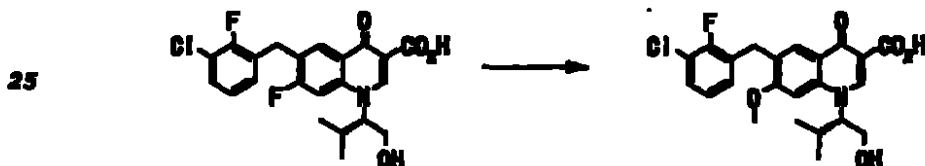


The crude product (30 g) obtained in Step 5 was dissolved in isopropanol (150 ml), 1N aqueous sodium hydroxide solution (300 ml, 300 mmol) was added, and the mixture was heated under reflux for 2.5 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, and the mixture was filtered through Celite. The filtrate was acidified by adding concentrated hydrochloric acid, and the mixture was stirred at room temperature for 2 hr. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give a crude product (18 g) as a beige solid. The obtained crude product (18 g) was suspended in butyl acetate (90 ml), and subjected to slurry stirring with heating under reflux for 1 hr. The suspension was allowed to cool to room temperature, filtered and vacuum dried to give 6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-7-fluoro-1-((S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid (11 g, yield 62% (relative to Step 3)) as a white solid.

^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) (δ) ppm: 0.71 (3H, d, $J=6.5\text{Hz}$), 1.13 (3H, d, $J=6.5\text{Hz}$), 2.36 (1H, br), 3.77 (1H, br), 3.94 (1H, br), 4.25 (2H, s), 4.77 (1H, br), 5.16 (1H, t, $J=2.4\text{Hz}$), 7.19-7.23 (1H, m), 7.32-7.35 (1H, m), 7.48-7.52 (1H, m), 8.24-8.28 (2H, m), 9.00 (1H, s), 15.00 (1H, s)

MS(ESI): M^+ 436

Step 7



The compound (11 g, 26 mmol) obtained in Step 6 was dissolved in methanol (60 ml), 28% sodium methoxide methanol

solution (52 ml, 256 mmol) was added, and the mixture was heated under reflux for 24 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and filtered through Celite, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue
5 was acidified by adding water (330 ml) and concentrated hydrochloric acid, and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed successively with water and saturated brine, and dried over sodium sulfate. The mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced
10 pressure to give a crude product (12 g) as a brown oil. The obtained crude product (12 g) was dissolved in isobutyl acetate (60 ml) by heating under reflux. A seed crystal (crystal form II of compound A) was seeded, and the mixture was stirred for 23 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected
15 by filtration and vacuum dried to give compound A (8.2 g, yield 71%) as a white solid.

¹H NMR (DMSO-d₆, 300MHz) (8) ppm: 0.72 (3H, d, J=6.5Hz), 1.16 (3H, d, J=6.5Hz), 2.30-2.50 (1H, m), 3.70-3.90 (1H, m), 3.90-4.00 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.12 (2H, s), 4.80-4.90 (1H, m), 5.19 (1H, t),
20 7.19-7.25 (2H, m), 7.46-7.51 (2H, m), 8.04 (1H, s), 8.88 (1H, s), 15.44 (1H, s)

MS (ESI) : M+ 448

Step 8

Compound A (7.66 g) obtained in Step 7 and compound A
25 (9.17 g) obtained in Step 2 were dissolved in isobutyl acetate (84 ml) by heating under reflux and the mixture was stirred for 16 hr while allowing to cool. The precipitated solid was collected by filtration and vacuum dried to give crystal form II (14.73 g, yield 88%) of compound A as a white solid.

30 Example 2-6: Production of crystal form II of the compound A

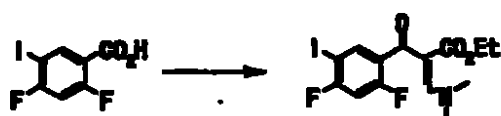
Step 1



2,4-Difluorobenzoic acid (100 g, 633 mmol) was dissolved in trifluoromethanesulfonic acid (400 ml) and N-iodosuccinimide (157 g, 696 mmol) was added by portions at not more than 5°C. After the completion of the addition, the mixture was stirred at 50°C for 1.5 hr. The reaction mixture was poured into iced water, and the mixture was stirred for 1 hr. The precipitated solid was collected by filtration, washed successively with water and hexane, and vacuum dried to give 2,4-difluoro-5-iodobenzoic acid (179 g yield quantitative) as a white solid.

¹H NMR(CDCl₃, 300MHz) (σ) ppm: 6.94(1H, dd, J=10.3, 10.3Hz), 8.46(1H, d, J=7.5Hz)

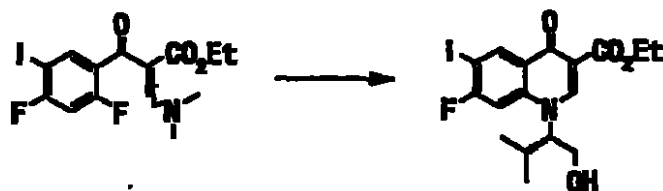
Step 2



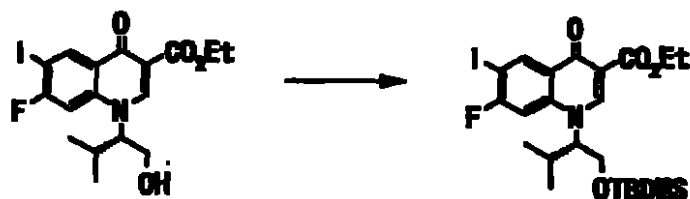
The compound (28 g, 100 mmol) obtained in Step 1 was dissolved in ethyl acetate (300 ml), oxalyl chloride (11 ml, 122 mmol) and dimethylformamide (catalytic amount) were added, and the mixture was stirred at room temperature for 2 hr. The filtrate was concentrated under reduced pressure and azeotroped with toluene. The residue was dissolved in tetrahydrofuran (100 ml), this solution was added dropwise to a solution of ethyl 3,3-dimethylaminoacrylate (17 g, 120 mmol) and triethylamine (21 ml, 150 mmol) in tetrahydrofuran (100 ml), and the mixture was heated under reflux for 3 hr. The reaction mixture was allowed to cool and ethyl acetate (200 ml) was added. The mixture was washed successively with water (twice) and saturated brine, and dried over sodium sulfate. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The obtained residue was subject to slurry stirring with a mixed solvent of diethyl ether (50 ml) and hexane (50 ml). The mixture was filtered and the remaining solid was vacuum dried to give a crude product (26 g, yield 63%) of 2-(2,4-difluoro-5-

iodobenzoyl)-3-dimethylaminoacrylic acid ethyl ester as a yellow solid.

Step 3

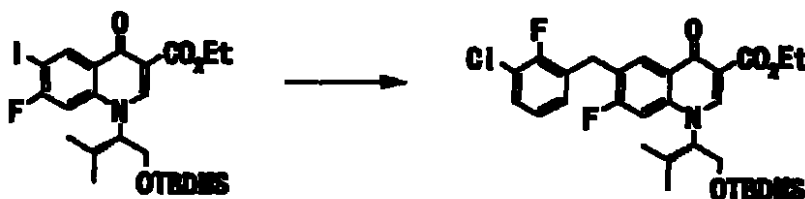


- 5 The crude product (22 g, 55 mmol) obtained in Step 2 was dissolved in tetrahydrofuran (110 ml), (S)-(+)-valinol (6.8 g, 65.8 mmol) was added, and the mixture was stirred with heating at 50°C for 30 min. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, and the residue was dissolved in ethyl acetate
- 10 (100 ml), washed successively with water and saturated brine, and dried over magnesium sulfate. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The obtained residue was dissolved in dimethylformamide (80 ml), potassium carbonate (19 g, 137 mmol) was added, and the mixture
- 15 was stirred with heating at 60°C for 1.5 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature and concentrated under reduced pressure. Water (250 ml) was added to the obtained residue and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The precipitated solid was collected by filtration.
- 20 The obtained solid was washed successively with a mixed solvent of water (100 ml), ethyl acetate (10 ml) and hexane (40 ml) and vacuum dried to give 7-fluoro-1-((S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl)-6-iodo-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (22 g, yield 88%) as a pale-yellow solid.
- 25 ¹H NMR(DMSO-d₆ 300MHz) (δ) ppm: 0.72 (3H, d, J=6.6Hz), 1.10 (3H, d, J=6.6Hz), 1.28 (3H, t, J=7.0Hz), 2.27 (1H, br), 3.77 (1H, br), 3.86 (1H, br), 4.23 (2H, q, J=7.0Hz), 4.56(1H, br), 5.12 (1H, t, J=4.9Hz), 8.09 (1H, d, J=11.1Hz), 8.62 (1H, d, J=7.5Hz), 8.68 (1H, s).
- 30 MS(ESI): M⁺ 448

Step 4

The compound (22 g, 48 mmol) obtained in Step 3 was
 5 dissolved in dimethylformamide (60 ml), imidazole (3.9 g, 57.7
 mmol) and tert-butyldimethylsilyl chloride (8.0 g, 53.0 mmol)
 were added, and the mixture was stirred at room temperature for
 1.5 hr. The reaction mixture was concentrated under reduced
 pressure, and the obtained residue was dissolved in ethyl
 10 acetate (200 ml), washed successively with water (twice) and
 saturated brine, and dried over sodium sulfate. The mixture was
 filtered and the filtrate was concentrated under reduced
 pressure. The obtained residue was purified by silica gel
 chromatography (ethyl acetate:hexane=3:7 to 4:6) to give 1-((S)-
 15 1-tert-butyldimethylsilyloxymethyl-2-methylpropyl)-7-fluoro-6-
 iodo-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester
 (25 g, yield 92%) as a white wax.

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) (δ) ppm: -0.07(3H, s), -0.05(3H, s), 0.77(9H,
 s), 0.84(3H, d, J=6.5Hz), 1.18(3H, d, J=6.5Hz), 1.40(3H, t,
 20 J=7.2Hz), 2.35-2.50(1H, m), 3.85-3.95(1H, m), 3.98-4.10(2H, m),
 4.30-4.40(2H, m), 7.26(1H, s), 8.64(1H, s), 8.94(1H, d, J=7.2Hz)
 MS(ESI): M⁺ 562

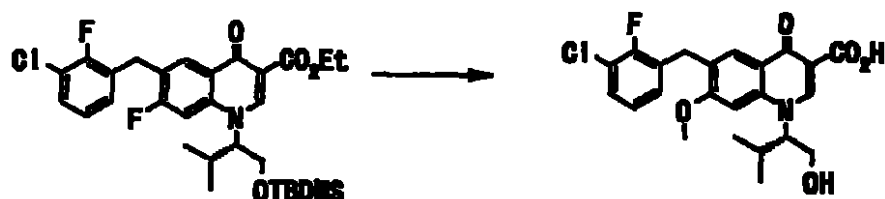
Step 5

25 The compound (25 g, 44 mmol) obtained in Step 4 was
 dissolved in tetrahydrofuran (200 ml) and, under an argon stream,

dibenzylidenacetonepalladium(II) (1.0 g, 1.8 mmol) and trifurylphosphine (824 mg, 3.5 mmol) were added. A solution (58 ml, 58 mmol) of 1M 3-chloro-2-fluorobenzylzinc bromide obtained in the same manner as in Example 1, Step 5 in tetrahydrofuran was added dropwise at 60°C. After the completion of the dropwise addition, the mixture was heated under reflux for 3 hr. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, ethyl acetate (200 ml) was added, washed successively with 1N hydrochloric acid, water, saturated aqueous sodium hydrogen carbonate, water and saturated brine, and dried over sodium sulfate. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The obtained residue was purified by silica gel chromatography (ethyl acetate:hexane=4:6 to 1:1) to give 1-((S)-1-tert-butyltrimethylsilyloxymethyl-2-methylpropyl)-6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (17 g, yield 68%) as a pale-yellow oil.

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) (δ) ppm: -0.09(3H, s), -0.05(3H, s), 0.75(9H, s), 0.85(3H,d, J=6.7Hz), 1.18(3H, d, 6.7Hz), 1.39(3H, t, J=7.1Hz), 2.45(1H, br), 3.89-3.92(1H, m), 3.98-4.02(1H, m), 4.07-4.12(1H, m), 4.12(2H, s), 4.34-4.41(2H, m), 6.96-7.00(1H, m), 7.03-7.05(1H, m), 7.21-7.24(1H, m), 7.26-7.29(1H, m), 8.39(1H, d, J=8.8Hz), 8.63(1H, s)

Step 6



The compound (17 g, 30 mmol) obtained in Step 5 was dissolved in methanol (120 ml), 28% sodium methoxide methanol solution (62 ml, 304 mmol) was added, and the mixture was heated under reflux for 19 hr. The reaction mixture was allowed to

cool to room temperature, water (200 ml) was added, and methanol was evaporated under reduced pressure. The residue was acidified by adding concentrated hydrochloric acid, extracted with ethyl acetate, and dried over sodium sulfate. The mixture
5 was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a crude product (14 g) of compound A as a pale-yellow oil.

Step 7

Compound A (14.11 g) obtained in Step 6 was suspended in a
10 mixed solvent of ethyl acetate (20 ml) and hexane (20 ml) at room temperature, a seed crystal (crystal form II of compound A) was seeded, and the mixture was stirred for 1 hr. The suspension was filtered, and the remaining solid was vacuum dried to give compound A (crystal form II, 10.40 g, yield 77%)
15 as a white solid.

Example 3: Production of crystal form III of the compound A

Example 3-1: Production of crystal form III of the compound A

The crystal form II of compound A (10.0 g, 22.3 mmol) obtained in Example 2-2 was added to isobutyl acetate (30 mL)
20 and the crystal was dissolved by heating under reflux. The solution was cooled to 90°C, and stirred for 5 hr to allow precipitation of crystals. This solution was further allowed to cool to room temperature, and further stirred for 12 hr. The precipitated crystal was collected by filtration. The obtained
25 crystal was washed with isobutyl acetate (10 mL) and vacuum dried to give a white crystal (9.85 g, yield 98.5%). Since this crystal was confirmed to be different from crystal form II by XRPD analysis, a crystal showing the XRPD chart (Fig. 1) as this crystal was taken as crystal form III.

30 Example 3-2: Production of crystal form III of the compound A

The crystal form II of compound A (250 g, 558 mmol) obtained in Example 2-2 was added to isobutyl acetate (750 mL). A seed crystal (12.5 g) of the crystal form III of compound A obtained in Example 3 was added at room temperature and the

mixture was stirred for 17 hr. The precipitated crystal was collected by filtration. The obtained crystal was washed with isobutyl acetate (250 mL), and vacuum dried to give the object product (crystal form III, 259 g, yield 98.6%) as a white
5 crystal. This crystal was confirmed to be equivalent to the standard product of the crystal (crystal form III of compound A obtained in Example 3-1) by XRPD analysis.

Example 3-3: Production of crystal form III of the compound A

Compound A (crystal form II, 10.0 g, 22.3 mmol) obtained
10 in Example 2-2 was added to isopropanol (30 mL), and the mixture was heated under reflux to dissolve the crystal. The solution was cooled to 70°C, a seed crystal (10 mg) of the crystal form III of compound A obtained in Example 3-1 was added, and the mixture was stirred for 5 hr. This mixture was further allowed
15 to cool to room temperature, stirred for 12 hr, and the crystal was collected by filtration. The obtained crystal was washed with isopropanol (10 mL), and vacuum dried to give the object product (crystal form III, 9.72 g, yield 97.2%) as a white crystal. This crystal was confirmed to be equivalent to the
20 standard product of the crystal (crystal form III of compound A obtained in Example 3-1) by XRPD analysis.

Example 3-4: Production of crystal form III of compound A

The crystal form II of compound A (7.00 g, 15.6 mmol)
obtained in Example 2-2 was added to a mixed solution of ethanol
25 (52.5 mL) and water (7 mL) and dissolved by heating. Water (28 mL) was added, a seed crystal (10 mg) of the object product was added at 70°C and the mixture was stirred for 4 hrs. After allowing to cool to room temperature, the mixture was ice-cooled and further stirred for 2 hrs, and the crystals were collected
30 by filtration. The obtained crystals were washed with a mixed solution of cool ethanol (8.4 mL) and water (5.6 mL) and vacuum dried to give the object product as white crystals (crystal form III, 6.77 g, yield 96.8%). This crystal was confirmed to be

equivalent to the standard product (Example 3-1) by XRPD analysis.

Experimental Example

5 The property values of each crystal form were determined by the following analysis tests, and the stability test of each crystal form was performed using them as indices.

Sample

10 Unless otherwise specified, the aforementioned crystal (crystal form I) obtained in Reference Example 1, the crystal (crystal form II) obtained in Example 1 and the crystal (crystal form III) obtained in Example 3-1 were used as samples.

Analysis test

1. X-ray powder diffractometry

15 This test aims at obtaining X-ray powder diffraction patterns to specify the crystal form of the crystals obtained in Reference Example 1, Example 1 and Example 3-1. The diffraction patterns are utilized to specify the crystal form, evaluate the stability, to determine the purity and the like.

20 A sample was fixed to an aluminum cell, and the measurement was performed using an X-ray powder diffractometer (RINT 2000/PC Ultima⁺, manufactured by Rigaku Corporation, X-ray source: Cu-K α 1 ray, tube voltage: 40 kV, tube electric current: 40 mA, scan speed: 5° per min, step width: 0.02°, diffraction
25 angle: 5-40°), based on which the diffraction patterns were obtained. The obtained diffraction patterns are shown in Fig. 1

As shown in Fig. 1, X-ray powder diffraction patterns obtained from respective samples were different.

Therefore it was confirmed that the crystals obtained in
30 Reference Example 1, Example 1 and Example 3-1 were distinct from each other, and show characteristic diffraction patterns as shown in the X-ray powder diffraction pattern. Therefore, in the present specification, they were named as crystal form I, crystal form II and crystal form III, based on the X-ray

powder diffraction patterns.

For specification of the crystal form, the diffraction peak characteristic of each crystal may be evaluated in a comprehensive manner based on the diffraction chart in Fig. 1.

5 The main diffraction peaks and characteristic diffraction peaks specified from the diffraction patterns in Fig. 1 are shown below.

[Crystal form I]

Main diffraction peak: $2\theta=6.58, 14.40, 14.64, 15.24, 16.48, 19.16,$
10 $20.90, 21.14, 22.24, 24.74, 25.64, 26.12, 27.20^\circ$;

Characteristic diffraction peak: $2\theta=6.58, 14.40, 19.16, 20.90,$
 21.14° .

[Crystal form II]

Main diffraction peak: $2\theta=6.56, 9.04, 13.20, 14.62, 15.24, 16.48,$
15 $19.86, 20.84, 21.22, 22.24, 25.22, 25.96, 26.12, 27.34^\circ$;

Characteristic diffraction peak: $2\theta=6.56, 13.20, 19.86, 20.84,$
 $21.22, 25.22^\circ$.

[Crystal form III]

Main diffraction peak: $2\theta=8.54, 14.02, 15.68, 15.90, 16.00, 17.06,$
20 $17.24, 17.84, 18.12, 19.50, 19.90, 22.26, 22.68, 23.02, 24.16,$
 $24.76, 25.18, 25.74, 25.98, 27.50, 28.80, 30.38, 30.72, 32.54^\circ$;

Characteristic diffraction peak: $2\theta=8.54, 14.02, 15.68, 17.06,$
 $17.24, 24.16, 25.74^\circ$.

2. Thermal analysis

25 This test aims at the measurement of the enthalpy and extrapolated onset temperature at an endothermic peak on the Differential Scanning Calorimetry (DSC) measurement curve. These values are among the indices of the stability of the above-mentioned crystal form I, crystal form II and crystal form
30 III, and can be used as an index to specify the crystal form.

2.1. Enthalpy and extrapolated onset temperature of crystal form I and crystal form II

Crystal form I and crystal form II were subjected to measurement using a Differential Scanning Calorimetry (DSC)

measurement apparatus (DSC8240, manufactured by Rigaku Corporation), under atmosphere, measurement sample 5±1 mg, temperature rise rate: 10°C/min, aluminum open pan, and alumina oxide as a reference. The enthalpy and extrapolated onset
5 temperature at an endothermic peak on the obtained DSC curve were determined.

2.2. Enthalpy and extrapolated onset temperature of crystal form III

Crystal form III was subjected to measurement using a DSC
10 measurement apparatus (DSC8240, manufactured by Rigaku Corporation), under atmosphere, measurement sample 5.0±0.5 mg, temperature rise rate: 5°C/min, aluminum closed pan, and alumina oxide as a reference. The enthalpy and extrapolated onset
15 temperature at an endothermic peak on the obtained DSC curve were determined.

The results are shown in Table 1.

Table 1

DSC curve at endothermic peak on enthalpy and extrapolated onset
20 temperature

Crystal form	Endothermic peak	
	Enthalpy (J/g)	Extrapolated onset temperature (°C)
Crystal form I	51.080	150.3
Crystal form II	53.542	151.2
Crystal form III	81.404	162.1

As shown in Table 1, crystal form III shows greatest enthalpy and highest extrapolated onset temperature among three
25 crystal forms. Thus, crystal form III was confirmed to be most stable form.

3. Purity test

This test aims at measurement of the purity of compound A. The purity can be used as indices of chemical stability.

3.1. Purity of compound of crystal form I and crystal form II

Each sample (crystal form I and crystal form II, ca. 10 mg) was dissolved in acetonitrile to make an amount of 10 mL and used as a sample solution. This solution (10 μ L) was applied to high performance liquid chromatography (HPLC) under the following conditions. The peak area of each sample solution was measured by automatic integration, and the purity was determined by the following formula. The purity is shown in the Tables 5 and 6 below.

$$\text{Purity (\%)} = 100 - (A_{\text{sum}}/A_{\text{s}}) \times 100$$

A_{s} : total peak area of peaks obtained from sample solution

A_{sum} : total peak area of peaks other than the main peak obtained from sample solution

Test conditions

Detector: UV absorptiometer (wavelength: 259 nm)

Column: CAPCELL PAK MG (inner diameter 4.6 cm, length 15 cm, particle size 5 μ m, manufactured by Shiseido Co., Ltd.

Column temperature: constant temperature around 40°C

Mobile phase A: trifluoroacetic acid solution (1:1000)

Mobile phase B: solution of trifluoroacetic acid in acetonitrile (1:1000)

Gradient program: As shown in the following Table 2, the mixing ratio of mobile phase A and mobile phase B is changed to control concentration gradient.

Table 2

Time (min) after injection	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	55	45
0-5	55→52	45→48
5-15	52	48
15-25	52→20	48→80
25-35	20	80
35-36	20→55	80→45
36-45	55	45

Flow rate: 1 mL/min

3.2. Purity of compound of crystal form III

5 A sample (crystal form III, ca. 50 mg) was dissolved in a mixture (4:1) of mobile phase B and mobile phase A to make an amount of 50 mL, which was used as a sample solution. This solution (1 mL) was precisely measured and a mixture (4:1) of mobile phase B and mobile phase A was added to precisely make an
10 amount of 100 mL, which was used as a standard solution. The sample solution and standard solution (15 μ L) was applied to high performance liquid chromatography (HPLC) under the following conditions. The peak area of each solution was measured by automatic integration, and the purity was determined
15 by the following formula. The purity is shown in the Table 7 below.

$$\text{Purity (\%)} = 100 - (A_{\text{sum}}/A_r)$$

20 A_r : peak area of main peak obtained from standard solution

A_{sum} : total peak area of peaks other than the main peak obtained from sample solution

Test conditions

25 Detector: UV absorptiometer (wavelength: 259 nm)

Column: Waters XTerra MC C18 (inner diameter 4.6 cm, length 5

cm, particles diameter 2.5 μ m, manufactured by Waters)
Column temperature: constant temperature around 40°C
Mobile phase A: phosphoric acid is added to dipotassium hydrogenphosphate solution (1→1149) to adjust pH to 7.0

5 Mobile phase B: acetonitrile

Gradient program: As shown in the following Table 3, the mixing ratio of mobile phase A and mobile phase B is changed to control concentration gradient.

10

Table 3

Time (min) after injection	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0-15	58	42
15-35	58→20	42→80
35-45	20	80
45-46	20→58	80→42
46-55	58	42

Flow rate: 0.9 mL/min

4. Solubility test

15

This test aims at measurement of solubility of the crystal in various test solutions and under various pHs. The solubility is one of the indices of the stability of the above-mentioned crystal form I, crystal form II and crystal form III and can be used also as a reference indices of absorbability of crystal

20

form by living organisms.

25

Each sample (crystal form I type I, crystal form II and crystal form III, ca. 10 mg) was placed in a 10 mL centrifuge tube together with the following test solution (5 mL) and shaken with a shaker (SR-1M; manufactured by Tietech Co., Ltd.) for 14 hours. After shaking, the mixture was centrifuged (3000 rpm, 20 min) and the supernatant was filtered through 0.2 μ m pore size - 13 mm diameter polytetrafluoroethylene disk filter (Millex-LG; manufactured by Millipore Corporation). The measurement was

performed by high performance liquid chromatography (HPLC). The results are shown in Table 4.

Table 4 Solubility Test

5

Test solution	pH	Solubility (μg/mL)	
		Crystal form II	Crystal form III
Purified water	—	0.5	< 0.1
Japanese Pharmacopoeia 1st fluid ¹⁾	1.2	0.9	< 0.1
Japanese Pharmacopoeia 2nd fluid ²⁾	6.8	5.8	2.4
McIlvaine ³⁾	2.2	1.9	< 0.1
	4	0.8	< 0.1
	5	0.4	< 0.1
	6	1.0	0.7
	6.8	6.3	0.7
	8	84	23

1) Japanese Pharmacopoeia, General Test Method, Disintegration Test Method, 1st fluid. Hydrochloric acid (7.0 mL) and water are added to sodium chloride (2.0 g) to make an amount of 1000 mL. This solution is transparent and colorless and has a pH of about 1.2.

2) Japanese Pharmacopoeia, General Test Method, Disintegration Test Method, 2nd fluid. 0.2 mol/L sodium hydroxide sample (118 mL) and water are added to 0.2 mol/L potassium disodium phosphate sample (250 mL) to make an amount of 1000 mL. This solution is transparent and colorless and has a pH of about 6.8.

3) McIlvaine buffer obtained by mixing disodium hydrogenphosphate and citric acid at a given ratio to adjust to a given pH.

From the above-mentioned results, it was confirmed that crystal form II has higher solubility than crystal form III.

5. Stability test

A stability test of each sample was performed under the

following preservation conditions. The results of crystal form I are shown in Table 5, the results of crystal form II are shown in Table 6, and the results of crystal form III are shown in Table 7.

5 As shown in Table 6 and Table 7, crystal form II and crystal form III did not show any difference in the test results under all preservation conditions, as compared to the initial sample. In contrast, as shown in Table 5, crystal form I showed changes in the X-ray powder diffraction pattern obtained from
10 sample after preservation under preservation condition #3 (80°C, preservation in an open container for 3 days) and preservation condition #5 (60°C, preservation in an open container for 3 weeks), and the X-ray powder diffraction pattern of crystal form I was observed to have overlapped with the X-ray powder
15 diffraction pattern derived from crystal form II. Thus, it was evaluated that a part of the sample showed crystal transition to crystal form II during preservation. The X-ray powder diffraction patterns of the samples preservation sample under preservation conditions #1-6 of crystal form I are shown in Fig.
20 2.

Table 5

Results of stability test of crystal form I

Preservation conditions		Appearance	Purity	XRD	Thermal analysis
1	Initial	-	99.1%	Diffraction pattern of crystal form I	Endothermic peak (extrapolated onset temperature 150.3°C)
2	80°C Closed container Preserved for 3 days	No change in appearance	99.1%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve
3	80°C Open container Preserved for 3 days	No change in appearance	99.1%	Overlap of diffraction patterns of crystal form I and crystal form II	No change in DSC curve
4	60°C Closed container Preserved for 3 weeks	No change in appearance	99.1%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve
5	60°C Open container Preserved for 3 weeks	No change in appearance	99.1%	Overlap of diffraction patterns of crystal form I and crystal form II	No change in DSC curve
6	60°C/75% R.H. Open container Preserved for 3 weeks	No change in appearance	99.1%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve

5 R.H.: relative humidity

XRD: X-ray powder diffractometry

Table 6

Results of stability test of crystal form II

Preservation conditions		Appearance	Purity	XRD	Thermal analysis
1	Initial	-	98.9%	Diffraction pattern of crystal form II	Endothermic peak (extrapolated onset temperature 151.2°C)
2	80°C Closed container Preserved for 3 days	No change in appearance	98.9%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve
3	80°C Open container Preserved for 3 days	No change in appearance	98.8%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve
4	60°C Closed container Preserved for 3 weeks	No change in appearance	98.9%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve
5	60°C Open container Preserved for 3 weeks	No change in appearance	98.8%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve
6	60°C/75%R.H. Open container Preserved for 3 weeks	No change in appearance	98.9%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve

⁵ R.H.: relative humidity

XRD: X-ray powder diffractometry

Table 7

Results of stability test of crystal form III

Preservation conditions		Appearance	Purity	XRD	Thermal analysis
1	Initial	-	98.71%	Diffraction pattern of crystal form III	Endothermic peak (extrapolated onset temperature 162.1°C)
2	80°C Closed container Preserved for 3 days	No change in appearance	98.68%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve
3	80°C Open container Preserved for 3 days	No change in appearance	98.69%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve
4	60°C Closed container Preserved for 3 weeks	No change in appearance	98.67%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve
5	60°C Open container Preserved for 3 weeks	No change in appearance	98.66%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve
6	60°C/75% R.H. Open container Preserved for 3 weeks	No change in appearance	98.65%	No change in diffraction pattern	No change in DSC curve

⁵ R.H.: relative humidity

XRD: X-ray powder diffractometry

From the results of the above-mentioned stability test, it was observed that the crystal form I was unstable but crystal

form II and crystal form III were extremely stable under various preservation conditions. Therefore, it was evidenced that crystal form II and crystal form III are preferable for use as a pharmaceutical product and the like.

- 5 As for the absorbability by living organisms, crystal form II is more preferable, and crystal form III is more preferable because it is the most stable crystal.

Since crystal form II and crystal form III are both stable, a mixed crystal of them can be used for the present invention.

10 **Experimental Example**

The following explains evaluation methods of the HIV integrase inhibitory activity of a crystal or a mixed crystal of compound A of the present invention.

(i) Construction of recombinant integrase gene expression system

- 15 The 185th phenylalanine of HIV integrase full length gene (J. Virol., 67, 425-437 (1993)) was substituted by histidine and inserted into the restriction enzyme NdeI and XhoI sites of the plasmid pET21a(+) (manufactured by Novagen), whereby an integrase expression vector pET21a-IN-F185H was constructed.

20 (ii) Production and purification of integrase protein

- Escherichia coli recombinant BL21(DE3) transformed with plasmid pET21a-IN-F185H obtained in (i) was shake cultured at 30°C in a liquid medium containing ampicillin. When the culture reached the logarithmic growth phase, isopropyl- β -D-
25 thiogalactopyranoside was added to promote expression of integrase gene. The culture was continued for 3 hr to promote accumulation of the integrase protein. The recombinant E. coli was collected in pellets by centrifugal separation and preserved at -80°C.

- 30 The E. coli was suspended in Lysis buffer (20 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM DTT, 10 mM CHAPS, 10% glycerol) containing 1M sodium chloride and subjected to repeat pressurization and depressurization for rupture, and centrifugal separation at 4°C, 40,000xg, 60 min to recover a water-soluble fraction

(supernatant). This was diluted 10-fold with Lysis buffer free of sodium chloride, mixed with SP-Sepharose (manufactured by Pharmacia Corporation) and stirred at 4°C for 60 min to allow adsorption of integrase protein to the resin. The resin was
5 washed with Lysis buffer containing 100 mM sodium chloride and the integrase protein was eluted with Lysis buffer containing 1M sodium chloride.

The eluted integrase protein solution was applied to a Superdex 75 (Pharmacia Corporation) column for gel filtration.
10 The protein was eluted with Lysis buffer containing 1M sodium chloride.

The obtained fractions of the integrase protein were collected and preserved at -80°C.

(iii) Preparation of DNA solution

15 The following DNA synthesized by Greiner was dissolved in TE buffer (10 mM Tris-hydrochloric acid (pH 8.0), 1 mM EDTA) and mixed with donor DNA, target DNA, and each complementary strand (+ and - strands) to 1 µM. The mixture was heated at 95°C for 5 min, 80°C for 10 min, 70°C for 10 min, 60°C for 10 min, 50°C for
20 10 min and 40°C for 10 min and preserved at 25°C to give a double stranded DNA, which was used for the test.

Donor DNA (- strand having biotin attached to the 5' terminal)
Donor + strand: 5'-Biotin-ACC CTT TTA GTC AGT GTG GAA AAT CTC
TAG CA-3' (SEQ ID NO:1)

25 Donor - strand: 5'-ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAC TGA CTA AAA G-3'
(SEQ ID NO:2)

Target DNA (+, - strands both having digoxigenin added at 3' terminal)

Target + strand: 5'-TGA CCA AGG GCT AAT TCA CT-Dig-3' (SEQ ID
30 NO:3)

Target - strand: 5'-AGT GAA TTA GCC CTT GGT CA-Dig-3' (SEQ ID NO:4)

(iv) Determination of enzyme (HIV integrase) inhibitory activity

The donor DNA was diluted with TE buffer to 10 nM, of which 50 μ l was added to each well of streptavidin-coated microtiter plate (manufactured by Roche) and allowed to adsorb at 37°C for 60 min. The DNA was then washed with phosphate buffer (Dulbecco PBS, Sanko Junyaku Co., Ltd.) containing 0.1% Tween 20 and phosphate buffer. Then, a reaction mixture (70 μ l, see the following * for the composition), a test substance (10 μ l) diluted with the reaction mixture and 100 μ g/ml integrase protein (10 μ l) were added to each well and reacted at 37°C for 60 min.

Then, 50 nM target DNA (10 μ l) was added, reacted at 37°C for 10 min and washed with phosphate buffer containing 0.1% Tween 20 to stop the reaction.

Then, 100 mU/ml peroxidase labeled anti-digoxigenin antibody solution (manufactured by Roche, 100 μ l) was added, and the mixture was reacted at 37°C for 60 min, followed by washing with phosphate buffer containing 0.1% Tween 20.

A peroxidase color solution (manufactured by Bio Rad, 100 μ l) was added and allowed to react at room temperature for 4 min. The color reaction was stopped by adding 1N sulfuric acid (100 μ l). The absorbance at 450 nm was measured.

The HIV integrase inhibitory activity (IC_{50}) of the compound A of the present invention was calculated from the inhibition rate according to the following formula. The results are shown in Table 8.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [1 - (\text{Object-Blank}) / (\text{Control-Blank})] \times 100$$

Object; absorbance of well in the presence of test compound
Control; absorbance of well in the absence of test compound
Blank; absorbance of well in the absence of test compound, in the absence of integrase protein

*Composition of the reaction mixture: 30 mM

morph linopropanesulfonic acid (MOPS), 5 mM MgCl₂, 3 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 5% glycerol, 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), 0.01% Tween 20

5

Table 8

Compound No.	Enzyme activity IC ₅₀ (μM)
Compound A	0.0029

Evaluation of antiviral activity

The effect of combined use of a crystal or a mixed
10 crystal of compound A of the present invention and existent anti-HIV agents can be determined in the following manner.

For example, the effect of combined use of two agents from existent nucleoside reverse transcriptase inhibitors (zidovudine, lamivudine, tenofovir), non-nucleoside reverse
15 transcriptase inhibitors (efavirenz) or protease inhibitors (indinavir, nelfinavir) and a crystal or a mixed crystal of compound A and the like are evaluated by XTT method using CEM-SS cells infected with HIV-1 IIIB.

In addition, the effect of combined use of three agents
20 of a crystal or a mixed crystal of compound A, zidovudine and lamivudine, or a crystal or a mixed crystal of compound A, tenofovir and lamivudine, and the like is evaluated.

Prior to the combined use test, IC₅₀ and CC₅₀ of each pharmaceutical agent alone are measured. 5 concentrations of
25 pharmaceutical agent a and 9 concentrations of pharmaceutical agent b, determined based on these results, are combined to evaluate the effect of combined use of two agents. For combined use of three agents, a high concentration pharmaceutical agent b and a pharmaceutical agent c are mixed and pharmaceutical agent
30 a and the concentration are combined for evaluation.

The test results of the crystal or mixed crystal of compound A and combination drug alone or in combination thereof

are analyzed based on the programs of Prichard and Shipman MacSynergy II version 2.01 and Deltagraph version 1.5d.

A three-dimensional plot is drawn from % inhibition at the concentrations of each combined pharmaceutical agent, obtained from 3 times of tests, with 95% (or 68%, 99%) confidence limits, and the effect of the combined use is evaluated based on the numerical values of μM^2 calculated therefrom. The criteria of evaluation are shown in the following.

10

Definition of interaction	μM^2
Strong synergistic action	>100
Slight synergistic action	+51 - +100
Additive action	+50 - -50
15 Slight antagonistic action	-51 - -100
Strong antagonistic action	<-100

INDUSTRIAL APPLICABILITY

The crystal of compound A of the present invention, which has the above-mentioned particular crystal form, shows an anti-HIV effect as well as superior crystal stability. Therefore, it is useful as a starting material of a pharmaceutical composition, particularly, various pharmaceutical compositions for the prophylaxis and/or treatment of AIDS.

25

This application is based on patent application No. 2004-150979 filed in Japan, the contents of which are hereby incorporated by reference. All of the references cited herein, including patents, patent applications and publications, are hereby incorporated in their entireties by reference.

30

CLAIMS

1. A crystal (crystal form II) of 6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-1-
[(S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl]-7-methoxy-4-oxo-1,4-
5 dihydroquinoline-3-carboxylic acid, which has an X-ray powder
diffraction pattern having characteristic diffraction peaks at
diffraction angles $2\theta(^{\circ})$ of 6.56, 13.20, 19.86, 20.84, 21.22,
25.22° as measured by X-ray powder diffractometer.
- 10 2. A crystal (crystal form III) of 6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-
1-[(S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl]-7-methoxy-4-oxo-1,4-
dihydroquinoline-3-carboxylic acid, which has an X-ray powder
diffraction pattern having characteristic diffraction peaks at
diffraction angles $2\theta(^{\circ})$ of 8.54, 14.02, 15.68, 17.06, 17.24,
15 24.16, 25.74° as measured by X-ray powder diffractometer.
3. A crystal (crystal form III) of 6-(3-chloro-2-fluorobenzyl)-
1-[(S)-1-hydroxymethyl-2-methylpropyl]-7-methoxy-4-oxo-1,4-
dihydroquinoline-3-carboxylic acid, having an extrapolated onset
20 temperature of $162.1 \pm 5.0^{\circ}\text{C}$.
4. The crystal of any of claims 1 to 3, which has a purity of
crystal of not less than 70%.
- 25 5. A mixed crystal comprising the crystal of claim 1 and the
crystal of claim 2 or 3.
6. The mixed crystal of claim 5, wherein the purity of crystal
is not less than 70%.
- 30 7. A pharmaceutical composition comprising the crystal of any of
claims 1 to 4 or the mixed crystal of claim 5 or 6, and a
pharmaceutically acceptable carrier.

8. An integrase inhibitor comprising the crystal of any of claims 1 to 4 or the mixed crystal of claim 5 or 6 as an active ingredient.

5 9. An antiviral agent comprising the crystal of any of claims 1 to 4 or the mixed crystal of claim 5 or 6 as an active ingredient.

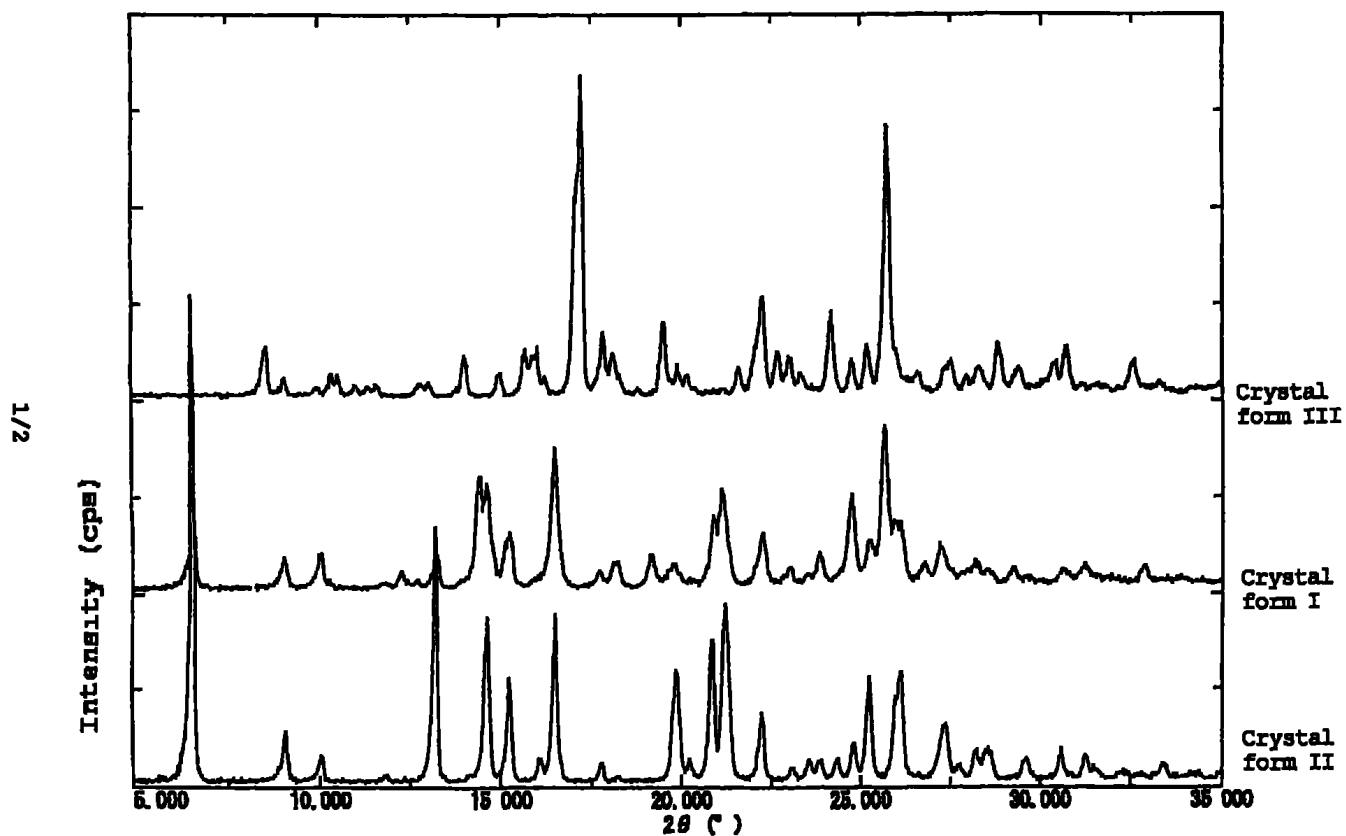
10 10. An anti-HIV agent comprising the crystal of any of claims 1 to 4 or the mixed crystal of claim 5 or 6 as an active ingredient.

15 11. An anti-HIV composition comprising the crystal of any of claims 1 to 4 or the mixed crystal of claim 5 or 6 and one or more kinds of other anti-HIV active substances as active ingredients.

20 12. An anti-HIV agent for a multiple drug therapy with other anti-HIV agent, which comprises the crystal of any of claims 1 to 4 or the mixed crystal of claim 5 or 6 as an active ingredient.

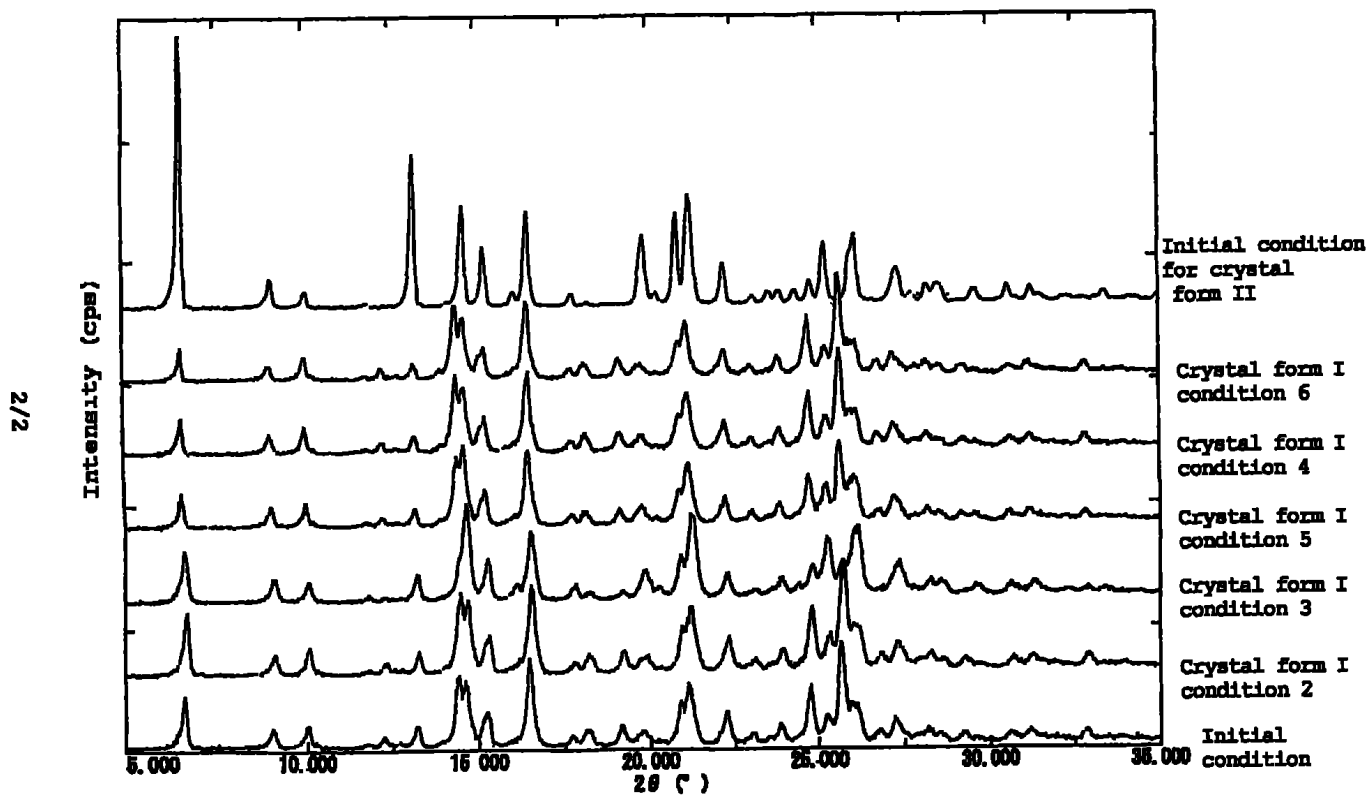
63

Fig 1



24

Fig 2



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco Inc.

<120> Stable Crystal of 4-Oxoquinoline Compound

<130> 09765

<150> JP2004-150979

<151> 2004-5-20

<160> 4

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Donor plus strand for activity determination of HIV integrase.

<400> 1

acccttttag tcagtgtgga aaatctctag ca 32

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Donor minus strand for activity determination of HIV integrase.

<400> 2

actgctagag attttccaca ctgactaaaa g 31

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Target plus strand for activity determination of HIV integrase.

<400> 3

tgaccaaggg ctaattcact 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Target minus strand for activity determination of HIV integrase.

<400> 4

agtgaattag cccttggtca 20

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

International Application No
PCT/JP2005/009604

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07D215/56 A61K31/47 A61P31/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-internal, CHEM ABS Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indicia, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/45269 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ; MEKOUAR, KHALID; D'ANGE) 15 October 1998 (1998-10-15) claim 1	1-12
A	US 3 472 859 A (GEORGE Y. LESHER) 14 October 1969 (1969-10-14) claim 1	1-12
E	EP 1 564 210 A (JAPAN TOBACCO INC) 17 August 2005 (2005-08-17) example 4-32 on page 18	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document number of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 October 2005

Date of mailing of the international search report

28/10/2005

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.O. Box 1
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wolf, C

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

Information on patent family members

International Application No

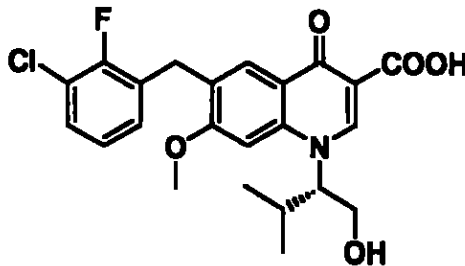
PCT/JP2005/009604

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9845269	A	15-10-1998	CA	2286385 A1	15-10-1998
			EP	0975597 A1	02-02-2000
			FR	2761687 A1	09-10-1998
			JP	2001518890 T	16-10-2001
			US	6670377 B1	30-12-2003
US 3472859	A	14-10-1969	FR	7263 M	15-09-1969
			NL	6714679 A	02-05-1968
EP 1564210	A	17-08-2005	AU	2003302029 A1	15-06-2004
			BR	0306214 A	24-08-2004
			CA	2470365 A1	03-06-2004
			CZ	20040764 A3	16-02-2005
			WO	2004046115 A1	03-06-2004
			SK	2662004 A3	02-06-2005
			TR	200401663 T1	21-04-2005

CRISTAL ESTABLE DE COMPUESTO 4-OXOQUINOLINA

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un cristal estable de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico.



(más adelante en la presente a veces compuesto A) y un cristal mezcla de los mismos. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprenda el cristal o cristal de mezcla.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El presente Solicitante ha descrito en la solicitud WO2004/046115 (PCT/JP2003/014773) registrada por el mismo solicitante que el compuesto indicado A precedentemente posee una acción inhibitoria de integrasa que es una enzima esencial para el crecimiento del VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humano) que es un virus que causa SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida), y demuestra un efecto anti-VIH (particularmente el Ejemplo 4-32 y el Ejemplo Experimental).

En general, cuando un compuesto es utilizado como un producto farmacéutico, se requiere estabilidad química y física del compuesto para mantener la calidad y/o facilitar la conservación. No sólo la composición farmacéutica final sino también un compuesto como material de comienzo sintético es deseable que sea químicamente y físicamente estable por las mismas razones.

Por consiguiente, tal compuesto es preferentemente un cristal, en particular preferentemente un cristal estable. Cuando el compuesto posee polimorfismo de cristal, generalmente se selecciona el cristal más estable.

Mientras la solicitud indicada precedentemente describe el compuesto A, no se encuentra ninguna descripción concreta que la relacione a la forma del cristal del compuesto A.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 Así, los presentes inventores han estudiado diversas formas de cristal de compuesto A en un intento por encontrar un cristal estable de compuesto A. Como resultado, han encontrado que el compuesto A posee polimorfismo de cristal, y un cristal de compuesto A que posea un cristal de forma particular es útil como cristal estable, y basado en los resultados, han completado la presente invención.

10 Concordantemente, la presente invención provee lo siguiente.

[1] Un cristal (cristal de forma II) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico que posee un modelo de difracción de polvo con rayos X que tiene crestas de difracción característica en ángulos de difracción $2\theta(^{\circ})$ de 6,56; 13,20; 19,86; 20,84; 21,22; 25,22° medido por difractómetro de polvo con rayos X;

[2] Un cristal (cristal de forma III) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico que tiene un modelo de difracción de polvo con rayos X que tiene crestas de difracción característica en ángulos de difracción $2\theta(^{\circ})$ de 8,54; 14,02; 15,88; 17,06; 17,24; 24,16; 25,74° medido por difractómetro de polvo con rayos X;

[3] Un cristal (cristal de forma III) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico, que posee una temperatura de comienzo extrapolada de $162,1 \pm 5,0^{\circ}\text{C}$;

[4] Un cristal de cualquiera de los puntos indicados precedentemente [1] a [3] que posee una pureza de cristal no inferior de 70%;

[5] Un cristal mezcla que comprenda el cristal indicado precedentemente en 1 y el cristal indicado precedentemente [2] ó [3];

[6] Un cristal mezcla indicado precedentemente en [5], en donde la pureza de cristal no es inferior de 70%;

[7] Una composición farmacéutica que comprende el cristal de cualquiera de los puntos indicado precedentemente [1] a [4] ó el cristal mezcla de los puntos indicados precedentemente [5] ó [6], y un vehículo farmacéuticamente aceptable.;

[8] Un inhibidor de integrasa que comprende el cristal de cualquiera de los puntos indicados precedentemente [1] a [4] o el cristal mezcla de los puntos indicados precedentemente [5] ó [6] como ingrediente activo;

[9] Un agente antiviral que comprendel cristal de cualquiera de los puntos indicados precedentemente [1] a [4] o el cristal mezcla del punto indicado precedentemente [5] ó [6] como un ingrediente activo;

[10] Un agente anti-VIH que comprendel cristal de cualquiera de los puntos indicados precedentemente [1] a [4] o el cristal mezcla del punto indicado precedentemente [5] ó [6] como ingrediente activo;

[11] Una composición anti-VIH que comprendel cristal de cualquiera de los puntos indicados precedentemente [1] a [4] o el cristal mezcla indicado precedentemente [5] ó [6] y uno o más tipos de otros productos activos anti-VIH como ingredientes activos; y

[12] Un agente anti-VIH para una terapia de droga múltiple con otro agente anti-VIH que comprendel cristal de cualquiera de los puntos indicados precedentemente [1] a [4] o el cristal mezcla del punto indicado precedentemente [5] o [6] como ingrediente activo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La fig. 1 ilustra los registros múltiples de modelos de difracción del polvo con rayos X, en donde la línea superior ilustra el modelo de difracción del cristal de forma III, la línea media ilustra el modelo de difracción del cristal de forma I, la línea inferior ilustra el modelo de difracción del cristal de forma II, el eje vertical ilustra la intensidad de difracción (cps: cuentas por segundo: intervalos de escala son 2500 cps) y el eje transversal ilustra el ángulo de difracción $2\theta(^{\circ})$.

La fig. 2 ilustra los registros múltiples de modelo de difracción de polvo con rayos X obtenido de la muestra después de 3 días de preservación de la prueba de estabilidad del cristal de forma I. Para comparación, la línea superior ilustra el modelo de difracción (condiciones iniciales) del cristal de forma II, y en la parte inferior la línea ilustra el modelo de difracción (condiciones iniciales) del cristal de forma I. Desde la segunda línea se ilustran los modelos de difracción bajo condiciones de preservación N° 6 (60°C/75% H.R., recipiente abierto, 3 semanas de preservación), condiciones de preservación N° 4 (60°C, recipiente con tapón, 3 semanas de preservación), condiciones de preservación N° 5 (60°C, recipiente abierto, 3 semanas de preservación), condiciones de preservación N° 3 (80°C, recipiente abierto, 3 días de preservación) y condiciones de preservación N° 2 (80°C, recipiente con tapón, 3 días de preservación). El eje vertical ilustra la intensidad de difracción (cps: cuentas por segundo: intervalos de escala son 2500 cps) y el eje transversal ilustra el ángulo de difracción $2\theta(^{\circ})$.

EFECTO DE LA INVENCION

El cristal o cristal mezcla de compuesto A de la presente invención posee el cristal de forma particular indicada precedentemente y es superior en estabilidad física y química, lo cual a su vez tiene la ventaja del mantenimiento de la calidad del compuesto A porque a largo plazo se hace posible facilitar la conservación. Adicionalmente, los mismos poseen la ventaja que es fácil la manipulación y volumen durante la producción de diversas composiciones farmacéuticas lo cual reduce el costo de producción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención será explicada en detalle a continuación.

En la presente invención, el "cristal de forma II" del compuesto A significa un cristal del compuesto A que posee un modelo de difracción de polvo con rayos X que posee una cresta de difracción característica ángulos de difracción $2\theta(^{\circ})$ de 6,56; 13,20; 19,86; 20,84; 21,22; 25,22° medido por difractómetro de polvo con rayos X.

En la presente invención; la "cristal de forma III" del compuesto A significa un cristal de compuesto A que tiene un modelo de difracción de polvo con rayos X que tiene una cresta de difracción característica a un ángulo de difracción $2\theta(^{\circ})$ de 8,54; 14,02; 15,68; 17,06; 17,24; 24,16; 25,74° medido por difractómetro de polvo con rayos X.

El valor máximo de difracción en el ángulo de difracción indicado precedentemente $2\theta(^{\circ})$ puede presentar un ligero error de medición debido al instrumento de medición o las condiciones de medición y lo similar. Para ser específico, el error de medición puede estar dentro del rango de $\pm 0,2$, preferentemente $\pm 0,1$, más preferentemente $\pm 0,06$.

El cristal de compuesto A de la presente invención también se caracteriza por análisis térmico. Por ejemplo, cuando el cristal de forma III del compuesto A de la presente invención es sometido a Calorimetría de exploración diferencial (DSC), la entalpía de cresta endotérmica es de aproximadamente 81 J/g, y la temperatura de comienzo extrapolada es de $162,1 \pm 5,0^{\circ}\text{C}$, preferentemente $162,1 \pm 3,0^{\circ}\text{C}$, más preferentemente $162,1 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, en donde la "la temperatura de comienzo extrapolada", según lo definido por JIS K 7121 (método de medición de temperatura de transferencia de plástico), la temperatura a una intersección de una línea de base extrapolada de la temperatura inferior hacia el lado de temperatura superior con la línea tangente dibujada en el punto que ilustra la máxima pendiente en el borde de extremo de la cresta fundición en un lado de temperatura inferior en una curva DSC. Cuando la entalpía y la temperatura de comienzo extrapolada de la cresta endotérmica está dentro del rango indicado precedentemente, el cristal de compuesto A es estable.

El cristal del compuesto A de la presente invención puede ser un cristal de forma II o un cristal de forma III, o un cristal mezcla de un cristal de forma II y un cristal de forma III. Para la utilización en un producto farmacéutico del compuesto A y lo similar, es preferible el cristal de forma II o cristal de forma III porque los mismos son cristales

estables, y un cristal de forma III es más preferible porque es el cristal más estable. Adicionalmente, un cristal de forma II es preferible en vista de la absorbabilidad por los organismos vivos en administración como composición farmacéutica.

En la presente invención, la "pureza de cristal" significa la pureza del cristal de forma II ó cristal de forma III de compuesto A. En el caso de un cristal mezcla de un cristal de forma II y un cristal de forma III, significa la proporción de cristal en relación a cantidad total de sustancia de un cristal de forma II y un cristal de forma III. La pureza del cristal de la presente invención puede ser determinada, por ejemplo, mediante métodos conocidos tales como difracción de rayos X del polvo, análisis térmico y lo similar. La pureza del cristal o cristal mezcla de la presente invención no necesita ser de 100%, y no puede ser inferior de 70%, preferentemente no inferior de 80%, más preferentemente no inferior de 90%, aún más preferentemente no inferior de 95%, y más preferentemente no inferior de 98%. La pureza dentro de este rango es preferible para garantizar la calidad.

El cristal o cristal mezcla de compuesto A de la presente invención puede ser administrado a un mamífero (el ser humano, ratón, rata, marmota, conejo, gato, perro, bovino, ovino, mono etc.) y lo similar como diversas composiciones farmacéuticas tales como agentes anti-VIH, inhibidores de integrasa VIH, agentes antivirales y lo similar utilizados para, por ejemplo, profilaxis y/o tratamiento de SIDA.

Cuando el cristal o cristal mezcla de compuesto A de la presente invención es utilizado como una composición farmacéutica, es mezclado con vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, diluyentes, agentes de extensión, disintegradores, estabilizadores, conservantes, agentes de amortiguación, emulsores, agentes aromatizantes, agentes colorantes, agentes endulzantes, espesantes, correctores, auxiliares de disolución, y otros aditivos que son generalmente conocidos por sí mismos tales como agua, aceite vegetal, alcohol (por ejemplo, etanol o alcohol bencílico etc.), polietilén glicol, glicerol triacetato, gelatina, hidrato de carbono (por

ejemplo, lactosa, almidón etc.), estearato de magnesio, talco, lanolina, petrolato y lo similar, son formados en tableta, píldora, polvo, gránulo, supositorio, inyección, colirio, líquido, cápsula, pastilla, aerosol, elixir, suspensión, emulsión, jarabe y lo similar por un método convencional, y son administrados sistémicamente o tópicamente, y oralmente o parenteralmente.

La dosis varía, dependiendo de la edad, peso del cuerpo, síntoma, efecto de tratamiento, método de administración y lo similar, generalmente es de 0,01 mg a 1 g por administración para un adulto que es aplicada una vez oralmente en varias veces por día o en una forma de dosis de una inyección tal como la inyección intravenosa y lo similar.

Un agente anti-VIH generalmente requiere mantener su efecto durante mucho tiempo, de manera tal que no sólo pueda ser eficaz para la supresión temporal del crecimiento viral sino también para la prohibición de recrecimiento viral. Esto significa que es necesaria una administración prolongada y que una sola dosis elevada puede ser frecuentemente inevitable para sostener el efecto por un período más prolongado durante la noche y lo similar. Tal administración de dosis prolongada y elevada aumentan el riesgo de accidentes producidos por un medicamento.

En vista de esto, una de las modalidades preferibles de realización de la presente invención es tal compuesto que permite una elevada absorción por administración oral, y tal compuesto capaz de mantener la concentración en sangre del compuesto administrado por un extenso período de tiempo.

Por la "profiláctica de SIDA" se indica, por ejemplo, la administración de un agente farmacéutico a un individuo que ha sido probado como VIH positivo pero aún no ha desarrollado el estado de enfermedad del SIDA, la administración de un agente farmacéutico a un individuo que presenta un estado de enfermedad mejorada de SIDA después del tratamiento pero aún posee VIH a ser erradicado y quien está angustiado por recaer de SIDA, y la administración de un agente farmacéutico fuera de un temor de

una posible infección.

La composición anti-VIH de la presente invención es utilizada para, por ejemplo, una terapia de combinación con droga múltiple contra SIDA. Los ejemplos del "otro producto anti-VIH activo" a ser utilizado para la composición anti-VIH incluyen un anticuerpo anti-VIH, una vacuna de VIH, inmunoestimulantes tales como interferón y lo similar, una ribozima de VIH, una droga de VIH de sentido contrario, un inhibidor de transcriptasa inversa de VIH, un inhibidor de proteasa VIH, un inhibidor de enlace entre un receptor de enlace (CD4, CXCR4, CCR5 y lo similar) de una célula de anfitrión reconocida por el virus y el virus, y lo similar.

Los ejemplos específicos del inhibidor de transcriptasa inversa VIH incluye Retrovir(R) (zidovudina), Epivir(R) (lamivudina), Zerit(R) (sanilvudina), Videx(R) (didanosina), Hivid(R) (zalcitabina), Ziagen(R) (sulfato de abacavir), Viramune(R) (nevirapina), Stocrin(R) (efavirenz), Rescriptor(R) (mesilato de delavirdina), Combivir(R) (zidovudina+lamivudina), Trizivir(R) (sulfato de abacavir+lamivudina+zidovudina), Coactinon(R) (emivirina), Phosphonovir(R), Coviracil(R), alovudina (3'-fluoro-3'-desoxitimidina), Tiovir (ácido de tiofosfonofórmico), Capravirin (ácido carbámico de 5-[(3,5-diclorofenil)tio]-4-isopropil-1-(4-piridilmetil)imidazol-2-metanol), Tenofovir disoproxil fumarato (ácido (R)-[[2-(6-amino-9H-purin-9-il)-1-metiletoximetil]fosfónico fumarato de bis(isopropoxycarboniloximetil)éster), DPC-083 ((4S)-6-cloro-4-[(1E)-ciclopropiletetil]-3,4-dihidro-4-trifluorometil-2(1H)-quinazolinone), DPC-961 ((4S)-6-cloro-4-(ciclopropiletetil)-3,4-dihidro-4-(trifluorometil)-2(1H)-quinazolinona), DAPD ((-)-β-D-2,6-diaminopurina dioxolano), Immunocal, MSK-055, MSA-254, MSH-143, NV-01, TMC-120, DPC-817, G-7340, TMC-125, SPD-754, D-A4FC, capravirina, UC-781, emtricitabina, alovudina, Fosfazid, UC-781, BCH-10618, DPC-083, Etravirina, BCH-13520, MIV-210, sulfato de Abacavir/lamivudina, G-7340, GW-5634, GW-695634 y lo similar, en donde (R) indica una marca de fábrica registrada (más adelante en la presente lo mismo) y las denominaciones de otros agentes farmacéuticos son los

nombres generales.

Los ejemplos específicos del inhibidor de proteasa VIH incluyen Crixivan(R) (etanolato de sulfato de indinavir), saquinavir, Invirase(R) (mesilato de saquinavir), Norvir(R) (ritonavir), Viracept(R) (mesilato de nelfinavir), lopinavir, Prozei(R) (amprenavir), Kaletra(R) (ritonavir+lopinavir), dimesilato de mozenavir (dimetansulfonato de [4R-(4 α ,5 α ,6 β)]-1,3-bis[(3-aminofenil)metil]-hexahidro-5,6-dihidroxi-4,7-bis(fenilmetil)-2H-1,3-diazepin-2-ona), tipranavir (3'-[(1R)-1-[(6R)-5,6-dihidro-4-hidroxi-2-oxo-8-feniletil-6-propil-2H-piran-3-il]propil]-5-(trifluorometil)-2-piridinsulfonamida), lasinavir (N-[5(S)-(terc-butoxicarbonilamino)-4(S)-hidroxi-8-fenil-2(R)-(2,3,4-trimetoxibencil)hexanoil]-1-valina 2-metoxietilenamida), KNI-272 ((R)-N-terc-butil-3-[(2S,3S)-2-hidroxi-3-N-[(R)-2-N-(isoquinolin-5-iloxiacetil)amino-3-metiltiopropanoil]amino-4-fenilbutanoil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolidin-4-carboxamida), GW-433908, TMC-126, DPC-681, buckminsterfulereno, MK-944A (MK944 (N-(2(R)-hidroxi-1(S)-indanil)-2(R)-fenilmetil-4(S)-hidroxi-5-[4-(2-benzo[b]furanilmetil)-2(S)-(terc-butilcarbamoil)piperazin-1-il]pentanamida)+sulfato de indinavir), JE-2147 ([2(S)-oxo-4-fenilmetil-3(S)-[(2-metil-3-oxi)fenilcarbonilamino]-1-oxabutil]-4-[(2-metilfenil)metilamino]carbonil-4(R)-5,5-dimetil-1,3-tiazol), BMS-232632 (dimetil éster de ácido (3S,8S,9S,12S)-3,12-bis(1,1-dimetiletil)-8-hidroxi-4,11-dioxo-9-(fenilmetil)-6-[[4-(2-piridinil)fenil]metil]-2,5,6,10,13-pentaazatetradecandicarboxílico), DMP-850 ((4R,5S,6S,7R)-1-(3-amino-1H-indazol-5-ilmetil)-4,7-dibencil-3-butil-5,6-dihidroxi-perhidro-1,3-diazepin-2-ona), DMP-851, RO-0334649, Nar-DG-35, R-944, VX-385, TMC-114, Tipranavir, Fosamprenavir sodio, Fosamprenavir calcio, Darunavir, GW-0385, R-944, RO-033-4649, AG-1859 y lo similar.

El inhibidor de integrasa VIH se ejemplifica por S-1360, L-870810 y lo similar, inhibidor de polimerasa ADN o inhibidor de síntesis de ADN se ejemplifica por Foscavir(R), ACH-126443 (L-2',3'-dideshidro-didesoxi-5-fluorocitidina), entecavir ((1S,3S,4S)-9-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)-2-metilenciclopentil]guanina), calanolida A ([10R-(10a,11b,12a)]-11,12-dihidro-12-hidroxi-6,6,10,11-tetrametil-4-propil-2H,6H,10H-

benzo[1,2-b:3,4-b':5,6-b'']tripiran-2-ona), calanolida B, NSC-674447 (1,1'-azobisformamida), Iscador (extracto de viscum alubm), Rubitecan y lo similar, droga de sentido contrario VIH se ejemplifica por HGTV-43, GEM-92 y lo similar, anticuerpo anti-VIH u otro anticuerpo se ejemplifica por NM-01, PRO-367, KD-247, Cytolin(R), TNX-355 (anticuerpo CD4), AGT-1, PRO -140 (anticuerpo CCR5), Anti-CTLA-4MAb y lo similar, vacuna de VIH u otra vacuna se ejemplifica por ALVAC(R), AIDSVAX(R), Remune(R), vacuna HIVgp41, vacuna HIVgp120, vacuna HIVgp140, vacuna HIVgp160, vacuna HIVp17, vacuna HIVp24, vacuna HIVp55, Sistema AlphaVax Vector, vacuna canarypox gp160, AntiTat, vacuna MVA-F6 Nef, vacuna HIVrev, péptido C4-V3, p2249f, VIR-201, HGP-30W, TBC-3B, PARTÍCULA-3B y lo similar, Antíferon (vacuna interferón- α) y lo similar, el interferón o agonista de interferón se ejemplifica por Sumiferon(R), MultiFeron(R), interferón- τ , Reticulosa, interferón de leucocito humano α y lo similar, el antagonista de CCR5 se ejemplifica por SCH-351125 y lo similar, el agente farmacéutico que actúa en VIH p24 se ejemplifica por GPG-NH2 (glicil-prolil-glicinamida) y lo similar, el inhibidor de fusión VIH se ejemplifica por FP-21399 (1,4-bis[3-[(2,4-diclorofenil)carbonilamino]-2-oxo-5,8-disodiosulfonil]naftil-2,5-dimetoxifenil-1,4-dihidrazona), T-1249, Construcción Polimérica Sintética No.3, pentafusida, FP-21399, PRO-542, Enfuvirtida y lo similar, agonista o antagonista de IL-2 se ejemplifica por interleucina-2, Imunace(R), Proleukin(R), Multikine(R), Ontak(R) y lo similar, el antagonista de TNF- α se ejemplifica por Thalomid(R) (talidomida), Remicade(R) (infliximab), sulfato de curde lan, el inhibidor de α -glucosidase se ejemplifica por Bucast(R) y lo similar, el inhibidor purina nucleósido fosforilasa se ejemplifica por peldesina (2-amino-4-oxo-3H,5H-7-[(3-piridil)metil]pimolo[3,2-d]pirimidina) y lo similar, el agonista o inhibidor de apoptosis se ejemplifica por Arkin Z(R), Panavir(R), Coenzima Q10 (2-deca(3-metil-2-butenil)-5,6-dimetoxi-3-metil-p-benzoquinone) y lo similar, el inhibidor de colinesterasa se ejemplifica por Cognex(R) y lo similar, y el inmunomodulador se ejemplifica por Imunox(R), Prokine(R), Met-encefalina (6-de-L-

arginina-7-de-L-arginina-8-de-L-valinamida-adrenorfina), WF-10 (dilución de la solución de tetraclorodecaóxido 10 veces), Perthon, PRO-542, SCH-D, UK-427857, AMD-070, AK-802 y lo similar.

Adicionalmente, Neurotropin(R), Lidakol(R), Ancer 20(R), Ampligen(R),
5 Anticort(R), Inactivin(R) y lo similar, PRO-2000, gen Rev M10, célula T citotóxica específica de VIH (inmunoterapia CTL, terapia 080 protocolo ACTG, terapia de gen CD4-ζ), proteína de enlace SCA, complejo CR-CD4, Motexafin gadolinio, GEM-92, CNI-1493, (±)-FTC, Ushercell, D2S, BufferGel(R), VivaGel(R), gel vaginal Glyminox, lauril sulfato de sodio, 2F5, 2F5/2G12, VRX-496, Ad5gag2, BG-777, IGIV-C, BILR-255 y lo
10 similar son ejemplificados.

Como la "otra sustancia de actividad anti-VIH" a ser utilizada para la composición anti-VIH de la presente invención en la terapia de combinación de droga múltiple, el preferido es un inhibidor de transcriptasa inversa de VIH y un inhibidor de proteasa VIH. Dos o tres, o incluso un número mayor de agentes farmacéuticos puede
15 ser utilizado en combinación, en donde una combinación de agentes farmacéuticos que tienen mecanismos de acción diferentes es una de las modalidades de realización preferidas. Adicionalmente, la selección de agentes farmacéuticos libres de efectos colaterales de duplicación es preferible.

Los ejemplos específicos de la combinación de agentes farmacéuticos incluyen
20 una combinación de un grupo que consiste de efavirenz, tenofovir, emtricitabina, indinavir, nelfinavir, atazanavir, ritonavir + indinavir, ritonavir + lopinavir y ritonavir + saquinavir, didanosina + lamivudina, zidovudina + didanosina, stavudina + didanosina, zidovudina + lamivudina, stavudina + lamivudina y emtriva, y el cristal o cristal mezcla de la presente invención ("Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected
25 Adults and Adolescents. Del 13 de agosto de 2001). Es particularmente preferible la utilización combinada de dos agentes de cristal o cristal mezcla de la presente invención con efavirenz, indinavir, nelfinavir, tenofovir, emtricitabina, zidovudina o

lamivudina, y una utilización combinada de tres agentes de cristal o cristal mezcla de la presente invención con zidovudina + lamivudina, tenofovir + lamivudina, tenofovir + zidovudine, tenofovir + efavirenz, tenofovir + nelfinavir, tenofovir + indinavir, tenofovir + emtricitabina, emtricitabina + lamivudina, emtricitabina + zidovudine, emtricitabina + efavirenz, emtricitabina + nelfinavir, emtricitabina + indinavir, nelfinavir + lamivudina, nelfinavir + zidovudina, nelfinavir + efavirenz, nelfinavir + indinavir, efavirenz + lamivudina, efavirenz + zidovudina o efavirenz + indinavir.

El método de producción del cristal o cristal mezcla de compuesto A de la presente invención no está particularmente limitado, y el cristal puede ser producido por un método conocido por sí mismo o métodos ilustrados en los Ejemplos siguientes y lo similar.

Ejemplos

Mientras el método de producción del cristal de compuesto A de la presente invención se explica en lo siguiente con referencia a Ejemplos, los cuales son simplemente ejemplos y no limitan de forma alguna la presente invención.

Ejemplo de referencia 1: producción del cristal de forma I del compuesto A

Etapas 1

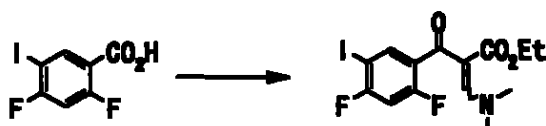


El ácido 2,4-difluorobenzoico (50 g, 316 mmol) fue disuelto en ácido sulfúrico concentrado (200 ml), y N-iodosuccinimida (68 g, 300 mmol) fue agregado por porciones a no más de 5°C. Después de la realización del agregado, la mezcla fue agitada a la misma temperatura durante 4,5 hr. La mezcla de reacción fue vertida en agua helada (aproximadamente 600 ml), entonces fue agregada una solución 10% de sulfito de sodio acuosa, y la mezcla fue agitada. El sólido precipitado fue recolectado por filtración, lavado con agua, y secado al vacío para producir los cristales en bruto (85

g). Se combinaron los cristales en bruto obtenidos de la misma manera (cantidad total 205 g), y se recrystalizaron de 50% etanol acuoso (820 ml) para dar ácido 2,4-difluoro-5-iodobenzoico (148 g, rendimiento 73%) como un sólido blanco.

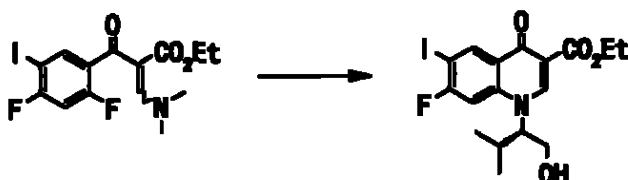
^1H RMN(CDCl_3 300MHz) (σ) ppm: 6,94(1H; dd; $J=10,3$; 10,3Hz); 8,46 (1H; d; $J=7,5\text{Hz}$).

5 Etapas 2



El compuesto (148 g; 521 mmol) que fue obtenido en la Etapa 1 fue disuelto en tolueno (750 ml), cloruro de tionilo (76 ml; 1,04 mol) y fue agregada dimetilformamida (cantidad catalizadora), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 2 hr. El material insoluble fue eliminado por filtración a 60°C , y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida y destilada azeotrópicamente con tolueno (330 ml). El residuo fue disuelto en tetrahydrofurano (400 ml), y esta solución fue agregada por gotas a una solución de etil 3,3-dimetilaminoacrilato (82 g, 573 mmol) y trietilamina (87 ml, 625 mmol) en tetrahydrofurano (400 ml), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 7 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, y fue concentrada bajo presión reducida. Fue agregada agua (700 ml) y acetato de etilo (800 ml) para dividir. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con carbonato hidrógeno de sodio acuoso saturado (250 ml, x2), agua (300 ml) y solución salina saturada (300 ml), y fue secada sobre sulfato de sodio. Después de la filtración del material insoluble, el filtrado fue concentrado bajo presión reducida para dar un producto en bruto (210 g) de etil éster de ácido 2-(2,4-difluoro-5-iodobenzoyl)-3-dimetilaminoacrílico como un sólido castaño.

25 Etapas 3

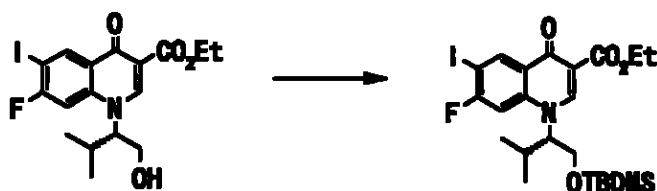


El producto en bruto (210 g) que fue obtenido en la Etapa 2 fue disuelto en tetrahidrofurano (500 ml), fue agregado (S)-(+)-valinol (54 g, 521 mmol), y la mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción fue concentrada bajo presión reducida, y el residuo fue disuelto en dimetilformamida (600 ml). Fue agregado carbonato de potasio (144 g; 1,04 mol) y la mezcla fue agitada con calentamiento a 70°C por 2 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar, y fue agregada agua (1500 ml) y fue agitada. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y el sólido obtenido fue lavado consecutivamente con 30% etanol acuoso (500 ml) y un solvente mezcla de dietil éter (150 ml) y hexano (150 ml) y fue secado al vacío para dar etil éster de ácido 7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-6-iodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (178 g, rendimiento 76%) como un sólido beige.

^1H RMN(DMSO- d_6 300MHz) (δ) ppm: 0,72(3H; d; $J=6,6\text{Hz}$); 1,10 (3H; d; $J=6,6\text{Hz}$); 1,28(3H; t; $J=7,0\text{Hz}$); 2,27 (1H; br); 3,77 (1H; br); 3,86(1H; br); 4,23 (2H; q; $J=7,0\text{Hz}$); 4,56(1H; br); 5,12 (1H; t; $J=4,9\text{Hz}$); 8,09(1H; d; $J=11,1\text{Hz}$); 8,62 (1H; d; $J=7,5\text{Hz}$); 8,68(1H, s)

MS(ESI): M^+ 448.

Etapa 4



En donde TBDMS significa un grupo terc-butildimetilsililo.

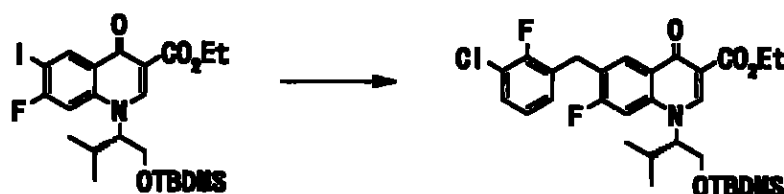
El compuesto (80 g, 179 mmol) que fue obtenido en la Etapa 3 fue disuelto en dimetilformamida (320 ml), imidazol (16 g, 233 mmol) y fue agregado cloruro de terc-butildimetilsililo (30 g, 197 mmol), y la mezcla fue agitada a la temperatura ambiente

durante 1,5 hr. Fueron agregados agua a la mezcla de reacción y la mezcla fue extractada con acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con solución de cloruro de amonio acuosa saturada y solución salina saturada, y fue secada sobre sulfato de sodio. La capa orgánica fue filtrada y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida. El residuo obtenido fue purificado por cromatografía de gel de sílice (acetato de etilo:hexano=1:3 a 1:2) para dar etil éster de ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-7-fluoro-6-iodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (77 g, rendimiento 77%) como un forma amorfa incolora.

^1H RMN(CDCl_3 400MHz) (δ) ppm: -0,07(3H; s); -0,05(3H; s); 0,77(9H; s); 0,84(3H; d; $J=6,5\text{Hz}$); 1,18(3H; d; $J=6,5\text{Hz}$); 1,40(3H; t; $J=7,2\text{Hz}$); 2,35-2,50(1H; m); 3,85-3,95(1H; m); 3,98-4,10(2H; m); 4,30-4,40(2H; m); 7,26(1H; s); 8,64(1H; s); 8,94(1H; d; $J=7,2\text{Hz}$)

MS(ESI): M^+ 562.

Etapas 5



(Preparación de una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilzinc en tetrahidrofurano)

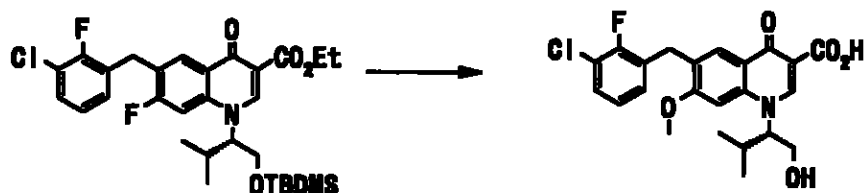
Bajo una corriente de argón, polvo de zinc (11 g, 267 mmol) fue suspendido en tetrahidrofurano (30 ml), fue agregado 1,2-dibromoetano (0,15 ml; 1,8 mmol) y cloruro de trimetilsililo (0,45 ml; 3,6 mmol) a 65°C , y la mezcla fue agitada con calentamiento por 30 min. Una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilo (41 g, 178 mmol) en tetrahidrofurano (100 ml) fue agregada por gotas a 65°C , y la mezcla fue agitada con calentamiento por 2 hr y se le permitió enfriar a la temperatura ambiente para dar una solución 1M bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilzinc en tetrahidrofurano. Esto fue utilizado en la siguiente etapa principal.

(Etapa principal).

El compuesto (76 g, 136 mmol) que fue obtenido en la Etapa 4 fue disuelto en tetrahidrofurano (600 ml) y, bajo una corriente de argón, fue agregado dibencilidenacetonaaladio(II) (3,2 g; 5,5 mmol) y trifurilfosfina (2,6 g; 11,0 mmol), y una
 5 solución del mencionado 1M bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilzinc en tetrahidrofurano (178 ml, 178 mmol) fue agregada por gotas a 60°C. Después de la realización del agregado por gotas, la mezcla fue agitada con calentamiento a la misma temperatura durante 2 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, fue agregada la solución acuosa saturada de cloruro de amonio, y la mezcla fue filtrada
 10 a través celite. El filtrado fue extractado dos veces con acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con agua (dos veces) y solución salina saturada, y fue secada sobre sulfato de magnesio. La capa orgánica fue filtrada y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida, y el residuo obtenido fue purificado por cromatografía de gel de sílice (cloroform:acetona=40:1) para dar etil éster de ácido 1-
 15 ((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (68 g, rendimiento 84%) como una forma amorfa incolora.

^1H RMN(CDCl_3 , 400MHz) (δ) ppm: -0,09(3H; s); -0,05(3H; s); 0,75(9H; s); 0,85(3H; d; $J=6,7\text{Hz}$); 1,18(3H; d; 6,7Hz); 1,39(3H; t; $J=7,1\text{Hz}$); 2,45(1H; br); 3,89-3,92(1H; m); 3,98-
 20 4,02(1H; m); 4,07-4,12(1H; m); 4,12(2H; s); 4,34-4,41(2H; m); 6,96-7,00(1H; m); 7,03-7,05(1H; m); 7,21-7,24(1H; m); 7,26-7,29(1H; m); 8,39(1H; d; $J=8,8\text{Hz}$); 8,63(1H; s).

Etapa 6



El compuesto (48 g, 86 mmol) que fue obtenido en la Etapa 5 fue disuelto en

metanol (300 ml), agua (5 ml) y fue agregada una solución de metanol 28% de metóxido de sodio (176 ml, 862 mmol), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 24 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente y la mezcla fue neutralizada agregando 6N ácido clorhídrico. El metanol fue evaporado bajo presión reducida. Fueron agregados agua a la solución obtenida y la mezcla fue agitada. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y el sólido obtenido fue disuelto en acetato de etilo. La mezcla fue lavada con agua y fue secada sobre sulfato de sodio. La solución fue filtrada y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida. El residuo obtenido fue recrystalizado del acetato de etilo-hexano para dar un compuesto (32 g, rendimiento 86%) como un sólido blanco. El compuesto obtenido (32 g) fue disuelto en acetato de butilo (160 ml) calentando bajo reflujo, y fue sembrado cristal de forma II a 75°C. La mezcla fue agitada por 3,5 hr mientras se permite enfriar tal como estaba. El sólido precipitado fue recolectado por filtración, lavado con acetato de butilo (25 ml) y secado al vacío para dar un compuesto (25 g, rendimiento 77%) como un sólido blanco. El compuesto obtenido (4,0 g) fue disuelto en metanol (40 ml) calentando bajo reflujo a 50°C, y fue agregado por gotas al agua (40 ml) a la temperatura ambiente. La mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 16 hr, fue filtrada, y el sólido restante fue lavado con 66% metanol acuoso, y secado al vacío para dar un cristal de compuesto A (cristal de forma I) (3,9 g, rendimiento 97%) como un sólido blanco.

p.f. 151-152°C.

^1H RMN (DMSO- d_6 300MHz) (δ) ppm: 0,72 (3H; d; $J=6,5\text{Hz}$); 1,16 (3H; d; $J=6,5\text{Hz}$); 2,30-2,50 (1H; m); 3,70-3,90 (1H; m); 3,90-4,00 (1H; m); 4,03 (3H; s); 4,12 (2H;s); 4,80-4,90 (1H; m); 5,19 (1H; t); 7,19-7,25 (2H; m); 7,46-7,51 (2H; m); 8,04(1H; s); 8,88 (1H; s); 15,44 (1H; s).

MS (ESI): M^+ 448.

Ejemplo 1: Producción del cristal de forma II del compuesto A

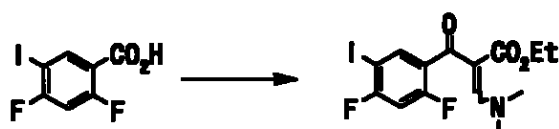
Etapas 1



El ácido 2,4-difluorobenzoico (50 g; 316 mmol) fue disuelto en ácido sulfúrico concentrado (200 ml), y fue agregado por porciones N-iodosuccinimida (68 g, 300 mmol) a no más de 5°C. Después de la realización del agregado, la mezcla fue agitada a la misma temperatura durante 4,5 hr. La mezcla de reacción fue vertida en agua helada (aproximadamente 600 ml), entonces 10% solución de sulfito de sodio acuosa, y la mezcla fue agitada. El sólido precipitado fue recolectado por filtración, lavado con agua, y secado al vacío para producir los cristales en bruto (85 g). Se combinaron los cristales en bruto obtenidos de la misma manera (agregado total 205 g), y recristalizado de 50% etanol acuoso (820 ml) para dar ácido 2,4-difluoro-5-iodobenzoico (148 g, rendimiento 73%) como un sólido blanco.

^1H RMN(CDCl_3 300MHz) (σ) ppm: 8,94(1H; dd; $J=10,3$; 10,3Hz); 8,46 (1H; d; $J=7,5\text{Hz}$)

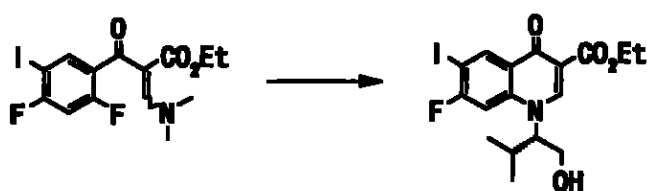
Etapas 2



El compuesto (148 g; 521 mmol) que fue obtenido en la Etapa 1 fue disuelto en tolueno (750 ml), fue agregado cloruro de tionilo (76 ml, 1,04 mol) y dimetilformamida (cantidad catalizadora), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 2 hr. El material insoluble fue eliminado por filtración a 60°C, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida y destilada azeotrópicamente con tolueno (330 ml). El residuo fue disuelto en tetrahidrofurano (400 ml), y esta solución fue agregada por gotas a una solución de etil 3,3-dimetilaminoacrilato (82 g, 573 mmol) y trietilamina (87 ml, 625 mmol) en tetrahidrofurano (400 ml), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 7 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente y fue concentrada

bajo presión reducida. Fue agregada agua (700 ml) y acetato de etilo (800 ml) para permitir la división. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con carbonato hidrógeno de sodio acuoso saturado (250 ml) dos veces, agua (300 ml) y solución salina saturada (300 ml), y fue secada sobre sulfato de sodio. La mezcla fue filtrada, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida para dar un producto en bruto (210 g) de etil éster de ácido 2-(2,4-difluoro-5-iodobenzoyl)-3-dimetilaminoacrílico como un sólido castaño.

Etapas 3



El producto en bruto (210 g) que fue obtenido en la Etapa 2 fue disuelto en tetrahidrofurano (500 ml), fue agregado (S)-(+)-valinol (54 g, 521 mmol), y la mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción fue concentrada bajo presión reducida, y el residuo fue disuelto en dimetilformamida (600 ml). Fue agregado carbonato de potasio (144 g; 1,04 mol), y la mezcla fue agitada con calentamiento a 70°C por 2 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, fue agregada agua (1500 ml) y la mezcla fue agitada. El sólido precipitado fue recolectado por filtración. El sólido obtenido fue lavado consecutivamente con 30% etanol acuoso (500 ml) y un solvente mezcla de dietil éter (150 ml) y hexano (150 ml), y fue secado al vacío para dar etil éster de ácido 7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-6-iodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (178 g, rendimiento 76% (en relación a la Etapa 2)) como un sólido beige.

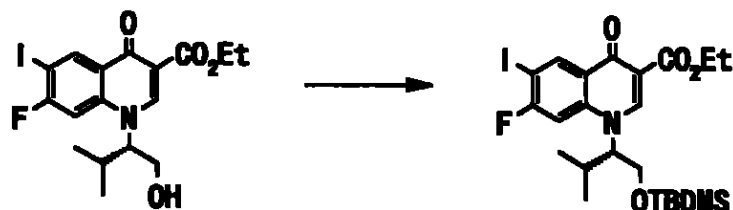
^1H RMN(DMSO- d_6 300MHz) (δ) ppm: 0,72(3H; d; J=6,6Hz); 1,10 (3H; d; J=6,6Hz); 1,28(3H; t; J=7,0Hz); 2,27 (1H; br); 3,77 (1H; br); 3,86(1H; br); 4,23 (2H; q; J=7,0Hz); 4,56(1H; br); 5,12 (1H; t; J=4,9Hz); 8,09(1H; d; J=11,1Hz); 8,62 (1H; d; J=7,5Hz);

8,68(1H; s).

MS(ESI): M+ 448.

Etapas 4

5



10

El compuesto (150 g, 335 mmol) que fue obtenido en la Etapa 3 fue disuelto en dimetilformamida (500 ml), fue agregado imidazol (30 g; 436 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (56 g; 369 mmol), y la mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 1,5 hr. Fue agregada agua a la mezcla de reacción y fue extracata con acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con agua, solución acuosa saturada de cloruro de amonio y solución salina saturada, y fue secada sobre sulfato de sodio. La capa orgánica fue filtrada y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida, y el residuo obtenido fue purificado por cromatografía de gel de sílice (acetato de etilo:hexano=1:3 a 1:2) para dar etil éster de ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-7-fluoro-6-iodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (173 g, rendimiento 92%) como un forma amorfa incoloro.

15

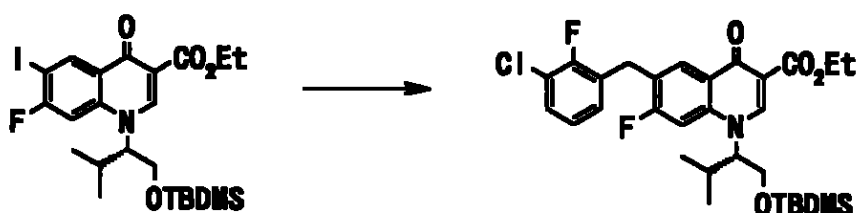
¹H RMN(CDCl₃ 400MHz) (δ) ppm: -0,07(3H; s); -0,05(3H; s); 0,77(9H; s); 0,84(3H;d; J=6,5Hz); 1,18(3H; d; J=6,5Hz); 1,40(3H; t; J=7,2Hz); 2,35-2,50(1H; m); 3,85-3,95(1H; m); 3,98-4,10(2H; m); 4,30-4,40(2H; m); 7,26(1H;s); 8,64(1H; s); 8,94(1H; d; J=7,2Hz)

20

MS(ESI): M+ 562

Etapas 5

25



(Preparación de una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilzinc en tetrahidrofurano)

Bajo una corriente de argón, fue suspendido polvo de zinc (11 g, 175 mmol) en tetrahidrofurano (30 ml), fue agregado 1,2-dibromoetano (0,1 ml; 1,20 mmol) y cloruro de trimetilsililo (0,29 ml; 2,4 mmol) a 60°C, y la mezcla fue agitada con calentamiento por 30 min. Una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilo (27 g, 119 mmol) en tetrahidrofurano (60 ml) fue agregada por gotas a 60°C. La mezcla fue agitada con calentamiento por 1 hr y se le permitió enfriar a la temperatura ambiente para dar una solución 1M de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilzinc en tetrahidrofurano. Esto fue utilizado en la etapa principal siguiente.

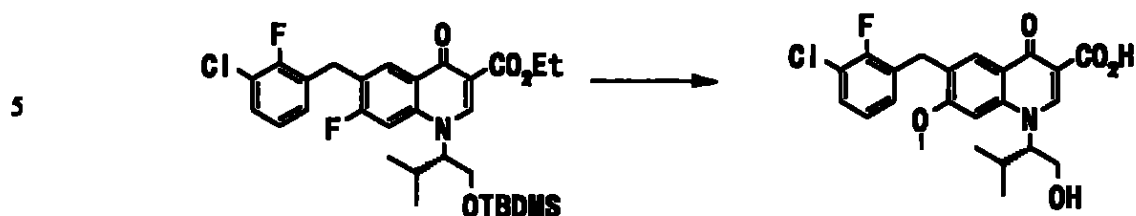
(Etapa principal).

El compuesto (50 g, 89 mmol) que fue obtenido en la Etapa 4 fue disuelto en tetrahidrofurano (400 ml) y, bajo una corriente de argón fue agregado diclorobis(trifenilfosfina)paladio(II) (2,1 g; 3,6 mmol) y una solución 1M de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilzinc indicada precedentemente en tetrahidrofurano fue agregada por gotas a 60°C. Después de la realización del agregado por gotas, la mezcla fue agitada con calentamiento a la misma temperatura durante 1,5 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, fue agregado 1N ácido clorhídrico y la mezcla fue extractada 3 veces con acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con agua y solución salina saturada, y fue secada sobre sulfato del magnesio. La capa orgánica se fue filtrada y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida, y el residuo obtenido fue purificado por cromatografía de gel de sílice (acetato de etilo:hexano=1:2 a 1:1) para dar etil éster de ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (43 g, rendimiento 83%) como una forma amorfa castaño.

^1H RMN(CDCl_3 400MHz) (δ) ppm: -0,09(3H; s); -0,05(3H; s); 0,75(9H; s); 0,85(3H; d; $J=6,7\text{Hz}$); 1,18(3H; d; $J=6,7\text{Hz}$); 1,39(3H; t; $J=7,1\text{Hz}$); 2,45(1H; br); 3,89-3,92(1H; m); 3,98-

4,02(1H; m); 4,07-4,12(1H; m); 4,12(2H; s); 4,34-4,41(2H; m); 6,96-7,00(1H; m); 7,03-7,05(1H; m); 7,21-7,24(1H; m); 7,26-7,29(1H; m); 8,39(1H; d; J=8,8Hz); 8,63(1H; s).

Etapas 6



El compuesto (43 g, 74 mmol) que fue obtenido en la Etapa 5 fue disuelto en metanol (280 ml), fue agregada una solución de metanol de 28% metóxido de sodio (151 ml, 742 mmol) y agua (4,3 ml), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 20 hr. La mezcla de reacción fue filtrada a través de celite. El filtrado fue concentrada bajo presión reducida. El agua (400 ml) fue agregada al residuo, y la mezcla fue lavada con hexano (100 ml). La capa acuosa fue acidificada agregando ácido clorhídrico concentrado (65 ml), y la mezcla fue extractada con acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con agua y solución salina saturada, y fue secada sobre sulfato de sodio. La solución fue filtrada y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida. El producto en bruto obtenido (35 g, aceite castaño) fue disuelto en acetato de etilo (49 ml) calentado bajo reflujo, fue agregado hexano (30 ml) mientras se permite enfriar, y la mezcla fue agitada por 18.5 hr. El sólido precipitado fue recolectado por filtración, fue lavado con un solvente mezcla de acetato de etilo y hexano (1:1), y secado al vacío para dar un cristal de compuesto A (cristal de forma II) (27 g, rendimiento 82%) como un sólido blanco.

p.f. 153,7-153,9°C.

¹H RMN (DMSO-d₆ 300MHz) (δ) ppm: 0,72 (3H; d; J=6,5Hz); 1,16 (3H; d; J=6,5Hz); 2,30-2,50 (1H; m); 3,70-3,90 (1H; m); 3,90-4,00 (1H; m); 4,03 (3H; s); 4,12 (2H;s); 4,80-4,90 (1H; m); 5,19 (1H; t); 7,19-7,25 (2H; m); 7,46-7,51 (2H; m); 8,04(1H; s); 8,88 (1H; s); 15,44 (1H; s).

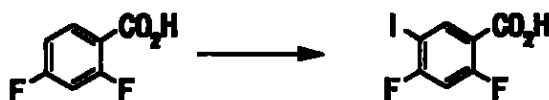
MS (ESI): M+ 448

Ejemplo 2: Producción de cristal de forma II del compuesto A

Ejemplo 2-1: Producción de cristal de forma II de compuesto A

Etapas 1

5



10

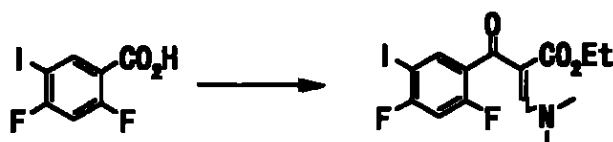
15

El ácido 2,4-difluorobenzoico (100 g, 633 mmol) fue disuelto en ácido sulfúrico concentrado (400 ml), y fue agregada N-iodosuccinimida (142 g, 601 mol) por porciones a no más de 5°C. Después de la realización del agregado, la mezcla fue agitada a la misma temperatura durante 6 hr. La mezcla de reacción fue vertida en agua helada (aproximadamente 2400 ml), entonces fue agregada solución acuosa saturada de sulfito de sodio, y la mezcla fue agitada. El sólido precipitado fue recolectado por filtración, lavado con agua, y secado al vacío para producir los cristales en bruto (188 g). Los cristales en bruto obtenidos de la misma manera fueron combinados (cantidad total 568 g), y recristalizados desde 50% etanol acuoso (2600 ml) para dar ácido 2,4-difluoro-5-iodobenzoico (388 g, rendimiento 68%) como un sólido blanco.

¹H RMN(CDCl₃ 300MHz) (σ) ppm: 8,94(1H; dd; J=10,3; 10,3Hz); 8,46 (1H; d; J=7,5Hz).

Etapas 2

20

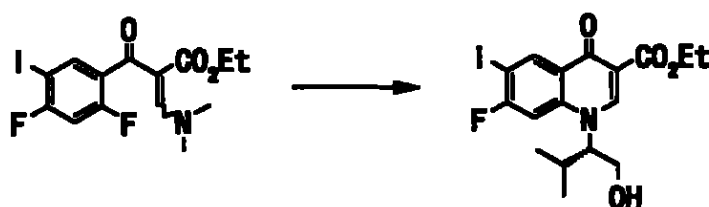


25

El compuesto (200 g; 704 mmol) que fue obtenido en la Etapa 1 fue disuelto en tolueno (1000 ml), cloruro de tionilo (103 ml, 408 mmol) y fue agregada dimetilformamida (cantidad catalizadora), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 2 hr. El material insoluble fue eliminado por filtración, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida y destilada azeotrópicamente con tolueno. El residuo fue disuelto en

tetrahidrofurano (500 ml), esta solución fue agregada por gotas a una solución de etil 3,3-dimetilaminoacrilato (111 g, 775 mmol) y trietilamina (118 ml, 845 mmol) en tetrahidrofurano (500 ml), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 3 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente y fue filtrada y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida. Fue agregada agua (500 ml) y acetato de etilo (800 ml) para permitir la división. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con carbonato hidrógeno de sodio acuoso saturado (200 ml), agua (200 ml) y solución salina saturada, y fue secada sobre sulfato de sodio. La capa orgánica fue filtrada, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida para dar un producto en bruto (273 g) de etil éster de ácido 2-(2,4-difluoro-5-iodobenzoi)-3-dimetilaminoacrílico como un sólido castaño.

Etapas 3



El producto en bruto (273 g) que fue obtenido en la Etapa 2 fue disuelto en tetrahidrofurano (650 ml), fue agregado (S)-(+)-valinol (73 g, 708 mmol), y la mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 2 hr. La mezcla de reacción fue concentrada bajo presión reducida y el residuo fue disuelto en dimetilformamida (800 ml). Fue agregado carbonato de potasio (195 g; 1,41 mol), y la mezcla fue agitada con calentamiento a 70°C por 2,5 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, fue agregada agua (2000 ml) y la mezcla fue agitada. El sólido precipitado fue recolectado por filtración. El sólido obtenido fue sometido a suspensión por lavando consecutivamente con agua y 30% etanol acuoso (650 ml) y fue secado al vacío para dar un producto en bruto (217 g). El producto en bruto obtenido (217 g) fue sometido a suspensión por lavado con un solvente mezcla de acetato de etilo (650 ml) y

hexano (440 ml) con calentamiento bajo reflujo. La mezcla fue filtrada, y el sólido restante fue secado al vacío para dar etil éster de ácido 7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-6-iodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (207 g, rendimiento 66% (en relación a la Etapa 2)) como un sólido castaño pálido.

¹H RMN(DMSO-d₆ 300MHz) (δ) ppm: 0,72(3H; d; J=6,6Hz); 1,10 (3H; d; J=6,6Hz); 1,28(3H; t; J=7,0Hz); 2,27 (1H; br); 3,77 (1H; br); 3,86(1H; br); 4,23 (2H; q; J=7,0Hz); 4,58(1H; br); 5,12 (1H; t; J=4,9Hz); 8,09(1H; d; J=11,1Hz); 8,62 (1H; d; J=7,5Hz); 8,68(1H; s)

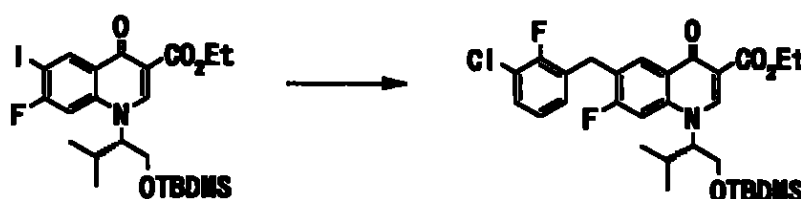
MS(ESI): M+ 448.

Etapa 4



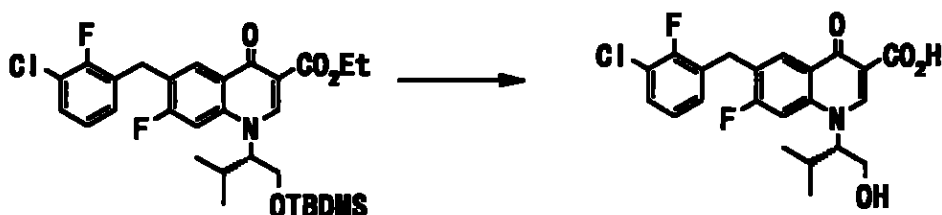
El compuesto (150 g, 335 mmol) que fue obtenido en la Etapa 3 fue disuelto en dimetilformamida (450 ml), fue agregado imidazol (27 g, 397 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (58 g, 385 mmol), y la mezcla fue agitada toda la noche a la temperatura ambiente. Fue agregada agua (900 ml) a la mezcla de reacción, y la mezcla fue extractada con acetato de etilo (680 ml). La capa orgánica fue lavada consecutivamente con agua (450 ml, 3 veces) y solución salina saturada (200 ml), y fue secada sobre sulfato de sodio. La capa orgánica fue filtrada, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida para dar un producto en bruto (192 g) de etil éster de ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-7-fluoro-6-iodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico como un forma amorfa amarillo pálido.

Etapa 5



El producto en bruto (162 g) que fue obtenido en la Etapa 4 fue disuelto en tetrahidrofurano (160 ml) y, bajo una corriente de argón, fue agregado dibencilidenacetona paladio(II) (1,7 g; 2,9 mmol) y trifurilfosfina (1,3 g; 5,8 mmol). A esta mezcla por gotas fueron agregados a 60°C una solución de (375 ml, 375 mmol) de 1M bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilzinc en tetrahidrofurano obtenido de la misma manera como en Ejemplo 1, Etapa 5 y, después de la realización del agregado por gotas, la mezcla fue agitada con calentamiento a la misma temperatura durante 3.5 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, fue agregado acetato de etilo (640 ml) y 10% solución acuosa de ácido cítrico (400 ml), y la mezcla fue filtrada a través de Celite, y el filtrado fue dividido. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con agua (200 ml), el carbonato de hidrógeno de sodio acuoso saturado (400 ml) y solución salina saturada (200 ml), y fue secada sobre sulfato de sodio. La capa orgánica fue filtrada, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida para dar un producto en bruto (186 g) de etil éster de ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico como un aceite castaño.

Etapa 6



El producto en bruto (193 g) que fue obtenido en la Etapa 5 fue disuelto en isopropanol (650 ml), fue agregada 1N solución de hidróxido de sodio acuosa (1.290 ml, 1,29 mol), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 2 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, y fue filtrada a través de Celite. El filtrado fue acidificado agregando ácido clorhídrico concentrado y la mezcla fue agitada.

El sólido precipitado fue recolectado por filtración, y secado al vacío para dar un producto en bruto (132 g) como un sólido pálido-amarillo. Se combinaron los productos en bruto obtenidos de la misma manera (cantidad total 143 g), fueron suspendidos en acetato de butilo (430 ml) y sometidos a suspensión agitando continuamente y con calentamiento bajo reflujo por 1 hr. A la suspensión se le permitió enfriar a la temperatura ambiente y fue filtrada y fue secada al vacío para producir de ésta manera ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (99 g, rendimiento 74% (en relación a la Etapa 3)) como un sólido gris.

^1H RMN(DMSO- d_6 400MHz) (δ)ppm: 0,71 (3H; d; J=6,5Hz); 1,13 (3H; d; J=6,5Hz); 2,38 (1H; br); 3,77(1H; br); 3,94 (1H; br); 4,25 (2H; s); 4,77(1H; br); 5,16 (1H; t; J=2,4Hz); 7,19-7,23(1H; m); 7,32-7,35 (1H; m); 7,48-7,52(1H; m); 8,24-8,28 (2H; m); 9,00 (1H; s); 15,00 (1H; s).

MS(ESI): M+ 436.

Etapa 7



El compuesto (99 g, 227 mmol) que fue obtenido en la Etapa 6 fue disuelto en metanol (530 ml), fue agregada solución 28% de metanol en metóxido de sodio (465 ml, 2,28 mol), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 20 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente y fue filtrada a través de Celite. El filtrado fue concentrado bajo presión reducida. El residuo fue acidificado agregando agua (200 ml) y ácido clorhídrico concentrado (190 ml), y fue extractada con acetato de etilo (500 ml). La capa orgánica fue lavada dos veces con agua (200 ml), y fue secada sobre sulfato de sodio. La mezcla fue filtrada, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida para dar un producto en bruto (108 g). El producto en bruto obtenido (108 g)

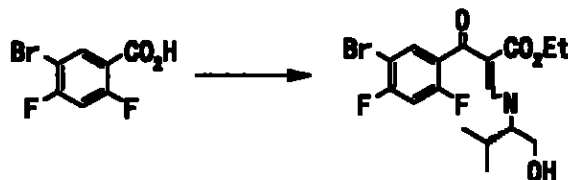
fue disuelto en acetato de isobutilo (330 ml) con calentamiento y la mezcla fue agitada mientras se permite enfriar por 24 hr. El sólido precipitado fue recolectado por filtración, y fue secado al vacío para dar compuesto A (71 g, rendimiento 69%) como un sólido blanco. Fueron combinados los cristales en bruto obtenidos de la misma manera (cantidad total 233 g), fueron disueltos en acetato de isobutilo (470 ml) calentando bajo reflujo, y la mezcla fue agitada toda la noche permitiendo enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración, y secado al vacío para dar un cristal de compuesto A (cristal de forma II) (206 g, rendimiento 88%) como un sólido blanco.

^1H RMN (DMSO- d_6 300MHz)(δ) ppm: 0.72 (3H; d; $J=6.5\text{Hz}$); 1.16 (3H; d; $J=6.5\text{Hz}$); 2.30-2.50 (1H; m); 3.70-3.90 (1H; m); 3.90-4.00 (1H; m); 4.03 (3H; s); 4.12 (2H; s); 4.80-4.90 (1H; m); 5.19 (1H; t); 7.19-7.25 (2H; m); 7.46-7.51 (2H; m); 8.04 (1H; s); 8.88 (1H; s); 15.44 (1H; s).

MS (ESI): M^+ 448.

Ejemplo 2-2: Producción de cristal de forma II de compuesto A

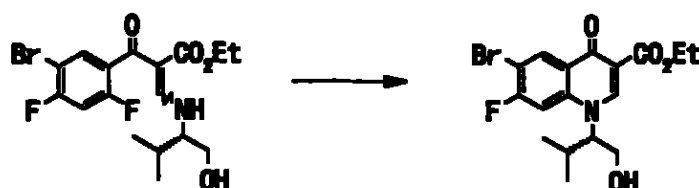
Etapas 1



El ácido 5-bromo-2,4-difluorobenzoico (82,7 kg, 349 mol) fue disuelto en tolueno (420 L), fue agregado cloruro de tionilo (62,3 kg; 523 mol) y dimetilformamida (cantidad catalizadora), y la mezcla fue agitada a 70°C por 6 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, fue concentrada bajo presión reducida, y azeotrópica de nuevo con tolueno (420 L). El residuo fue disuelto en tolueno (220 L), esta solución fue agregada por gotas a una solución de etil 3,3-dimetilaminoacrilato (55,0 kg, 384 mol) y diisopropiletilamina (58,6 kg; 523 mol) en tolueno (220 L), y la mezcla fue agitada con calentamiento a 70°C por 21 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, fue agregado (S)-(+)-valinol (36,0 kg; 349

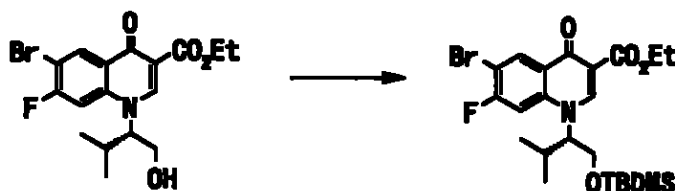
mol), y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 1,5 hr. Fue agregada agua (420 L) a la mezcla de reacción para permitir la división, y la capa orgánica fue lavada consecutivamente con 1N ácido clorhídrico (250 L, dos veces), agua (420 L), 5% carbonato de hidrógeno de sodio acuoso (250 L, dos veces), agua (420 L) y 10% solución salina (250 L). El extracto fue concentrado bajo presión reducida y destilada azeotrópicamente con dimetilformamida (420 L) para dar un residuo de la concentración (330 L) conteniendo un producto en bruto de etil éster de ácido 2-(5-bromo-2,4-difluorobenzoyl)-3-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropilmetilamino)acrílico.

Etapas 2



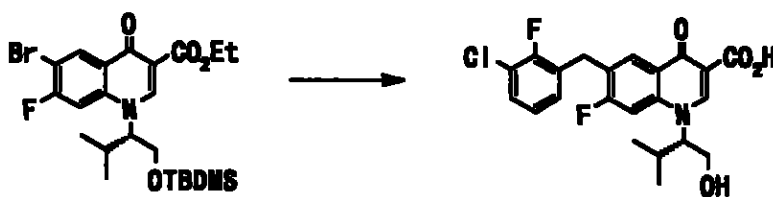
A una solución (330 L) del producto en bruto obtenido en Etapa 1 en dimetilformamida fue agregado 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undeceno (105 kg, 349 mol) y la mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 23 hr. A la mezcla de reacción se agregaron dimetilformamida (330 L), y entonces agua (170 L) y, después de agitación durante 2 hr, fue agregada agua (170 L) por gotas. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y fue lavado con mezcla dimetilformamida (170 L) agua (170 L), y entonces con una solución mezcla de etanol (460 L) agua (200 L). El sólido obtenido fue secado al vacío, suspendido en una mezcla acetato de etilo (330 L) n-heptano (330 L) y fue sometido a suspensión por lavado. La suspensión fue filtrada, y el sólido restante fue secado al vacío para dar etil éster de ácido 8-bromo-7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (102 kg, rendimiento 73%) como un sólido blanco amarillo. Este compuesto fue confirmado que era equivalente al producto normal del compuesto por análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Etapas 3



El compuesto (45,0 kg; 112 mol) que fue obtenido en la Etapa 2 e imidazol (9,95 kg; 146 mol) fue suspendido en tolueno (180 L), fue agregada una solución de cloruro de terc-butildimetilsililo (17.8 kg, 118 mol) en tolueno (45 L) a 50°C, y la mezcla fue agitada a la misma temperatura durante 3 hr. El tolueno (230 L) fue agregado a mezcla de reacción, y fue lavada consecutivamente con agua (450 L, dos veces) y 20% solución salina (450 L). El extracto fue concentrado bajo presión reducida y destilada azeotrópicamente con tetrahidrofurano (320 L) para dar un residuo de la concentración (390 L) conteniendo un producto en bruto de etil éster de ácido 6-bromo-1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico.

Etapa 4



(Preparación de una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilzinc en tetrahidrofurano)

Bajo una corriente de nitrógeno, polvo de zinc (18,8 kg; 287 mol) fue suspendido en tetrahidrofurano (130 L), fue agregado 1,2-dibromoetano (470 g; 2,50 mol) a 60°C, y la mezcla fue agitada a la misma temperatura durante 30 min. Fue agregado cloruro de trimetilsililo (560 g; 3,10 mol) a esta suspensión a la temperatura ambiente, y la mezcla fue agitada con calentamiento por 30 min. Una solución de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilo (54,0 kg; 242 mol) en tetrahidrofurano (65 L) fue agregada por gotas a 0°C, y la mezcla fue agitada a 20°C por 3 hr. El zinc restante fue eliminado por filtración para dar una solución de 1M de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilzinc en tetrahidrofurano. Esto fue utilizado en la etapa principal siguiente.

(Etapa principal).

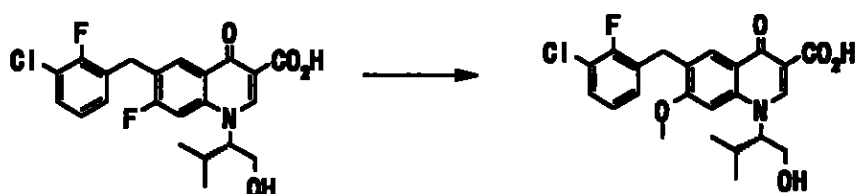
Bajo una corriente de nitrógeno, tris(dibencilidenacetona)dipaladio(0) (1,96 kg; 3,36 mol) y trifenilfosfina (1,77 kg; 6,72 mol) fueron disueltos en tetrahidrofurano (180 L), y la mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 1 hr. Una solución (390 L) del producto en bruto obtenido en Etapa 3 en tetrahidrofurano por gotas fue agregada a la temperatura ambiente y fue lavada con tetrahidrofurano (45 L). Una solución (164 kg, 157 mol) de 1M de bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilzinc indicado precedentemente en tetrahidrofurano preparada de antemano fue agregada por gotas a la temperatura ambiente, y la mezcla fue agitada con calentamiento a 55°C por 5 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a temperatura ambiente, fue agregado tolueno (230 L) y solución de 25% cloruro de amonio acuosa (230 L) y la mezcla fue agitada. Después de la filtración, la mezcla fue dividida. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con solución 25% de cloruro de amonio acuosa (230 L), agua (230 L), 5% de carbonato hidrógeno de sodio acuoso (230 L, 3 veces) y solución salina 10% (230 L). El extracto fue concentrado bajo presión reducida para dar un producto en bruto (80 L) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico como un aceite castaño.

Etapas 5

El producto en bruto (80 L) que fue obtenido en la Etapa 4 fue disuelto en isopropanol (180 L), fue agregada solución 1N de hidróxido de sodio acuosa (180 L, 180 mol), y la mezcla fue agitada con calentamiento a 50°C por 9 hr. Fue agregado carbón activado (4,5 kg) a la mezcla de reacción. La mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 30 min, fue filtrada a través de polvo de celulosa y fue lavada completamente con mezcla de isopropanol (45 L) agua (45 L). El agua (180 L) y n-heptano (230 L) fueron agregados al filtrado y, después de agitación, la mezcla fue dividida. La capa acuosa fue lavada nuevamente con n-heptano (230 L). Fueron agregados 4N ácido clorhídrico (45 L, 180 mol) y metil isopropil cetona (450 L) a la capa orgánica y, después de agitación, la mezcla fue dividida. La capa orgánica fue lavada

consecutivamente con solución salina 10% (230 L), dos veces con 8,5% carbonato de hidrógeno de sodio acuoso (230 L), 0,5N ácido clorhídrico (230 L) y agua (230 L). El extracto fue concentrado bajo presión reducida, azeotrópica 3 veces con tolueno (230 L). El residuo fue agitado a 100°C por 1,5 hr, le fue permitido enfriar a la temperatura ambiente y fue agitado por 3 hr. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y el sólido obtenido fue lavado con tolueno (45 L) y secado al vacío para dar ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (42,5 kg, rendimiento 87%) como un sólido amarillo pálido. Fue confirmado que este compuesto era equivalente al producto normal por análisis de HPLC.

Etapas 6



El compuesto (39,2 kg; 89,9 mol) que fue obtenido en la Etapa 5 fue disuelto en metanol (240 L), fue agregada solución 28% de metanol de metóxido de sodio (173 kg, 899 mol) por gotas a 10°C, y la mezcla fue agitada con calentamiento a 70°C por 21 hr. Fue agregado carbón activado (3,9 kg) a la mezcla de reacción. La mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 1 hr, fue filtrada a través de polvo de celulosa y fue lavada completamente con metanol (80 L). Fue agregada agua (29 kg, 1620 mol) al filtrado y la mezcla fue concentrada bajo presión reducida. El residuo era dos veces destilado azeotrópicamente con isopropanol (240 L, 120 L). Al residuo fue agregado solución salina 15% (200 L) y tolueno (200 L) y, después de agitación, la mezcla fue dividida. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con solución salina 20% (200 L, 3 veces), 0,5N ácido clorhídrico (200 L) conteniendo cloruro de sodio (10 kg) y solución salina 20% (200 L). La capa orgánica fue concentrada bajo presión reducida y

destilada azeotrópicamente con acetato de etilo (200 L). Fueron agregados acetato de etilo (320 L) y agua (200 L) al residuo y, después de agitación, la mezcla fue dividida. La capa orgánica fue concentrada dos veces bajo presión reducida y destilada azeotrópicamente con acetato de isobutilo (200 L). El residuo fue disuelto por calentamiento, fue filtrado mientras estaba caliente, y lavado completamente con acetato de isobutilo (20 L). Fue agregado un núcleo cristalino (cristal de forma II de compuesto A, 39 g) al filtrado a 60°C, y la mezcla fue agitada a la misma temperatura durante 1,5 hr. La mezcla fue agitada con calentamiento a 80°C por 2 hr, fue permitida enfriar a la temperatura ambiente y además fue agitada por 6 hr. El sólido precipitado fue recolectado por filtración. El sólido obtenido fue lavado con acetato de isobutilo (40 L) y secado al vacío para dar un cristal de compuesto A (cristal de forma II) (29,0 kg, rendimiento 72%) como un sólido blanco. Fue confirmado que este cristal era equivalente al producto normal del cristal (cristal de forma II de compuesto A que fue obtenido en el Ejemplo 2-1) por análisis HPLC y difractómetro de polvo con rayos X (XRPD).

Ejemplo 2-3: Producción de cristal de forma II de compuesto A

El cristal de forma II también puede ser producido por cristalización según los métodos descritos en los Ejemplos 2-3-1 a 2-3-26.

Ejemplo 2-3-1.

El compuesto A (200 mg) que fue obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en 1-butanol (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. La mezcla fue agitada por 17 hr permitiendo enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (125 mg, rendimiento 63%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-2.

El compuesto A (200 mg) que fue obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en acetato de butilo (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. La mezcla fue agitada por 17 hr

permitiendo enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (102 mg, rendimiento 51%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-3

5 El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en metil isobutil cetona (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. Fue agregado heptano (2 ml) por gotas y la mezcla fue agitada por 6 hr permitiendo enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (168 mg, rendimiento 84%) de compuesto A como un sólido blanco.

10 Ejemplo 2-3-4.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en etanol (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. La mezcla fue agitada por 17 hr permitiendo enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (56 mg, rendimiento 28%) de compuesto A como un sólido blanco.

15 Ejemplo 2-3-5.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en acetato de etilo (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. El heptano (1,6 ml) fue agregado por gotas y la mezcla fue agitada por 6 hr permitiendo enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (166 mg, rendimiento 83%) de compuesto A como un sólido blanco.

20

Ejemplo 2-3-6.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en metil etil cetona (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. Fue agregado heptano (4 ml) por gotas y la mezcla fue agitada por 6 hr permitiendo enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (123 mg, rendimiento 62%) de compuesto A como un sólido blanco.

25

Ejemplo 2-3-7.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en 1-propilalcohol (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. La mezcla fue agitada por 17 hr permitiendo enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (91 mg, rendimiento 46%) de compuesto A como un sólido blanco.

5 Ejemplo 2-3-8.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en isopropanol (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. La mezcla fue agitada por 17 hr permitiendo enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (88 mg, rendimiento 44%) de compuesto A como un sólido blanco.

10 Ejemplo 2-3-9.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en cumeno (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. La mezcla fue agitada por 17 hr permitiendo enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (188 mg, rendimiento 94%) de compuesto A como un sólido blanco.

15 Ejemplo 2-3-10.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en anisol (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. La mezcla fue agitada durante 17 hr permitiendo enfriar. El sólido precipitado fue recolectado mediante filtración y secado al vacío para producir de ésta manera un cristal de forma II (107 mg, rendimiento 54%) de compuesto A como un sólido blanco.

20 Ejemplo 2-3-11.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en acetona (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. El heptano (2 ml) fue agregado por gotas y la mezcla fue agitada por 16,5 hr mientras se permite enfriar. Fue agregado heptano (4 ml) adicional, y la mezcla fue agitada por 24 hr adicionales. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (134 mg, rendimiento 67%) de compuesto A como un sólido blanco.

25

Ejemplo 2-3-12.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en etanol (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. El heptano (4 ml) fue agregado por gotas y la mezcla fue agitada por 19 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (129 mg, rendimiento 65%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-13.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en isopropanol (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. El heptano (4 ml) fue agregado por gotas y la mezcla fue agitada por 19 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (166 mg, rendimiento 83%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-14.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en 1-propilalcohol (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. El heptano (4 ml) fue agregado por gotas y la mezcla fue agitada por 19 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (158 mg, rendimiento 79%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-15.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en isobutanol (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. La mezcla fue agitada por 21 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (131 mg, rendimiento 66%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-16.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en tolueno (2 ml) con calentamiento a 100°C. La mezcla fue agitada por 37 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de

forma II (190 mg, rendimiento 95%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-17.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en metil butil cetona (2 ml) con calentamiento a 60°C. El heptano (1,8 ml) fue agregado por gotas y la
5 mezcla fue agitada por 37 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (191 mg, rendimiento 96%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-18.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en cloroformo (1
10 ml) con calentamiento a 60°C. El isopropil éter (1.8 ml) fue agregado por gotas y la mezcla fue agitada por 37 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (184 mg, rendimiento 92%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-19.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en tetrahidrofurano (1 ml) calentando a 60°C. El isopropil éter (2 ml) fue agregado por
15 gotas y la mezcla fue agitada por 41 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (144 mg, rendimiento 72%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-20.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en isobutanol (2
20 ml) con calentamiento bajo reflujo. El heptano (2 ml) fue agregado por gotas y la mezcla fue agitada por 21 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (160 mg, rendimiento 80%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-21.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en butanol (2 ml)

con calentamiento bajo reflujo. El heptano (2 ml) fue agregado por gotas y la mezcla fue agitada por 21 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (152 mg, rendimiento 76%) de compuesto A como un sólido blanco.

5 Ejemplo 2-3-22.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en acetato de isobutilo (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. La mezcla fue agitada por 21 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (140 mg, rendimiento 70%) de compuesto A como un sólido
10 blanco.

Ejemplo 2-3-23.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en acetato de isobutilo (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. El heptano (2 ml) fue agregado por gotas y la mezcla fue agitada por 21 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue
15 recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (178 mg, rendimiento 89%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-24.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en acetato de butilo (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. El heptano (1,5 ml) fue agregado por gotas y
20 la mezcla fue agitada por 21 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (158 mg, rendimiento 78%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-25.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en anisol (2 ml)
25 calentando a 110°C. El heptano (2 ml) fue agregado por gotas y la mezcla fue agitada por 21 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (187 mg, rendimiento 89%) de compuesto

A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-3-26.

El compuesto A (200 mg) obtenido en el Ejemplo 1 fue disuelto en acetato de butilo (2 ml) con calentamiento bajo reflujo. Después de rápido enfriamiento, la mezcla
5 fue agitada por 2 hr. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para producir cristal de forma II (131 mg, rendimiento 66%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-4: Producción de cristal de forma II de compuesto A

Etapas 1

10 El etil éster de ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (48 g, 86 mmol) obtenido en el Ejemplo 1, Etapa 5 fue disuelto en metanol (300 ml), agua (5 ml) y fue agregada
15 solución de 28% metanol de metóxido de sodio (176 ml, 862 mmol), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 24 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, fue neutralizada con 6N de ácido clorhídrico y el metanol fue evaporado bajo presión reducida. Fue agregada agua a la solución obtenida y, después de agitación, el sólido precipitado fue recolectado por filtración. El sólido obtenido fue
20 disuelto en acetato de etilo, lavado con agua, y fue secado sobre sulfato de sodio. La mezcla fue filtrada y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida. El residuo obtenido fue recrystalizado del acetato de etilo-hexano para dar el compuesto A (cristal primario 29,5 g; cristal secundario 2,8 g; en total 32,3 g; rendimiento 86%) como un sólido blanco.

p.f. 151-152°C.

¹H RMN (DMSO-d₆ 300MHz) (δ) ppm: 0,72 (3H; d; J=6,5Hz); 1,16 (3H; d; J=6,5Hz);
25 2,30-2,50 (1H; m); 3,70-3,90 (1H; m); 3,90-4,00 (1H; m); 4,03 (3H; s); 4,12 (2H;s); 4,80-4,90 (1H; m); 5,19 (1H; t); 7,19-7,25 (2H; m); 7,46-7,51 (2H; m); 8,04(1H; s); 8,88 (1H; s); 15,44 (1H; s)

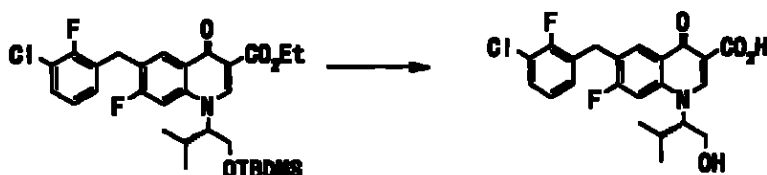
MS (ESI): M+ 448.

Etapas 2

El compuesto A (32,3 g) que fue obtenido en la Etapa 1 fue disuelto en acetato de butilo (160 ml) con calentamiento bajo reflujo. El cristal de forma II del Ejemplo 2 fue sembrado a 63°C y la mezcla fue agitada por 3 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar el cristal de compuesto A (cristal de forma II) (24,79 g; rendimiento 77%) como un sólido blanco.

Ejemplo 2-5: Producción de cristal de forma II de compuesto A

Etapas 1



El etil éster de ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (19 g, 33 mmol) obtenido en el Ejemplo 1, Etapa 5 fue disuelto en isopropanol (100 ml), fue agregada solución 1N de hidróxido de sodio acuosa (200 ml, 200 mmol), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 2,5 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, y la mezcla fue filtrada a través de Celite. El filtrado fue acidificado agregando ácido clorhídrico concentrado, y fue agitado a la temperatura ambiente durante 2 hr. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (12 g, rendimiento 82%) como un sólido amarillo pálido. ¹H RMN(DMSO-d₆ 400MHz) (δ)ppm: 0,71(3H; d; J=6,5Hz); 1,13(3H; d; J=8,5Hz); 2,36(1H; br); 3,77(1H; br); 3,94(1H; br); 4,25(2H; s); 4,77(1H; br); 5,16(1H; t; J=2,4Hz); 7,19-7,23(1H; m); 7,32-7,35(1H; m); 7,48-7,52(1H; m); 8,24-8,28(2H; m); 9,00(1H; s); 15,00(1H; s).

Etapas 2

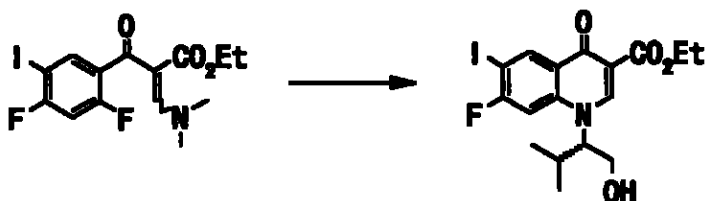


El compuesto (12 g, 27 mmol) que fue obtenido en la Etapa 1 fue disuelto en metanol (64 ml), fue agregada una solución 28% de metanol de metóxido de sodio (52 ml, 256 mmol), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 24 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente y fue filtrada a través de Celite. El filtrado fue concentrado bajo presión reducida. El residuo fue acidificado agregando agua (360 ml) y ácido clorhídrico concentrado, y fue extractado con acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con agua y solución salina saturada y fue secada sobre sulfato de sodio. La mezcla fue filtrada, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida para dar un producto en bruto (13 g) como un aceite castaño. El producto en bruto obtenido (13 g) fue disuelto en acetato de isobutilo (60 ml) calentando y, después del sembrado, la mezcla fue agitada por 23 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración, y secado al vacío para dar el compuesto A (9,2 g; rendimiento 75%) como un sólido blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆ 300MHz) (δ) ppm: 0,72 (3H; d; J=6,5Hz); 1,16 (3H; d; J=6,5Hz); 2,30-2,50 (1H; m); 3,70-3,90 (1H; m); 3,90-4,00 (1H; m); 4,03 (3H; s); 4,12 (2H;s); 4,80-4,90 (1H; m); 5,19 (1H; t); 7,19-7,25 (2H; m); 7,46-7,51 (2H; m); 8,04(1H; s); 8,88 (1H; s); 15,44 (1H; s)

MS (ESI): M+ 448.

Etapa 3



El etil éster de ácido 2-(2,4-Difluoro-5-iodobenzoyl)-3-dimetilaminoacrílico (20 g) obtenido en el Ejemplo 1, Etapa 2 fue sometido a suspensión por lavado con un

solvente mezcla de acetato de etilo (60 ml) y hexano (40 ml) y calentamiento bajo reflujo. La mezcla fue filtrada, y el sólido restante fue secado al vacío para dar etil éster de ácido 7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-6-iodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (18 g, rendimiento 94%) como un sólido beige.

¹H RMN(DMSO-d₆ 300MHz) (δ) ppm: 0,72(3H; d; J=6,6Hz); 1,10 (3H; d; J=6,6Hz); 1,28(3H; t; J=7,0Hz); 2,27 (1H; br); 3,77 (1H; br); 3,86(1H; br); 4,23 (2H; q; J=7,0Hz); 4,56(1H; br); 5,12 (1H; t; J=4,9Hz); 8,09(1H; d; J=11,1Hz); 8,62 (1H; d; J=7,5Hz); 8,68(1H; s).

MS(ESI): M+ 448.

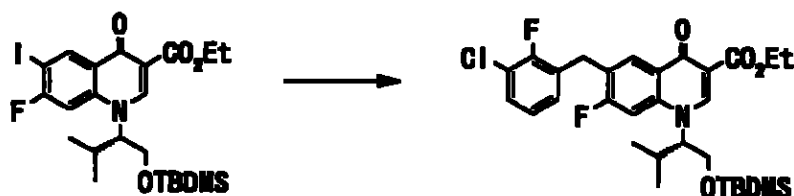
10 Etapas 4



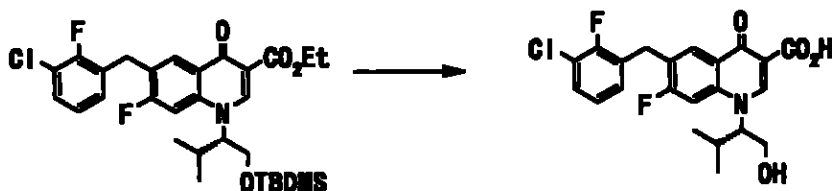
El compuesto (19 g, 42 mmol) que fue obtenido en la Etapa 3 fue disuelto en dimetilformamida (65 ml), fue agregado imidazol (3,4 g; 49,9 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (7,2 g; 47,8 mmol), y la mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 1,5 hr. Fue agregada agua a la mezcla de reacción, y la mezcla fue extractada con acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con agua, solución acuosa saturada de cloruro de amonio y solución salina saturada, y fue secada sobre sulfato de sodio. La capa orgánica fue filtrada, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida para dar un producto en bruto (24 g) de etil éster de ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-7-fluoro-6-iodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico como una forma amorfa beige.

¹H RMN(CDCl₃ 400MHz) (δ) ppm: -0,07(3H; s); -0,05(3H; s); 0,77(9H; s); 0,84(3H; d; J=6,5Hz); 1,18(3H; d; J=6,5Hz); 1,40(3H; t; J=7,2Hz); 2,35-2,50(1H; m); 3,85-3,95(1H; m); 3,98-4,10(2H; m); 4,30-4,40(2H; m); 7,26(1H; s); 8,64(1H; s); 8,94(1H; d; J=7,2Hz).

MS(ESI): M+ 562.

Etapas 5

El producto en bruto (24 g) que fue obtenido en la Etapa 4 fue disuelto en tetrahidrofurano (200 ml) y, bajo una corriente de argón, fue agregado dibencilidenacetonaaladio(II) (984 mg; 1,7 mmol) y trifurilfosfina (795 mg; 3,4 mmol) fueron agregados; y fue agregada una solución (56 ml; 56 mmol) de 1M bromuro de 3-cloro-2-fluorobencilzinc obtenido de la misma manera como en el Ejemplo 1, Etapa 5 en tetrahidrofurano por gotas a 60°C. Después de la realización del agregado por gotas, la mezcla fue agitada con calentamiento a la misma temperatura durante 2 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, fue agregada una solución acuosa saturada de cloruro de amonio, y fue filtrada a través de Celite, y el filtrado fue extractado dos veces con acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con agua (dos veces) y solución salina saturada, y fue secada sobre sulfato de magnesio. La capa orgánica fue filtrada, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida para dar un producto en bruto (30 g) de etil éster de ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsiloximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico como una pasta castaña.

Etapas 6

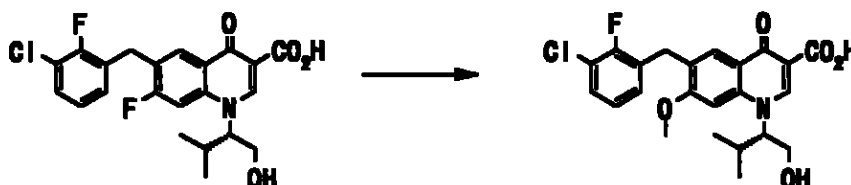
El producto en bruto (30 g) que fue obtenido en la Etapa 5 fue disuelto en isopropanol (150 ml), fue agregada 1N solución de hidróxido de sodio acuosa (300 ml, 300 mmol), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 2,5 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, y la mezcla fue filtrada a

través de Celite. El filtrado fue acidificado agregando ácido clorhídrico concentrado, y la mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 2 hr. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar un producto en bruto (18 g) como un sólido beige. El producto en bruto obtenido (18 g) fue suspendido en acetato de butilo (90 ml), y sometido a suspensión agitando con calentamiento bajo reflujo por 1 hr. A la suspensión se permitió enfriar a la temperatura ambiente, fue filtrada y limpiada con secada al vacío dar ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-1-((S)-1-hidroximetil-2-metilpropil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (11 g, rendimiento 62% (en relación a la Etapa 3)) como un sólido blanco.

¹H RMN(DMSO-d₆ 400MHz) (δ) ppm: 0,71 (3H; d; J=6,5Hz); 1,13 (3H; d; J=6,5Hz); 2,36 (1H; br); 3,77(1H; br); 3,94 (1H; br); 4,25 (2H; s); 4,77(1H; br); 5,16 (1H;t; J=2,4Hz); 7,19-7,23(1H; m); 7,32-7,35 (1H; m); 7,48-7,52(1H; m); 8,24-8,28 (2H, m); 9,00 (1H; s); 15,00 (1H; s)

MS(ESI): M+ 436.

Etapa 7



El compuesto (11 g, 26 mmol) que fue obtenido en la Etapa 6 fue disuelto en metanol (60 ml), fue agregada una solución 28% de metanol de metóxido de sodio (52 ml, 256 mmol), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 24 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente y fue filtrada a través de Celite, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida. El residuo fue acidificado agregando agua (330 ml) y ácido clorhídrico concentrado, y la mezcla fue extractada con acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada consecutivamente con agua y solución salina saturada, y fue secada sobre sulfato de sodio. La mezcla fue filtrada, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida para dar un producto en bruto (12 g) como un aceite

castaño. El producto en bruto obtenido (12 g) fue disuelto en acetato de isobutilo (60 ml) calentando bajo reflujo. Un núcleo cristalino (cristal de forma II de compuesto A) fue sembrado, y la mezcla fue agitada por 23 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para producir así el compuesto A (8,2 g; rendimiento 71%) como un sólido blanco.

^1H RMN (DMSO- d_6 300MHz) (δ) ppm: 0,72 (3H; d; $J=6,5\text{Hz}$); 1,16 (3H; d; $J=6,5\text{Hz}$); 2,30-2,50 (1H; m); 3,70-3,90 (1H; m); 3,90-4,00 (1H; m); 4,03 (3H; s); 4,12 (2H;s); 4,80-4,90 (1H; m); 5,19 (1H; t); 7,19-7,25 (2H; m); 7,46-7,51 (2H; m); 8,04(1H; s); 8,88 (1H; s); 15,44 (1H; s)

MS (ESI): M^+ 448

Etapas 8

El compuesto A (7,66 g) que fue obtenido en la Etapa 7 y compoene A (9,17 g) que fue obtenido en la Etapa 2 fue disuelto en acetato de isobutilo (84 ml) calentando bajo reflujo y la mezcla fue agitada por 16 hr mientras se permite enfriar. El sólido precipitado fue recolectado por filtración y secado al vacío para dar cristal de forma II (14,73 g, rendimiento 88%) de compuesto A como un sólido blanco.

Ejemplo 2-6: Producción de cristal de forma II de compuesto A

Etapas 1

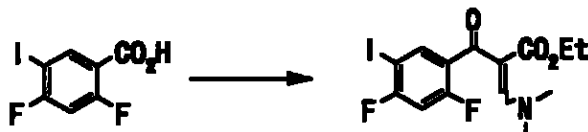


El ácido 2,4-difluorobenzoico (100 g, 633 mmol) fue disuelto en ácido trifluorometansulfónico (400 ml) y fue agregada N-iodosuccinimida (157 g, 696 mmol) por porciones a no más de 5°C. Después de la realización del agregado, la mezcla fue agitada a 50°C por 1,5 hr. La mezcla de reacción fue vertida en agua con hielo, y la mezcla fue agitada por 1 hr. El sólido precipitado fue recolectado por filtración, fue lavado consecutivamente con agua y hexano, y secado al vacío para dar ácido 2,4-

difluoro-5-iodobenzoico (179 g, rendimiento cuantitativo) como un sólido blanco.

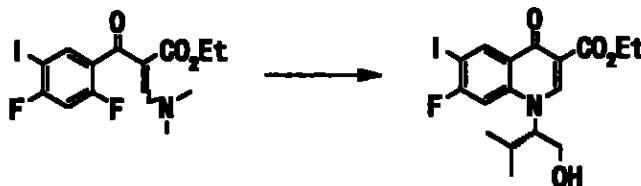
^1H RMN(CDCl_3 300MHz) (σ) ppm: 6,94(1H; dd; $J=10,3$; 10,3Hz); 8,46 (1H; d; $J=7,5\text{Hz}$).

Etapas 2



El compuesto (28 g; 100 mmol) que fue obtenido en la Etapa 1 fue disuelto en acetato de etilo (300 ml), fue agregado cloruro de oxalilo (11 ml, 122 mmol) y dimetilformamida (cantidad catalizadora), y la mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 2 hr. El filtrado fue concentrado bajo presión reducida y destilada azeotrópicamente con tolueno. El residuo fue disuelto en tetrahidrofurano (100 ml), esta solución fue agregada por gotas a una solución de etil 3,3-dimetilaminoacrilato (17 g, 120 mmol) y trietilamina (21 ml, 150 mmol) en tetrahidrofurano (100 ml), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 3 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar y fue agregado acetato de etilo (200 ml). La mezcla fue lavada consecutivamente con agua (dos veces) y solución salina saturada, y fue secada sobre sulfato de sodio. La mezcla fue filtrada y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida. El residuo obtenido fue sometido a suspensión agitando con un solvente mezcla de dietil éter (50 ml) y hexano (50 ml). La mezcla fue filtrada y el sólido restante fue secado al vacío para dar un producto en bruto (26 g, rendimiento 63%) de etil éster de ácido 2-(2,4-difluoro-5-iodobenzoyl)-3-dimetilaminoacrílico como un sólido amarillo.

Etapas 3



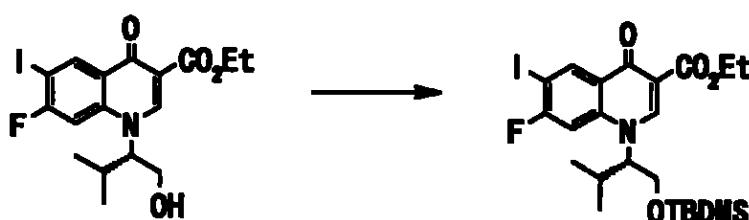
El producto en bruto (22 g, 55 mmol) que fue obtenido en la Etapa 2 fue disuelto en tetrahidrofurano (110 ml), fue agregado (S)-(+)-valinol (6,8 g; 65,8 mmol), y la mezcla fue agitada con calentamiento a 50°C por 30 min. La mezcla de reacción fue

concentrada bajo presión reducida, y el residuo fue disuelto en acetato de etilo (100 ml), lavado consecutivamente con agua y solución salina saturada, y fue secado sobre sulfato de magnesio. La mezcla fue filtrada y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida. El residuo obtenido fue disuelto en dimetilformamida (80 ml), fue agregado
 5 carbonato de potasio (19 g, 137 mmol), y la mezcla fue agitada con calentamiento a 60°C por 1,5 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente y fue concentrada bajo presión reducida. Fue agregada agua (250 ml) al residuo obtenido y la mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 30 min. El sólido precipitado fue recolectado por filtración. El sólido obtenido fue lavado
 10 consecutivamente con un solvente mezcla de agua (100 ml), acetato de etilo (10 ml) y hexano (40 ml) y secado al vacío para dar etil éster de ácido 7-fluoro-1-((S)-1-hidroxi-2-metilpropil)-6-iodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (22 g, rendimiento 88%) como un sólido amarillo pálido.

¹H RMN(DMSO-d₆ 300MHz) (δ) ppm: 0,72(3H; d; J=6,6Hz); 1,10 (3H; d; J=6,6Hz);
 15 1,28(3H; t; J=7,0Hz); 2,27 (1H; br); 3,77 (1H; br); 3,86(1H; br); 4,23 (2H; q; J=7,0Hz); 4,56(1H; br); 5,12 (1H; t; J=4,9Hz); 8,09(1H; d; J=11,1Hz); 8,62 (1H; d; J=7,5Hz); 8,68(1H; s).

MS(ESI): M+ 448.

Etapas 4



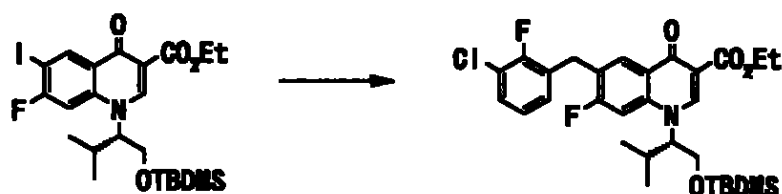
El compuesto (22 g, 48 mmol) que fue obtenido en la Etapa 3 fue disuelto en
 25 dimetilformamida (60 ml), fueron agregados imidazol (3,9 g; 57,7 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (8,0 g; 53,0 mmol), y la mezcla fue agitada a la temperatura ambiente durante 1,5 hr. La mezcla de reacción fue concentrada bajo presión reducida,

y el residuo obtenido fue disuelto en acetato de etilo (200 ml), lavado consecutivamente con agua (dos veces) y solución salina saturada, y fue secado sobre sulfato de sodio. La mezcla fue filtrada y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida. El residuo obtenido fue purificado por cromatografía de gel de sílice (acetato de etilo:hexano=3:7 a 4:6) para dar etil éster de ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-7-fluoro-6-iodo-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (25 g, rendimiento 92%) como una cera blanca.

^1H RMN(CDCl_3 400MHz) (δ) ppm: -0,07(3H; s); -0,05(3H; s); 0,77(9H; s); 0,84(3H; d; $J=6,5\text{Hz}$); 1,18(3H; d; $J=6,5\text{Hz}$); 1,40(3H; t; $J=7,2\text{Hz}$); 2,35-2,50(1H; m); 3,85-3,95(1H; m); 3,98-4,10(2H; m); 4,30-4,40(2H; m); 7,26(1H; s); 8,64(1H; s); 8,94(1H; d; $J=7,2\text{Hz}$).

MS(ESI): M^+ 562.

Etapas 5

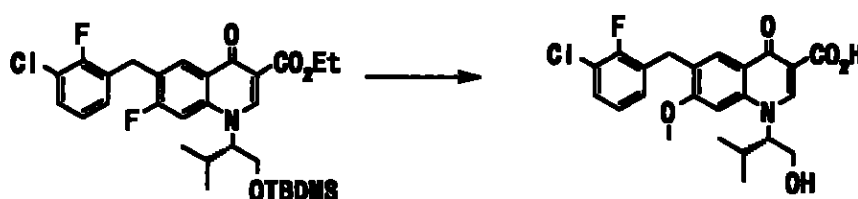


El compuesto (25 g, 44 mmol) que fue obtenido en la Etapa 4 fue disuelto en tetrahidrofurano (200 ml) y, bajo una corriente de argón, fueron agregados dibencilidenacetona paladio(II) (1,0 g; 1,8 mmol) y trifurilfosfina (824 mg; 3,5 mmol). Una solución (58 ml; 58 mmol) de 1M bromuro de 3-cloro-2-fluorobencil zinc obtenido de la misma manera como en el Ejemplo 1; Etapa 5 en tetrahidrofurano fue agregado por gotas a 60°C. Después de la realización del agregado por gotas, la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 3 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, fue agregado acetato de etilo (200 ml), lavada consecutivamente con 1N ácido clorhídrico, agua, carbonato hidrógeno de sodio acuoso saturado, agua y solución salina saturada, y fue secada sobre sulfato de sodio. La mezcla fue filtrada y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida. El residuo obtenido era purificado por cromatografía de gel de sílice (acetato de etilo:hexano=4:6 a 1:1) para dar etil éster de

ácido 1-((S)-1-terc-butildimetilsililoximetil-2-metilpropil)-6-(3-cloro-2-fluorobencil)-7-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (17 g, rendimiento 68%) como un aceite amarillo pálido.

¹H RMN(CDCl₃ 400MHz) (δ) ppm: -0,09(3H; s); -0,05(3H; s); 0,75(9H; s); 0,85(3H;d; J=6,7Hz); 1,18(3H; d; 6,7Hz); 1,39(3H; t; J=7,1Hz); 2,45(1H; br); 3,89-3,92(1H; m); 3,98-4,02(1H; m); 4,07-4,12(1H; m); 4,12(2H; s); 4,34-4,41(2H; m); 6,96-7,00(1H; m); 7,03-7,05(1H; m); 7,21-7,24(1H; m); 7,26-7,29(1H; m); 8,39(1H; d; J=8,8Hz); 8,63(1H; s),

Etapas 6



El compuesto (17 g, 30 mmol) que fue obtenido en la Etapa 5 fue disuelto en metanol (120 ml), fue agregada una solución 28% de metanol de metóxido de sodio (62 ml, 304 mmol), y la mezcla fue calentada bajo reflujo durante 19 hr. A la mezcla de reacción se le permitió enfriar a la temperatura ambiente, fue agregada agua (200 ml), y el metanol fue evaporada bajo presión reducida. El residuo fue acidificado agregando ácido clorhídrico concentrado, fue extractado con acetato de etilo, y fue secado sobre sulfato de sodio. La mezcla fue filtrada, y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida para dar un producto en bruto (14 g) de compuesto A como un aceite amarillo pálido.

Etapas 7

El Compuesto A (14,11 g) que fue obtenido en la Etapa 6 fue suspendido en un solvente mezcla de acetato de etilo (20 ml) y hexano (20 ml) a la temperatura ambiente, fue sembrado un núcleo cristalino (cristal de forma II de compuesto A), y la mezcla fue agitada por 1 hr. La suspensión fue filtrada, y el sólido restante fue secado al vacío para dar el compuesto A (cristal de forma II, 10,40 g, rendimiento 77%) como un sólido blanco.

Ejemplo 3: Producción del cristal de forma III compuesto A

Ejemplo 3-1: Producción de cristal forma III de compuesto A

El cristal de forma II de compuesto A (10,0 g; 22,3 mmol) obtenido en el Ejemplo 2-2 fue agregado al acetato de isobutilo (30 mL) y el cristal fue disuelto calentando bajo reflujo. La solución fue enfriada a 90°C, y fue agitada por 5 hr para permitir precipitación de cristales. A esta solución se le permitió enfriar a la temperatura ambiente adicionalmente, y además fue agitada por 12 hr. El cristal precipitado fue recolectado por filtración. El cristal obtenido fue lavado con acetato de isobutilo (10 mL) y secado al vacío para dar un cristal blanco (9,85 g, rendimiento 98,5%). Debido a que fue confirmado que este cristal es diferente del cristal de forma II por análisis XRPD, un cristal que presenta un gráfico XRPD (Fig. 1) como este cristal se toma como cristal de forma III.

Ejemplo 3-2: Producción de cristal forma III del compuesto A.

El cristal de forma II del compuesto A (250 g, 558 mmol) obtenido en el Ejemplo 2-2 fue agregado al acetato de isobutilo (750 mL). Un núcleo cristalino (12,5 g) del cristal de forma III de compuesto A obtenido en el Ejemplo 3 fue agregado a la temperatura ambiente y la mezcla fue agitada por 17 hr. El cristal precipitado fue recolectado por filtración. El cristal obtenido fue lavado con acetato de isobutilo (250 mL), y fue secado al vacío para dar un producto objeto (cristal de forma III, 259 g, rendimiento 98,6%) como un cristal blanco. Este cristal fue confirmado que era equivalente al producto normal del cristal (cristal de forma III de compuesto A obtenido en Ejemplo 3-1) por análisis XRPD.

Ejemplo 3-3: Producción de cristal forma III del compuesto A

El compuesto A (cristal de forma II, 10,0 g; 22,3 mmol) obtenido en el Ejemplo 2-2 fue agregado a isopropanol (30 mL), y la mezcla fue calentada bajo reflujo para disolver el cristal. La solución fue enfriada a 70°C, fue agregado un núcleo cristalino (10 mg) del cristal de forma III de compuesto A que fue obtenido en el Ejemplo 3-1, y la

mezcla fue agitada por 5 hr. A esta mezcla se le permite enfriar adicionalmente a la temperatura ambiente, fue agitada por 12 hr, y el cristal fue recolectado por filtración. El cristal obtenido fue lavado con isopropanol (10 mL), y secado al vacío para producir el producto objeto (cristal de forma III, 9,72 g, rendimiento 97,2%) como un cristal blanco.

5 Fue confirmado así que este cristal es equivalente al producto normal del cristal (cristal de forma III del compuesto A el cual fue obtenido en el Ejemplo 3-1) por medio de análisis XRPD.

Ejemplo 3-4: producción de cristal forma III del compuesto A

El cristal de forma II de compuesto A (7,00 g; 15,6 mmol) obtenido en el Ejemplo 2-2 fue agregado a una solución mezcla de etanol (52,5 mL) y agua (7 mL) y fue disuelta por calentamiento. Fue agregada agua (28 mL); fue agregado un núcleo cristalino (10 mg) del producto objeto a 70°C y la mezcla fue agitada por 4 hrs. Después de permitir enfriar a la temperatura ambiente, la mezcla fue enfrida con hielo y fue agitada adicionalmente por 2 hrs, y los cristales fueron recolectados por filtración.

10 Los cristales obtenidos fueron lavados con una solución mezcla de etanol fresco (8,4 mL) y agua (5,6 mL) y secados al vacío para dar el producto objeto como cristales blancos (cristal de forma III, 6,77 g, rendimiento 96,8%). Fue confirmado que este cristal es equivalente al producto normal (Ejemplo 3-1) por análisis de XRD.

Ejemplo experimental

20 Los valores de propiedad de cada cristal de forma fueron determinados por pruebas de análisis siguientes, y la prueba de estabilidad de cada cristal de forma fue realizada usándolos como índices.

Muestra

A menos que sea especificado de otra manera, el cristal mencionado (cristal de forma I) obtenido en el Ejemplo de referencia 1, el cristal (cristal de forma II) obtenido en el Ejemplo 1 y el cristal (cristal de forma III) obtenido en el Ejemplo 3-1 fueron utilizados como muestras.

25

Prueba de análisis

1. Difractometría de polvo con rayos X

Esta prueba apunta a obtener los modelos de difractómetro de polvo con rayos X para especificar el cristal de forma de los cristales obtenidos en el Ejemplo de referencia 1, Ejemplo 1 y Ejemplo 3-1. Los modelos de difracción fueron utilizados para especificar la forma del cristal, evaluar la estabilidad, para determinar la pureza y lo similar.

Una muestra fue fijada en una celda de aluminio, y la medición fue realizada utilizando un difractómetro de rayos X de polvo ("RINT 2000/PC Ultima⁺", fabricados por "Rigaku Corporation", fuente de rayos X: rayo Cu-K α 1, tensión del tubo: 40 kV, corriente eléctrica del tubo: 40 mA, velocidad de exploración: 5° por min, ancho de paso: 0,02°, ángulo de difracción: 5-40°), basándose en lo anterior, fueron obtenidos los modelos de difracción. Los modelos de difracción obtenidos se ilustran en la Fig. 1.

Según se ilustra en la Fig. 1, los modelos de difractómetro de polvo con rayos X obtenidos de las muestras respectivas eran diferentes.

Por lo tanto se confirma que los cristales obtenidos en el Ejemplo de Referencia 1, Ejemplo 1 y Ejemplo 3-1 eran distintos entre sí, y presenta los modelos de difracción característicos según se ilustra en el modelo de difracción de polvo con rayos X. Por consiguiente, en la presente descripción, son nombrados como cristal de forma I, cristal de forma II y cristal de forma III, basados en éstos modelos de difractómetro de polvo con rayos X.

Para la especificación del cristal de forma, la característica de difracción máxima de cada cristal puede evaluarse de una manera comprensiva basada en el gráfico de difracción en la Fig. 1.

La difracción principal alcanza el máximo y las crestas de difracción características son especificadas de los modelos de difracción en la Fig. 1 que se ilustra más adelante.

[cristal de forma I]

Cresta de difracción principal: $2\theta=6,58; 14,40; 14,64; 15,24; 16,48; 19,16; 20,90; 21,14; 22,24; 24,74; 25,64; 26,12; 27,20^\circ$;

Cresta de difracción característica: $2\theta=6,58; 14,40; 19,16; 20,90; 21,14^\circ$;

[cristal de forma II]

5 Cresta de difracción principal: $2\theta=6,56; 9,04; 13,20; 14,62; 15,24; 16,48; 19,86; 20,84; 21,22; 22,24; 25,22; 25,96; 26,12; 27,34^\circ$;

Cresta de difracción característica: $2\theta=6,56; 13,20; 19,86; 20,84; 21,22; 25,22^\circ$;

[cristal de forma III]

10 Cresta de difracción principal: $2\theta=8,54; 14,02; 15,68; 15,90; 16,00; 17,06; 17,24; 17,84; 18,12; 19,50; 19,90; 22,26; 22,68; 23,02; 24,16; 24,76; 25,18; 25,74; 25,98; 27,50; 28,80; 30,38; 30,72; 32,54^\circ$.

Cresta de difracción característica: $2\theta=8,54; 14,02; 15,68; 17,06; 17,24; 24,16; 25,74^\circ$;

2. Análisis térmico

15 Esta prueba apunta a la medición de la entalpía y la temperatura de comienzo extrapolada a una cresta endotérmica en medición de la curva por Calorimetría de exploración diferencial (DSC). Estos valores están entre los índices de estabilidad de los cristales indicados precedentemente cristal de forma I, cristal de forma II y cristal de forma III, y pueden usarse como un índice para especificar la forma del cristal.

20 2.1. Entalpía y temperatura de comienzo extrapolada del cristal de forma I y cristal de forma II.

El cristal de forma I y cristal de forma II fue sometido a medición usando un aparato de medición de Calorimetría de exploración diferencial (DSC) (DSC8240, fabricado por "Rigaku Corporation"), bajo atmósfera, muestra de medición 5 ± 1 mg, proporción de elevación de temperatura: $10^\circ\text{C}/\text{min}$, cacerola de aluminio abierta, y óxido de alúmina como referencia. Fue determinada la entalpía y la temperatura de comienzo extrapolada en una cresta endotérmica en la curva de DSC.

2.2. Entalpía y temperatura de comienzo extrapolada del cristal de forma III

El cristal de forma III fue sometido a medición usando un aparato de medición DSC (DSC8240, fabricado por Rigaku Corporation), bajo atmósfera, medida de muestra 5,0±0,5 mg, proporción de elevación de temperatura: 5°C/min, cacerola cerrada de aluminio, y óxido de alúmina como referencia. Fue determinada la entalpía y la temperatura de comienzo extrapolada en una cresta endotérmica de la curva DSC.

Los resultados se ilustran en la Tabla 1.

Tabla 1

Curva DSC en la cresta endotérmica de entalpía y temperatura de comienzo extrapolada

Forma de cristal	Cresta endotérmica	
	Entalpía (J/g)	Temperatura de comienzo extrapolada (°C)
cristal de forma I	51,080	150,3
cristal de forma II	53,542	151,2
cristal de forma III	81,404	162,1

Según se ilustra en la Tabla 1, el cristal de forma III demuestra una temperatura de comienzo extrapolada superior y entalpía más elevada en comparación con cristal de forma I y cristal de forma II. Así, fue confirmado que el cristal de forma III es de una forma más estable.

3. Prueba de pureza

Esta prueba apunta a la medición de la pureza de compuesto A. La pureza puede ser usada como índices de estabilidad química.

3.1. Pureza de compuesto del cristal de forma I y cristal de forma II

Cada muestra (cristal de forma I y cristal de forma II, aproximadamente 10 mg) fue disuelta en acetonitrilo para hacer una cantidad 10 mL y fue utilizada como solución de muestra. Esta solución (10 mL) fue aplicada a la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) bajo las condiciones siguientes. El área máxima de cada solución de muestra fue medida por integración automática, y la pureza fue determinada por la fórmula siguiente. La pureza se ilustra en las Tablas 5 y 6 a continuación.

$$\text{Pureza (\%)} = 100 - (A_{\text{sum}}/A_{\text{s}}) \times 100$$

A_s: área total máxima de crestas obtenidas de la solución de muestra.

A_{sum}: área máxima total de crestas distintas de la cresta principal obtenida de la solución de muestra.

Condiciones de prueba

Detector: medidor de absorción de UV (longitud de onda: 259 nm)

Columna: "CAPCELL PAK MG" (diámetro interno 4,6 cm, longitud 15 cm, dimensión de partículas 5 μm, fabricado por Shiseido Co., Ltd.

Temperatura de columna: temperatura constante alrededor de 40°C

Fase móvil A: solución de ácido trifluoracético (1:1000)

Fase móvil B: solución de ácido trifluoracético en acetonitrilo (1:1000).

Programa gradiente: Según lo ilustrado en la Tabla 2 siguiente, la proporción de mezcla de fase móvil A y fase móvil B cambia para controlar el gradiente de concentración.

Tabla 2

Tiempo (min) después de inyección	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	55	45

0-5	55→52	45→48
5-15	52	48
15-25	52→20	48→80
25-35	20	80
35-36	20→55	80→45
36-45	55	45

Caudal: 1mL/min

3.2. Pureza de compuesto del cristal de forma III

Una muestra (cristal de forma III, aproximadamente 50 mg) fue disuelto en una mezcla (4:1) de fase móvil B y fase móvil A para hacer una cantidad de 50 mL que fue utilizada como una solución de muestra. Esta solución (1 mL) fue medida precisamente y una mezcla (4:1) de la fase móvil B y fase móvil A fue agregada para hacer una cantidad de 100 mL que fue utilizada como una solución normal precisa. La solución de muestra y la solución normal (15 µL) fueron aplicadas a la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) bajo las condiciones siguientes. El área máxima de cada solución fue medida por integración automática, y la pureza fue determinada por la fórmula siguiente. La pureza se ilustra en la Tabla 7 a continuación.

Pureza (%) = 100 - (A_{sum}/A_r)

- A_r: área máxima de cresta principal obtenida de la solución normal.
- A_{sum}: área máxima total de crestas distintas de la cresta principal obtenida de la solución de muestra.

Condiciones de prueba

- Detector: medidor de absorción de UV (longitud de onda de medición: 259 nm).
- Columna: "Waters Xterra MC C18" (diámetro interno 4,6 cm, longitud 5 cm, diámetro de partículas 2,5 µm, fabricado por Waters).

Temperatura de columna: temperatura constante aprox. 40°C.

Fase móvil A: ácido fosfórico se agrega a solución de hidrogenfosfato de dipotasio (1→1149) para ajustar pH a 7,0.

Fase móvil B: acetonitrilo.

5 Programa gradiente: Según lo ilustrado en la Tabla 3 siguiente, la proporción de la mezcla de fase móvil A y la fase móvil B cambia para controlar el graiente de concentración.

10

Tabla 3

Tiempo (min) después de inyección	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0-15	58	42
15-35	58→20	42→80
35-45	20	80
45-46	20→58	80→42
46-55	58	42

Caudal: 0,9 mL/min

4. Prueba de solubilidad

15 Esta prueba apunta a la medición de la solubilidad del cristal en las diversas soluciones de prueba y bajo diversos pH. La solubilidad es uno de los índices de estabilidad del cristal de forma I, cristal de forma II y cristal de forma III indicado precedentemente y también puede ser utilizado como indices de referencia de absorbabilidad de la forma de cristal por los organismos vivientes.

20 Cada muestra (cristal de forma I, cristal de forma II y cristal de forma III, aproximadamente 10 mg) fue colocada en un tubo centrífugo de 10 mL junto con la

solución de prueba siguiente (5 mL) y fueron agitados con un agitador (SR-1M; fabricado por Tietech Co., Ltd.) por 14 hr. Después de la agitación, la mezcla fue centrifugada (3000 rpm, 20 min) y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de disco de politetrafluoroetileno de 0,2 µm tamaño de poro - 13 mm de diámetro (Millex-LG; fabricado por Corporación de Millipore). La medida fue realizada por la cromatografía líquida de rendimiento elevado (HPLC). Los resultados se ilustran en Tabla 4.

Tabla 4 Prueba de solubilidad

Solución de prueba	pH	Solubilidad (µg/mL)	
		Cristal tipo II	Cristal tipo III
Agua purificada	-	0,5	< 0,1
Farmacopea Japonesa Primer fluido ¹⁾	1,2	0,9	< 0,1
Farmacopea Japonesa Segundo fluido ²⁾	6,8	5,8	2,4
McIlvaine ³⁾	2,2	1,9	< 0,1
	4	0,8	< 0,1
	5	0,4	< 0,1
	6	1,0	0,7
	6,8	6,3	0,7
	8	84	23

¹⁾ Farmacopea Japonesa, Método de prueba general, Método de Prueba de desintegración, Primer fluido. El ácido clorhídrico (7,0 mL) y agua fueron agregados al cloruro de sodio (2,0 g) para hacer una cantidad de 1000 mL. Esta solución es transparente e incolora y tiene un pH de aproximadamente 1,2.

2) Farmacopea japonesa, Método de prueba general, Método de Prueba de desintegración, Segundo fluido. Muestra de hidróxido de sodio de 0,2 mol/L (118 mL) y fue agregada agua a 0,2 mol/L muestra fosfato potasio disodio (250 mL) para hacer una cantidad de 1000 mL. Esta solución es transparente e incolora y tiene un pH de aproximadamente 6,8.

3) Amortiguador de McIlvaina obtenido mezclando hidrogenfosfato de disodio y ácido cítrico en una proporción determinada para ajustar a un pH determinado.

De los resultados indicados precedentemente, se confirma que el cristal de forma II posee la solubilidad más alta que el cristal de forma III.

5. Prueba de estabilidad

Una prueba de estabilidad de cada muestra fue realizada bajo las condiciones de preservación siguientes. Los resultados del cristal de forma I se ilustran en Tabla 5, los resultados del cristal de forma II se ilustran en Tabla 6, y los resultados del cristal de forma III en Tabla 7.

Según se ilustran en Tabla 6 y Tabla 7, el cristal de forma II y cristal de forma III no demuestran ninguna diferencia en los resultados prueba bajo ambas condiciones de preservación, en comparación a la muestra inicial. En contraste, según se ilustra en Tabla 5, el cristal de forma I presenta cambios en el modelo de difracción de polvo con rayos X obtenido de la muestra después de preservación bajo condiciones de preservación N° 3 (80°C, preservación en recipiente abierto durante 3 días) y condiciones de preservación N° 5 (60°C, preservación en un recipiente abierto durante 3 semanas), y el modelo de difracción de polvo con rayos X del cristal de forma I fue observado por solaparse con el modelo de difracción de polvo con rayos X derivado del cristal de forma II. Así, se ha evaluado que una parte de la muestra presentó una transición de cristal para cristal de forma II durante la preservación. Los modelos de difracción de polvo con rayos X de la muestra de preservación de muestras bajo condiciones de preservación N° 1-6 del cristal de forma I se ilustran en la Fig. 2.

Tabla 5

Resultados de prueba de estabilidad del cristal de forma I

Condiciones de preservación		Aspecto	Pureza	XRD	Análisis térmico
1	inicial	-	99,1%	Modelo de difracción del cristal de forma I	Cresta endotérmica (temperatura de comienzo extrapolada 150,3°C)
2	80°C recipiente cerrado Preservado por 3 días	Sin cambio en aspecto	99,1%	Sin cambio en modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC
3	80°C recipiente abierto Preservado por 3 días	Sin cambio en aspecto	99,1%	Superposición de modelo de difracciones of tipo I cristal and tipo II cristal	Sin cambio en curva DSC
4	60°C Recipiente cerrado Preservado por 3 semanas	Sin cambio en aspecto	99,1%	sin cambio en ^o modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC
5	60°C	Sin cambio	99,1%	Superposición	Sin cambio en

	Recipiente abierto Preservado por 3 semanas	en aspecto		de modelo de difracción del cristal de forma I y cristal de forma II	curva DSC
6	60°C/75% H.R. Recipiente abierto Preservado por 3 semanas	Sin cambio en aspecto	99.1%	Sin cambio en modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC

H.R.: humedad relativa

Tabla 6

Resultados de prueba de estabilidad del cristal de forma II

Condiciones de preservación		Aspecto	Pureza	XRD	Análisis térmico
1	Inicial	-	98,9%	Modelo de difracción del cristal de forma II	Cresta endotérmica (temperatura de comienzo extrapolada 151,2°C)
2	80°C Envase cerrado Preservado	Sin cambio en aspecto	98,9%	Sin cambio en modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC

	por 3 días				
3	80°C Envase abierto Preservado por 3 días	Sin cambio en aspecto	98,8%	Sin cambio en modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC
4	60°C Envase cerrado Preservado por 3 semanas	Sin cambio en aspecto	98,9%	Sin cambio en modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC
5	60°C Envase abierto Preservado por 3 semanas	Sin cambio en aspecto	98,8%	Sin cambio en modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC
6	60°C/75%H.R. Envase abierto Preservado por 3 semanas	Sin cambio en aspecto	98,9%	Sin cambio en modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC

H.R. : humedad relativa

Tabla 7

Resultados de prueba de estabilidad del cristal de forma III

Condiciones de preservación		Aspecto	Pureza	XRD	Análisis térmico
1	Inicial	-	98,71%	Modelo de difracción del cristal de forma III	cresta endotérmica (temperatura inicial de fundición por extrapolación 162,1°C)
2	80°C Recipiente cerrado Preservado por 3 días	Sin cambio en aspecto	98,68%	Sin cambio en modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC
3	80°C Recipiente abierto Preservado por 3 días	Sin cambio en aspecto	98,69%	Sin cambio en modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC
4	60°C Recipiente cerrado Preservado por 3	Sin cambio en aspecto	98,67%	Sin cambio en modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC

	semanas				
5	60°C Recipiente abierto Preservado por 3 semanas	Sin cambio en aspecto	98,66%	Sin cambio en modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC
6	60°C/75% H.R. Recipiente abierto Preservado por 3 semanas	Sin cambio en aspecto	98,65%	Sin cambio en modelo de difracción	Sin cambio en curva DSC

H.R.: humedad relativa

De los resultados de prueba de estabilidad indicada precedentemente, fue observado que el cristal de forma I era inestable pero el cristal de forma II y el cristal de forma III eran sumamente estables bajo las diversas condiciones de preservación. Por consiguiente, fue evidenciado que el cristal de forma II y el cristal de forma III son preferible para la utilización como un producto farmacéutico y lo similar.

En cuanto a absorbabilidad por los organismos vivos, el cristal de forma II es más preferible, y el cristal de forma III es más preferible porque es el cristal más estable.

Debido a que el cristal de forma II y el cristal de forma III son ambos estables, un cristal mezcla de los mismos puede ser utilizado para la presente invención.

Ejemplo experimental

Lo siguiente explica los métodos de evaluación de la actividad inhibitoria de integrasa de VIH de un cristal o un cristal mezcla de compuesto A de la presente invención.

(i) Construcción de sistema de expresión de gen integrasa recombinante

La fenilalanina 185 de gen de longitud completa de integrasa de VIH ("J. Virol.", 67, 425-437 (1993)) fue sustituida por histidina y fue insertada en la enzima de restricción NdeI y sitios XhoI del plásmido pET21a(+) (fabricado por Novagen), por lo cual se construyó un vector de expresión de integrasa pET21a-IN-F185H.

(ii) Producción y purificación de proteína de integrasa

Escherichia coli recombinante BL21(DE3) transformado con plásmido pET21a-IN-F185H obtenido en (i) fue cultivado con agitación a 30°C en un medio líquido que contiene ampicilina. Cuando el cultivo alcanzó la fase de crecimiento logarítmica, fue agregado isopropil-β-D-tiogalactopiranosida para promover expresión de gen integrasa. El cultivo fue continuado por 3 hr para promover acumulación de proteína de integrasa. El E coli. recombinante fue recolectado en nódulos por separación centrífuga y fueron conservados a -80°C.

El E coli. fue suspendido en solución amortiguadora de Lysis (20 mM HEPES (pH 7,5), 5 mM DTT, 10 mM CHAPS, 10% glicerol) conteniendo 1M cloruro de sodio y sometido a presurización y despresurización repetida para ruptura, y separación centrífuga a 4°C, 40.000'G, 60 min para recuperar un fragmento soluble en agua (sobrenadante). Éste fue diluido 10 veces con solución amortiguadora de Lysis libre de cloruro de sodio, mezclado con PV-Sefarosa (fabricado por Pharmacia Corp.) y fue agitado a 4°C por 60 min para permitir adsorción de proteína integrasa a la resina. La resina fue lavada con solución amortiguadora de Lysis que contiene 100 mM de cloruro de sodio y la proteína de integrasa fue eluída con solución amortiguadora de Lysis que contiene 1M de cloruro de sodio.

La solución proteína integrase eluída fue aplicada a una columna "Superdex 75" (Pharmacia Corporation) para filtración de gel. La proteína fue eluída con solución amortiguadora de Lysis que contiene 1M cloruro de sodio.

Las fracciones obtenidas de la proteína de integrasa fueron recolectadas y conservadas a -80°C.

(iii) Preparación de solución de ADN

El ADN siguiente sintetizado por Greiner fue disuelto en solución amortiguadora TE (10 mM ácido Tris-clorhídrico (pH 8,0), 1 mM EDTA) y mezclado con ADN donador, ADN objetivo, y cada hebra complementaria (hebras + y -) a 1 µM. La mezcla fue calentada a 95°C por 5 min, 80°C por 10 min, 70°C por 10 min, 60°C por 10 min, 50°C por 10 min y 40°C por 10 min y conservado a 25°C para dar un ADN de doble hebra, que fue utilizado para la prueba.

ADN donador (hebra - que tiene biotina unida en término 5')

hebra + donador: 5'-Biotin-ACC CTT TTA GTC AGT GTG GAA AAT CTC TAG CA-3' (SEQ ID NO:1).

hebra - donador: 5'-ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAC TGA CTA AAA G-3' (SEQ ID NO:2)

ADN objetivo (+, ambas hebras - poseen digoxigenina agregada en término 3')

hebra + objetivo: 5'-TGA CCA AGG GCT AAT TCA CT-Dig-3' (SEQ ID NO:3)

hebra - objetivo: 5'-AGT GAA TTA GCC CTT GGT CA-Dig-3' (SEQ ID NO:4)

(iv) Determinación de la actividad inhibitoria de enzima (integrasa de VIH)

5 El ADN donador fue diluido con solución amortiguadora de TE a 10 nM, de lo cual 50 ml fueron agregados a cada hendidura de placa de microtitulación recubierta de estreptavidina (fabricada por Roche) y se permite adsorber a 37°C por 60 min. El ADN fue lavado entonces con solución amortiguadora de fosfato (Dulbecco PBS, Sanko Junyaku Co., Ltd.) conteniendo 0,1% Tween 20 y solución amortiguadora de fosfato.
10 Entonces, una mezcla de reacción (70 µl, ver lo siguiente * para la composición), una sustancia de prueba (10 µl) diluida con la mezcla de reacción y 100 µg/ml de proteína de integrasa (10 µl) fueron agregadas a cada hendidura y se hizo reaccionar a 37°C por 60 min.

Entonces, fueron agregados 50 nM de ADN objetivo (10 µl), se hicieron
15 reaccionar a 37°C por 10 min y fueron lavados con una solución amortiguadora de fosfato que contiene 0,1% de Tween 20 para detener la reacción.

Entonces, 100 mU/ml de la solución de anticuerpo anti-digoxigenina etiquetada con peroxidasa (fabricada por Roche, 100 µl) fueron agregados, y la mezcla se hizo reaccionar a 37°C por 60 min, seguido de lavando con solución amortiguadora de
20 fosfato que contiene 0,1% de Tween 20.

Una solución coloración de peroxidasa (fabricada por Bio Rad, 100 µl) fueron agregados y se permitió reaccionar a la temperatura ambiente durante 4 min. La reacción de coloración se detuvo agregando 1N ácido sulfúrico (100 µl). La absorbencia fue medida a 450 nm.

25 La actividad inhibitoria de integrasa de VIH (IC₅₀) del compuesto A de la presente invención fue calculado de la proporción de inhibición según la fórmula siguiente. Los resultados se ilustran en Tabla 8.

Relación de

inhibición (%) = [1-(Objetivo-blanco)/(Control-blanco)] × 100

- 5
- Objetivo; absorbencia de hendidura en presencia de compuesto de prueba.**

Control; absorbencia de hendidura en ausencia de compuesto de prueba.

Blanco; absorbencia de hendidura en ausencia de compuesto de prueba, en ausencia de proteína de integrasa.

- 10
- *Composición de la mezcla de reacción: 30 mM**

ácido de morfolinopropansulfónico (MOPS), 5 mM MgCl₂,

3 mM de ditioneitol (DTT), 0,1 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA), 5% de

glicerol, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,01% de Tween 20.

Tabla 8

Compuesto No.	Actividad de enzima IC₅₀ (μM)
Compuesto A	0,0029

- 15
- Evaluación de actividad antiviral**

El efecto de uso combinado de un cristal o un cristal mezcla de compuesto A de la presente invención y los agentes anti-VIH existentes puede ser determinado de la manera siguiente.

- 20
- Por ejemplo, el efecto de la utilización combinado de dos agentes inhibidores de transcriptasa inversa de nucleósido existentes (zidovudina, lamivudina, tenofovir), inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósido (efavirenz) o inhibidores de proteasa (indinavir, nelfinavir) y un cristal o un cristal mezcla de compuesto A y lo similar es evaluado por un método XTT utilizando células CEM-S infectadas con VIH-1 IIIB.**

- 25
- Adicionalmente, es evaluado el efecto de la utilización combinado de tres**

agentes de un cristal o un cristal mezcla de compuesto A, zidovudina y lamivudina, o un cristal o un cristal mezcla de compuesto A, tenofovir y lamivudina, y lo similar.

Antes de la prueba de la utilización combinado, es medido el IC₅₀ y CC₅₀ de cada agente farmacéutico solo. Unas 5 concentraciones de agente farmacéutico "a" y 9 concentraciones de agente farmacéutico "b", determinadas basándose en estos resultados, fueron combinadas para evaluar el efecto de la utilización combinado de dos agentes. Para la utilización combinada de tres agentes, una alta concentración del agente farmacéutico b y un agente farmacéutico c son mezclados mixto y un agente farmacéutico a y la concentración son combinados para evaluación.

Los resultados prueba del cristal o cristal mezcla de compuesto A y droga de combinación sola o en combinación es analizado basado en los programas de Prichard y Shipman "MacSynergy II" versión 2.01 y "Deltagraph" versión 1.5d.

Un trazado tridimensional es dibujado de % de inhibición a las concentraciones de cada agente farmacéutico combinado, obtenidos de 3 veces de pruebas, con 95% de límite de confianza (o 68%, 99%), y es evaluado el efecto de la utilización combinada basado en los valores numéricos de $\mu M^2\%$ calculado de los mismos. El criterio de evaluación se ilustra a continuación.

Definición de interacción $\mu M^2\%$	
Acción sinérgica fuerte	>100
Acción sinérgica ligera	+51 - +100
Acción aditiva	+50 - -50
Acción antagónica ligera	-51 - -100
Acción antagónica fuerte	<-100

Aplicabilidad industrial

El cristal de compuesto A de la presente invención que tiene un cristal de forma particular indicada precedentemente presenta un efecto anti-VIH así como una estabilidad de cristal superior. Por consiguiente, es útil como material de comienzo de

una composición farmacéutica, particularmente, diversas composiciones farmacéuticas para profilaxis y/o tratamiento de SIDA.

REIVINDICACIONES

1. Un cristal (cristal de forma II) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico, caracterizado por que posee un modelo de difracción de polvo con rayos X que posee crestas de difracción característica en ángulos de difracción $2\theta(^{\circ})$ de 6,56; 13,20; 19,86; 20,84; 21,22; 25,22° medido por difractómetro de polvo con rayos X.

2. Un cristal (cristal de forma III) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico, caracterizado por que posee un modelo de difracción de polvo con rayos X que posee crestas de difracción característica en ángulos de difracción $2\theta(^{\circ})$ de 8,54; 14,02; 15,68; 17,06; 17,24; 24,16; 25,74° medido por difractómetro de polvo con rayos X.

3. Un cristal (cristal de forma III) de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico, caracterizado por que posee una temperatura de comienzo extrapolada de $162,1 \pm 5,0^{\circ}\text{C}$.

4. Un cristal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que posee una pureza de cristal no menor de 70%.

5. Un cristal mezcla caracterizado por que comprende el cristal de acuerdo con la reivindicación 1 y el cristal de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3.

6. Un cristal mezcla de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que la pureza de cristal no es inferior de 70%.

7. Una composición farmacéutica caracterizada por que comprende un cristal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó el cristal mezcla de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Un inhibidor de integrasa caracterizado por que comprende el cristal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó el cristal mezcla de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6 como ingrediente activo.

9. Un agente antiviral caracterizado por que comprende el cristal de acuerdo

con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó el cristal mezcla de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6 como ingrediente activo.

5 10. Un agente anti-VIH caracterizado por que comprende un cristal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó el cristal mezcla de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6 como un ingrediente activo.

11. Una composición anti-VIH caracterizada por que comprende un cristal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó el cristal mezcla de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6 y uno ó más tipos de otros productos activos anti-VIH como ingredientes activos.

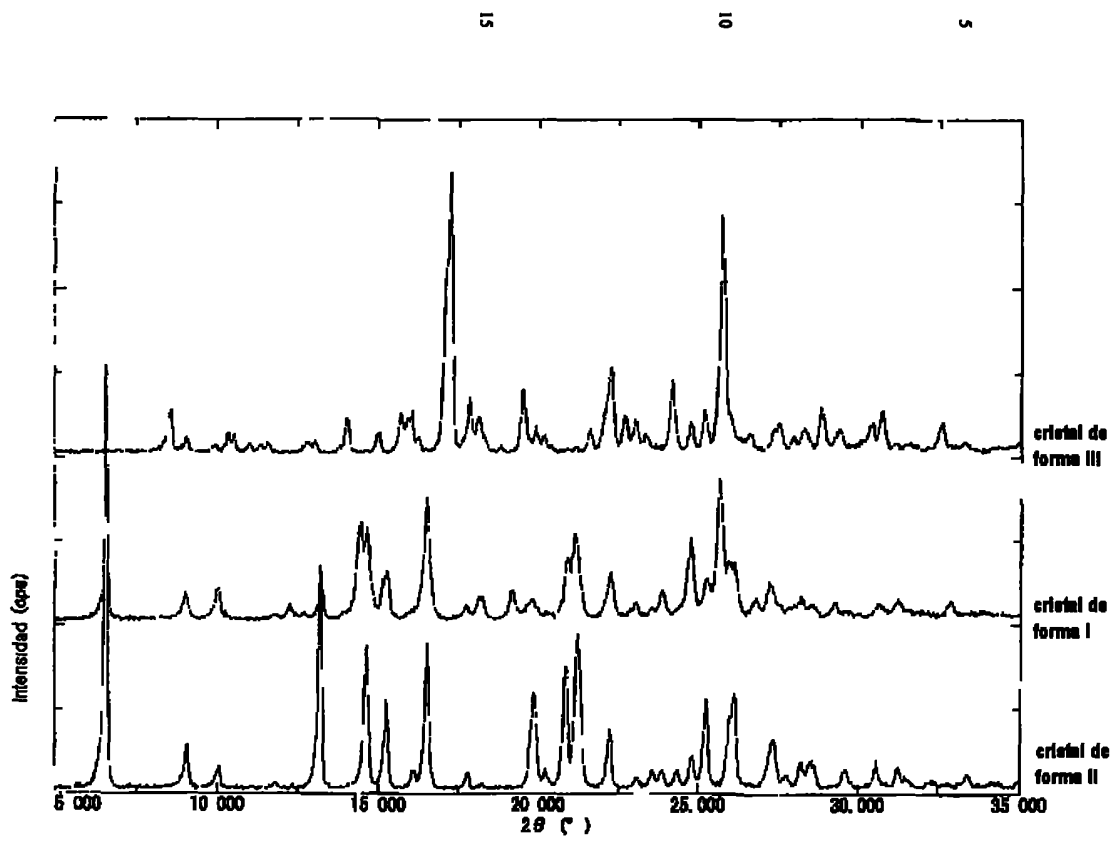
10 12. Un agente anti-VIH para una terapia de droga múltiple con otro agente del anti-VIH caracterizado por que comprendel cristal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó el cristal mezcla de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6 como ingrediente activo.

RESUMEN

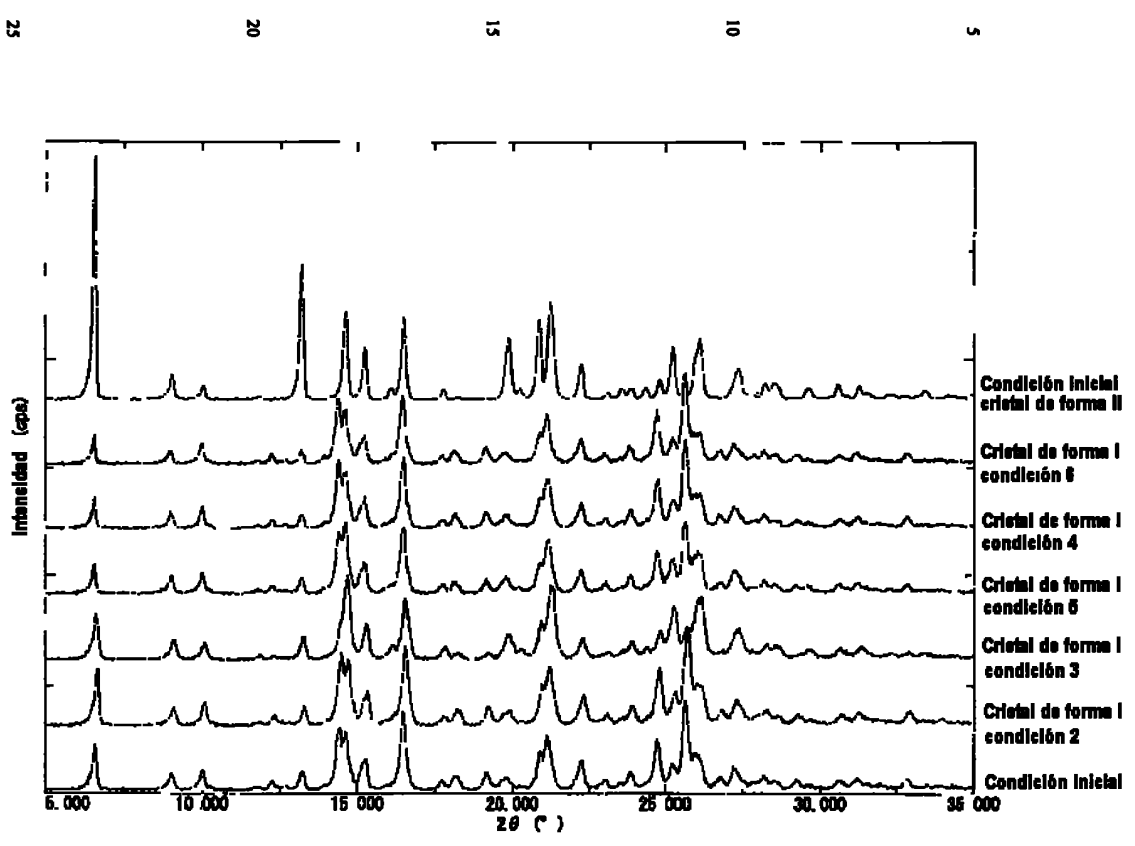
La presente invención provee un cristal de ácido 6-(3-cloro-2-fluorobencil)-1-[(S)-1-hidroximetil-2-metilpropil]-7-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (compuesto A), que presenta un modelo de difracción de polvo con rayos X particular con crestas de difracción característica en ángulos de difracción $2\theta(^{\circ})$ medidos por difracción de polvo con rayos X. El cristal de la presente invención es superior en estabilidad física y química.

1

[Fig. 1]



[Fig 2]



141

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco Inc.

<120> Stable Crystal of 4-Oxoquinoline Compound

<130> 09765

<150> JP2004-150979

<151> 2004-5-20

<160> 4

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Donor plus strand for activity determination of HIV integrase.

<400> 1

acccttttag tcagtgtgga aaatctctag ca 32

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Donor minus strand for activity determination of HIV integrase.

<400> 2

actgctagag attttccaca ctgactaaaa g 31

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Target plus strand for activity determination of HIV integrase.

<400> 3

tgaccaaggg ctaattcact 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Target minus strand for activity determination of HIV integrase.

<400> 4

agtgaattag cccttggtca 20

Tarjeta amarilla folio 144
" Blanca " 145
Extracto publicación folio 146

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 04 July 2005 (04.07.2005)		RECEIVED with thanks JUL 11 2005 TAKASHIMA, Hajime	
Applicant's or agent's file reference 09785			IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP2005/009804	International filing date (day/month/year) 19 May 2005 (19.05.2005)		
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 20 May 2004 (20.05.2004)		
Applicant JAPAN TOBACCO INC. et al			

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Office, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
20 May 2004 (20.05.2004)	2004-150979	JP	24 June 2005 (24.06.2005)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/304 (January 2004)

Authorized officer

Sean TAYLOR

Facsimile No. (41-22) 338 90 90

Telephone No. +41 22 338 9811

CH1XLH85

140
AS



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-126877- -00000-0000
Fec: 2008-12-10 14:42:54 Dep. 2020 NUECREACIONES
Trib. 11 PATENTE/IN
Evo: 378 FABENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 147

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRÁMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ()	(X)	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	(X)	(/)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	(X)	(/)
- Descripción de la invención	(X)	(/)
- Dibujos de ser estos pertinentes	(X)	(/)
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	(X)	(/)

COMPLETA (X) INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

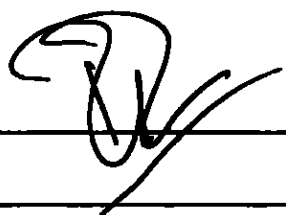
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

EZQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica del Esquema de Trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma responsable:  _____
Fecha: _____

46

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Folio 1/9

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
CASTELLANOS ABONDANO MARGARITA
Apoderado(a) y/o Representante de
JAPAN TOBACCO INC.

REFERENCIA	Radicación No.	06 126877
	Solicitud internacional	PCT/JP2005/009604
	Fecha inicio fase nacional	20/01/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	2392
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

131 ENE 2007

ALIX CARMENEA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpa10