



- (51) International Patent Classification:
C07F 9/6521 (2006.01) *C07F 9/6558* (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2018/016301
- (22) International Filing Date:
31 January 2018 (31.01.2018)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
62/453,437 01 February 2017 (01.02.2017) US
62/469,912 10 March 2017 (10.03.2017) US
62/488,366 21 April 2017 (21.04.2017) US
62/575,248 20 October 2017 (20.10.2017) US
- (71) Applicant: ATEA PHARMACEUTICALS, INC.
[US/US]; 125 Summer Street, Boston, MA 02110 (US).
- (72) Inventors: MOUSSA, Adel; C/o Atea Pharmaceuticals, Inc., 125 Summer Street, Boston, MA 02110 (US). SOM-MADOSSI, Jean-Pierre; C/o Atea Pharmaceuticals, Inc., 125 Summer Street, Boston, MA 02110 (US).
- (74) Agent: BELLOWS, Brent, R. et al.; Knowles Intellectual Property Strategies, LLC, 400 Perimeter Center Terrace, Suite 200, Atlanta, GA 30346 (US).
- (81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: NUCLEOTIDE HEMI-SULFATE SALT FOR THE TREATMENT OF HEPATITIS C VIRUS

(57) Abstract: A hemi-sulfate salt of the structure: [Formula should be inserted here] to treat a host infected with hepatitis C, as well as pharmaceutical compositions and dosage forms, including solid dosage forms, thereof.

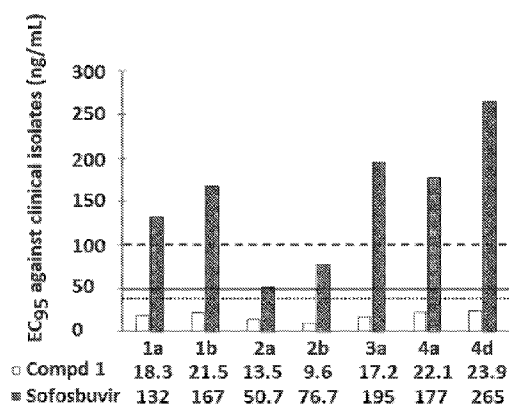
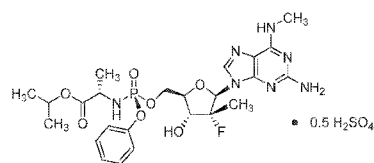


FIG. 24



Declarations under Rule 4.17:

- *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*
- *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

- *with international search report (Art. 21(3))*

Sheet No. . . 6 . . .

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

In relation to this International Application,

ATEA PHARMACEUTICALS, INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an Assignment from: MOUSSA, Adel and SOMMADOSSI, Jean-Pierre to Atea Pharmaceuticals, Inc. dated February 1, 2017;

an Assignment from: MOUSSA, Adel and SOMMADOSSI, Jean-Pierre to Atea Pharmaceuticals, Inc. dated on March 10, 2017;

an Assignment from: MOUSSA, Adel and SOMMADOSSI, Jean-Pierre to Atea Pharmaceuticals, Inc. dated May 9, 2017; and

an Assignment from: MOUSSA, Adel and SOMMADOSSI, Jean-Pierre to Atea Pharmaceuticals, Inc. dated October 20, 2017.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

SAL HEMI-SULFATO DE NUCLEÓTIDO

PARA EL TRATAMIENTO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

REFERENCIA RECÍPROCA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de las solicitudes provisionales de EE. UU. Nos. 62/453,437 presentado el 1 de Febrero de 2017; 62/469,912 presentado el 10 de Marzo de 2017; 62/488,366 presentado el 21 de Abril del 2017; y, 62/575,248 presentado el 20 de Octubre de 2017. La totalidad de estas aplicaciones se incorporan como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

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

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

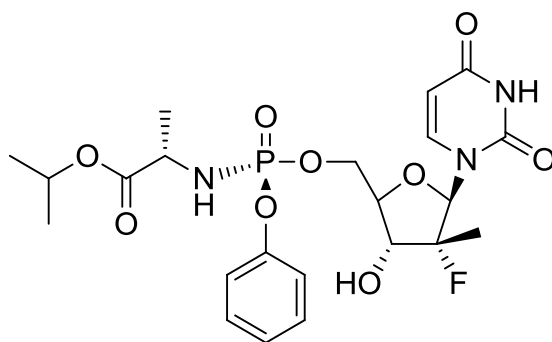
15 La hepatitis C (VHC) es un virus monocatenario de ARN y miembro del género Hepacivirus. Se estima que el 75% de todos los casos de enfermedad hepática son causados por VHC. La infección por VHC puede provocar cirrosis y cáncer hepático, y si se deja progresar, una insuficiencia hepática puede requerir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

 La ARN polimerasa es un objetivo clave para el desarrollo de fármacos contra los virus monocatenarios de ARN. La ARN polimerasa dependiente de ARN NS5B de proteína no estructural del VHC es una enzima clave responsable de iniciar y catalizar la síntesis de ARN
25 viral. Existen dos subclases principales de inhibidores de NS5B: análogos de nucleósidos e inhibidores no nucleósidos (INNs). Los análogos de nucleósidos se anabolizan a trifosfatos activos que actúan como sustratos alternativos para la polimerasa y los inhibidores no nucleosídicos (NNI) se unen a regiones alostéricas de la proteína. Los inhibidores de nucleósidos o nucleótidos imitan los sustratos de la polimerasa natural y actúan como terminadores de

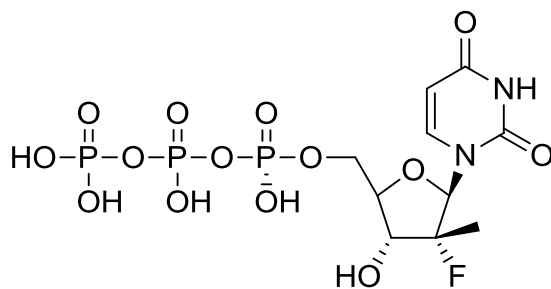
cadena. Inhiben el inicio de la transcripción de ARN y el alargamiento de una cadena de ARN naciente.

Además de dirigirse a la ARN polimerasa, otras proteínas virales de ARN también pueden dirigirse en terapias combinadas. Por ejemplo, las proteínas del VHC que son objetivos adicionales para los enfoques terapéuticos son NS3/4A (una serina proteasa) y NS5A (una proteína no estructural que es un componente esencial de la replicasa del VHC y ejerce un rango de efectos en las vías celulares).

En Diciembre de 2013, se aprobó el primer inhibidor de la polimerasa nucleósido NS5B sofosbuvir (Sovaldi®, Gilead Sciences). Sovaldi® es un profármaco de fosforamidato de uridina que es captado por los hepatocitos y que se somete a una activación intracelular para producir el metabolito activo, 2'-deoxi-2'- α -fluoro- β -C-metiluridina-5'-trifosfato.



Sovaldi®



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

Sovaldi® es el primer fármaco que ha demostrado seguridad y eficacia para tratar ciertos tipos de infección por VHC sin la necesidad de la administración conjunta de interferón. Sovaldi® es el tercer fármaco con una designación de terapia avanzada que recibe la aprobación de la FDA.

En 2014, la FDA de EE. UU. aprobó Harvoni® (ledipasvir, un inhibidor de NS5A y sofosbuvir) para tratar la infección crónica por el virus de la hepatitis C Genotipo 1. Harvoni® es la primera píldora

combinada aprobada para tratar la infección crónica por el VHC genotipo 1. También es el primer régimen aprobado que no requiere administración con interferón o ribavirina. Además, la FDA aprobó simeprevir (Olysio™) en combinación con sofosbuvir (Sovaldi®) como un tratamiento de una vez al día, totalmente oral, sin ribavirina e interferón para adultos con infección por VHC Genotipo 1.

5 La FDA de los EE. UU. también aprobó VIEKIRA Pak™ de AbbVie en 2014, un paquete de múltiples píldoras que contiene dasabuvir (un inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleosídico), ombitasvir (un inhibidor de NS5A), paritaprevir (un inhibidor de NS3/4A) y ritonavir. VIEKIRA Pak™ se puede usar con o sin ribavirina para tratar pacientes infectados con VHC genotipo 1, incluyendo pacientes con cirrosis compensada. VIEKIRA Pak™ no requiere terapia conjunta con interferón.

10 En julio de 2015, la FDA de EE. UU. aprobó Technivie™ y Daklinza™ para el tratamiento del VHC genotipo 4 y el VHC genotipo 3, respectivamente. Technivie™ (Ombitasvir/paritaprevir/ritonavir) fue aprobado para su uso en combinación con ribavirina para el tratamiento del VHC genotipo 4 en pacientes sin cicatrización y cirrosis y es la primera opción para pacientes infectados con el VHC-4 que no requieren la administración conjunta de interferón. Daklinza™ fue aprobado para su uso con
15 Sovaldi® para tratar infecciones por el VHC genotipo 3. Daklinza™ es el primer fármaco que ha demostrado seguridad y eficacia en el tratamiento del VHC Genotipo 3 sin la necesidad de administración conjunta de interferón o ribavirina.

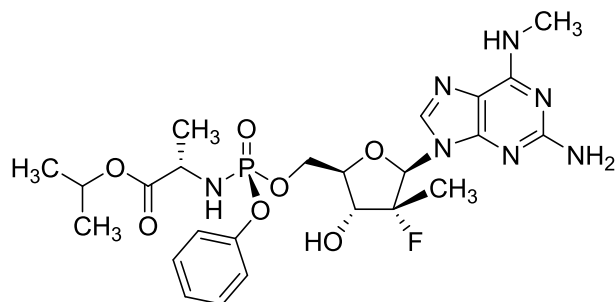
En octubre de 2015, la FDA de EE. UU. advirtió que los tratamientos contra el VHC Viekira Pak y Technivie pueden causar lesiones hepáticas graves principalmente en pacientes
20 con enfermedad hepática avanzada subyacente y exigió que se agregue información adicional sobre la seguridad a la etiqueta.

Otras terapias aprobadas actualmente para el VHC incluyen interferón alfa-2b o interferón pegilado alfa-2b (Pegintron®), que pueden administrarse con ribavirina (Rebetol®), NS3/4A telaprevir (Incivek®, Vertex y Johnson & Johnson), boceprevir (Victrelis™, Merck), simeprevir (Olysio™,
25 Johnson & Johnson), paritaprevir (AbbVie), Ombitasvir (AbbVie), NNI Dasabuvir (ABT-333) y Merck's Zepatier™ (una combinación de una sola tableta de los dos fármacos grazoprevir y elbasvir).

Actualmente se están desarrollando inhibidores adicionales de la polimerasa NS5B. Merck está desarrollando el profármaco de nucleótidos de uridina MK-3682 (anteriormente Idenix IDX21437) y el fármaco se encuentra actualmente en ensayos de combinación de Fase II.

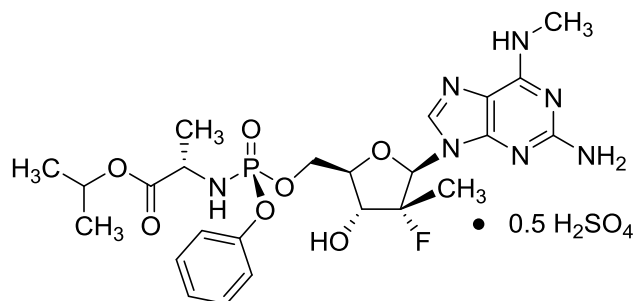
30 Las patentes de los Estados Unidos y las solicitudes WO que describen inhibidores de la nucleosido polimerasa para el tratamiento de Flaviviridae, incluido el VHC, incluyen los presentados por Idenix Pharmaceuticals (6,812,219; 6,914,054; 7,105,493; 7,138,376; 7,148,206; 7,157,441; 7,163,929; 7,169,766; 7,192,936; 7,365,057; 7,384,924; 7,456,155; 7,547,704;

7,582,618; 7,608,597; 7,608,600; 7,625,875; 7,635,689; 7,662,798; 7,824,851; 7,902,202;
7,932,240; 7,951,789; 8,193,372; 8,299,038; 8,343,937; 8,362,068; 8,507,460; 8,637,475;
8,674,085; 8,680,071; 8,691,788; 8,742,101; 8,951,985; 9,109,001; 9,243,025; US2016/0002281;
US2013/0064794; WO/2015/095305; WO/2015/081133; WO/2015/061683; WO/2013/177219;
5 WO/2013/039920; WO/2014/137930; WO/2014/052638; WO/2012/154321); Merck (6,777,395;
7,105,499; 7,125,855; 7,202,224; 7,323,449; 7,339,054; 7,534,767; 7,632,821; 7,879,815;
8,071,568; 8,148,349; 8,470,834; 8,481,712; 8,541,434; 8,697,694; 8,715,638; 9,061,041;
9,156,872 y WO/2013/009737); Universidad de Emory (6,348,587; 6,911,424; 7,307,065;
7,495,006; 7,662,938; 7,772,208; 8,114,994; 8,168,583; 8,609,627; US 2014/0212382; y
10 WO2014/1244430); Gilead Sciences/ Pharmasset Inc. (7,842,672; 7,973,013; 8,008,264;
8,012,941; 8,012,942; 8,318,682; 8,324,179; 8,415,308; 8,455,451; 8,563,530; 8,841,275;
8,853,171; 8,871,785; 8,877,733; 8,889,159; 8,906,880; 8,912,321; 8,957,045; 8,957,046;
9,045,520; 9,085,573; 9,090,642; y 9,139,604) y (6,908,924; 6,949,522; 7,094,770; 7,211,570;
7,429,572; 7,601,820; 7,638,502; 7,718,790; 7,772,208; RE42,015; 7,919,247; 7,964,580;
15 8,093,380; 8,114,997; 8,173,621; 8,334,270; 8,415,322; 8,481,713; 8,492,539; 8,551,973;
8,580,765; 8,618,076; 8,629,263; 8,633,309; 8,642,756; 8,716,262; 8,716,263; 8,735,345;
8,735,372; 8,735,569; 8,759,510 y 8,765,710); Hoffman La-Roche (6,660,721), Roche
(6,784,166; 7,608,599, 7,608,601 y 8,071,567); Alios BioPharma Inc. (8,895,723; 8,877,731;
8,871,737, 8,846,896, 8,772,474; 8,980,865; 9,012,427; US 2015/0105341; US 2015/0011497;
20 US 2010/0249068; US2012/0070411; WO 2015/054465; WO 2014/209979; WO 2014/100505;
WO 2014/100498; WO 2013/142159; WO 2013/142157; WO 2013/096680; WO 2013/088155;
WO 2010/108135), Enanta Pharmaceuticals (US 8,575,119; 8,846,638; 9,085,599; WO
2013/044030; WO 2012/125900), Biota (7,268,119; 7,285,658; 7,713,941; 8,119,607; 8,415,309;
8,501,699 and 8,802,840), Biocryst Pharmaceuticals (7,388,002; 7,429,571; 7,514,410;
25 7,560,434; 7,994,139; 8,133,870; 8,163,703; 8,242,085 y 8,440,813), Alla Chem, LLC
(8,889,701 y WO 2015/053662), Inhibitex (8,759,318 y WO/2012/092484), Janssen Products
(8,399,429; 8,431,588, 8,481,510, 8,552,021, 8,933,052; 9,006,29 y 9,012,428) la Fundación de
la Universidad de Georgia (6,348,587; 7,307,065; 7,662,938; 8,168,583; 8,673,926, 8,816,074;
8,921,384 y 8,946,244), RFS Pharma, LLC (8,895,531; 8,859,595; 8,815,829; 8,609,627;
30 7,560,550; US 2014/0066395; US 2014/0235566; US 2010/0279969; WO/2010/091386 y WO
2012/158811) University College Cardiff Consultants Limited (WO/2014/076490, WO



Compuesto 1

5



Compuesto 2

10 El Compuesto 2, como el Compuesto 1, se convierte en su nucleótido trifosfato correspondiente (Compuesto 1-6) en la célula, que es el metabolito activo e inhibidor de la ARN polimerasa (véase el Esquema 1 a continuación). Dado que el Compuesto 1-6 se produce en la célula y no abandona la célula, no se puede medir en el plasma. Sin embargo, el Compuesto 1-7 del metabolito 5'-OH (véase el Esquema 1) se exporta desde la célula, y por lo tanto se puede medir en el plasma y actúa como un sustituto de la concentración del Compuesto 1-6 del metabolito activo intracelular.

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

20 Además, el compuesto 2 se particiona selectivamente in vivo en el hígado frente al corazón (Ejemplo 19, Tabla 29), lo cual es beneficioso debido a que el hígado es el órgano enfermo en los huéspedes infectados con el VHC. A los perros se les administró el Compuesto 1 o el Compuesto 2 y se

25

5 midió la concentración del trifosfato activo (**1-6**) en el hígado y el corazón. La relación de hígado a corazón de la concentración de trifosfato activo fue mayor después de la dosificación con el Compuesto **2** en comparación con el Compuesto **1** como se muestra en la Tabla 29. Específicamente, la proporción de partición hígado/corazón para el Compuesto **2** es 20 en comparación con una proporción de partición hígado/corazón de 3.1 para el Compuesto **1**. Estos datos indican, inesperadamente, que la administración del Compuesto **2** da como resultado la distribución preferencial del trifosfato de guanina activo (Compuesto **1-6**) en el hígado frente al corazón cuando se compara con el Compuesto **1**, lo que reduce los posibles efectos secundarios. Fue inesperado que la administración del Compuesto **2** redujera significativamente la partición no deseada. Esto permite la administración del Compuesto **2** en una dosis
10 más alta que el Compuesto **1**, si así lo desea el profesional de la salud.

Además, se midieron los niveles de tejido en hígado y corazón del derivado activo de trifosfato de guanina del Compuesto **2** (metabolito **1-6**) después de las dosis orales del Compuesto **2** en ratas y monos (Ejemplo 20). Los niveles altos de trifosfato de guanina activo (**1-6**) se midieron en el hígado de todas las especies analizadas. Es importante destacar que los niveles no cuantificables de trifosfato de guanina (**1-6**) se midieron en corazones de monos, y esto es indicativo de la formación específica del hígado del trifosfato activo. Por lo tanto, se descubrió que en comparación con la dosis del Compuesto **1**, la dosificación del Compuesto **2** mejora la distribución del trifosfato de guanina (**1-6**).

20 Cuando se administró a pacientes sanos e infectados con hepatitis C, el Compuesto **2** fue bien tolerado después de una dosis oral única y los parámetros farmacocinéticos C_{max} , T_{max} y AUC_{tot} fueron comparables en ambos grupos (Tablas 34 y 35). Como se describe en el Ejemplo 24, una dosis única del Compuesto **2** en pacientes infectados por el VHC dio como resultado una actividad antiviral significativa. La exposición plasmática del metabolito **1-7** fue mayormente proporcional a la dosis en el rango estudiado.

25 Los análisis farmacocinéticos/farmacodinámicos individuales de pacientes dosificados con el Compuesto **2** mostraron que la respuesta viral se correlacionaba con la exposición plasmática del metabolito **1-7** del Compuesto **2** (Ejemplo 24, Figs. 23A-23F), lo que indica que se pueden alcanzar respuestas virales profundas con dosis robustas del Compuesto **2**.

El Ejemplo 24 confirma que, como modalidades no limitantes, las dosis orales únicas de 300 mg, 400 mg y 600 mg dan como resultado una actividad antiviral significativa en seres
30 humanos. La concentración plasmática de C_{24} del metabolito **1-7** después de una dosis de 600 mg del Compuesto **2** se duplicó desde la concentración plasmática de C_{24} del metabolito **1-7** seguido de una dosis de 300 mg del Compuesto **2**.

La FIG. 24 y el Ejemplo 25 resaltan la sorprendente invención proporcionada por el Compuesto **2** para el tratamiento de la hepatitis C. Como se muestra en la FIG. 24, se predijeron

las concentraciones plasmáticas mínimas en el estado estacionario ($C_{24, ss}$) del metabolito **1-7** seguido de la dosificación del Compuesto **2** en humanos (600 mg QD (550 mg de base libre equivalente) y 450 mg QD (400 mg de base libre equivalente)) y se compararon con el EC_{95} del Compuesto **1** *in vitro* en un rango de aislamientos clínicos del VHC para determinar si la
5 concentración plasmática en estado estacionario es consistentemente más alta que el EC_{95} , lo que resultaría en una alta eficacia contra múltiples aislamientos clínicos *in vivo*. El EC_{95} para el Compuesto **1** es el mismo que el EC_{95} del Compuesto **2**. Para que el Compuesto **2** sea efectivo, el nivel plasmático en el estado estacionario del metabolito **1-7** debe exceder el EC_{95} .

Como se muestra en la FIG. 24, el EC_{95} del Compuesto **2** contra todos los aislamientos
10 clínicos evaluados varió de 18 nM a 24 nM aproximadamente.

Como se muestra en la FIG. 24, el Compuesto **2** a una dosis de 450 mg QD (400 mg de base libre equivalente) en humanos proporciona una concentración plasmática media aproximada ($C_{24, ss}$) de aproximadamente 40 ng/mL. El Compuesto **2** a una dosis de 600 mg QD (550 mg de base libre equivalente) en humanos proporciona una concentración plasmática media aproximada
15 ($C_{24, ss}$) de aproximadamente 50 ng/mL.

Por lo tanto, la concentración plasmática pronosticada en el estado estacionario del metabolito sustituto **1-7** es casi el doble del EC_{95} frente a todos los aislamientos clínicos probados (incluso el GT3a difícil de tratar), lo que indica un rendimiento superior.

En contraste, el EC_{95} del estándar de cuidado de nucleótidos sofosbuvir (Sovaldi) varía de
20 50 nM a 265 nM en todos los aislamientos clínicos del VHC evaluados, con un EC_{95} menor que la concentración pronosticada en el estado estacionario en la dosis comercial de 400 mg para solo dos aislamientos, GT2a y GT2b. El EC_{95} para la dosis comercial de 400 mg de sofosbuvir es mayor que la concentración en estado estacionario predicha para otros aislados clínicos, GT1a, GT1b, GT3a, GT4a y GT4d.

Los datos que comparan la eficacia y los parámetros farmacocinéticos de estado
25 estacionario en la FIG. 24 demuestran claramente la inesperada importancia terapéutica del Compuesto **2** para el tratamiento de la hepatitis C. De hecho, se pronostica que el nivel plasmático en estado estacionario ($C_{24, ss}$) predicho después de la administración del Compuesto **2** es al menos 2 veces mayor que el EC_{95} para todos los genotipos probados, y es 3 a 5 veces más
30 potente que el GT2. Estos datos indican que el Compuesto **2** tiene una potente actividad antiviral pan-genotípica en humanos. Como se muestra en la FIG. 24, el EC_{95} de sofosbuvir contra GT1,

GT3 y GT4 es mayor que 100 ng/mL. Por lo tanto, sorprendentemente, el Compuesto 2 es activo contra el VHC en una forma de dosificación que brinda una concentración en estado estacionario inferior (40-50 ng/ml) que la concentración resistente en el estado estable (aproximadamente 100 ng/ml) alcanzada por la forma de dosificación equivalente de sofosbuvir.

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

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

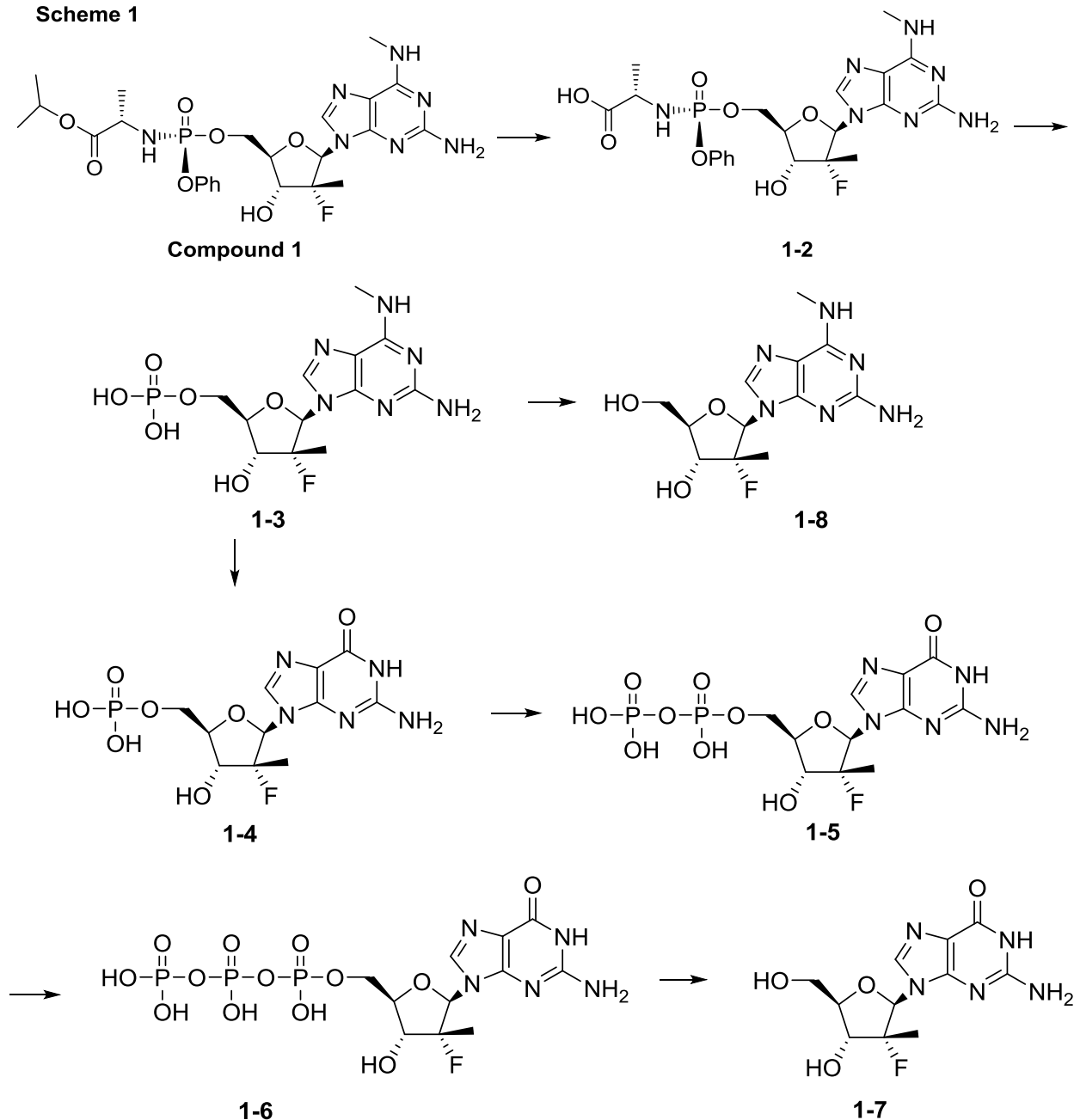
Como se discutió en el Ejemplo 16, el Compuesto 2 sigue siendo un sólido blanco con un IR que corresponde al estándar de referencia durante 6 meses en condiciones de estabilidad acelerada (40 20 °C/75% HR). El compuesto 2 es estable durante 9 meses en condiciones ambientales (25 °C/60% HR) y en condiciones de refrigeración (5 °C).

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

El Esquema 1 proporciona la ruta metabólica del Compuesto 1 y Compuesto 2, que implica la desesterificación inicial del fosforamidato (metabolito 1-1) para formar el metabolito 1-2. Luego, el metabolito 1-2 se convierte en el derivado N⁶-metil-2,6-diaminopurina-5'-monofosfato (metabolito 1-3), que a su vez se metaboliza a nucleósido 5'-hidroxil-N⁶-metil-2,6-diaminopurina libre (metabolito 1-8) y 30 dihidrogenfosfato de ((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-9*H*-purin-9-il) -4- fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metilo como el 5'-monofosfato (metabolito 1-4). El metabolito 1-4 se anaboliza al difosfato correspondiente (metabolito 1-5) y luego el derivado de trifosfato activo (metabolito 1-6). El 5'-trifosfato puede metabolizarse adicionalmente para generar 2-amino-9-((2*R*, 3*R*, 4*R*, 5*R*) -3-fluoro-4-

hidroxi-5- (hidroximetil) -3-metil tetrahidrofuran-2-il) -1,9-dihidro-6H-purin-6-ona (**1-7**). El metabolito **1-7** se puede medir en plasma y, por lo tanto, es un sustituto del trifosfato activo (**1-6**), que no se puede medir en plasma.

Scheme 1



En una modalidad, la invención es el Compuesto 2 y su uso para tratar la hepatitis C (VHC) en un huésped que lo necesite, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, el Compuesto 2 se usa como un sólido amorfo. En otro aspecto, el Compuesto 2 se usa como un sólido cristalino.

La presente invención incluye además un proceso limitativo de ejemplo para la preparación del Compuesto 2 que incluye

- (i) un primer paso para disolver el Compuesto 1 en un disolvente orgánico, por ejemplo, acetona, acetato de etilo, metanol, acetonitrilo o éter, o similar, en un matraz o recipiente;
- 5 (ii) cargar un segundo matraz o recipiente con un segundo solvente orgánico, que puede ser igual o diferente al solvente orgánico en el paso (i), enfriar opcionalmente el segundo solvente a 0-10 grados C y agregar por goteo H_2SO_4 al segundo disolvente orgánico para crear una mezcla de H_2SO_4 /disolvente orgánico; y en donde el disolvente, por ejemplo, puede ser metanol;
- 10 (iii) agregar por goteo la mezcla de H_2SO_4 /solvente en una proporción molar de 0.5/1.0 del paso (ii) a la solución del Compuesto 1 del paso (i) a temperatura ambiente o ligeramente aumentada o disminuida (por ejemplo, 23-35 grados C);
- (iv) agitar la reacción del paso (iii) hasta que se forme un precipitado del Compuesto 2, por ejemplo, a temperatura ambiente o ligeramente aumentada o disminuida;
- 15 (v) filtrar opcionalmente el precipitado resultante del paso (iv) y lavar con un disolvente orgánico; y
- (vi) secar opcionalmente el Compuesto 2 resultante al vacío, opcionalmente a una temperatura elevada, por ejemplo, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 °C.

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

A pesar del volumen de bibliografía de nucleósidos antivíricos y solicitudes de patente, el Compuesto 2 no se ha descrito específicamente. Por consiguiente, la presente invención incluye el
25 Compuesto 2, o una composición farmacéuticamente aceptable o una forma de dosificación del mismo, como se describe en el presente documento.

Los compuestos, métodos, formas de dosificación y composiciones se proporcionan para el tratamiento de un huésped infectado con un virus del VHC mediante la administración de una cantidad efectiva del Compuesto 2. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra a una dosis de al menos
30 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 mg aproximadamente. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra por hasta 12 semanas, por hasta 10 semanas, por hasta 8 semanas, por hasta 6 semanas, o por hasta 4 semanas. En modalidades alternativas, el Compuesto 2 se administra durante al menos 4 semanas, durante al menos 6 semanas,

durante al menos **8** semanas, durante al menos **10** semanas o durante al menos **12** semanas. En ciertas modalidades, el Compuesto **2** se administra al menos una vez al día o cada dos días. En ciertas modalidades, el Compuesto **2** se administra en una forma de dosificación que logra un nivel plasmático en el estado estacionario ($C_{24, ss}$) del metabolito **1-7** entre aproximadamente 15-75 ng/mL. En una modalidad, el Compuesto **2** se administra en una forma de dosificación que logra un nivel plasmático en el estado estacionario ($C_{24, ss}$) del metabolito **1-7** entre aproximadamente 20-60 ng/mL. En ciertas modalidades, el Compuesto **2** se administra en una forma de dosificación que logra una AUC del metabolito **1-7** entre aproximadamente 1.200 ng*h/mL y 3.000 ng*h/mL. En una modalidad, el Compuesto **2** se administra en una forma de dosificación que logra una AUC del metabolito **1-7** entre aproximadamente 1.500 y 2.100 ng*h/mL.

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

La presente invención incluye así las siguientes características:

- (a) Compuesto **2** como se describe en el presente documento;
- (b) Profármacos del Compuesto **2**
- (c) Uso del Compuesto **2** en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis C;
- (d) Compuesto **2** para uso en el tratamiento de la hepatitis C, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- (e) Un método para fabricar un medicamento destinado al uso terapéutico para tratar una infección por el virus de la hepatitis C, caracterizado porque el Compuesto **2**, o una sal farmacéuticamente aceptable, como se describe en el presente documento, se usa en la fabricación;
- (e) Una formulación farmacéutica que comprende una cantidad eficaz para el tratamiento del huésped del Compuesto **2** con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;
- (f) Procesos para la preparación de productos terapéuticos que contengan una cantidad eficaz del Compuesto **2**;

- (g) Formas de dosificación sólidas, incluyen las que proporcionan un perfil farmacocinético ventajoso; y
- (h) Procesos para la fabricación del Compuesto **2**, como se describe en el presente documento.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

10

La FIG. 1B es el cromatógrafo de HPLC del Compuesto **1** amorfo (muestra 1-1) para determinar la pureza como se describe en el Ejemplo 2. La pureza de la muestra fue del 98,7%. El eje x es el tiempo medido en minutos y el eje-y es la intensidad medida en conteos.

15

La FIG. 2A es el cromatógrafo de HPLC del Compuesto **1** cristalino (muestra 1-2) para determinar la pureza como se describe en el Ejemplo 2. La pureza de la muestra fue del 99,11%. El eje x es el tiempo medido en minutos y el eje-y es la intensidad medida en conteos.

La FIG. 2B es un gráfico DSC y TGA del Compuesto **1** cristalino (muestra 1-2) antes de cualquier estudio de estabilidad con fines de caracterización como se describe en el Ejemplo 2. El eje X es la temperatura medida en °C, el eje Y izquierdo es el flujo térmico medido en (W/g) y el eje Y derecho es el peso medido en porcentaje.

20

La FIG. 3 es una imagen de cristalografía de rayos X del Compuesto **1** que muestra la estereoquímica absoluta como se describe en el Ejemplo 2.

25

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

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

30

La FIG. 5A es una superposición de difractogramas de XRPD de las muestras 1-4, 1-6, 1-7 y 1-9 después de almacenar a 25 °C y 60% de humedad relativa durante 14 días como se

describe en el Ejemplo 4. El eje x es 2Teta medido en grados y el eje-y es la intensidad medida en conteos.

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

5 La FIG. 6A es el cromatógrafo de HPLC del Compuesto 2 amorfo (muestra 1-3) para determinar la pureza como se describe en el Ejemplo 5. La pureza de la muestra fue del 99,6%. El eje x es el tiempo medido en minutos y la intensidad del eje-y es medida en conteos.

La FIG. 6B es un gráfico DSC y TGA para el Compuesto 2 amorfo (muestra 1-3) antes de cualquier estudio de estabilidad con fines de caracterización como se describe en el Ejemplo 5. El eje X es la temperatura medida en °C, el eje Y izquierdo es el flujo térmico medido en (W/g) y el eje Y derecho es el peso medido en porcentaje.

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

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

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

La FIG. 8B es un gráfico DSC y TGA para la muestra 2-2 (Ejemplo 6). El eje X es la temperatura medida en °C, el eje Y izquierdo es el flujo térmico medido en (W/g) y el eje Y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se dan en el Ejemplo 2.

La FIG. 9A es un gráfico DSC y TGA para la muestra 2-3 (Ejemplo 6). El eje X es la temperatura medida en °C, el eje Y izquierdo es el flujo térmico medido en (W/g) y el eje Y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se dan en el Ejemplo 2.

La FIG. 9B es un gráfico DSC y TGA para la muestra 2-4 (Ejemplo 6). El eje X es la temperatura medida en °C, el eje Y izquierdo es el flujo térmico medido en (W/g) y el eje Y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se dan en el Ejemplo 2.

5 La FIG. 10A es un gráfico DSC y TGA para la muestra 2-5 (Ejemplo 6). El eje X es la temperatura medida en °C, el eje Y izquierdo es el flujo térmico medido en (W/g) y el eje Y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se dan en el Ejemplo 2.

10 La FIG. 10B es un gráfico DSC y TGA para la muestra 2-6 (Ejemplo 6). El eje X es la temperatura medida en °C, el eje Y izquierdo es el flujo térmico medido en (W/g) y el eje Y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se dan en el Ejemplo 2.

15 La FIG. 11A es un gráfico DSC y TGA para la muestra 2-7 (Ejemplo 6). El eje X es la temperatura medida en °C, el eje Y izquierdo es el flujo térmico medido en (W/g) y el eje Y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se dan en el Ejemplo 2.

20 La FIG. 11B es un gráfico DSC y TGA para la muestra 2-8 (Ejemplo 6). El eje X es la temperatura medida en °C, el eje Y izquierdo es el flujo térmico medido en (W/g) y el eje Y derecho es el peso medido en porcentaje. Los procedimientos experimentales para la recolección de DSC y TGA se dan en el Ejemplo 2.

La FIG. 12A es el patrón XRPD del Compuesto **4** amorfo (muestra 3-12) como se discute en el Ejemplo 7. El eje x es 2Teta medido en grados y el eje-y es la intensidad medida en conteos. No se observó cristalización de una sal de malonato independientemente del disolvente utilizado.

25 La FIG. 12B es una superposición de difractogramas XRPD de muestras amorfas (muestras 3-6, 3-10, 3-11 y 3-12) identificadas a partir del intento de cristalización del Compuesto **1** con sal de malonato (Ejemplo 7). El eje x es 2Teta medido en grados y el eje-y es la intensidad medida en conteos.

30 La FIG. 13A es el cromatograma de HPLC de la muestra 3-12 del intento de cristalización del Compuesto **1** con sal de malonato como se describe en el Ejemplo 7. La muestra tenía una pureza del 99,2%. El eje x es el tiempo medido en minutos y la intensidad del eje-y es medida en mAu.

La FIG. 13B es una superposición de difractogramas de XRPD de muestras sólidas obtenidas de la cristalización utilizando LAG (muestras 4-13, 4-12, 4-9, 4-3 y 4-1) en comparación con el Compuesto **1** (muestra 1-2) como se describe en el Ejemplo 8. Todos los XRPD coinciden con los patrones del contraíón de ácido cristalino sin picos adicionales. El eje x es 2Teta medido en grados y el eje-y es la intensidad medida en conteos.

La FIG. 14A es una superposición de difractogramas de XRPD de muestras obtenidas de la utilización de acetato de etilo como disolvente de cristalización (muestras 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-8, 6-7, 6-6, 6-5, 6-4 y 6-2) en comparación con el Compuesto **1** cristalino (muestra 1-2) como se describe en el Ejemplo 10. En general, se encontró que los patrones de XRPD coinciden con el patrón del Compuesto **1**, con la excepción de las muestras 6-2, 6-4 y 6-5 que exhiben pequeñas diferencias. El eje x es 2Teta medido en grados y el eje-y es la intensidad medida en conteos.

La Fig. 14B es una superposición del difractograma XRPD de la muestra 5-1 después de una segunda disolución en MEK y la adición del antidisolvente ciclohexano y ácido pamioco como se describe en el Ejemplo 9. La muestra 5-1, cristalizada en ácido pamioco, era un sólido seguido de la maduración, pero el patrón XRPD coincidía con el patrón del ácido pamioco.

La FIG. 15A es una superposición de difractogramas de XRPD de muestras obtenidas de la utilización de acetato de etilo como un disolvente de cristalización (muestras 6-5, 6-4 y 6-2) en comparación con el Compuesto **1** cristalino (muestra 1-2) como se describe en el Ejemplo 10. En general, se encontró que los patrones de XRPD coinciden con el patrón del Compuesto **1**, con la excepción de las muestras 6-2, 6-4 y 6-5 que exhiben pequeñas diferencias. El eje x es 2Teta medido en grados y el eje-y es la intensidad medida en conteos y etiquetada con el ácido utilizado en la cristalización.

La FIG. 15B es el patrón XRPD para el Compuesto **2** como se describe en el Ejemplo 14. El eje x es 2Teta medido en grados y el eje-y es la intensidad medida en conteos.

La FIG. 16A es una gráfica de los niveles de concentración de TP activo (metabolito **1-6**) en los hígados y corazones de ratas, perros y monos (Ejemplo 18). El eje x es la dosis medida en mg/kg para cada especie y el eje-y es la concentración de TP activa medida en ng/g.

La FIG. 16B es un gráfico de los niveles de concentración de TP activo (metabolito **1-6**) en el hígado y el corazón de perros (n = 2) medidos 4 horas después de una dosis oral única del Compuesto **1** o del Compuesto **2** (Ejemplo 19). El eje x es la dosis de cada compuesto medida en mg/kg y el eje-y es la concentración de TP activo medida en ng/g.

La FIG. 17 es el perfil plasmático del Compuesto **1** y el metabolito **1-7** en ratas a las que se administró una dosis oral única de 500 mg/kg del Compuesto **2** (Ejemplo 20), medido 72 horas después

de la dosis. El eje x es el tiempo medido en horas y el eje-y es la concentración plasmática medida en ng/mL.

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

La FIG. 19 es un gráfico de EC₉₅ medido en nM de sofosbuvir y Compuesto **1** frente a aislados clínicos de VHC. Los valores de EC₉₅ para el Compuesto **1** son 7-33 veces más bajos que el sofosbuvir (Ejemplo 22). El eje x está marcado con el genotipo y el eje-y es EC₉₅ medido en nM.

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

La FIG. 21 es un gráfico del perfil de concentración-tiempo plasmática medio del Compuesto **1** seguido de la administración de una dosis única del Compuesto **2** en todas las cohortes de la Parte B del estudio, como se describe en el Ejemplo 24. El compuesto **1** se absorbió rápidamente y se metabolizó rápidamente en aproximadamente 8 horas en todas las cohortes de la Parte B. El eje x es el tiempo medido en horas y el eje y es la concentración plasmática media geométrica medida en ng/mL.

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

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

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

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

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

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

La FIG. 23F es un análisis farmacocinético/farmacodinámico individual de un sujeto inscrito en la cohorte 3b como se describe en el Ejemplo 24. Cada gráfico muestra la exposición al metabolito del plasma **1-7** y los niveles de reducción de ARN del VHC. La línea discontinua representa la concentración mínima del metabolito 1-7 requerido para una respuesta viral mayor que el valor EC₉₅ frente a GT1b. El eje x es el tiempo medido en horas. El eje y izquierdo es la concentración

plasmática del metabolito 1-7 medida en ng/mL y el eje y derecho es la reducción del ARN del VHC medida en $\log_{10}$ IU/mL.

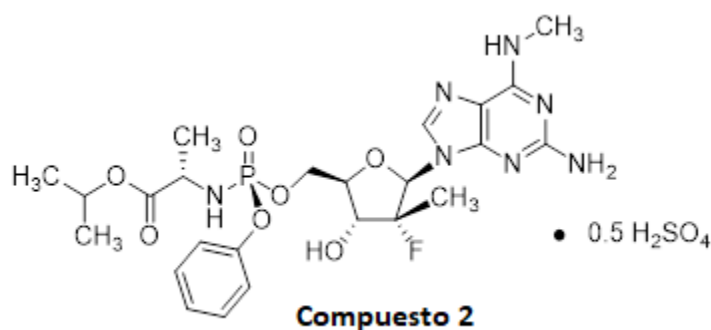
La FIG. 24 es un gráfico de los valores de EC_{95} del Compuesto 1 y sofosbuvir frente a aislados clínicos de pacientes infectados por el GT1, GT2, GT3 y GT4 del VHC. La línea discontinua horizontal (- - - -) representa la concentración mínima en el estado estacionario ($C_{24, ss}$) del nucleósido de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

La FIG. 25 es un diagrama de flujo que muestra el proceso de fabricación de comprimidos de 50 mg y 100 mg del Compuesto 2 como se describe en el Ejemplo 26. En el paso 1, la celulosa microcristalina, el Compuesto 2, la lactosa monohidrato y la croscarmelosa de sodio se filtran a través de una pantalla de 600 μ M. En el paso 2, los contenidos del paso 1 se cargan en un mezclador en V y se mezclan durante 5 minutos a 25 rpm. En el paso 3, el estearato de magnesio se filtra a través de una pantalla de 600 μ M. En el paso 4, se carga estearato de magnesio en el mezclador en V que contiene el contenido del paso 2 (celulosa microcristalina, Compuesto 2, lactosa monohidrato y croscarmelosa de sodio) y se mezcla durante 2 minutos a 25 rpm. La mezcla común se divide luego para la producción de tabletas de 50 mg y tabletas de 100 mg. Para producir tabletas de 50 mg, la mezcla del paso 4 se comprime con herramientas cóncavas estándar redondas de 6 mm. Para producir tabletas de 100 mg, la mezcla del paso 4 se comprime con herramientas cóncavas estándar redondas de 8 mm. Luego, las tabletas se empaquetan en botellas de HDPE selladas por inducción con tapas de PP con desecante.

La FIG. 26 es la sal de hemisulfato que presenta propiedades farmacológicas ventajosas sobre su base libre correspondiente para el tratamiento de un virus del VHC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención descrita en este documento es un compuesto, método, composición y forma de dosificación sólida para el tratamiento de infecciones en seres humanos y otros animales huésped del virus del VHC que incluye la administración de una cantidad eficaz de la sal de hemisulfato de isopropil((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(metilamino)-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-yl)metoxi)(fenoxi)fosforil)-L-alaninato (Compuesto 2) como se describe en el presente documento, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, el compuesto 2 es un sólido amorfo. En aún otra modalidad, el Compuesto 2 es un sólido cristalino.



El compuesto, composiciones y formas de dosificación también se pueden usar para tratar afecciones relacionadas o que se producen como resultado de una exposición viral al VHC. Por ejemplo, el compuesto activo se puede usar para tratar afecciones positivas al antígeno del VHC y positivas al anticuerpo del VHC, inflamación crónica del hígado basada en el virus, cáncer de hígado como resultado de la hepatitis C avanzada (ej., carcinoma hepatocelular), cirrosis, hepatitis C aguda, hepatitis C fulminante, hepatitis C crónica persistente y fatiga basada en anti-VHC.

Los compuestos y composiciones activos también se pueden usar para tratar la gama de genotipos de VHC. Se han identificado al menos seis genotipos distintos de VHC, cada uno de los cuales tiene múltiples subtipos, a nivel mundial. Los genotipos 1-3 son prevalentes en todo el mundo, y los genotipos 4, 5 y 6 están más limitados geográficamente. El genotipo 4 es común en Oriente Medio y África. El genotipo 5 se encuentra principalmente en Sudáfrica. El genotipo 6 existe predominantemente en el sudeste asiático. Aunque el genotipo más común en los Estados Unidos es el genotipo 1, la definición del genotipo y el subtipo puede ayudar en el tipo y duración del tratamiento. Por ejemplo, diferentes genotipos responden de manera diferente a

diferentes medicamentos y los tiempos óptimos de tratamiento varían según la infección del genotipo. Dentro de los genotipos, los subtipos, tales como el Genotipo 1a y el Genotipo 1b, también responden de manera diferente al tratamiento. La infección con un tipo de genotipo no excluye una infección posterior con un genotipo diferente.

5 Como se describe en el Ejemplo 22, el Compuesto 2 está activo contra el rango de genotipos de VHC, incluidos los Genotipos 1-5. En una modalidad, el compuesto 2 se usa para tratar el genotipo 1 del VHC, el genotipo 2 del VHC, el genotipo 3 del VHC, el genotipo 4 del VHC, el genotipo 5 del VHC o el genotipo 6 del VHC. En una modalidad, el compuesto 2 se usa para tratar el genotipo 1a del VHC. En una modalidad, el compuesto 2 se usa para tratar el genotipo 1b del VHC. En una modalidad, el compuesto 2 se usa para tratar el genotipo 2a del VHC. En una modalidad, el compuesto 2 se usa para tratar el genotipo 2b del VHC. En una modalidad, el compuesto 2 se usa para tratar el genotipo 3a del VHC. En una modalidad, el compuesto 2 se usa para tratar el genotipo 4a del VHC. En una modalidad, el compuesto 2 se usa para tratar el genotipo 4d del VHC.

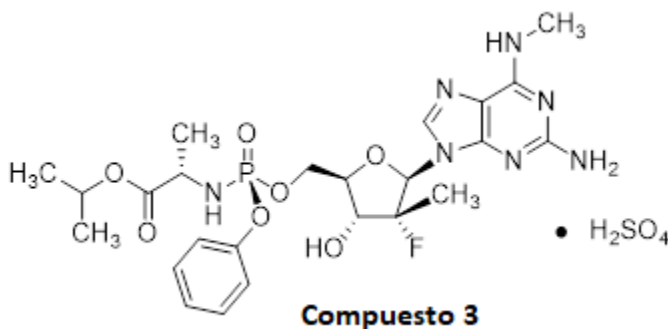
15 En una modalidad, el Compuesto 1 o el Compuesto 2 se usa para tratar el genotipo 5a del VHC. En una modalidad, el Compuesto 1 o el Compuesto 2 se usa para tratar el genotipo 6a del VHC. En una modalidad, el Compuesto 1 o el Compuesto 2 se usa para tratar el genotipo 6b, 6c, 6d, 6e, 6f, 6g, 6h, 6j, 6k, 6l, 6m, 6n, 6o, 6p, 6q, 6r, 6s, 6t, 6u, 6v, 6w, 6x, 6y, 6z, 6aa, 6ab, 6ac, 6ad, 6ae, 6af, 6ag, 6ah, 6ai, 6aj, 6ak, 6al, 6am, 6an, 6ao, 6ap, 6aq, 6ar, 6as, 6at, 6au, 6av, 6aw, 6ax, 6ay, 6az, 6ba, 6bb, 6bc, 6bd, 6be, 6bf, 6bg, 6bh, 6bi, 6bj, 6bk, 6bl, 6bm, 6bn, 6bo, 6bp, 6bq, 6br, 6bs, 6bt, 6bu, 6bv, 6bw, 6bx, 6by, 6bz, 6ca, 6cb, 6cc, 6cd, 6ce, 6cf, 6cg, 6ch, 6ci, 6cj, 6ck, 6cl, 6cm, 6cn, 6co, 6cp, 6cq, 6cr, 6cs, 6ct, 6cu, 6cv, 6cw, 6cx, 6cy, 6cz, 6da, 6db, 6dc, 6dd, 6de, 6df, 6dg, 6dh, 6di, 6dj, 6dk, 6dl, 6dm, 6dn, 6do, 6dp, 6dq, 6dr, 6ds, 6dt, 6du, 6dv, 6dw, 6dx, 6dy, 6dz, 6ea, 6eb, 6ec, 6ed, 6ee, 6ef, 6eg, 6eh, 6ei, 6ej, 6ek, 6el, 6em, 6en, 6eo, 6ep, 6eq, 6er, 6es, 6et, 6eu, 6ev, 6ew, 6ex, 6ey, 6ez, 6fa, 6fb, 6fc, 6fd, 6fe, 6ff, 6fg, 6fh, 6fi, 6fj, 6fk, 6fl, 6fm, 6fn, 6fo, 6fp, 6fq, 6fr, 6fs, 6ft, 6fu, 6fv, 6fw, 6fx, 6fy, 6fz, 6ga, 6gb, 6gc, 6gd, 6ge, 6gf, 6gg, 6gh, 6gi, 6gj, 6gk, 6gl, 6gm, 6gn, 6go, 6gp, 6gq, 6gr, 6gs, 6gt, 6gu, 6gv, 6gw, 6gx, 6gy, 6gz, 6ha, 6hb, 6hc, 6hd, 6he, 6hf, 6hg, 6hh, 6hi, 6hj, 6hk, 6hl, 6hm, 6hn, 6ho, 6hp, 6hq, 6hr, 6hs, 6ht, 6hu, 6hv, 6hw, 6hx, 6hy, 6hz, 6ia, 6ib, 6ic, 6id, 6ie, 6if, 6ig, 6ih, 6ii, 6ij, 6ik, 6il, 6im, 6in, 6io, 6ip, 6iq, 6ir, 6is, 6it, 6iu, 6iv, 6iw, 6ix, 6iy, 6iz, 6ja, 6jb, 6jc, 6jd, 6je, 6jf, 6jg, 6jh, 6ji, 6jj, 6jk, 6jl, 6jm, 6jn, 6jo, 6jp, 6jq, 6jr, 6js, 6jt, 6ju, 6jv, 6jw, 6jx, 6jy, 6jz, 6ka, 6kb, 6kc, 6kd, 6ke, 6kf, 6kg, 6kh, 6ki, 6kj, 6kl, 6km, 6kn, 6ko, 6kp, 6kq, 6kr, 6ks, 6kt, 6ku, 6kv, 6kw, 6kx, 6ky, 6kz, 6la, 6lb, 6lc, 6ld, 6le, 6lf, 6lg, 6lh, 6li, 6lj, 6lk, 6ll, 6lm, 6ln, 6lo, 6lp, 6lq, 6lr, 6ls, 6lt, 6lu, 6lv, 6lw, 6lx, 6ly, 6lz, 6ma, 6mb, 6mc, 6md, 6me, 6mf, 6mg, 6mh, 6mi, 6mj, 6mk, 6ml, 6mm, 6mn, 6mo, 6mp, 6mq, 6mr, 6ms, 6mt, 6mu, 6mv, 6mw, 6mx, 6my, 6mz, 6na, 6nb, 6nc, 6nd, 6ne, 6nf, 6ng, 6nh, 6ni, 6nj, 6nk, 6nl, 6nm, 6nn, 6no, 6np, 6nq, 6nr, 6ns, 6nt, 6nu, 6nv, 6nw, 6nx, 6ny, 6nz, 6oa, 6ob, 6oc, 6od, 6oe, 6of, 6og, 6oh, 6oi, 6oj, 6ok, 6ol, 6om, 6on, 6oo, 6op, 6oq, 6or, 6os, 6ot, 6ou, 6ov, 6ow, 6ox, 6oy, 6oz, 6pa, 6pb, 6pc, 6pd, 6pe, 6pf, 6pg, 6ph, 6pi, 6pj, 6pk, 6pl, 6pm, 6pn, 6po, 6pp, 6pq, 6pr, 6ps, 6pt, 6pu, 6pv, 6pw, 6px, 6py, 6pz, 6qa, 6qb, 6qc, 6qd, 6qe, 6qf, 6qg, 6qh, 6qi, 6qj, 6qk, 6ql, 6qm, 6qn, 6qo, 6qp, 6qq, 6qr, 6qs, 6qt, 6qu, 6qv, 6qw, 6qx, 6qy, 6qz, 6ra, 6rb, 6rc, 6rd, 6re, 6rf, 6rg, 6rh, 6ri, 6rj, 6rk, 6rl, 6rm, 6rn, 6ro, 6rp, 6rq, 6rr, 6rs, 6rt, 6ru, 6rv, 6rw, 6rx, 6ry, 6rz, 6sa, 6sb, 6sc, 6sd, 6se, 6sf, 6sg, 6sh, 6si, 6sj, 6sk, 6sl, 6sm, 6sn, 6so, 6sp, 6sq, 6sr, 6ss, 6st, 6su, 6sv, 6sw, 6sx, 6sy, 6sz, 6ta, 6tb, 6tc, 6td, 6te, 6tf, 6tg, 6th, 6ti, 6tj, 6tk, 6tl, 6tm, 6tn, 6to, 6tp, 6tq, 6tr, 6ts, 6tt, 6tu, 6tv, 6tw, 6tx, 6ty, 6tz, 6ua, 6ub, 6uc, 6ud, 6ue, 6uf, 6ug, 6uh, 6ui, 6uj, 6uk, 6ul, 6um, 6un, 6uo, 6up, 6uq, 6ur, 6us, 6ut, 6uu, 6uv, 6uw, 6ux, 6uy, 6uz, 6va, 6vb, 6vc, 6vd, 6ve, 6vf, 6vg, 6vh, 6vi, 6vj, 6vk, 6vl, 6vm, 6vn, 6vo, 6vp, 6vq, 6vr, 6vs, 6vt, 6vu, 6vv, 6vw, 6vx, 6vy, 6vz, 6wa, 6wb, 6wc, 6wd, 6we, 6wf, 6wg, 6wh, 6wi, 6wj, 6wk, 6wl, 6wm, 6wn, 6wo, 6wp, 6wq, 6wr, 6ws, 6wt, 6wu, 6wv, 6ww, 6wx, 6wy, 6wz, 6xa, 6xb, 6xc, 6xd, 6xe, 6xf, 6xg, 6xh, 6xi, 6xj, 6xk, 6xl, 6xm, 6xn, 6xo, 6xp, 6xq, 6xr, 6xs, 6xt, 6xu, 6xv, 6xw, 6xx, 6xy, 6xz, 6ya, 6yb, 6yc, 6yd, 6ye, 6yf, 6yg, 6yh, 6yi, 6yj, 6yk, 6yl, 6ym, 6yn, 6yo, 6yp, 6yq, 6yr, 6ys, 6yt, 6yu, 6yv, 6yw, 6yx, 6yy, 6yz, 6za, 6zb, 6zc, 6zd, 6ze, 6zf, 6zg, 6zh, 6zi, 6zj, 6zk, 6zl, 6zm, 6zn, 6zo, 6zp, 6zq, 6zr, 6zs, 6zt, 6zu, 6zv, 6zw, 6zx, 6zy, 6zz, 7a, 7b, 7c, 7d, 7e, 7f, 7g, 7h, 7i, 7j, 7k, 7l, 7m, 7n, 7o, 7p, 7q, 7r, 7s, 7t, 7u, 7v, 7w, 7x, 7y, 7z, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e, 8f, 8g, 8h, 8i, 8j, 8k, 8l, 8m, 8n, 8o, 8p, 8q, 8r, 8s, 8t, 8u, 8v, 8w, 8x, 8y, 8z, 9a, 9b, 9c, 9d, 9e, 9f, 9g, 9h, 9i, 9j, 9k, 9l, 9m, 9n, 9o, 9p, 9q, 9r, 9s, 9t, 9u, 9v, 9w, 9x, 9y, 9z, 10a, 10b, 10c, 10d, 10e, 10f, 10g, 10h, 10i, 10j, 10k, 10l, 10m, 10n, 10o, 10p, 10q, 10r, 10s, 10t, 10u, 10v, 10w, 10x, 10y, 10z, 11a, 11b, 11c, 11d, 11e, 11f, 11g, 11h, 11i, 11j, 11k, 11l, 11m, 11n, 11o, 11p, 11q, 11r, 11s, 11t, 11u, 11v, 11w, 11x, 11y, 11z, 12a, 12b, 12c, 12d, 12e, 12f, 12g, 12h, 12i, 12j, 12k, 12l, 12m, 12n, 12o, 12p, 12q, 12r, 12s, 12t, 12u, 12v, 12w, 12x, 12y, 12z, 13a, 13b, 13c, 13d, 13e, 13f, 13g, 13h, 13i, 13j, 13k, 13l, 13m, 13n, 13o, 13p, 13q, 13r, 13s, 13t, 13u, 13v, 13w, 13x, 13y, 13z, 14a, 14b, 14c, 14d, 14e, 14f, 14g, 14h, 14i, 14j, 14k, 14l, 14m, 14n, 14o, 14p, 14q, 14r, 14s, 14t, 14u, 14v, 14w, 14x, 14y, 14z, 15a, 15b, 15c, 15d, 15e, 15f, 15g, 15h, 15i, 15j, 15k, 15l, 15m, 15n, 15o, 15p, 15q, 15r, 15s, 15t, 15u, 15v, 15w, 15x, 15y, 15z, 16a, 16b, 16c, 16d, 16e, 16f, 16g, 16h, 16i, 16j, 16k, 16l, 16m, 16n, 16o, 16p, 16q, 16r, 16s, 16t, 16u, 16v, 16w, 16x, 16y, 16z, 17a, 17b, 17c, 17d, 17e, 17f, 17g, 17h, 17i, 17j, 17k, 17l, 17m, 17n, 17o, 17p, 17q, 17r, 17s, 17t, 17u, 17v, 17w, 17x, 17y, 17z, 18a, 18b, 18c, 18d, 18e, 18f, 18g, 18h, 18i, 18j, 18k, 18l, 18m, 18n, 18o, 18p, 18q, 18r, 18s, 18t, 18u, 18v, 18w, 18x, 18y, 18z, 19a, 19b, 19c, 19d, 19e, 19f, 19g, 19h, 19i, 19j, 19k, 19l, 19m, 19n, 19o, 19p, 19q, 19r, 19s, 19t, 19u, 19v, 19w, 19x, 19y, 19z, 20a, 20b, 20c, 20d, 20e, 20f, 20g, 20h, 20i, 20j, 20k, 20l, 20m, 20n, 20o, 20p, 20q, 20r, 20s, 20t, 20u, 20v, 20w, 20x, 20y, 20z, 21a, 21b, 21c, 21d, 21e, 21f, 21g, 21h, 21i, 21j, 21k, 21l, 21m, 21n, 21o, 21p, 21q, 21r, 21s, 21t, 21u, 21v, 21w, 21x, 21y, 21z, 22a, 22b, 22c, 22d, 22e, 22f, 22g, 22h, 22i, 22j, 22k, 22l, 22m, 22n, 22o, 22p, 22q, 22r, 22s, 22t, 22u, 22v, 22w, 22x, 22y, 22z, 23a, 23b, 23c, 23d, 23e, 23f, 23g, 23h, 23i, 23j, 23k, 23l, 23m, 23n, 23o, 23p, 23q, 23r, 23s, 23t, 23u, 23v, 23w, 23x, 23y, 23z, 24a, 24b, 24c, 24d, 24e, 24f, 24g, 24h, 24i, 24j, 24k, 24l, 24m, 24n, 24o, 24p, 24q, 24r, 24s, 24t, 24u, 24v, 24w, 24x, 24y, 24z, 25a, 25b, 25c, 25d, 25e, 25f, 25g, 25h, 25i, 25j, 25k, 25l, 25m, 25n, 25o, 25p, 25q, 25r, 25s, 25t, 25u, 25v, 25w, 25x, 25y, 25z, 26a, 26b, 26c, 26d, 26e, 26f, 26g, 26h, 26i, 26j, 26k, 26l, 26m, 26n, 26o, 26p, 26q, 26r, 26s, 26t, 26u, 26v, 26w, 26x, 26y, 26z, 27a, 27b, 27c, 27d, 27e, 27f, 27g, 27h, 27i, 27j, 27k, 27l, 27m, 27n, 27o, 27p, 27q, 27r, 27s, 27t, 27u, 27v, 27w, 27x, 27y, 27z, 28a, 28b, 28c, 28d, 28e, 28f, 28g, 28h, 28i, 28j, 28k, 28l, 28m, 28n, 28o, 28p, 28q, 28r, 28s, 28t, 28u, 28v, 28w, 28x, 28y, 28z, 29a, 29b, 29c, 29d, 29e, 29f, 29g, 29h, 29i, 29j, 29k, 29l, 29m, 29n, 29o, 29p, 29q, 29r, 29s, 29t, 29u, 29v, 29w, 29x, 29y, 29z, 30a, 30b, 30c, 30d, 30e, 30f, 30g, 30h, 30i, 30j, 30k, 30l, 30m, 30n, 30o, 30p, 30q, 30r, 30s, 30t, 30u, 30v, 30w, 30x, 30y, 30z, 31a, 31b, 31c, 31d, 31e, 31f, 31g, 31h, 31i, 31j, 31k, 31l, 31m, 31n, 31o, 31p, 31q, 31r, 31s, 31t, 31u, 31v, 31w, 31x, 31y, 31z, 32a, 32b, 32c, 32d, 32e, 32f, 32g, 32h, 32i, 32j, 32k, 32l, 32m, 32n, 32o, 32p, 32q, 32r, 32s, 32t, 32u, 32v, 32w, 32x, 32y, 32z, 33a, 33b, 33c, 33d, 33e, 33f, 33g, 33h, 33i, 33j, 33k, 33l, 33m, 33n, 33o, 33p, 33q, 33r, 33s, 33t, 33u, 33v, 33w, 33x, 33y, 33z, 34a, 34b, 34c, 34d, 34e, 34f, 34g, 34h, 34i, 34j, 34k, 34l, 34m, 34n, 34o, 34p, 34q, 34r, 34s, 34t, 34u, 34v, 34w, 34x, 34y, 34z, 35a, 35b, 35c, 35d, 35e, 35f, 35g, 35h, 35i, 35j, 35k, 35l, 35m, 35n, 35o, 35p, 35q, 35r, 35s, 35t, 35u, 35v, 35w, 35x, 35y, 35z, 36a, 36b, 36c, 36d, 36e, 36f, 36g, 36h, 36i, 36j, 36k, 36l, 36m, 36n, 36o, 36p, 36q, 36r, 36s, 36t, 36u, 36v, 36w, 36x, 36y, 36z, 37a, 37b, 37c, 37d, 37e, 37f, 37g, 37h, 37i, 37j, 37k, 37l, 37m, 37n, 37o, 37p, 37q, 37r, 37s, 37t, 37u, 37v, 37w, 37x, 37y, 37z, 38a, 38b, 38c, 38d, 38e, 38f, 38g, 38h, 38i, 38j, 38k, 38l, 38m, 38n, 38o, 38p, 38q, 38r, 38s, 38t, 38u, 38v, 38w, 38x, 38y, 38z, 39a, 39b, 39c, 39d, 39e, 39f, 39g, 39h, 39i, 39j, 39k, 39l, 39m, 39n, 39o, 39p, 39q, 39r, 39s, 39t, 39u, 39v, 39w, 39x, 39y, 39z, 40a, 40b, 40c, 40d, 40e, 40f, 40g, 40h, 40i, 40j, 40k, 40l, 40m, 40n, 40o, 40p, 40q, 40r, 40s, 40t, 40u, 40v, 40w, 40x, 40y, 40z, 41a, 41b, 41c, 41d, 41e, 41f, 41g, 41h, 41i, 41j, 41k, 41l, 41m, 41n, 41o, 41p, 41q, 41r, 41s, 41t, 41u, 41v, 41w, 41x, 41y, 41z, 42a, 42b, 42c, 42d, 42e, 42f, 42g, 42h, 42i, 42j, 42k, 42l, 42m, 42n, 42o, 42p, 42q, 42r, 42s, 42t, 42u, 42v, 42w, 42x, 42y, 42z, 43a, 43b, 43c, 43d, 43e, 43f, 43g, 43h, 43i, 43j, 43k, 43l, 43m, 43n, 43o, 43p, 43q, 43r, 43s, 43t, 43u, 43v, 43w, 43x, 43y, 43z, 44a, 44b, 44c, 44d, 44e, 44f, 44g, 44h, 44i, 44j, 44k, 44l, 44m, 44n, 44o, 44p, 44q, 44r, 44s, 44t, 44u, 44v, 44w, 44x, 44y, 44z, 45a, 45b, 45c, 45d, 45e, 45f, 45g, 45h, 45i, 45j, 45k, 45l, 45m, 45n, 45o, 45p, 45q, 45r, 45s, 45t, 45u, 45v, 45w, 45x, 45y, 45z, 46a, 46b, 46c, 46d, 46e, 46f, 46g, 46h, 46i, 46j, 46k, 46l, 46m, 46n, 46o, 46p, 46q, 46r, 46s, 46t, 46u, 46v, 46w, 46x, 46y, 46z, 47a, 47b, 47c, 47d, 47e, 47f, 47g, 47h, 47i, 47j, 47k, 47l, 47m, 47n, 47o, 47p, 47q, 47r, 47s, 47t, 47u, 47v, 47w, 47x, 47y, 47z, 48a, 48b, 48c, 48d, 48e, 48f, 48g, 48h, 48i, 48j, 48k, 48l, 48m, 48n, 48o, 48p, 48q, 48r, 48s, 48t, 48u, 48v, 48w, 48x, 48y, 48z, 49a, 49b, 49c, 49d, 49e, 49f, 49g, 49h, 49i, 49j, 49k, 49l, 49m, 49n, 49o, 49p, 49q, 49r, 49s, 49t, 49u, 49v, 49w, 49x, 49y, 49z, 50a, 50b, 50c, 50d, 50e, 50f, 50g, 50h, 50i, 50j, 50k, 50l, 50m, 50n, 50o, 50p, 50q, 50r, 50s, 50t, 50u, 50v, 50w, 50x, 50y, 50z, 51a, 51b, 51c, 51d, 51e, 51f, 51g, 51h, 51i, 51j, 51k, 51l, 51m, 51n, 51o, 51p, 51q, 51r, 51s, 51t, 51u, 51v, 51w, 51x, 51y, 51z, 52a, 52b, 52c, 52d, 52e, 52f, 52g, 52h, 52i, 52j, 52k, 52l, 52m, 52n, 52o, 52p, 52q, 52r, 52s, 52t, 52u, 52v, 52w, 52x, 52y, 52z, 53a, 53b, 53c, 53d, 53e, 53f, 53g, 53h, 53i, 53j, 53k, 53l, 53m, 53n, 53o, 53p, 53q, 53r, 53s, 53t, 53u, 53v, 53w, 53x, 53y, 53z, 54a, 54b, 54c, 54d, 54e, 54f, 54g, 54h, 54i, 54j, 54k, 54l, 54m, 54n, 54o, 54p, 54q, 54r, 54s, 54t, 54u, 54v, 54w, 54x, 54y, 54z, 55a, 55b, 55c, 55d, 55e, 55f, 55g, 55h, 55i, 55j, 55k, 55l, 55m, 55n, 55o, 55p, 55q, 55r, 55s, 55t, 55u, 55v, 55w, 55x, 55y, 55z, 56a, 56b, 56c, 56d, 56e, 56f, 56g, 56h, 56i, 56j, 56k, 56l, 56m, 56n, 56o, 56p, 56q, 56r, 56s, 56t, 56u, 56v, 56w, 56x, 56y, 56z, 57a, 57b, 57c, 57d, 57e, 57f, 57g, 57h, 57i, 57j, 57k, 57l, 57m, 57n, 57o, 57p, 57q, 57r, 57s, 57t, 57u, 57v, 57w, 57x, 57y, 57z, 58a, 58b, 58c, 58d, 58e, 58f, 58g, 58h, 58i, 58j, 58k, 58l, 58m, 58n, 58o, 58p, 58q, 58r, 58s, 58t, 58u, 58v, 58w, 58x, 58y, 58z, 59a, 59b, 59c, 59d, 59e, 59f, 59g, 59h, 59i, 59j, 59k, 59l, 59m, 59n, 59o, 59p, 59q, 59r, 59s, 59t, 59u, 59v, 59w, 59x, 59y, 59z, 60a, 60b, 60c, 60d, 60e, 60f, 60g, 60h, 60i, 60j, 60k, 60l, 60m, 60n, 60o, 60p, 60q, 60r, 60s, 60t, 60u, 60v, 60w, 60x, 60y, 60z, 61a, 61b, 61c, 61d, 61e, 61f, 61g, 61h, 61i, 61j, 61k, 61l, 61m, 61n, 61o, 61p, 61q, 61r, 61s, 61t, 61u, 61v, 61w, 61x, 61y, 61z, 62a, 62b, 62c, 62d, 62e, 62f, 62g, 62h, 62i, 62j, 62k, 62l, 62m, 62n, 62o, 62p, 62q, 62r, 62s, 62t, 62u, 62v, 62w, 62x, 62y, 62z, 63a, 63b, 63c, 63d, 63e, 63f, 63g, 63h, 63i, 63j, 63k, 63l, 63m, 63n, 63o, 63p, 63q, 63r, 63s, 63t, 63u, 63v, 63w, 63x, 63y, 63z, 64a, 64b, 64c, 64d, 64e, 64f, 64g, 64h, 64i, 64j, 64k, 64l, 64m, 64n, 64o, 64p, 64q, 64r, 64s, 64t, 64u, 64v, 64w, 64x, 64y, 64z, 65a, 65b, 65c, 65d, 65e, 65f, 65g, 65h, 65i, 65j, 65k, 65l, 65m, 65n, 65o, 65p, 65q, 65r, 65s, 65t, 65u, 65v, 65w, 65x, 65y, 65z, 66a, 66b, 66c, 66d, 66e, 66f, 66g, 66h, 66i, 66j, 66k, 66l, 66m, 66n, 66o, 66p, 66q, 66r, 66s, 66t, 66u, 66v, 66w, 66x, 66y, 66z, 67a, 67b, 67c, 67d, 67e, 67f, 67g, 67h, 67i, 67j, 67k, 67l, 67m, 67n, 67o, 67p, 67q, 67r, 67s, 67t, 67u, 67v, 67w, 67x, 67y, 67z, 68a, 68b, 68c, 68d, 68e, 68f, 68g, 68h, 68i, 68j, 68k, 68l, 68m, 68n, 68o, 68p, 68q, 68r, 68s, 68t, 68u, 68v, 68w, 68x, 68y, 68z, 69a, 69b, 69c, 69d, 69e, 69f, 69g, 69h, 69i, 69j, 69k, 69l, 69m, 69n, 69o, 69p, 69q, 69r, 69s, 69t, 69u, 69v, 69w, 69x, 69y, 69z, 70a, 70b, 70c, 70d, 70e, 70f, 70g, 70h, 70i, 70j, 70k, 70l, 70m, 70n, 70o, 70p, 70q, 70r, 70s, 70t, 70u, 70v, 70w, 70x, 70y, 70z, 71a, 71b, 71c, 71d, 71e, 71f, 71g, 71h, 71i, 71j, 71k, 71l, 71m, 71n, 71o, 71p, 71q, 71r, 71s, 71t, 71u, 71v, 71w, 71x, 71y, 71z, 72a, 72b, 72c, 72d, 72e, 72f, 72g, 72h, 72i, 72j, 72k, 72l, 72m, 72n, 72o, 72p, 72q, 72r, 72s, 72t, 72u, 72v, 72w, 72x, 72y, 72z, 73a, 73b, 73c, 73d, 73e, 73f, 73g, 73h, 73i, 73j, 73k, 73l, 73m, 73n, 73o, 73p, 73q, 73r, 73s, 73t, 73u, 73v, 73w, 73x, 73y, 73z, 74a, 74b, 74c, 74d, 74e, 74f, 74g, 74h, 74i, 74j, 74k, 74l, 74m, 74n, 74o, 74p, 74q, 74r, 74s, 74t, 74u, 74v, 74w, 74x, 74y, 74z, 75a, 75b, 75c, 75d, 75e, 75f, 75g, 75h, 75i, 75j, 75k, 75l, 75m, 75n, 75o, 75p, 75q, 75r, 75s, 75t, 75u, 75v, 75w, 75x, 75y, 75z, 76a, 76b, 76c, 76d, 76e, 76f, 76g, 76h, 76i, 76j, 76k, 76l, 76m, 76n, 76o, 76p, 76q, 76r, 76s, 76t, 76u, 76v, 76w,

mínima en el estado estacionario del metabolito **1-7** ($C_{24, ss}$) entre aproximadamente 20-60 ng/mL, 20-50 ng/mL, o 20-40 ng/mL.

En una modalidad, el compuesto, formulaciones o formas de dosificación sólidas que incluyen el compuesto también se pueden usar profilácticamente para prevenir o retardar la progresión de la enfermedad clínica en individuos que son positivos a anticuerpos VHC o positivos a antígenos VHC o que han estado expuestos a la hepatitis C.

En particular, se ha descubierto que el Compuesto **2** está activo contra el VHC y muestra propiedades farmacológicas y de tipo farmacológico superiores en comparación con su base libre (Compuesto **1**). Sorprendentemente, el Compuesto **2** está más biodisponible y alcanza una AUC mayor que el Compuesto **1** (Ejemplo 19) y el Compuesto **2** es más selectivo para el órgano diana, el hígado, que el Compuesto **1** (Ejemplo 19).

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



A pesar del volumen de bibliografía de nucleósidos antivíricos y solicitudes de patente, el Compuesto **2** no se ha descrito específicamente.

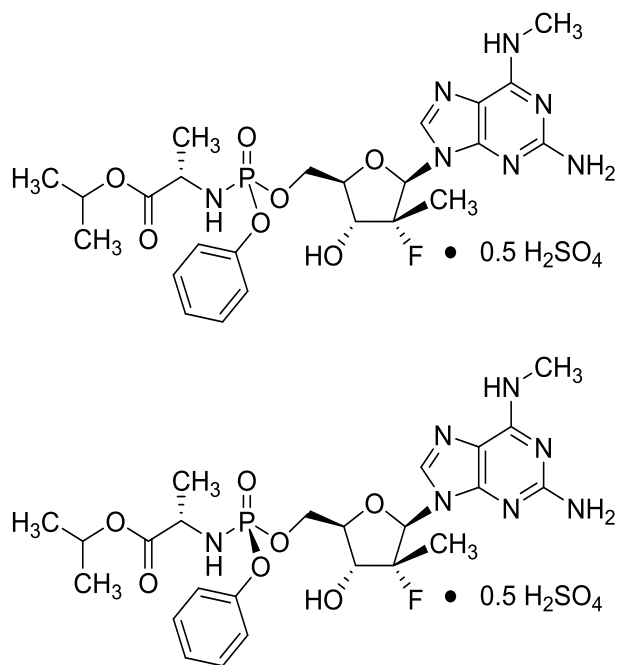
El compuesto **2** tiene una estereoquímica S en el átomo de fósforo que se ha confirmado con la cristalografía de rayos X (FIG. 3, Ejemplo 2). En modalidades alternativas, el Compuesto **2** se puede usar en forma de cualquier proporción deseada de enantiómeros R y S de fósforo, que incluye hasta enantiómeros puros. En algunas modalidades, el Compuesto **2** se usa en una forma que está al menos libre en un 90% del enantiómero opuesto, y puede estar libre al menos en un 98%, 99%, o incluso en un 100%

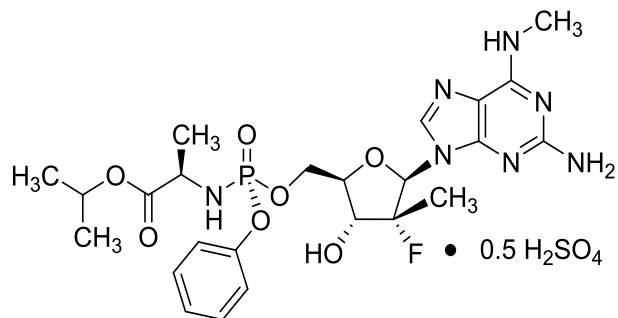
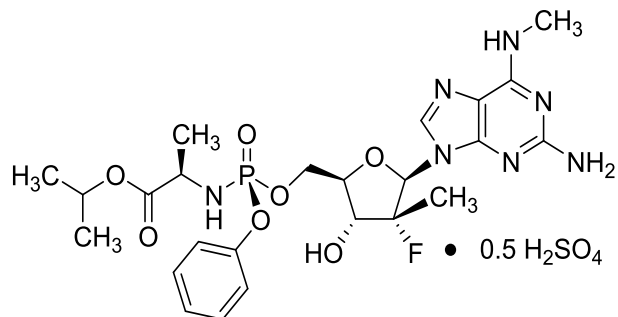
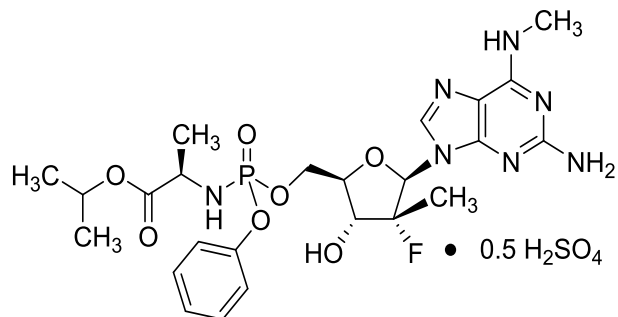
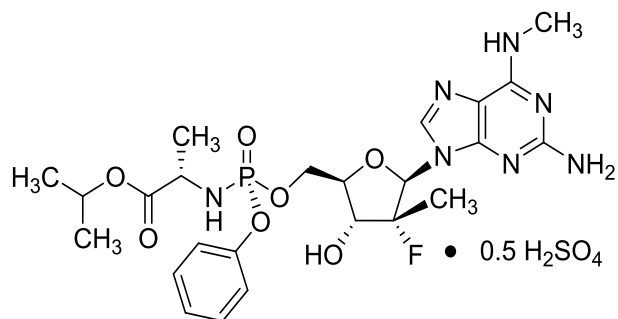
del enantiómero opuesto. A menos que se describa lo contrario, un Compuesto 2 enriquecido enantioméricamente está libre al menos en un 90% del enantiómero opuesto. Además, en una modalidad alternativa, el aminoácido del fosforamidato puede estar en la configuración D o L, o una mezcla de los mismos, incluida una mezcla racémica.

5 A menos que se especifique lo contrario, los compuestos descritos aquí se proporcionan en la configuración β -D. En una modalidad alternativa, los compuestos pueden proporcionarse en una configuración β -L. Del mismo modo, cualquier grupo sustituyente que muestre quiralidad puede proporcionarse en forma racémica, enantiomérica, diastereomérica o cualquier mezcla de las mismas. Cuando un fosforamidato exhibe quiralidad, puede proporcionarse como un derivado
10 de fósforo quiral R o S o una mezcla de los mismos, incluyendo una mezcla racémica. Todas las combinaciones de estas estereo configuraciones son modalidades alternativas en la invención descrita en este documento. En otra modalidad, al menos uno de los hidrógenos del Compuesto 2 (el nucleótido o la sal de hemisulfato) se puede reemplazar con deuterio.

Estas configuraciones alternativas incluyen, pero no se limitan a,

15





5

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

El compuesto activo de la invención es el Compuesto 2, que se puede proporcionar en una composición farmacéuticamente aceptable o en una forma de dosificación sólida del mismo. En una

modalidad, el compuesto **2** es un sólido amorfo. En aún una modalidad adicional, el Compuesto **2** es un sólido cristalino.

Síntesis del Compuesto 2

La presente invención incluye además un proceso ilustrativo no limitativo para la preparación del Compuesto **2** que incluye

- (i) un primer paso para disolver el Compuesto **1** en un disolvente orgánico, por ejemplo, acetona, acetato de etilo, metanol, acetonitrilo o éter, o similar, en un matraz o recipiente;
- (ii) cargar un segundo matraz o recipiente con un segundo solvente orgánico, que puede ser igual o diferente al solvente orgánico en el paso (i), enfriar opcionalmente el segundo solvente a 0-10 grados C y agregar por goteo H_2SO_4 al segundo disolvente orgánico para crear una mezcla de H_2SO_4 /disolvente orgánico; y en donde el disolvente, por ejemplo, puede ser metanol;
- (iii) agregar por goteo la mezcla de H_2SO_4 /solvente en una proporción molar de 0.5/1.0 del paso (ii) a la solución del Compuesto **1** del paso (i) a temperatura ambiente o ligeramente aumentada o disminuida (por ejemplo, 23-35 grados C);
- (iv) agitar la reacción del paso (iii) hasta que se forme un precipitado del Compuesto **2**, por ejemplo, a temperatura ambiente o ligeramente aumentada o disminuida;
- (v) filtrar opcionalmente el precipitado resultante del paso (iv) y lavar con un disolvente orgánico; y
- (vi) secar opcionalmente el Compuesto **2** resultante al vacío, opcionalmente a una temperatura elevada, por ejemplo, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 °C.

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

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

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

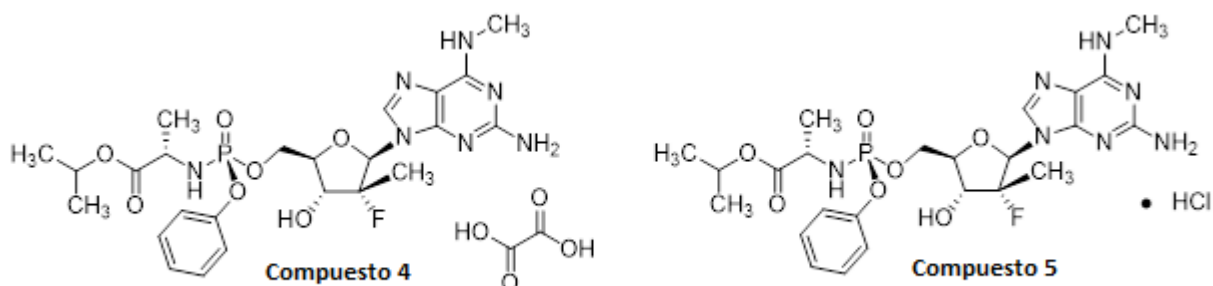
En una modalidad, se utiliza una mezcla de disolventes para lavar en el paso (v), por ejemplo, etanol/acetona. En una modalidad, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es isopropanol/acetona. En una modalidad, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es n-butanol/acetona. En una modalidad, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es etanol/acetato de etilo. En una modalidad, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es isopropanol/acetato de etilo. En una modalidad, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es n-butanol/acetato de etilo. En una modalidad, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es etanol/tetrahidrofurano. En una modalidad, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es isopropanol/tetrahidrofurano. En una modalidad, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es n-butanol/tetrahidrofurano. En una modalidad, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es etanol/acetonitrilo. En una modalidad, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es isopropanol/acetonitrilo. En una modalidad, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es isopropanol/acetonitrilo. En una modalidad la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es etanol/dimetilformamida. En una modalidad, la mezcla de disolvente para lavar en el paso (v) es isopropanol/dimetilformamida. En una modalidad, la mezcla de disolvente para el lavado en el paso (v) es isopropanol/dimetilformamida.

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

El metabolismo del Compuesto **1** y el Compuesto **2** implica la producción de un 5'-monofosfato y el anabolismo subsiguiente de la base de N⁶-metil-2,6-diaminopurina (**1-3**) para generar dihidrogenfosfato de ((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metilo (**1-4**) como el 5'-monofosfato. El monofosfato se anaboliza aún más a las especies de trifosfato activo: el 5'-trifosfato (**1-6**). El 5'-trifosfato puede metabolizarse adicionalmente para generar 2-amino-9-((2R, 3R, 4R, 5R) -3-fluoro-4-hidroxi-5- (hidroximetil) -3-metiltetrahidrofuran-2-il) -1,9-dihidro-6H-purin-6-ona (**1-7**). Alternativamente, el 5'-monofosfato 1-2 puede metabolizarse para generar la base de purina **1-8**. La ruta metabólica para el isopropilo ((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(metilamino) -9H-purin-9-il) -4-fluor-3- hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil) -L-alaninato se ilustra en el Esquema 1 (mostrado arriba).

III. Sales adicionales del Compuesto 1

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



5

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

IV. Definiciones

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

Los términos "coadministrador" y "coadministración" o terapia de combinación se usan para describir la administración del Compuesto 2 de acuerdo con la presente invención en combinación con al menos otro agente activo, por ejemplo, cuando sea apropiado, al menos un agente anti-VHC adicional. El momento de la coadministración se determina mejor por el médico especialista que trata al paciente. A veces se prefiere que los agentes se administren al mismo tiempo. Alternativamente, los fármacos seleccionados para la terapia de combinación pueden administrarse en diferentes momentos al paciente. Por supuesto, cuando hay más de una viral u

otra infección u otra condición, los presentes compuestos pueden combinarse con otros agentes para tratar esa otra infección o condición según se requiera.

El término "huésped", como se usa en el presente documento, se refiere a un organismo unicelular o multicelular en el que un virus del VHC puede replicarse, incluyendo líneas celulares y animales, y típicamente un ser humano. El término huésped se refiere específicamente a las células infectadas, las células transfectadas con todo o parte de un genoma del VHC, y los animales, en particular, los primates (incluidos los chimpancés) y los humanos. En la mayoría de las aplicaciones animales de la presente invención, el huésped es un paciente humano. Sin embargo, las aplicaciones veterinarias, en ciertas indicaciones, están claramente anticipadas por la presente invención (tales como los chimpancés). El huésped puede ser, por ejemplo, bovino, equino, aviar, canino, felino, etc.

Sustitución isotópica

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

La sustitución con isótopos tales como el deuterio puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, tales como, por ejemplo, una vida media *in vivo* aumentada o una reducción en los requisitos de dosificación. La sustitución de deuterio por hidrógeno en un sitio de descomposición metabólica puede reducir la tasa o eliminar el metabolismo en ese enlace. En cualquier posición del compuesto en el que pueda estar presente un átomo de hidrógeno, el átomo de hidrógeno puede ser cualquier isótopo de hidrógeno, incluido el protio

(¹H), deuterio (²H) y tritio (³H). Por lo tanto, en este documento se hace referencia a un compuesto que abarca todas las formas isotópicas potenciales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

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

V. Métodos de tratamiento o profilaxis.

El tratamiento, como se usa en este documento, se refiere a la administración del Compuesto 2 a un huésped, por ejemplo, un ser humano que está o puede infectarse con un virus del VHC.

El término "profiláctico" o preventivo, cuando se usa, se refiere a la administración del Compuesto 2 para prevenir o reducir la probabilidad de que ocurra un trastorno viral. La presente invención incluye tanto tratamientos como terapias profilácticas o preventivas. En una modalidad, el Compuesto 2 se administra a un huésped que ha estado expuesto y, por lo tanto, está en riesgo de infección por una infección por el virus de la hepatitis C.

La invención está dirigida a un método de tratamiento o profilaxis de un virus de la hepatitis C, que incluye formas de VHC resistentes a fármacos y resistentes a multifármacos y estados de enfermedad, afecciones o complicaciones de una infección por el VHC, incluyendo cirrosis y hepatotoxicidades relacionadas, así como otras afecciones secundarias a una infección por el VHC, tales como debilidad, pérdida de apetito, pérdida de peso, aumento de tamaño de los senos (especialmente en hombres), salpullido (especialmente en las palmas de las manos), dificultad para la coagulación de la sangre, vasos sanguíneos en forma de araña en la piel, confusión, coma (encefalopatía), acumulación de líquido en la cavidad abdominal (ascitis), várices esofágicas, hipertensión portal, insuficiencia renal, aumento en el tamaño del bazo,

disminución de las células sanguíneas, anemia, trombocitopenia, ictericia y cáncer hepatocelular, entre otros. El método consiste en administrar a un huésped que lo necesite, habitualmente un ser humano, una cantidad efectiva de Compuesto 2 como se describe aquí, opcionalmente en combinación con al menos un agente bioactivo adicional, por ejemplo, un agente anti-VHC adicional, además en combinación con un aditivo y/o excipiente de soporte farmacéuticamente aceptable.

En aún otro aspecto, la presente invención es un método para la prevención o profilaxis de una infección por VHC o un estado de enfermedad o estado de enfermedad relacionado o de seguimiento, condición o complicación de una infección por VHC, que incluye cirrosis y hepatotoxicidades relacionadas, debilidad, pérdida de apetito, pérdida de peso, aumento de tamaño de los senos (especialmente en los hombres), salpullido (especialmente en las palmas de las manos), dificultad para coagulación de la sangre, vasos sanguíneos en forma de araña en la piel, confusión, coma (encefalopatía), acumulación de líquido en la cavidad abdominal (ascitis), várices esofágicas, hipertensión portal, insuficiencia renal, aumento del tamaño del bazo, disminución de las células sanguíneas, anemia, trombocitopenia, ictericia y cáncer hepatocelular (hígado), entre otros, dicho método comprende administrar a un paciente en riesgo una cantidad eficaz del compuesto 2 como se describe anteriormente en combinación con un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en combinación con otro agente anti-VHC. En otra modalidad, los compuestos activos de la invención se pueden administrar a un paciente después de un trasplante de hígado relacionado con la hepatitis para proteger el nuevo órgano.

En una modalidad alternativa, el Compuesto 2 se proporciona como la sal de hemisulfato de un fosforamidato del Compuesto 1 diferente al fosforamidato específico descrito en la ilustración del compuesto. Los expertos en la técnica conocen una amplia gama de fosforamidatos que incluyen diversos ésteres y fosfoésteres, cualquier combinación de los cuales puede usarse para proporcionar un compuesto activo como se describe en el presente documento en forma de una sal de hemisulfato.

VI. Composiciones farmacéuticas y formas de dosificación

En un aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden una cantidad eficaz contra el virus del VHC del Compuesto 2 como se describe en el presente documento, opcionalmente en combinación con un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable, además opcionalmente en combinación o alternancia con al menos otro compuesto activo. En una modalidad, la invención incluye una forma de dosificación sólida del Compuesto 2 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden una cantidad eficaz anti-VHC del Compuesto 2 descrito en el presente documento, opcionalmente en combinación con un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable, además opcionalmente en combinación con al menos otro agente antiviral, como un agente anti-VHC.

5 La invención incluye composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad eficaz para tratar una infección por el virus de la hepatitis C del Compuesto 2 de la presente invención o profármaco, en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una modalidad alternativa, la invención incluye composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad eficaz para prevenir una infección por el virus de la hepatitis C del Compuesto 2 de la presente invención o profármaco, en un vehículo o excipiente
10 farmacéuticamente aceptable.

Un experto en la técnica reconocerá que una cantidad terapéuticamente eficaz variará con la infección o afección que se va a tratar, su gravedad, el régimen de tratamiento a emplear, la farmacocinética del agente utilizado, así como el paciente o el sujeto (animal o humano) a tratar, y tal cantidad terapéutica puede ser determinada por el médico o especialista a cargo.

15 El Compuesto 2 de acuerdo con la presente invención se puede formular en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En general, es preferible administrar la composición farmacéutica en forma administrable por vía oral, y en particular, una forma de dosificación sólida tal como una píldora o tableta. Ciertas formulaciones pueden administrarse a través de una vía parenteral, intravenosa, intramuscular, tópica, transdérmica, bucal, subcutánea, de supositorio
20 u otra, incluido el spray intranasal. Las formulaciones intravenosas e intramusculares a menudo se administran en solución salina estéril. Un experto en la técnica puede modificar las formulaciones para hacerlas más solubles en agua u otro vehículo, por ejemplo, esto puede lograrse fácilmente mediante modificaciones menores (formulación de sal, esterificación, etc.) que están dentro de la experiencia habitual en el estado de la técnica. También está dentro de las
25 habilidades rutinarias modificar la ruta de administración y el régimen de dosificación del Compuesto 2 con el fin de controlar la farmacocinética de los presentes compuestos para lograr un efecto beneficioso máximo en los pacientes, como se describe con más detalle en este documento.

En ciertas formas de dosificación farmacéutica, se puede usar la forma de profármaco de los compuestos, incluyendo especialmente derivados acilados (acetilados u otros) y de éter
30 (alquilo y relacionados), ésteres de fosfato, tiofosforamidatos, fosforamidatos y diversas formas de sal de los presentes compuestos para lograr el efecto deseado. Un experto habitual en la técnica reconocerá cómo modificar fácilmente los presentes compuestos a formas de profármaco

para facilitar el suministro de compuestos activos a un sitio objetivo dentro del organismo huésped o paciente. El experto en la técnica también aprovechará los parámetros farmacocinéticos favorables de las formas de los profármacos, cuando corresponda, al administrar los presentes compuestos a un sitio objetivo dentro del organismo huésped o paciente para maximizar el efecto deseado del compuesto.

La cantidad de Compuesto 2 incluida dentro de la formulación terapéuticamente activa de acuerdo con la presente invención es una cantidad efectiva para lograr el resultado deseado de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, para tratar la infección por VHC, reduciendo la probabilidad de una infección por VHC o la inhibición, reducción y/o supresión del VHC o sus efectos secundarios, incluidos los estados de enfermedad, afecciones y/o complicaciones que ocurren como consecuencia del VHC. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz del presente compuesto en una forma de dosificación farmacéutica puede variar de 0,001 mg/kg a 100 mg/kg aproximadamente por día o más, más a menudo, ligeramente menos de 0,1 mg/kg a más de 25 mg/kg aproximadamente por día del paciente o considerablemente más, dependiendo del compuesto utilizado, la afección o infección tratada y la vía de administración. El Compuesto 2 se administra a menudo en cantidades que van desde 0,1 mg/kg a 15 mg/kg aproximadamente por día del paciente, dependiendo de la farmacocinética del agente en el paciente. Este intervalo de dosificación generalmente produce concentraciones efectivas en el nivel de sangre del compuesto activo que pueden variar desde 0,001 a 100 aproximadamente, 0,05 a 100 microgramos/cc aproximadamente de sangre en el paciente.

A menudo, para tratar, prevenir o retrasar la aparición de estas infecciones y/o para reducir la probabilidad de una infección por el virus del VHC o un estado patológico secundario, afección o complicación del VHC, el Compuesto 2 se administrará en una forma de dosificación sólida en una cantidad que va desde aproximadamente 250 microgramos hasta aproximadamente 800 miligramos o más al menos una vez al día, por ejemplo, al menos 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 u 800 miligramos aproximadamente o más, una vez, dos veces, tres o hasta cuatro veces al día, según las indicaciones del proveedor de atención médica. El Compuesto 2 a menudo se administra por vía oral, pero puede administrarse por vía parenteral, tópica o en forma de supositorio, así como por vía intranasal, como un aerosol nasal o como se describe aquí de otra manera. Más generalmente, el Compuesto 2 se puede administrar en una tableta, cápsula, inyección, formulación intravenosa, suspensión, líquido, emulsión, implante, partícula, esfera, crema, pomada, supositorio, forma inhalable, forma transdérmica, bucal, sublingual, tópica, gel, mucosa, y similares.

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

En ciertas modalidades, la composición farmacéutica está en una forma de dosificación que
5 contiene de 1 mg a 2000 mg aproximadamente, de 10 mg a 1000 mg aproximadamente, de 100 mg a 800
mg aproximadamente, de 200 mg a 600 mg aproximadamente, de 300 mg a 500 mg aproximadamente, o
de 400 mg a 450 mg aproximadamente del Compuesto 2 en una forma de dosificación unitaria. En ciertas
modalidades, la composición farmacéutica está en una forma de dosificación, por ejemplo en una forma
de dosificación sólida, que contiene hasta aproximadamente 10, aproximadamente 50, aproximadamente
10 100, aproximadamente 125, aproximadamente 150, aproximadamente 175, aproximadamente 200,
aproximadamente 225, aproximadamente 250, aproximadamente 275, aproximadamente 300,
aproximadamente 325, aproximadamente 350, aproximadamente 375, aproximadamente 400,
aproximadamente 425, aproximadamente 450, aproximadamente 475, aproximadamente 500,
aproximadamente 525, aproximadamente 550, aproximadamente 575, aproximadamente 600,
15 aproximadamente 625, aproximadamente 650, aproximadamente 675, aproximadamente 700,
aproximadamente 725, aproximadamente 750, aproximadamente 775, aproximadamente 800,
aproximadamente 825, aproximadamente 850, aproximadamente 875, aproximadamente 900,
aproximadamente 925, aproximadamente 950, aproximadamente 975 o aproximadamente 1000 mg o más
del Compuesto 2 en una forma de dosificación unitaria. En una modalidad, el Compuesto 2 se administra
20 en una forma de dosificación que administra al menos aproximadamente 300 mg. En una modalidad, el
Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que administra al menos aproximadamente 400
mg. En una modalidad, el Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que administra al
menos aproximadamente 500 mg. En una modalidad, el Compuesto 2 se administra en una forma de
dosificación que administra al menos aproximadamente 600 mg. En una modalidad, el Compuesto 2 se
25 administra en una forma de dosificación que administra al menos aproximadamente 700 mg. En una
modalidad, el Compuesto 2 se administra en una forma de dosificación que administra al menos
aproximadamente 800 mg. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día
durante hasta 12 semanas. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día
durante hasta 10 semanas. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día
30 durante hasta 8 semanas. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día
durante hasta 6 semanas. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día
durante hasta 4 semanas. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día
durante al menos 4 semanas. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al
día durante al menos 6 semanas. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra al menos una vez

al día durante al menos 8 semanas. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante al menos 10 semanas. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante al menos 12 semanas. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra al menos cada dos días durante hasta 12 semanas, hasta 10 semanas, hasta 8 semanas, hasta 6 semanas o hasta 4 semanas. En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra al menos cada dos días durante al menos 4 semanas, al menos 6 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas o al menos 12 semanas. En una modalidad, al menos una vez al día se administran al menos unos 600 mg del Compuesto 2 durante hasta 6 semanas. En una modalidad, al menos una vez al día se administran al menos unos 500 mg del Compuesto 2 durante hasta 6 semanas. En una modalidad, al menos una vez al día se administran al menos unos 400 mg del Compuesto 2 durante hasta 6 semanas. En una modalidad, al menos 300 mg de Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante hasta 6 semanas. En una modalidad, al menos 200 mg de Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante hasta 6 semanas. En una modalidad, al menos 100 mg de Compuesto 2 se administra al menos una vez al día durante hasta 6 semanas.

El metabolito 1-6 es el trifosfato activo del Compuesto 2, pero el metabolito 1-6 no se puede medir en plasma. Un sustituto para el metabolito 1-6 es el metabolito 1-7. El metabolito 1-7 es un metabolito nucleósido medible en plasma y, por lo tanto, es una indicación de las concentraciones intracelulares del metabolito 1-6. Para obtener la actividad antiviral máxima del VHC, una forma de dosificación del Compuesto 2 debe alcanzar un metabolito 1-7 en una concentración mínima en el estado estacionario ($C_{24, ss}$) que exceda el valor EC_{95} del Compuesto 2. Como se muestra en la FIG. 24, el EC_{95} del Compuesto 1 contra los aislamientos clínicos de GT1, GT2, GT3 y GT4 es menor que 25 ng/mL (los valores del Compuesto 1 EC_{95} y el Compuesto 2 EC_{95} son los mismos). En una modalidad, se administra una forma de dosificación del Compuesto 2 que logra una concentración mínima en estado estable ($C_{24, ss}$) del metabolito 1-7 que está entre 15 y 75 ng/mL aproximadamente. En una modalidad, se administra una forma de dosificación del Compuesto 2 que logra una concentración mínima en estado estable ($C_{24, ss}$) del metabolito 1-7 que está entre 20 y 60 ng/mL aproximadamente. En una modalidad, se administra una forma de dosificación del Compuesto 2 que logra una concentración mínima en estado estable ($C_{24, ss}$) del metabolito 1-7 que está entre 30 y 60 ng/mL aproximadamente. En una modalidad, se administra una forma de dosificación del Compuesto 2 que logra una concentración mínima en estado estable ($C_{24, ss}$) del metabolito 1-7 que está entre 20 y 50 ng/mL aproximadamente. En una modalidad, se administra una forma de dosificación del Compuesto 2 que logra una concentración mínima en estado estable ($C_{24, ss}$) del metabolito 1-7 que está entre 30 y 50 ng/mL aproximadamente. En una modalidad, se administra una forma de dosificación del Compuesto 2 que logra una concentración mínima en estado estable ($C_{24, ss}$) del metabolito 1-7 que está entre 20 y 45 ng/mL aproximadamente. En una modalidad, se administra una

forma de dosificación del Compuesto 2 que logra una concentración mínima en estado estable ($C_{24, ss}$) del metabolito 1-7 que está entre 20 y 30 ng/mL aproximadamente. En una modalidad, se administra una forma de dosificación del Compuesto 2 que logra una concentración mínima en estado estable ($C_{24, ss}$) del metabolito 1-7 que está entre 20 y 35 ng/mL aproximadamente. En una modalidad, se administra una forma de dosificación del Compuesto 2 que logra una concentración mínima en estado estable ($C_{24, ss}$) del metabolito 1-7 que está entre 20 y 25 ng/mL aproximadamente. Las formas de dosificación aproximadas son $\pm 10\%$ de la concentración mínima en el estado estacionario.

En una modalidad, el Compuesto 2 se dosifica en una cantidad que logra un AUC del metabolito 1-7 (área bajo la curva) de entre 1.200 y 3.000 ng/mL aproximadamente. En una modalidad, el Compuesto 2 se dosifica en una cantidad que logra un AUC del metabolito 1-7 de entre 1.500 y 3.000 ng/mL aproximadamente. En una modalidad, el Compuesto 2 se dosifica en una cantidad que logra un AUC del metabolito 1-7 de entre 1.800 y 3.000 ng/mL aproximadamente. En una modalidad, el Compuesto 2 se dosifica en una cantidad que logra un AUC del metabolito 1-7 de entre 2.100 y 3.000 ng/mL aproximadamente. En una modalidad preferida, el Compuesto 2 se dosifica en una cantidad que logra un AUC del metabolito 1-7 de 2,200 ng*h/mL aproximadamente. Las formas de dosificación aproximadas son $\pm 10\%$ del AUC.

En el caso de la administración conjunta del Compuesto 2 en combinación con otro compuesto anti-VHC como se describe aquí de otra manera, la cantidad de Compuesto 2 de acuerdo con la presente invención que se administrará oscila entre 0,01 mg/kg del paciente a 800 mg/kg aproximadamente o más del paciente o considerablemente más, dependiendo del segundo agente a coadministrarse y su potencia contra el virus, el estado del paciente y la gravedad de la enfermedad o infección a tratar y la vía de administración. El otro agente anti-VHC puede administrarse, por ejemplo, en cantidades que varían desde 0,01 mg/kg a 800 mg/kg aproximadamente. Ejemplos de cantidades de dosificación del segundo agente activo son cantidades que van desde 250 microgramos hasta 750 mg aproximadamente o más al menos una vez al día, por ejemplo, al menos aproximadamente 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, u 800 miligramos o más, hasta cuatro veces al día. En ciertas modalidades preferidas, el Compuesto 2 puede administrarse a menudo en una cantidad que oscila entre 0,5 mg/kg a 50 mg/kg aproximadamente o más (generalmente hasta 100 mg/kg aproximadamente), generalmente dependiendo de la farmacocinética de los dos agentes en el paciente. Estos rangos de dosificación generalmente producen concentraciones efectivas en el nivel de sangre del compuesto activo en el paciente.

Para los fines de la presente invención, una cantidad eficaz profilácticamente o preventiva de las composiciones de acuerdo con la presente invención se encuentra dentro del

mismo intervalo de concentración como se expuso anteriormente para una cantidad terapéuticamente eficaz y es usualmente la misma que una cantidad terapéuticamente eficaz.

La administración del Compuesto **2** puede variar de administración continua (goteo intravenoso) a varias administraciones orales o intranasales por día (por ejemplo, Q.I.D.) o administración transdérmica y puede incluir administración oral, tópica, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica (que puede incluir un agente de mejora de la penetración), administración bucal y de supositorios, entre otras vías de administración. Los comprimidos orales con recubrimiento entérico también se pueden usar para mejorar la biodisponibilidad de los compuestos para una vía de administración oral. La forma de dosificación más efectiva dependerá de la biodisponibilidad/farmacocinética del agente particular elegido, así como de la gravedad de la enfermedad en el paciente. Las formas de dosificación oral son particularmente preferidas, debido a la facilidad de administración y al posible cumplimiento favorable por parte del paciente.

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

Para formulaciones parenterales, el vehículo usualmente comprenderá agua estéril o solución acuosa de cloruro de sodio, aunque también se pueden incluir otros ingredientes,

incluyendo aquellos que ayudan a la dispersión. Por supuesto, cuando se utiliza agua estéril y se mantiene como estéril, las composiciones y los vehículos también deben esterilizarse. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear vehículos líquidos, agentes de suspensión apropiados y similares.

5 Las suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos a antígenos víricos) también pueden prepararse mediante métodos convencionales para producir vehículos farmacéuticamente aceptables. Esto puede ser apropiado para el suministro de nucleósidos libres, nucleósidos de acilo/alquilo o formas profármaco de éster de fosfato de los compuestos de nucleósidos de acuerdo con la presente invención.

10 En modalidades típicas de acuerdo con la presente invención, el Compuesto 2 y las composiciones descritas se usan para tratar, prevenir o retrasar una infección por VHC o un estado patológico secundario, afección o complicación del VHC.

VII Terapia de combinación y alternancia

15 Es bien sabido que pueden surgir variantes de virus resistentes a los fármacos después de un tratamiento prolongado con un agente antiviral. La resistencia al fármaco a veces ocurre por la mutación de un gen que codifica una enzima utilizada en la replicación viral. La eficacia de un fármaco contra una infección por VHC puede prolongarse, aumentarse o restablecerse administrando el compuesto en combinación o alternando con otro, y quizás incluso con dos o
20 tres compuestos antivirales más que inducen una mutación diferente o actúan a través de una ruta diferente, a la del fármaco principal. Alternativamente, la farmacocinética, bio distribución, vida media u otro parámetro del fármaco se pueden alterar con dicha terapia de combinación (que puede incluir una terapia de alternancia si se considera concertada). Dado que el Compuesto 2 describe un inhibidor de la polimerasa NS5B, puede ser útil para administrar el compuesto un huésped en
25 combinación con, por ejemplo, un

- (1) Inhibidor de proteasa, tal como un inhibidor de proteasa NS3/4A;
- (2) Inhibidor de NS5A;
- (3) Otro inhibidor de la polimerasa NS5B;
- (4) Inhibidor no sustrato NS5B;
- 30 (5) Interferón alfa-2a, que puede estar pegilado o modificado de otra manera, y/o ribavirina;
- (6) Inhibidor no basado en sustrato;

- (7) Inhibidor de helicasa;
- (8) Oligodesoxinucleótido antisentido (S-ODN);
- (9) Aptamer;
- (10) Ribozima resistente a nucleasas;
- 5 (11) ARNi, incluyendo ARNmicro y ARNSi;
- (12) Anticuerpo, anticuerpo parcial o anticuerpo de dominio al virus, o
- (13) Antígeno viral o antígeno parcial que induce una respuesta de anticuerpos del huésped.

Ejemplos no limitantes de agentes anti-VHC que pueden administrarse en combinación con el Compuesto

10 2 de la invención, solos o con múltiples fármacos de esta lista, son

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

Si el Compuesto 2 se administra para tratar el virus de la hepatitis C avanzada que conduce a cáncer de hígado o cirrosis, en una modalidad, el compuesto se puede administrar en combinación o
 30 alternancia con otro fármaco que se usa típicamente para tratar el carcinoma hepatocelular (HCC), por ejemplo, como se describe por Andrew Zhu en "Nuevos Agentes en el Horizonte en Carcinoma Hepatocelular" Avances Terapéuticos en Oncología Médica, V 5 (1), enero de 2013, 41-50. Los

ejemplos de compuestos adecuados para la terapia de combinación donde el huésped tiene o está en riesgo de HCC incluyen agentes anti-angiogénicos, sunitinib, brivanib, linifanib, ramucirumab, bevacizumab, cediranib, pazopanib, TSU-68, lenvatinib, anticuerpos contra EGFR, inhibidores de mTor, Inhibidores de MEK, e inhibidores de decetilación de histonas.

5

EJEMPLOS

Métodos Generales

Los espectros de NMR ^1H , ^{19}F y ^{31}P se registraron en un espectrómetro Brücker de la transformada de Fourier de 400 MHz. Los espectros se obtuvieron DMSO- d_6 a menos que se indique lo contrario. Las multiplicidades de spín se indican mediante los símbolos s (singlete), d (doblete), t (triplete), m (multiplete) y br (ancho). Las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hz. Las reacciones se llevaron a cabo generalmente bajo una atmósfera de nitrógeno seco usando disolventes anhidros Sigma-Aldrich. Todos los productos químicos comunes fueron comprados de fuentes comerciales.

15

Las siguientes abreviaturas se utilizan en los ejemplos:

AUC: Área bajo la curva

C_{24} : Concentración del fármaco en plasma a las 24 horas.

$\text{C}_{24,ss}$: Concentración a las 24 horas después de la dosificación en estado estable.

20 C_{max} : Concentración máxima del fármaco alcanzado en plasma.

DCM: Diclorometano

EtOAc. Acetato de Etilo

EtOH Etanol

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

25 NaOH Hidróxido sódico

Na_2SO_4 : Sulfato de sodio (anhidro)

MeCN: Acetonitrilo

MeNH_2 : Metilamina

MeOH: Metanol

30 Na_2SO_4 : Sulfato sódico

NaHCO_3 : Bicarbonato de sodio

NH₄Cl: Cloruro de amonio

NH₄OH: Hidróxido de amonio

PE: Éter de petróleo

Ph₃P: Trifenilfosfina

5 RH: humedad relativa

Gel de sílice (malla 230 a 400, absorbente)

t-BuMgCl: cloruro de t-butilmagnesio

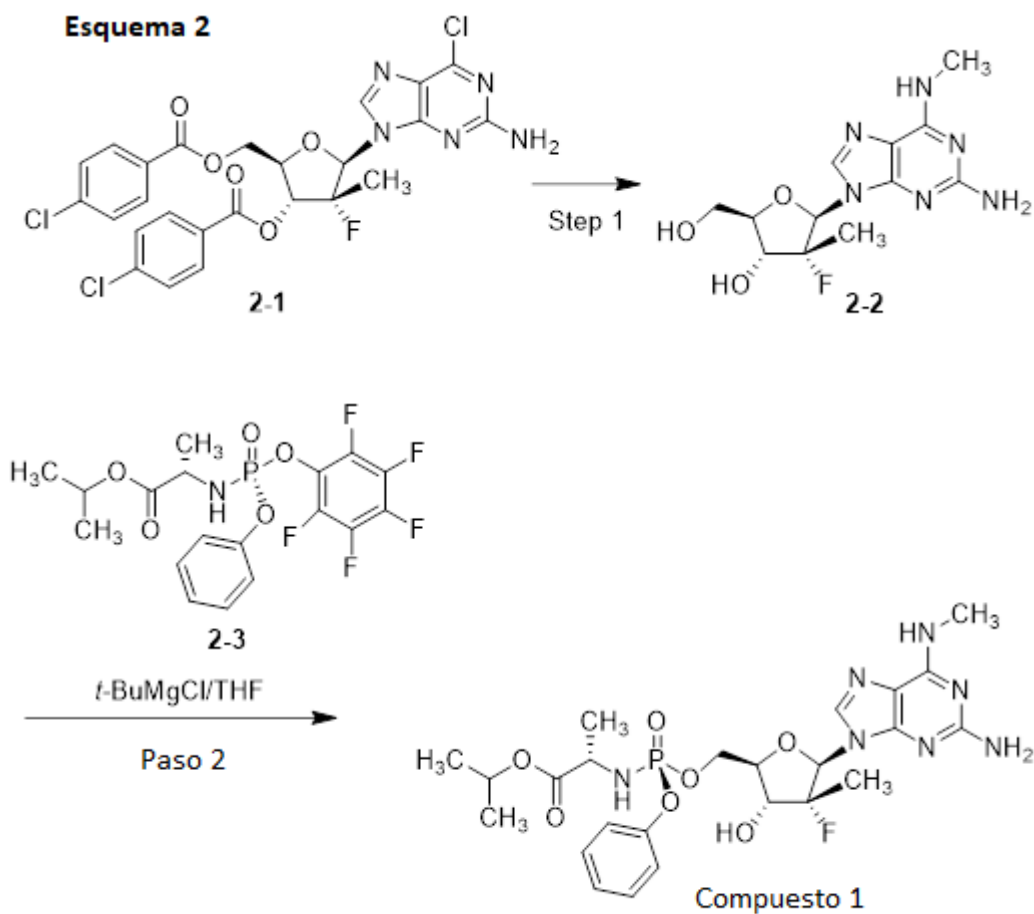
T_{max}: Tiempo en que se alcanza la C_{máx}.

THF: Tetrahidrofurano (THF), anhidro

10 TP: Trifosfato

Ejemplo 1. Síntesis del Compuesto 1

Esquema 2



Paso 1: Síntesis de (2R,3R,4R,5R)-5-(2-Amino-6-(metilamino) -9H-purin-9-il) -4-fluoro-2-(hidroximetil) -4-metiltetrahidrofurano-3- ol (2-2)

Un matraz de 50 L se cargó con metanol (30 L) y se agitó a 10 + 5 °C. NH₂CH₃ (3,95 kg) se ventiló lentamente en el reactor a 10 + 5 °C. El Compuesto **2-1** (3,77 kg) se agregó en lotes a 20 + 5 °C y se agitó durante 1 hora para obtener una solución transparente. La reacción se agitó durante 6 a 8 horas adicionales, momento en el que la HPLC indicó que el producto intermedio era menos del 0,1% de la solución. El reactor se cargó con NaOH sólido (254 g), se agitó durante 30 minutos y se concentró a 50 + 5 °C (grado de vacío: -0,095). El residuo resultante se cargó con EtOH (40 L) y se suspendió nuevamente durante 1 hora a 60 °C. Luego, la mezcla se filtró a través de celite y la torta del filtrado se suspendió nuevamente con EtOH (15 L) durante 1 hora a 60 °C. El filtrado se filtró una vez más, se combinó con el filtrado de la filtración anterior y luego se concentró a 50 + 5 °C (grado de vacío: -0.095). Se precipitó una gran cantidad de sólido. Se agregó EtOAc (6 L) al residuo sólido y la mezcla se concentró a 50 + 5 °C (grado de vacío: -0,095). Luego se agregó DCM al residuo y la mezcla se volvió a suspender a reflujo durante 1 hora, se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se secó a 50 + 5 °C en un horno de vacío para proporcionar el compuesto **2-2** como un sólido blancuzco. (1.89 Kg, 95.3%, pureza del 99.2%).

Método Analítico para el Compuesto 2-2: La pureza del compuesto **2-2** (15 mg) se obtuvo utilizando un sistema de HPLC Agilent 1100 con una columna Agilent Poroshell de 4 micras 120 EC-C18 de 4,6 x 150 mm con las siguientes condiciones: Tasa de flujo de 1 ml/min, leído a 254 nm, temperatura de la columna a 30 °C, volumen de inyección de 15 µL y tiempo de ejecución de 31 minutos. La muestra se disolvió en acetonitrilo - agua (20:80) (v/v). El método de gradiente se muestra a continuación.

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

Paso 2: Síntesis de isopropil((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(metilamino)-9H-purin-9-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)-L-alaninato (Compuesto 1)

El compuesto **2-2** y el compuesto **2-3** (isopropilo ((perfluorofenoxi)(fenoxi)fosforil) -L-alaninato) se disolvieron en THF (1 L) y se agitaron bajo nitrógeno. Luego, la suspensión se enfrió a una temperatura inferior a -5 °C y se agregó lentamente una solución 1,7 M de solución de t-BuMgCl (384 ml) durante 1,5 horas mientras se mantenía una temperatura de 5-10 °C. Se agregó una solución de NH₄Cl (2 L) y agua (8 L) a la suspensión a temperatura ambiente, seguido de DCM. La mezcla se agitó durante 5 minutos antes de agregar una solución acuosa al 5% de K₂CO₃ (10 L) y la mezcla se agitó durante 5 minutos adicionales antes de filtrar a través de diatomita (500 g). La diatomita se lavó con DCM y el filtrado se separó. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa de K₂CO₃ al 5% (10 L x 2), salmuera (10 l x 3) y se secó sobre Na₂SO₄ (500 g) durante aproximadamente 1 hora. Mientras tanto, todo este proceso se repitió 7 veces en paralelo y se combinaron los 8 lotes. Las fases orgánicas se filtraron y se concentraron a 45 ± 5 °C (grado de vacío de 0.09 Mpa). Se añadió EtOAc y la mezcla se agitó durante 1 hora a 60 °C y luego a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se filtró luego y se lavó con EtOAc (2 L) para proporcionar el Compuesto **1** en bruto. El material en bruto se disolvió en DCM (12 L), se agregó heptano (18 L) a 10-20 °C y la mezcla se dejó agitar durante 30 minutos a esta temperatura. La mezcla se filtró, se lavó con heptano (5 L) y se secó a 50 ± 5°C para proporcionar el Compuesto **1** puro (1650 g, 60%).

Método Analítico para el Compuesto 1: La pureza del Compuesto **1** (25 mg) se obtuvo utilizando un sistema de HPLC Agilent 1100 con una columna Waters XTerra Phenyl 5μ 4,6 * 250 mm con las siguientes condiciones: Tasa de flujo de 1 ml/min, leído a 254 nm, temperatura de la columna a 30 °C, volumen de inyección de 15 μL y tiempo de ejecución de 25 minutos. La muestra se disolvió en acetonitrilo - agua (50:50) (v/v). El método de gradiente se muestra a continuación.

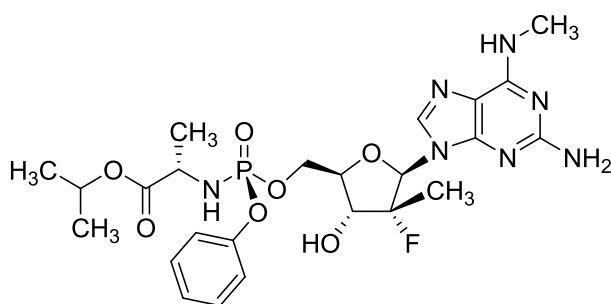
Tiempo (min):	A% (0.1% H ₃ PO ₄ en agua)	B% (Acetonitrilo)
0	90	10
20	20	80
20.1	90	10
25	90	10

Ejemplo 2. Caracterización del Compuesto **1** Amorfo y Cristalino

El compuesto **1** amorfo y el Compuesto **1** cristalino se analizaron inicialmente mediante XRPD, ¹HNMR y HPLC. Los patrones de XRPD para ambos compuestos se muestran en la FIG. 1A y las trazas de HPLC para determinar la pureza se muestran en las Figs. 1B y 2A, respectivamente. La Tabla 1 es una lista de picos del XRPD del Compuesto **1** cristalino y la Tabla 2 es una lista de los tiempos

de retención relativos (RTT) de las trazas de HPLC. El compuesto **1** amorfo tenía una pureza del 98,61% y el compuesto **1** cristalino tenía una pureza del 99,11%. Ambos compuestos eran un sólido blanco. La FIG. 2B son los gráficos TGA y DSC del Compuesto **1** cristalino. Para el Compuesto **1** cristalino, se observó una endotermia a 88,6 °C y hubo una pérdida de masa del 7,8% entre 80 y 110 °C.

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



Los datos de DSC se recolectaron en un Instrumento TA Q2000 equipado con un muestreador automático de 50 posiciones. La calibración de la capacidad térmica se llevó a cabo usando zafiro y la calibración para energía y temperatura se llevó a cabo usando indio certificado. Típicamente, aproximadamente 3 mg de cada muestra, en una bandeja de aluminio con orificios, se calentó a 10 °C/min desde 25 °C hasta 200 °C. Se mantuvo una purga de nitrógeno seco a 50 ml/min sobre la muestra. El software de control del instrumento fue Advantage para Q Series v2.8.0.394 y Thermal Advantage v5.5.3 y los datos se analizaron utilizando Universal Analysis v4.5A.

Los datos de TGA se recolectaron en un Instrumento TA Q500 TGA, equipado con un muestreador automático de 16 posiciones. El instrumento se calibró a temperatura utilizando Alumel y Níquel certificados. Típicamente, se cargaron 5-10 mg de cada muestra en una bandeja DSC de aluminio previamente tarada y se calentaron a 10 °C/min desde la temperatura ambiente a 350 °C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 60 ml/min sobre la muestra. El software de control del instrumento fue Advantage para Q Series v2.5.0.256 y Thermal Advantage v5.5.3 y los datos se analizaron utilizando Universal Analysis v4.5.

Compuesto 1 amorfo (1-1):

¹H NMR (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 1.01 - 1.15 (m, 9 H), 1.21 (d, *J*=7.20 Hz, 3 H), 2.75 - 3.08 (m, 3 H), 3.71 - 3.87 (m, 1 H), 4.02 - 4.13 (m, 1 H), 4.22 - 4.53 (m, 3 H), 4.81 (s, 1 H), 5.69 - 5.86 (m, 1 H), 6.04 (br d, *J*=19.33 Hz, 4 H), 7.12 - 7.27 (m, 3 H),
 5 7.27 - 7.44 (m, 3 H), 7.81 (s, 1 H)

Compuesto Cristalino 1 (1-2):

¹H NMR (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.97 - 1.16 (m, 16 H), 1.21 (d, *J*=7.07 Hz, 3 H), 2.87 (br s, 3 H), 3.08 (s, 2 H), 3.79 (br d, *J*=7.07 Hz, 1 H), 4.08 (br d, *J*=7.58 Hz, 1 H),
 10 4.17 - 4.55 (m, 3 H), 4.81 (quin, *J*=6.25 Hz, 1 H), 5.78 (br s, 1 H), 5.91 - 6.15 (m, 4 H), 7.10 - 7.26 (m, 3 H), 7.26 - 7.44 (m, 3 H), 7.81 (s, 1 H)

Tabla 1. Lista de picos para el Compuesto 1 cristalino

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

22.31	3.98	961	37.3
22.88	3.88	806	31.3
23.43	3.79	355	13.8
24.08	3.69	573	22.2
24.49	3.63	159	6.2
25.00	3.56	351	13.6
25.36	3.51	293	11.4
26.09	3.41	235	9.1
26.26	3.39	301	11.7
26.83	3.32	696	27.0
27.35	3.26	436	16.9
27.46	3.25	363	14.1
28.07	3.18	200	7.8
28.30	3.15	195	7.6
28.82	3.10	599	23.3
29.85	2.99	217	8.4
30.26	2.95	186	7.2
30.75	2.91	333	12.9
31.12	2.87	149	5.8
31.85	2.81	238	9.2
33.28	2.69	261	10.1
34.77	2.58	171	6.6
35.18	2.55	175	6.8
36.83	2.44	327	12.7
37.41	2.40	172	6.7

5

Tabla 2. Tiempos de Retención Relativos de cromatografías de HPLC de Compuesto **1** Amorfo y Compuesto **1** Cristalino

Compuesto 1 amorfo		Compuesto 1 cristalino	
RRT	Area %	RRT	Area %
0.48	0.15	0.48	0.17
0.51	0.04	0.48	0.17
0.48	0.15	0.94	0.12
0.51	0.04	1.00	99.11

0.94	0.13	1.04	0.22
0.98	0.21	1.37	0.07
1.00	98.61		
1.04	0.29		
1.37	0.31		

Tabla 3. Medición de cristal y datos del Compuesto 1

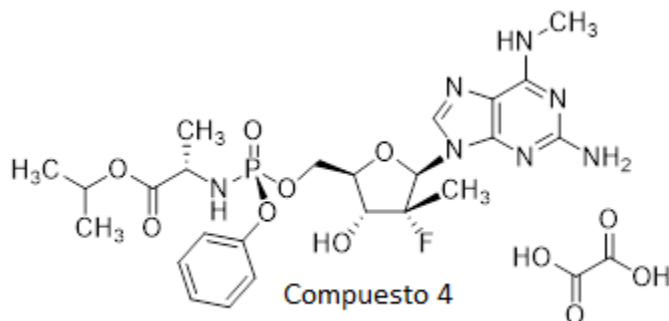
Precisión de Enlace	C-C = 0.0297Å, longitud de onda = 1.54184	
Célula	a=10.1884(3) b=28.6482(9) c=12.9497(5) alfa=90 beta=113.184(4) gamma=90	
Temperatura	150K	
	Calculado	Reportado
Volumen	3474.5(2)	3474.5(2)
Grupo espacial	P21	P 1 21 1
Grupo Hall	P 2yb	P 2yb
Fórmula de Fracción	C24 H34 F N7 O7 P	2(C24 H34 F N7 O7 P)
Fórmula de Suma	C24 H34 F N7 O7 P	C48 H68 F2 N14 O14 P2
Mr	582.55	1165.10
Dx, g cm ⁻³	1.114	1.114
Z	4	2
Mu (mm ⁻¹)	1.139	1.139
F000	1228.0	1228.0
F000'	1233.21	
h, k, l _{max}	12,34,15	12,34,15
N _{ref}	12742 [6510]	8259
T _{min} , T _{max}	0.790, 0.815	0.808, 1.000
T _{min} '	0,716	
Método de Corrección	# Límites de T Reportados: T _{min} = 0.808 T _{max} = 1.00	
AbsCorr	MULTI-SCAN	
Integridad de los Datos	1.27/0.65	
Theta (max)	68,244	

R (reflexiones)	0.2091 (7995)
wR2 (reflexiones)	0.5338 (8259)
S	2,875
Npar	716

Esta caracterización inicial fue seguida por el almacenamiento a 25 °C/60% de humedad relativa (HR) durante 14 días con análisis por HPLC y XRPD después de 7 y 14 días. La FIG. 4A es el XRPD después de 14 días a 25 °C/60% (HR). El Compuesto **1** amorfo (muestra 1-1) permaneció poco cristalino, mientras que el Compuesto **1** cristalino (muestra 1-2) retuvo su cristalinidad, pero ambos compuestos fueron estables después de 14 días a 25 °C/60% (HR).

Ejemplo 3. Formación del Compuesto 4 de Sal de Oxalato

Inicialmente, la sal de oxalato del Compuesto 1, Compuesto 4, se formó mezclando la sal oxálica con disolvente (5 vol, 100 µL) y permitiendo que cualquier solución se evapore a temperatura ambiente. Cualquier suspensión se maduró (temperatura ambiente - 50 °C) durante 3 horas y se accedió a la cristalinidad.



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

Tabla 4. Formación del Compuesto 4 de oxalato

Disolvente:	Observación posterior a la adición de ácido	Observación después de la maduración/evaporación.
-------------	---	---

	a temperatura ambiente.	
EtOH	Solución	OXA - Forma 1
IPA	Solución	OXA - Forma 1
Acetona	Solución	OXA - Forma 1
MEK	Solución	OXA - Forma 1
EtOAc	Suspensión	OXA - Forma 1
<i>i</i> PrOAc	Suspensión	OXA - Forma 1
THF	Solución	OXA - Forma 1
Tolueno	Solución	OXA - Forma 1
MeCN	Solución	OXA - Forma 1
IPA: 10% de agua	Solución	OXA - Forma 1
TBME	Suspensión	OXA - Forma 1
Ciclohexano	Suspensión	Amorfa
<i>n</i> -Heptano	Suspensión	Amorfa

Ejemplo 4. Compuestos de Sal de Compuesto 1 Amorfo

Dado que el compuesto **4** de sal de oxalato (Ejemplo 3) no se pudo llevar a cabo en ensayos clínicos debido a su potencial para formar cálculos renales, se formaron sales amorfas del Compuesto **1** con los contraiones enumerados en la Tabla 5. El Compuesto **1** se disolvió en *t*-butanol (20 vol, 6 ml) y la solución se trató con los contraiones de ácido (1 equivalente para cada muestra, excepto la muestra 1-9, que tenía 0,5 equivalentes de sulfato). Las muestras se congelaron luego con el disolvente eliminado por liofilización. El sólido residual en las muestras 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8 y 1-9 se analizó inicialmente por XRPD y HPLC.

Tabla 5. Detalles de la formación de sal amorfa.

ID de la Muestra	Detalles de la muestra	Detalles de la solución madre	Observación	NMR
1-4	HCl (1:1)	THF 1M	Sólido blanco	3 protones menos ~ 0.3 eq <i>t</i> -BuOH
1-5	Sulfúrico (1: 1)	THF 1M	Sólido blanco	3 protones menos ~ 0.3 eq <i>t</i> -BuOH
1-6	Fumarico (1:1)	MeOH:THF (1:1) 0.5M	Sólido vidrioso	1.05 eq de ácido fumárico

				0.84 eq <i>t</i> -BuOH
1-7	Benzoico (1: 1)	THF 1M	Sólido blanco	1.0 eq ácido benzoico 0.34 eq <i>t</i> -BuOH
1-8	Succínico (1: 1)	MeOH 1M	Sólido blanco pegajoso	~ 1.1 eq ácido succínico 0.37 eq <i>t</i> -BuOH
1-9	Sulfúrico (0.5: 1 ácido: API)	THF 1M	Sólido blanco	3 protones menos ~ 0.3 eq <i>t</i> -BuOH

Se tomaron los espectros de ^1H NMR para todas las muestras.

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

^1H NMR (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.93 - 1.39 (m, 16 H), 2.97 (br s, 2 H),
5 3.70 - 3.88 (m, 1 H), 4.10 (br s, 1 H), 4.18 - 4.49 (m, 3 H), 4.70 - 4.88 (m, 1 H), 5.71 - 5.94 (m, 1 H),
6.07 (br d, *J*=19.07 Hz, 2 H), 7.14 - 7.27 (m, 3 H), 7.29 - 7.44 (m, 2 H),
7.83 - 8.19 (m, 1 H)

Muestra 1-5, sal sulfúrica (1: 1):

10 ^1H NMR (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.97 - 1.38 (m, 15 H), 2.96 (br s, 2 H), 4.06 - 4.18 (m, 1 H),
4.19 - 4.49 (m, 3 H), 4.66 - 4.91 (m, 1 H), 5.70 - 5.95 (m, 1 H), 5.96 - 6.16 (m, 2 H), 7.10 -
7.27 (m, 3 H), 7.30 - 7.43 (m, 2 H), 7.88 - 8.19 (m, 1 H)

Muestra 1-6, sal fumárica (1: 1):

15 ^1H NMR (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.95 - 1.31 (m, 21 H), 2.87 (br s, 3 H),
3.79 (br d, *J*=7.20 Hz, 1 H), 4.01 - 4.13 (m, 1 H), 4.16 - 4.23 (m, 1 H), 4.16 - 4.24 (m, 1 H), 4.20
(s, 1 H), 4.18 - 4.23 (m, 1 H), 4.24 - 4.52 (m, 1 H), 4.24 - 4.52 (m, 1 H),
4.24 - 4.49 (m, 1 H), 4.72 - 4.88 (m, 1 H), 5.68 - 5.86 (m, 1 H), 6.04 (br d, *J*=19.33 Hz, 4 H),
6.63 (s, 1 H), 6.61 - 6.66 (m, 1 H), 7.12 - 7.27 (m, 3 H), 7.27 - 7.45 (m, 3 H), 7.81 (s, 1 H), 13.16
20 (br s, 2 H)

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

^1H NMR (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0.96 - 1.30 (m, 15 H), 2.87 (br s, 3 H),
3.79 (br d, *J*=7.07 Hz, 1 H), 4.07 (br s, 1 H), 4.20 (s, 1 H), 4.25 - 4.52 (m, 3 H), 4.81 (s, 1 H),

5.71 - 5.85 (m, 1 H), 6.04 (br d, $J=19.33$ Hz, 4 H), 7.08 - 7.27 (m, 3 H), 7.27 - 7.43 (m, 3 H), 7.45 - 7.57 (m, 2 H), 7.63 (s, 1 H), 7.81 (s, 1 H), 7.95 (dd, $J=8.27, 1.33$ Hz, 2 H), 12.98 (br s, 1 H)

5 **Muestra 1-8, sal succínica (1: 1):**

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0.98 - 1.28 (m, 15 H), 2.42 (s, 5 H), 2.87 (br s, 3 H), 3.57 - 3.62 (m, 1 H), 3.70 - 3.86 (m, 1 H), 4.02 - 4.14 (m, 1 H), 4.20 (s, 1 H), 4.24 - 4.51 (m, 3 H), 4.70 - 4.88 (m, 1 H), 5.69 - 5.86 (m, 1 H), 6.04 (br d, $J=19.33$ Hz, 4 H), 7.12 - 7.27 (m, 3 H), 7.27 - 7.44 (m, 3 H), 7.81 (s, 1 H), 11.95 - 12.58 (m, 2 H)

10

Muestra 1-9, sal sulfúrica (0,5: 1):

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.02 - 1.31 (m, 15 H), 2.94 (br s, 3 H), 3.79 (br d, $J=7.20$ Hz, 2 H), 4.09 (br s, 1 H), 4.22 - 4.48 (m, 3 H), 4.72 - 4.90 (m, 1 H), 5.71 - 5.92 (m, 1 H), 6.07 (br d, $J=19.07$ Hz, 2 H), 7.12 - 7.28 (m, 3 H), 7.31 - 7.44 (m, 2 H), 7.75 - 8.19 (m, 1 H).

15

Luego, las muestras se sometieron a almacenamiento a 25 °C/ 60% de humedad relativa (HR) durante 14 días con análisis por HPLC y XRPD después de 7 (FIG. 4B) y 14 días (FIG. 5A). Todas las sales preparadas permanecieron amorfas y las observaciones se muestran en la Tabla 6. El mono sulfato (muestra 1-5) y las sales de succinato (muestra 1-8) se descubrió que eran físicamente inestables y deslicuadas o se convirtieron en chicle durante el transcurso del estudio. Se encontró que tanto el fumarato (muestra 1-6) como las sales de benzoato (muestra 1-7) son sólidos vítreos. Se encontró que la sal de HCl (muestra 1-4) conserva su apariencia física. Sorprendentemente, la sal de hemisulfato (muestra 1-9) también conservó su apariencia física como un sólido blanco en contraste con el compuesto de monosulfato (muestra 1-5), que era una goma pegajosa. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Se encontró que la sal de mono HCl (muestra 1-4) y la sal de hemisulfato (muestra 1-9) son física y químicamente estables después de 2 semanas de almacenamiento a 25 °C / 60% de humedad relativa (HR). Aunque ambas sales se mantuvieron estables durante las dos semanas, la sal de hemisulfato fue superior a la sal de HCl porque la sal de HCl era higroscópica, lo que la hacía menos útil en comparación con la sal de hemisulfato para el almacenamiento o uso a largo plazo.

25

30

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

ID de la Muestra	Tiempo expuesto a 25 °C / 60% HR (días)					
	0		7		14	
	HPLC	Observación	HPLC	Observación	HPLC	Observación
1-1	98.6	Blanco sólido	98.7	Blanco sólido	98.5	Blanco sólido
1-2	99.1	Blanco sólido	99.2	Blanco sólido	99.0	Blanco sólido
1-3	99.7	Blanco sólido	99.6	Blanco sólido	99.4	Blanco sólido
1-4	98.7	Blanco sólido	98.8	Blanco sólido	98.6	Blanco sólido
1-5	98.4	Blanco sólido	55.7	Sólido blanco pegajoso	-	Goma pegajosa
1-6	98.7	Sólido vidrioso	98.6	Sólido vidrioso claro	98.4	Sólido vidrioso blanco
1-7	98.8	Blanco sólido	98.8	Sólido vidrioso claro	98.7	Sólido vidrioso claro
1-8	98.7	Sólido blanco pegajoso	-	Aceite deslicuado/pegajoso	-	Deslicuado
1-9	98.7	Blanco sólido	98.1	Blanco sólido	96.4	Blanco sólido

Ejemplo 5. Caracterización del Compuesto 2 amorfo

El Compuesto 2 amorfo se analizó inicialmente por XRPD, ¹HNMR, DSC, TGA y HPLC. El patrón XRPD para el Compuesto 2 amorfo superpuesto con el Compuesto 1 amorfo y el Compuesto 1 cristalino se muestra en la FIG. 1A y el patrón XRPD del Compuesto 2 amorfo solo se muestra en la FIG. 5B. La Tabla 7 es una lista de picos del patrón XRPD que se muestra en la FIG. 5B. El rastro de HPLC para determinar la pureza se muestra en la FIG. 6A. La Tabla 8 es una lista de los tiempos de retención relativos (RTT) del rastro de HPLC que se muestra en la FIG. 6A. El Compuesto 2 amorfo tenía una pureza del 99,68%. La FIG. 6B es un gráfico TGA y DSC del Compuesto 2 amorfo. Los detalles experimentales de los experimentos TGA y DSC se proporcionan en el Ejemplo 2.

Tabla 7. Lista de picos para el Compuesto 2 Amorfo

Ángulo / °2θ	d espaciado / Å	Intensidad / Recuentos	Intensidad /%
--------------	-----------------	------------------------	---------------

4.20	21.03	486	81,8
4.67	18.91	482	81.0
5.16	17.10	595	100.0
9.13	9.68	547	92,0

Tabla 8. HPLC cromatograma de Compuesto 2 Amorfo

Compuesto 2 amorfo	
RRT	Area %
0,48	0,02
0,48	0,02
0.67	0,01
0,94	0,13
1,00	99,68
1,04	0,06

Compuesto 2 Amorfo:

- 5 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0.93 - 1.29 (m, 13 H), 2.94 (br s, 3 H), 3.79 (td, $J=10.04$, 7.07 Hz, 2 H), 4.05 - 4.19 (m, 1 H), 4.19 - 4.50 (m, 3 H), 4.81 (quin, $J=6.25$ Hz, 1 H), 5.71 - 5.94 (m, 1 H), 5.97 - 6.16 (m, 2 H), 7.14 - 7.28 (m, 3 H), 7.31 - 7.44 (m, 2 H), 7.82 - 8.09 (m, 1 H)

10 **Ejemplo 6. Cristalización del Compuesto 2 Amorfo**

Dado que se encontró que la sal de hemisulfato permanecía como un sólido después del estudio de estabilidad de 14 días como se muestra en la Tabla 6, se realizaron pruebas preliminares que estudian las condiciones de cristalización con 11 disolventes diferentes. El compuesto amorfo 2 se suspendió en 5 volúmenes de disolvente a 25 °C (muestra 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, y 2-11). Para aquellas muestras que no fluyeron libremente (2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8 y 2-10), se agregó un adicional de 5 volúmenes de disolvente. Luego, las muestras se maduraron a 25-50 °C (1 °C/min entre temperaturas y 4 horas a cada temperatura) durante 6 días, excepto en la muestra 2-1, que se observó que era una solución transparente después de 1 día y se permitió evaporar en condiciones ambientales. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Los patrones cristalinos resultaron de la cristalización con isobutanol (muestra 2-1), acetona (muestra 2-2), EtOAc (muestra 2-6) y *i*PrOAc (muestra 2-7).

También se identificaron dos muestras poco cristalinas por cristalización con MEK (muestra 2-4) y MIBK (muestra 2-5). Los patrones de XRPD se muestran en la FIG. 7A.

Tabla 9. Condiciones de Cristalización del Compuesto 2

ID de la Muestra	Disolvente:	Observación después de 5 volúmenes.	Observación después de 10 volúmenes.	Observación después de 1 día de maduración.	XRPD
2-1	IPA	Sólido - no fluye de forma libre	Suspensión de flujo libre	Solución, evaporada a temperatura ambiente proporcionando una goma.	Goma
2-2	Isobutanol	Sólido - no fluye de forma libre	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Cristalino - Patrón 2
2-3	Acetona	Sólido - no fluye de forma libre	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Cristalino - Patrón 3
2-4	MEK	Sólido - no fluye de forma libre	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Poco cristalino - Patrón 4
2-5	MIBK	Sólido - no fluye de forma libre	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Poco cristalino - Patrón 4
2-6	EtOAc	Sólido - no fluye de forma libre	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Cristalino - Patrón 1
2-7	iPrOAc	Sólido - no fluye de forma libre	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Cristalino - Patrón 1
2-8	THF	Sólido - no fluye de forma libre	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Poco cristalino
2-9	TBME	Suspensión de flujo libre	-	Suspensión	Amorfa
2-10	Tolueno	Sólido - no fluye de forma libre	Suspensión de flujo libre	Suspensión	Amorfa
2-11	Heptano	Suspensión de flujo libre	-	Suspensión	Amorfa

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

10

Tabla 10. Caracterización de muestras de Compuesto 2 cristalino

ID de la Muestra	Disolvente:	DSC	TGA	¹ HNMR	IC (corregido por TGA)
2-2	Isobutanol	Endo 113.8 °C	8.3% ambiente-140 °C	1.1 eq isobutanol	0,45 eq
2-3	Acetona	Endo 30-95 °C Endo 100-145 °C	7.6% ambiente - 140 °C	0,5 eq acetona	0,46 eq
2-4	MEK	Complejo Amplio endo 30-115 °C Endo 115-145 °C	8.5 % ambiente - 140 °C	0.8 eq MEK	0,45 eq
2-5	MIBK	Endo amplio 30-105 °C Endo 114.7 °C	5.2% ambiente - 110 °C	0.2 eq MIBK	0,46 eq
2-6	EtOAc	Endo pronunciado 113.6 °C	2.0% ambiente-100 °C	0.9 eq EtOAc	0,46 eq
2-7	iPrOAc	Endo 30-90 °C	1.6% ambiente 90 °C	0.8 eq iPrOAc	0,45 eq
2-8	THF	Endo 30-100 °C Endo más agudo 115.6 °C	4.2% ambiente 130 °C	0.7 eq THF	0,45 eq

Se tomó el espectro de ^1H NMR para todas las muestras y se enumeran a continuación.

Muestra 2-2:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0.83 (d, $J=6.69$ Hz, 7 H), 0.99 - 1.26 (m, 14 H),
5 1.61 (dt, $J=13.26, 6.63$ Hz, 1 H), 3.73 - 3.87 (m, 2 H), 4.03 - 4.18 (m, 1 H),
4.18 - 4.51 (m, 4 H), 4.66 - 4.92 (m, 1 H), 4.70 - 4.90 (m, 1 H), 4.72 - 4.88 (m, 1 H),
5.81 (br s, 1 H), 5.93 - 6.11 (m, 2 H), 7.10 - 7.26 (m, 3 H), 7.14 - 7.26 (m, 1 H),
7.30 - 7.41 (m, 2 H), 7.94 (br s, 1 H)

10 **Muestra 2-3:**

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.00 - 1.26 (m, 13 H), 2.09 (s, 3 H),
3.74 - 3.87 (m, 2 H), 4.10 (br d, $J=7.70$ Hz, 1 H), 4.22 - 4.50 (m, 3 H),
4.81 (quin, $J=6.28$ Hz, 1 H), 5.71 - 5.90 (m, 1 H), 5.96 - 6.15 (m, 2 H), 7.12 - 7.26 (m, 3 H), 7.31
- 7.41 (m, 2 H), 7.79 - 8.07 (m, 1 H)

15

Muestra 2-4:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0.91 (t, $J=7.33$ Hz, 3 H), 1.01 - 1.28 (m, 13 H),
2.08 (s, 2 H), 3.72 - 3.89 (m, 2 H), 4.10 (br d, $J=8.08$ Hz, 1 H), 4.23 - 4.47 (m, 3 H),
4.81 (quin, $J=6.25$ Hz, 1 H), 5.69 - 5.89 (m, 1 H), 5.94 - 6.13 (m, 2 H), 7.14 - 7.25 (m, 3 H), 7.32
20 - 7.41 (m, 2 H), 7.79 - 8.11 (m, 1 H)

Muestra 2-5:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0.86 (d, $J=6.69$ Hz, 1 H), 0.98 - 1.33 (m, 13 H),
2.02 - 2.09 (m, 1 H), 4.03 - 4.17 (m, 1 H), 4.22 - 4.50 (m, 3 H), 4.81 (quin, $J=6.25$ Hz, 1 H), 5.81
25 (br s, 1 H), 5.93 - 6.15 (m, 2 H), 7.11 - 7.27 (m, 3 H), 7.31 - 7.41 (m, 2 H),
7.77 - 8.21 (m, 1 H)

Muestra 2-6:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0.98 - 1.28 (m, 15 H), 2.00 (s, 3 H),
30 3.99 - 4.14 (m, 3 H), 4.21 - 4.49 (m, 3 H), 4.81 (quin, $J=6.22$ Hz, 1 H), 5.82 (br s, 1 H),
5.93 - 6.14 (m, 2 H), 7.11 - 7.26 (m, 3 H), 7.29 - 7.42 (m, 2 H), 7.79 - 8.17 (m, 1 H)

Muestra 2-7:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.92 - 1.28 (m, 17 H), 1.97 (s, 2 H), 4.04 - 4.16 (m, 1 H), 4.20 - 4.51 (m, 3 H), 4.71 - 4.93 (m, 2 H), 5.82 (br s, 1 H),
5 5.95 - 6.14 (m, 2 H), 7.11 - 7.28 (m, 3 H), 7.31 - 7.43 (m, 2 H), 7.75 - 8.21 (m, 1 H)

Muestra 2-8:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.81 - 1.11 (m, 13 H), 1.19 (s, 1 H), 1.53 - 1.66 (m, 1 H), 3.87 - 4.01 (m, 1 H), 4.06 - 4.32 (m, 3 H), 4.64 (quin, *J*=6.25 Hz, 1 H), 5.55
10 - 5.75 (m, 1 H), 5.77 - 5.97 (m, 2 H), 6.94 - 7.10 (m, 3 H), 7.13 - 7.26 (m, 2 H), 7.66 - 7.96 (m, 1 H)

Ejemplo 7. Falla en la Cristalización de la Sal de Malonato Amorfo (Compuesto 4)

Como se muestra en el Ejemplo 3, se identificó una sal de oxalato cristalina al determinar las
15 sales apropiadas para el Compuesto **1**, pero la sal de oxalato del Compuesto **4** no se pudo llevar a cabo
en ensayos clínicos debido a su potencial para causar cálculos renales. Por lo tanto, se intentó la
cristalización de la sal de malonato relacionada químicamente (Compuesto **5**) utilizando los mismos 11
disolventes que para la sal de hemisulfato. Compuesto **1** (12 × 50 mg, muestras 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5,
3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, y 3-12) se disolvió en *t*-butanol (20 vol.) Y las soluciones se trataron con
20 1 equivalencia de una solución madre de ácido malónico (1 M en THF). Las muestras se congelaron
luego con el disolvente eliminado por liofilización. A las muestras 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6,
3-7, 3-8, 3-9, 3-10 y 3-11, se agregó solvente relevante (5 volúmenes) a temperatura ambiente.
Todas las soluciones resultantes se dejaron evaporar en condiciones ambientales, mientras que
las gomas o sólidos se maduraron a 25 - 50 °C (1 °C/min entre temperaturas y 4 horas a cada
25 temperatura) durante 5 días. Los sólidos fueron analizados por XRPD (FIG. 12B), pero se
encontró que todas las muestras formaban una goma o eran amorfas (FIG. 12B). Los
resultados se muestran en la Tabla 11. La única muestra sólida (amorfa) (3-12) fue analizada por
¹H-NMR y HPLC, y se encontró que contenía alrededor de 1 equivalencia de ácido malónico
(picos solapados), así como 0,6 eq. *t*-BuOH. El compuesto era 99.2% puro (FIG. 13A). La
30 FIG. 12A es un XRPD de la muestra 3-12 y la FIG. 13A es el cromatógrafo de HPLC de la
muestra 3-12.

Muestra 3-12:

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

Tabla 11. Condiciones de Cristalización del Compuesto 4 de Sal de Malonato Amorfo

ID de la Muestra	Disolvente:	Observación después de 5 volúmenes.	Observación después de 5 días de maduración/evaporación.	XRPD
3-1	IPA	Solución transparente*	Goma transparente	-
3-2	Isobutanol	Solución transparente*	Goma transparente	-
3-3	Acetona	Solución transparente*	Goma transparente	-
3-4	MEK	Solución transparente*	Goma transparente	-
3-5	MIBK	Solución y algo de goma	Goma transparente	-
3-6	EtOAc	Solución transparente*	Goma transparente y aspecto cristalino	Amorfa
3-7	iPrOAc	Goma	Goma transparente	-
3-8	THF	Solución transparente*	Goma transparente	-
3-9	TBME	Suspensión espesa	Goma transparente	-
3-10	Tolueno	Goma blanca / sólido	Goma blanca	Amorfa
3-11	Heptano	Sólido blanco (estático)	Goma blanca	Amorfa
3-12	-	(Sólido blanco - sin solvente)	(Sólido blanco pegajoso - condiciones ambientales)	Amorfa

* Evaporado a temperatura ambiente.

Ejemplo 8. Falla en la Formación Adecuada de Sal utilizando la Molienda Asistida por Líquido (LAG)

Se realizó un estudio de molienda asistida por líquido (LAG) para determinar las sales apropiadas diferentes de hemisulfato utilizando los 14 contraiones ácidos en la Tabla 12.

Tabla 12. Soluciones madre de contraiones usadas en la cristalización de LAG

Contra-ion	Disolvente (1 M)
Pamoico	DMSO
Malónico	THF
D-Glucurónico	Agua
DL- Mandélico	THF
D-glucónico	THF
Glicólico	THF
L-Láctico	THF
Oleico	THF
L-ascórbico	Agua
Adípico	THF (calor)
Caproico	THF
Estearico	THF
Palmitico	THF
Metanosulfónico	THF

- 5 El Compuesto 1 (30 mg) se colocó en viales de HPLC con dos rodamientos de bola de 3 mm. Los materiales se humedecieron con disolvente (15 µl de etanol, muestra 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4- 10, 4-11, 4-12, 4-13 y 4-14) y se agregó 1 equivalencia del contraión ácido. Las muestras se trituraron durante 2 horas a 650 rpm utilizando un sistema de molienda con un adaptador Automaxion. Se encontró que la mayoría de las muestras después de la molienda
- 10 eran gomas transparentes y no se analizaron más (Tabla 13). Las que se observó que contenían sólidos se analizaron por XRPD y, en todos los casos, se encontró que los patrones obtenidos coincidían con los del contraión de ácido cristalino sin picos adicionales (FIG. 13B).

Tabla 13. Observaciones y Resultados de XRPD del LAG de los Compuestos 1

ID de la Muestra	Ácido	Observación después de la molienda	XRPD
4-1	Pamoico	Goma / sólido amarilla	Ácido pamoico y halo amorfo.
4-2	Malónico	Goma transparente	-
4-3	D-Glucurónico	Goma / sólido blanco	Ácido D-glucurónico y halo amorfo
4-4	DL- Mandélico	Goma transparente	-
4-5	D-glucónico	Goma transparente	-

4-6	Glicólico	Goma transparente	
4-7	L-Láctico	Goma transparente	-
4-8	Oleico	Goma transparente	-
4-9	L-ascórbico	Goma / sólido blanco	Ácido L-ascórbico y halo amorfo
4-10	Adípico	Goma transparente	-
4-11	Caproico	Goma transparente	-
4-12	Esteárico	Goma / sólido blanco	Ácido esteárico y halo amorfo
4-13	Palmítico	Goma / sólido blanco	Ácido palmítico y halo amorfo
4-4	Metanosulfónico	Goma transparente	-

Ejemplo 9. Falla de obtención de una formación adecuada de sal con Metil Etil Cetona (MEK)

A continuación, se utilizó metil etil cetona (MEK) como disolvente para estudiar sales apropiadas distintas de la sal de hemisulfato. Usando los 14 contraiones ácidos en la Tabla 12, el estudio se realizó disolviendo el Compuesto 1 (50 mg) en MEK (20 vol) a temperatura ambiente. Las soluciones se trataron con 1 equivalencia de los contraiones seleccionados (Tabla 12). Luego, las muestras se enfriaron a 5 °C a 0,1 °C/min y se agitaron a esta temperatura durante la noche. Todas las muestras se dejaron evaporar en condiciones ambientales y cualquiera de los sólidos observados se analizaron mediante XRPD. Esta evaporación produjo principalmente gomas, con la excepción de las muestras con ácido estérico (muestra 4-12) y ácido palmítico (muestra 5-13), que proporcionaron solventes vítreos. Estos sólidos fueron amorfos por XRPD, pero no se obtuvieron formas cristalinas de la sal. Los resultados se muestran en la Tabla 14. (FIG. 13A).

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

ID de la Muestra	Ácido	Disolvente para ácido a 1 M	Observación tras la adición de ácido.	Observación al enfriar	Observación tras la evaporación
5-1	Pamoico	DMSO	Solución amarilla	Solución amarilla	Goma amarilla
5-2	Malónico	THF	Solución	Solución	Goma transparente
5-3	D-Glucurónico	Agua	Solución	Solución	Goma transparente

5-4	DL- Mandélico	THF	Solución	Solución	Goma transparente
5-5	D-glucónico	THF	Precipitado blanco	Solución turbia	Goma transparente
5-6	Glicólico	THF	Solución	Solución	Goma transparente
5-7	L-Láctico	THF	Solución	Solución	Goma transparente
5-8	Oleico	THF	Solución	Solución	Goma transparente
5-9	L-ascórbico	Agua	Solución	Solución	Goma amarilla
5-10	Adípico	THF (calor)	Solución	Solución	Goma transparente
5-11	Caproico	THF	Solución	Solución	Goma transparente
5-12	Estearico	THF	Solución	Solución turbia	Sólido vítreo claro*
5-13	Palmítico	THF	Solución	Solución	Sólido vítreo claro*
5-14	Metanosulfónico	THF	Solución	Solución	Goma transparente

Solución madre preparada antes de la adición de ácido

* Las muestras se analizaron por XRPD y proporcionaron patrones amorfos más picos del contraíón ácido

Dado que todas las muestras fueron amorfas, todas las muestras se redisolviéron en MEK (5 vol.) y se agregó ciclohexano (20 vol de antidisolvente) a temperatura ambiente, seguido de 1 hora de agitación a 25 °C. Las muestras se maduraron luego entre 50 y 5 °C (1 °C/min entre temperaturas, 4 horas a cada temperatura) durante 2 días antes de que el ciclo se cambiara a 50-25 °C durante otros 4 días. Las muestras se observaron a ojo tras la maduración. Los resultados se muestran en la Tabla 15. Después de la maduración, se encontró que todas las muestras, excepto 5-1 (con ácido pamoico), eran gomas. La muestra 5-1, un sólido amarillo, se analizó mediante XRPD, y se encontró que el patrón coincide con la forma conocida de ácido pamoico (FIG. 14B), y por lo tanto no se obtuvieron formas cristalinas de la sal.

Tabla 15. Resultados de redissolver el Compuesto 1 en MEK (5 volúmenes) y antidisolvente

ID de la Muestra	Observación inmediata	Observación después de 10 minutos.	Observación después de 60 minutos.	Observación después de la maduración.
5-1	Precipitado	Goma	Goma	Suspensión amarilla **
5-2	Precipitado	Goma	Goma	Goma
5-3	Precipitado/goma	Goma	Goma	Goma
5-4	Precipitado	Goma	Goma	Goma
5-5	Precipitado/goma	Goma	Goma	Goma
5-6	Precipitado	Goma	Goma	Goma
5-7	Precipitado	Goma	Goma	Goma
5-8	Precipitado	Suspensión ligera	Goma	Goma
5-9	Precipitado	Goma	Goma	Goma
5-10	Precipitado	Goma	Goma	Goma
5-11	Precipitado	Suspensión ligera	Goma	Goma
5-12	Precipitado	Suspensión ligera	Goma	Goma
5-13	Precipitado	Suspensión ligera	Goma	Goma
5-14	Precipitado	Goma	Goma	Goma

** Muestra analizada por XRPD con un patrón que coincide con la forma conocida de ácido pamoico (sin picos adicionales)

Ejemplo 10. Falla en la Obtención de una Formación de Sal Adecuada usando Acetato de Etilo

Luego se utilizó acetato de etilo para estudiar sales apropiadas distintas de la sal de hemisulfato. Utilizando los 14 contraiones ácidos en la Tabla 12, el estudio se realizó disolviendo el Compuesto **1** (50 mg) en acetato de etilo (20 vol) a 50 °C. Las soluciones se trataron con 1 equivalente de los contraiones seleccionados (Tabla 12). Luego, las muestras se enfriaron a 5 °C a 0,1 °C/min y se agitaron a esta temperatura durante 4 días. Las soluciones se dejaron evaporar en condiciones ambientales mientras se analizaron cualquiera de los sólidos por XRPD. Los resultados de las cristalizaciones con acetato de etilo se encuentran en la Tabla 16. En contraste con el Ejemplo 8, donde MEK era el disolvente, se observó que la mayoría de las muestras eran suspensiones después del enfriamiento de la mezcla de ácido:compuesto (las que eran soluciones se dejaron evaporar en condiciones ambientales). Sin embargo, se encontró que los difractogramas de XRPD generalmente coinciden con el Compuesto **1** cristalino. Las muestras 6-

2, 6-4 y 6-5 tienen algunas diferencias leves (FIG. 14A y FIG. 15A). No se obtuvieron formas cristalinas de la sal.

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

ID de la Muestra	Ácido	Disolvente para ácido a 1 M	Observación tras la adición de ácido.	Observación tras enfriamiento	XRPD	Observación tras la evaporación
6-1	Pamoico	DMSO	Solución amarilla	Solución amarilla*	-	Goma
6-2	Malónico	THF	Solución	Suspensión blanca	Diferencias leves con la base libre	-
6-3	D-Glucurónico	Agua	Solución	Solución*	-	Goma
6-4	DL- Mandélico	THF	Solución	Suspensión blanca	Diferencias leves con la base libre	-
6-5	D-glucónico	THF	Precipitado blanco	Goma blanca posible	Diferencias leves con la base libre	-
6-6	Glicólico	THF	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-7	L-Láctico	THF	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-8	Oleico	THF	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-9	L-ascórbico	Agua	Solución	Solución*	-	Goma sólida blanco en el lateral / amarilla-amorfa
6-10	Adípico	THF (calor)	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-11	Caproico	THF	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-12	Esteárico	THF	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-13	Palmítico	THF	Solución	Suspensión blanca	Base libre	-
6-14	Metanosulfónico	THF	Precipitado blanco	Solución / goma transparente*	-	Goma transparente

Ejemplo 11. Determinación de la Pureza Química por HPLC

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

Tabla 17. Método de HPLC para determinaciones de pureza química.

Parámetro	Valor		
Tipo de método	Fase inversa con elución por gradiente.		
Preparación de Muestras	0.5 mg/ml en acetonitrilo: agua 1:1		
Columna	Supelco Ascentis Express C18, 100 x 4,6 mm, 2,7 μ m		
Temperatura de la columna	25		
Inyección (μ l)	5		
Longitud de onda, ancho de	255, 90		
Tasa de Flujo (ml/min)	2		
Fase A	TFA al 0.1% en agua		
Fase B	0.085% de TFA en acetonitrilo		
Calendario	Tiempo	% Fase A	% Fase B
	0	95	5
	6	5	95
	6,2	95	5
	8	95	5

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

Los patrones de XRPD en los Ejemplos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se recolectaron en un difractómetro PANalytical Empyrean utilizando radiación de Cu K α (45 kV, 40 mA) en geometría de la transmisión. Se usó una rendija de 0,5 $^{\circ}$, una máscara de 4 mm y rendijas de Soller de 0,4 rad con un espejo de enfoque en el haz incidente. Se instaló un detector PIXcel3D, colocado en el haz difractado, con una ranura de recepción y ranuras de Soller de 0,04 rad. Se verifica el rendimiento del instrumento utilizando poder de silicio (computacional). El software utilizado para la recopilación de datos fue X'Pert Data Collector v. 5.3 y los datos se analizaron y presentaron utilizando DiffraC Plus EVA v. 15.0.0.0 o Highscore Plus v. 4.5. Las muestras se prepararon y analizaron en

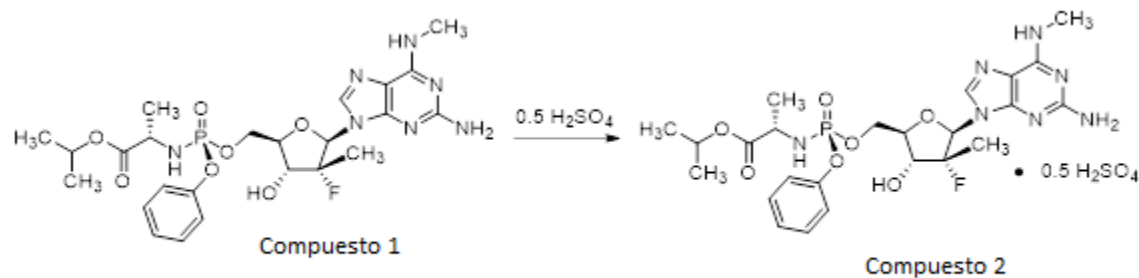
cualquiera una placa de 96 pozos de metal o Millipore en modo de transmisión. Se usó una película transparente de rayos X entre las láminas metálicas sobre la placa de pozos de metal y se usaron polvos (aproximadamente 1-2 mg) tal como se recibieron. La placa Millipore se utilizó para aislar y analizar los sólidos de las suspensiones agregando una pequeña cantidad de suspensión directamente a la placa antes de la filtración bajo un vacío ligero.

El modo de escaneo para la placa de metal utilizaba el eje de escaneo gonio, mientras que se utilizó un escaneo 2 θ para la placa Millipore. Se llevó a cabo una verificación de rendimiento utilizando polvo de silicio (placa de pozo de metal). Los detalles de la recolección de datos fueron un rango angular de 2.5 a 32.0° 2 θ , un tamaño de paso de 0.0130° 2 θ , y un tiempo total de recolección de 2.07 minutos.

También se recolectaron muestras en un difractómetro Bruker D8 utilizando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), goniómetro - 2 θ , y divergencia de V4 y rendijas de recepción, un monocromador Ge y un detector Lynxeye.. El instrumento se verificó para rendimiento utilizando un estándar de corindón certificado (NIST 1976). El software utilizado para la recopilación de datos fue *DiffraPlus* XRD Commander v2.6.1 y los datos se analizaron y presentaron utilizando *DiffraPlus* EVA v15.0.0.0.

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

Ejemplo 13. Síntesis del Compuesto 2 Amorfo



Un matraz de 250 mL se cargó con MeOH (151 ml) y la solución se enfrió a 0-5 °C. Se agregó por goteo una solución concentrada de H₂SO₄ durante 10 minutos. Se cargó un matraz separado con Compuesto **1** (151 g) y acetona (910 mL), y se agregó por goteo la solución de H₂SO₄/MeOH a 25-30 °C durante 2.5 horas. Se precipitó una gran cantidad de sólido. Después de que se agitó la solución durante 12-15 horas a 25-30 °C, la mezcla se filtró, se lavó con MeOH/acetona (25 mL / 150 mL) y se secó a 55-60 °C al vacío para proporcionar el Compuesto **2** (121 g, 74%).

Método Analítico para el Compuesto 2: La pureza del Compuesto **2** se obtuvo utilizando un sistema de HPLC Agilent 1100 con una columna Waters XTerra Phenyl 5µm 4,6*250 mm con las siguientes condiciones: Tasa de flujo de 1 ml/min, leído a 254 nm, temperatura de la columna a 30 °C, volumen de inyección de 10 µL y tiempo de ejecución de 30 minutos. La muestra se disolvió en ACN:agua (90:10, v/v). El método de gradiente para la separación se muestra a continuación. El R_t (min) del Compuesto **2** fue de aproximadamente 12.0 minutos.

Tiempo (min)	H ₃ PO ₄ al 0.1% en Agua (A)%	Acetonitrilo (B)%
0	90	10
20	20	80
20,1	90	10
30	90	10

¹HNMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.41 (br, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.36 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.17 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.73 (s, 2H), 6.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.00 (dd, *J* = 12.0, 8.0 Hz, 1H), 5.81(br, 1H), 4.84-4.73 (m, 1H), 4.44-4.28 (m, 3H), 4.10 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.85-3.74 (m, 1H), 2.95 (s, 3H), 1.21 (s, *J* = 4.0 Hz, 3H), 1.15-1.10 (m, 9H).

Ejemplo 14. Caracterización del Compuesto 2

El Compuesto **2** se caracterizó adicionalmente al ojo, ¹HNMR, ¹³CNMR, ¹⁹FNMR, MS, HPLC, y XRPD (FIG. 15B). El disolvente residual se midió por GC. El contenido de agua se midió mediante la titulación Karl Fischer, y el contenido de agua fue solo del 0,70%. Los datos se resumen en la Tabla 18.

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

Prueba	Resultado
Apariencia	Sólido Blanco
NMR	Los picos de ^1H NMR se enumeran en el Ejemplo 4
MS	MS(ESI+ve) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 582.3$ – se ajusta a la estructura
HPLC	99.8% por AUC a 254 nm (promedio de dos preparaciones)
Solvente Residual por GC	Metanol - 57 ppm Acetona - 752 ppm Diclorometano - 50 ppm Acetato de etilo - 176 ppm
Contenido de agua	0,70%

Ejemplo 15. Solubilidad del Compuesto 1 y Compuesto 2

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

Tabla 19. Resultados de las pruebas de solubilidad del Compuesto 1

Medios de prueba	Solubilidad (en mg/mL)		Apariencia	Termino descriptivo
	2 horas.	24 horas.		
Agua	1.5	2.5	Solución Transparente*	Ligeramente soluble

SGF	13,8	15.6	Solución transparente con goma en la parte inferior	Escasamente Soluble
FaSSIF	1.7	1.7	Turbio	Ligeramente soluble
FeSSIF	2.8	2.9	Turbio	Ligeramente soluble

* La muestra parecía transparente, pero se logró una solubilidad de solo 1.5 mg/mL. Tras una investigación adicional, se observó que se formó una película gomosa en la barra de agitación. El ingrediente farmacéutico activo del Ccompuesto 1 formó una bola gomosa en diluyente (90% de agua/10% de acetonitrilo) durante la preparación estándar que requirió un largo tiempo de sonicación para disolverse completamente.

5 **Tabla 20. Resultados de las pruebas de solubilidad del Compuesto 2**

Medios de prueba	Solubilidad (en mg/mL base de sal)			Apariencia	Termino descriptivo
	2 horas.	24 horas.	48 horas.		
Agua	65,3	68.0	N/A	Turbio	Soluble
SGF	89,0	84.2	81.3	Turbio	Soluble
FaSSIF	1.9	2.0	N/A	Turbio	Ligeramente soluble
FeSSIF	3.3	3.4	N/A	Turbio	Ligeramente soluble

Ejemplo 16. Estabilidad Química del Compuesto 2

El Compuesto 2 se probó para la estabilidad química a 25 y 40 °C durante un período de tiempo de 6 meses controlando la pureza orgánica, el contenido de agua, ¹HNMR, DSC y Ramen IR. El sistema de cierre del recipiente para el estudio era una combinación de bolsa de válvula medicinal con una película farmacéutica laminada sobre la bolsa y gel de sílice desecante entre las dos capas. El Compuesto 2 (1 g) se midió en cada recipiente. Luego, las bolsas se

almacenaron a 25 °C/60% HR (humedad relativa) y 40 °C/75% HR (humedad relativa). La pureza orgánica, el contenido de agua, ¹HNMR, DSC y Raman se midieron en el Tiempo 0, Mes 1, Mes 2, Mes 3 y Mes 6.

La pureza del Compuesto 2 se obtuvo utilizando un sistema Shimadzu LC-20AD con una columna Waters XTerra Phenyl, 4 µm, 4.6x250mm con las siguientes condiciones: Tasa de flujo de 1 ml/min, leído a 254 nm, temperatura de columna de 35 °C y 10 µL de volumen de inyección. La muestra se disolvió en acetonitrilo - agua (90:10) (v/v). El método de gradiente se muestra a continuación.

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

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

Los resultados se muestran en la Tabla 21 y la Tabla 22. Cuando el Compuesto 2 se almacenó durante 6 meses a 25 y 40 °C, la tasa de degradación fue mínima. A los 3 meses, el Compuesto 2 tenía una pureza del 99,75% en las condiciones de 25 °C y una pureza del 99,58% en las condiciones de 40 °C. A los 6 meses, el Compuesto 2 tenía todavía una pureza del 99,74% en las condiciones de 25 °C y una pureza del 99,30% en las condiciones de 40 °C. A 25 °C, el porcentaje de producto de degradación aumentó de 0.03% en el Día 0 a 0.08% después de 6 meses. A 40 °C, el porcentaje de producto de degradación aumentó de 0.03% a 0.39%. En el transcurso de 6 meses, el porcentaje de agua aumentó aproximadamente 0.6% a 25 °C y aumentó aproximadamente 0.7% a 40 °C.

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

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

Tiempo	Porcentaje	Porcentaje	Porcentaje de	Porcentaje de
--------	------------	------------	---------------	---------------

	de Prueba	de Agua	de Pureza	Producto de Degradación	Impureza Máxima
25 °C	Día 0:	1.2	99.82	0.03	0.12
	Mes 1	1.9	99.77	0.04	0.12
	Mes 2	1.8	99.75	0.06	0.12
	Mes 3	1.8	99.75	0.06	0.12
	Mes 6	1.8	99.74	0.08	0.13
40 °C	Día 0:	1.2	99.82	0.03	0.12
	Mes 1	2.0	99.71	0.09	0.12
	Mes 2	1.9	99.63	0.15	0.12
	Mes 3	1.9	99.58	0.20	0.12
	Mes 6	1.9	99.30	0.39	0.14

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

	Tiempo de Prueba	¹ HNMR	Raman	DSC
25 °C	Día 0:	Prueba inicial	Prueba inicial	Prueba inicial
	Mes 1	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0
	Mes 2	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0

	Mes 3	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0
	Mes 6	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0
40 °C	Día 0:	Prueba inicial	Prueba inicial	Prueba inicial
	Mes 1	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0
	Mes 2	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0
	Mes 3	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0
	Mes 6	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0	Lo mismo que en el Día 0

Se midieron estudios adicionales de estabilidad química del Compuesto **2** para determinar la impureza y los niveles de agua. Se probaron tres condiciones: estabilidad acelerada ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ / $75 \pm 5\%$ HR) durante un período de tiempo de 6 meses, estabilidad ambiental ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ / $60 \pm 5\%$ HR) durante un período de tiempo de 9 meses, y estabilidad en condiciones de refrigeración ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) durante un período de 9 meses. Los resultados para la estabilidad acelerada, estabilidad ambiental y condiciones de refrigeración se muestran en la Tabla 23, Tabla 24 y Tabla 25, respectivamente. Según los resultados de estos estudios, el Compuesto **2** es muy estable químicamente.

En el estudio de estabilidad acelerada (Tabla 23), en cada punto de tiempo (1^{er} mes, 3^{er} mes y 6^{to} mes) donde se midió el Compuesto **2**, la aparición del Compuesto **2** fue siempre un sólido blanco y el IR coincidió con el estándar de referencia. Después de seis meses, el total de las impurezas relacionadas con la sustancia 1 fue de solo el 0,08% y no se detectaron sustancias relacionadas ni isómeros.

Tabla 23. Estabilidad acelerada ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ / $75 \pm 5\%$ RH) del Compuesto 2

Artículos	Especificación	Punto de tiempo de prueba
-----------	----------------	---------------------------

		0 mes	1 ^{er} mes	3 ^{er} mes	6 ^{to} mes
Apariencia	Sólido blanco o blancuzco	Blanco sólido	Blanco sólido	Blanco sólido	Blanco sólido
IR	corresponde con el estándar de referencia	corresponde con el estándar de referencia	/	corresponde con el estándar de referencia	corresponde con el estándar de referencia
Agua		≤2.0%	0.45%	0,21%	0,36%
Sustancia 1 relacionada	Impureza A	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.
	Impureza B	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.
	Impureza F	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.
	Impureza H	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.
	Cualquier otra impureza única	≤0.10%	0,01%	0,02%	0,01%
	Impurezas totales	≤0.2%	0,01%	0,02%	0,02%
Sustancia 2 relacionada	Impureza G	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.
Isómero	Impureza C	≤0.15%	N.D.	/	N.D.
	Impureza D	≤0.15%	N.D.	/	N.D.
	Impureza E	≤0.15%	N.D.	/	N.D.
Ensayo		98.0%~102.0%	98.8%	101,5%	99,6%
Pruebas microbianas	TAMC	≤1000cfu/g	<1cfu/g	/	/
	Moho y levadura	≤100cfu/g	<1cfu/g	/	/
	E.Coli	No detectado	N.D.	/	/

N.D.: No detectado

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

Tabla 24. Estabilidad ambiental (25 ± 2°C / 60 ± 5% HR) del Compuesto 2

Elemento	Especificación	Punto de tiempo de prueba				
		0 mes	1 ^{er} mes	3 ^{er} mes	6 ^{to} mes	9 ^{to} mes
Apariencia	Sólido blanco o blancuzco	Blanco sólido	Blanco sólido	Blanco sólido	Blanco sólido	Sólido blancuzco
IR	corresponde con el	corresponde con el	/	corresponde con el	corresponde con el	corresponde con el

		estándar de referencia	estándar de referencia		estándar de referencia	estándar de referencia	estándar de referencia
Agua		≤2.0%	0,45%	0,19%	0,29%	0,46%	0,20%
Sustancia 1 relacionada	Impureza A	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Impureza B	≤0.15%	N.D.	N.D.	0,03%	N.D.	N.D.
	Impureza F	≤0.15%	N.D.	N.D.	0,02%	0,01%	N.D.
	Impureza H	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Cualquier otra impureza única	≤0.10%	0,01%	0,01%	0,03%	0,02%	0,02%
	Impurezas totales	≤0.2%	0,01%	0,02%	0,11%	0,05%	0,02%
Sustancia 2 relacionada	Impureza G	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Isómero	Impureza C	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.	N.D.
	Impureza D	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.	N.D.
	Impureza E	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.	N.D.
Ensayo		98.0%~102.0 %	98,8%	101,1%	99,6%	99,7%	100,9%
Pruebas microbianas	TAMC	≤1000cfu/g	<1cfu/g	/	/	/	/
	Moho y levadura	≤100cfu/g	<1cfu/g	/	/	/	/
	E.Coli	No detectado	N.D.	/	/	/	/

N.D.: No detectado

Los resultados de la medición de la estabilidad en condiciones de refrigeración se muestran en la Tabla 25. Las únicas impurezas detectadas incluso después de 9 meses fueron las de la sustancia 1 relacionada y el agua. El contenido de agua después de 9 meses fue del 0,32% y las impurezas totales de la sustancia 1 relacionada fueron solo del 0,01% de la muestra. El Compuesto 2 es muy estable químicamente en condiciones de refrigeración.

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

Elemento	Especificación	Punto de tiempo de prueba				
		0 mes	1 ^{er} mes	3 ^{er} mes	6 ^{to} mes	9 ^{to} mes
Apariencia	Sólido blanco o blancuzco	Blanco sólido	Blanco sólido	Blanco sólido	Blanco sólido	Sólido blancuzco
IR	corresponde	corresponde	/	corresponde	corresponde	corresponde

		con el estándar de referencia	e con el estándar de referencia		e con el estándar de referencia	e con el estándar de referencia	e con el estándar de referencia
Agua		≤2.0%	0,45%	0,19%	0,32%	0,42%	0,32%
Sustancia 1 relacionad a	Impureza A	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Impureza B	≤0.15%	N.D.	N.D.	0,01%	N.D.	N.D.
	Impureza F	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Impureza H	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Cualquier otra impureza única	≤0.10%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%
	Impurezas totales	≤0.2%	0,01%	0,01%	0,03%	0,03%	0,01%
Sustancia 2 relacionad a	Impureza G	≤0.15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Isómero	Impureza C	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.	N.D.
	Impureza D	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.	N.D.
	Impureza E	≤0.15%	N.D.	/	N.D.	N.D.	N.D.
Ensayo		98.0%~102.0 %	98,8%	101,1%	100,2%	98,6%	101,4%
Pruebas microbian as	TAMC	≤1000cfu/g	<1cfu/g	/	/	/	/
	Moho y levadura	≤100cfu/g	<1cfu/g	/	/	/	/
	E.Coli	No detectado	N.D.	/	/	/	/

N.D.: No detectado

Ejemplo 17. Niveles Plasmáticos de Metabolitos después de dosis orales únicas del Compuesto 2

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

La conversión del Compuesto 2 al Compuesto 1 y el metabolito 1-7 se muestran en la Tabla 26 y los resultados para el metabolito 1-8 y el metabolito 1-2 se muestran en la Tabla 27.

En ratas, se observaron niveles bajos de exposición del Compuesto **1**, pero se observaron niveles altos de metabolito **1-7**, el metabolito nucleósido del trifosfato activo (metabolito **1-6**). En monos, se midieron aproximadamente las exposiciones proporcionales a la dosis del Compuesto **1**. En perros, se midieron las exposiciones al Compuesto **1** supra-proporcionales, indicativas del aclaramiento metabólico de primer paso en el hígado. A lo largo del estudio, se observaron significativamente más vómitos en perros (5/5 en el grupo de dosis alta) que en monos (1/5 en el grupo de dosis alta).

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

Especies	Dosis* (mg/kg)	Compuesto 1			Metabolito 1-7	
		C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	AUC _{0-last} (hr*ng/mL)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-last} (hr*ng/mL)
Rata ^a	500	70.5	0.25	60.9	748	12000
Perro ^b	30	1530	0,25-1	1300	783	9270
	100	8120	0,5-1	10200	2030	24200
	300	21300	204	44300	4260	60800
Mono ^b	30	63.5	0,5-2	176	42.5	1620
	100	783	1-2	1100	131	3030
	300	501	204	1600	93.6	3660

3 machos por dosis por especie; * formulaciones de dosis: ^a0.5% CMC, 0.5% Tween 80 en agua; ^bpolvo en cápsulas

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

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

3 machos por dosis por especie; *formulaciones de dosis: ^a0.5% CMC, 0.5% Tween 80 en agua; ^bpolvo en cápsulas

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

5 Los niveles de tejido hepático y de corazón del Trifosfato activo (TP) del Compuesto 2 (metabolito **1-6**) se midieron 4 horas después de las dosis orales del Compuesto 2. Las muestras de hígado y corazón se obtuvieron 4 horas después de una dosis única del Compuesto 2, se congelaron rápidamente, se homogeneizaron y se analizaron por LC-MS / MS para los niveles intracelulares del TP activo. Los niveles de tejido se midieron en ratas, perros y monos como se muestra en la FIG.

10 16A. Los niveles altos de TP activo se midieron en el hígado de todas las especies analizadas. Se midieron niveles relativamente bajos del TP activo en los corazones de los perros debido a la saturación del metabolismo hepático de primer paso, y se midieron niveles no cuantificables de TP en corazones de ratas y monos, lo que indica una formación específica al hígado del TP activo. Si bien no se muestra, en comparación con la dosis del Compuesto 1, la dosis del Compuesto 2

15 mejoró la distribución de TP.

Ejemplo 19. Comparación Farmacológica del Compuesto 1 y el Compuesto 2 en Perros

Se realizó una comparación directa de perros dosificados con el Compuesto **1** y el Compuesto **2**. El estudio midió los niveles plasmáticos del Compuesto **1** y el metabolito **1-7** (del Esquema 1) hasta 4 horas después de la dosificación con el Compuesto **1** (25 mg/kg) y el Compuesto **2** (30 mg/kg) (Tabla 28), y el AUC_(0-4 h) del metabolito **1-7** fue dos veces mayor con el Compuesto **2** comparado con el Compuesto **1**. Las exposiciones normalizadas de dosis al Compuesto **1** y al metabolito **1-7** se muestran en la Tabla 28. Los valores de AUC_(0-4 h) para el Compuesto **1**, el metabolito **1-7** y la suma del Compuesto **1** + metabolito **1-7** fueron mayores después de la dosis con el Compuesto **2**.

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

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

Valores ^aAUC_(0-4 h) normalizados a una dosis de 25 mg/kg

Las concentraciones de trifosfato en la proporción de hígado/corazón indican que la dosificación con el Compuesto **2**, en comparación con el Compuesto **1**, aumenta la administración selectiva del trifosfato al hígado, como se muestra en la Tabla 29. El AUC_(0-4 h) del metabolito de guanina activo (**1-6**) después de la administración del Compuesto **1** medido en el corazón fue de 174 µM*h, mientras que el AUC_(0-4 h) del metabolito de guanina activo (**1-6**) después de la administración del Compuesto **2** medido en el corazón fue de 28 µM*hr. La relación hígado/corazón para el Compuesto **2** fue 20 en comparación con una relación hígado/corazón de 3.1 para el Compuesto **1**.

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

Compuesto Dosificado	AUC _(0-4hr) ^a normalizada de dosis media (μM*hr) para:		
	Hígado	Corazón	Hígado/Corazón
Compuesto 2	565	28 ^b	20
Compuesto 1	537	174	3.1

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

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

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

10 Compuesto **1** como para el Compuesto **2**, pero el TP activo fue más selectivo para el hígado sobre el corazón cuando se dosificó el Compuesto **2** en comparación con el Compuesto **1**.

Ejemplo 20. Perfiles de Plasma de Metabolitos del Compuesto 2 en Ratras y Monos

Se proporcionaron dosis orales únicas a ratas Sprague-Dawley macho y monos

15 *Cynomolgus* (3 animales por grupo de dosis) del Compuesto 2. Se analizaron alícuotas de plasma preparadas a partir de muestras de sangre tratadas con Diclorvos mediante LC-MS/MS para determinar las concentraciones del Compuesto **1** y el metabolito **1-7** (el metabolito nucleósido del trifosfato activo del Compuesto **2** que se muestra en el Esquema **1**), y se determinaron los parámetros farmacocinéticos utilizando WinNonlin. Los resultados para una

20 dosis única de 500 mg/kg en ratas se muestran en la FIG. 17 y los resultados para una dosis única de 30, 100 o 300 mg/kg en monos se muestran en la FIG. 18. Los resultados también se resumen en la Tabla 30.

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

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

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

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

	Especies	Rata ^a	Mono ^b		
	Dosis (mg/kg)	500	30	100	300
Compuesto 1	C_{max} (ng/mL)	60,8	63.5	783	501
	T_{max} (hr)	0.25	0,5-2	1-2	204
	AUC_{0-last} (hr*ng/mL)	78.2	176	1100	1600
Metabolito 1-7	C_{max} (ng/mL)	541	42.5	131	93.6
	AUC_{0-last} (hr*ng/mL)	9640	1620	3030	3660

	T_{max} (hr)	6-8	12-24	4	4-24
	T_{1/2} (hr)	15.3	11.5	15.0	18.8

formulaciones de dosis: ^a0.5% CMC, 0.5% Tween 80 en agua; ^bpolvo en cápsulas

Ejemplo 21. El Efecto del Trifosfato Activo del Compuesto 1 y el Compuesto 2 sobre la Integridad Mitocondrial

5 La eficacia relativa de la incorporación del trifosfato activo (TP) del Compuesto 1 y del Compuesto 2, metabolito 1-6 (Esquema 1), por la ARN polimerasa mitocondrial humana se comparó con la eficiencia relativa del TP activo de sofosbuvir y el TP activo de INX-189. El Compuesto 1 y el Compuesto 2 probablemente no afectan la integridad mitocondrial, ya que su trifosfato activo está poco incorporado por la ARN polimerasa mitocondrial humana con una eficiencia similar a la del trifosfato de sofosbuvir; la eficiencia relativa de incorporación del trifosfato de INX-189 fue hasta 55 veces mayor. Los resultados se muestran en la Tabla 31. La incorporación de estos análogos por la ARN polimerasa dependiente de ARN mitocondrial humana (POLRMT) se determinó de acuerdo con Arnold et al. (Sensibilidad de la transcripción mitocondrial y resistencia de la Transcripción nuclear dependiente de la ARN polimerasa II de ribonucleótidos antivirales. *PLoS Pathog.*, 2012, 10
15 8, e1003030).

Tabla 31. Parámetros Cinéticos para Análogos de Nucleótidos Evaluados con Polimerasa de ARN Mitocondrial Humana

Análogo de Nucleótido	K_{pol} (s⁻¹)	K_{d,app} (μM)	K_{pol}/K_{d,app} (μM⁻¹s⁻¹)	Eficiencia relativa*
2'-deoxi-2'-F-2'-C-metil UTP (TP activo de sofosbuvir)	0.00034 ± 0.00005	590 ± 250	5.8 x 10 ⁻⁷ ± 2.6 x 10 ⁻⁷	1.0 x10 ⁻⁶
2'-C-metil GTP (TP activo de	0,051 ± 0,002	240 ± 26	2.1 x 10 ⁻⁴ ± 0.2 x 10 ⁻⁴	5.5 x10 ⁻⁵

INX-189)				
TP activo del Compuesto 1 y del Compuesto 2 (metabolito 1-6)	0,0017 ± 0,0002	204 ± 94	8.3 x 10 ⁻⁶ ± 4.0 x 10 ⁻⁶	2.2 x10 ⁻⁶

*Eficacia relativa = $(K_{pop}/K_{d,app})_{\text{nucleótido análogo}} / (K_{pop}/K_{d,app})_{\text{nucleótido natural}}$

Ejemplo 22. Actividad del Compuesto 1 contra los Replicones que contienen la Secuencia NS5B

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

El compuesto 1 fue más potente que el sofosbuvir contra las cepas clínicas y de laboratorio del VHC. El Compuesto 1 mostró una potente actividad antiviral pan-genotípica *in vitro* contra aislados clínicos de tipo silvestre con EC₉₅ <80 nM, que es de 4 a 14 veces más potente que el sofosbuvir. Como se muestra en la FIG. 20, los valores de EC₉₅ para el Compuesto 1 fueron 7-33 veces más bajos que el sofosbuvir frente a aislados clínicos de todos los genotipos de HCV probados. Los valores de EC₅₀ para el Compuesto 1 fueron 6-11 veces más bajos que el sofosbuvir frente a cepas de laboratorio de los genotipos 1 a 5 del VHC (FIG. 19).

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

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

La dosificación en cada grupo se escalonó de tal manera que 2 sujetos (1 activo:1 placebo) se evaluaron durante 48 horas después de la dosificación antes de que se dosificara el

resto del grupo. Cada grupo recibió el Compuesto 2 en orden ascendente. La dosificación de grupos secuenciales ocurrió en base a la revisión de los datos de seguridad disponibles (hasta el Día 5) y los datos farmacocinéticos de plasma (hasta las 24 h) del grupo anterior.

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

Tabla 32. Régimen de Dosificación para la Administración de Compuesto 2, Parte A del Estudio

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

* Las dosis clínicas se expresan en términos del Compuesto 2, con la base aproximada del Compuesto 1 equivalente entre paréntesis

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

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

La Parte B se inició después de la revisión de los datos de seguridad (hasta el Día 5) y de farmacocinética del plasma (hasta las 24 h) del Grupo 3a en la Parte A. Los datos de seguridad disponibles (hasta el Día 5) y los datos de la farmacocinética (hasta las 24 h) se revisaron el primer grupo en la Parte B (Cohorte 1b) antes de inscribir grupos posteriores de la Parte B. Los grupos posteriores de la Parte B solo se dosificaron después de la revisión de los datos de seguridad disponible y datos farmacocinéticos de las dosis respectivas en la Parte A, así como la seguridad disponible (hasta el Día 5) de los grupos anteriores de la Parte B.

La escalada de dosificación de hasta 600 mg en pacientes infectados por el VHC se realizó después de una revisión satisfactoria de estos datos. El régimen de dosificación para la Parte B se muestra en la Tabla 33.

5 **Tabla 33. Régimen de Dosificación para el Compuesto 2 en la parte B del Estudio**

Cohorte	Población	N (activo)	Compuesto 2 (Compuesto 1) *
1b	GT1 infectada por el VHC	3	100 (90) mg x 1 día
2b	GT1 infectada por el VHC	3	300 (270) mg x 1 día
3b	GT1 infectada por el VHC	3	400 (360) mg x 1 día
4b	GT1 infectada por el VHC	3	600 (540) mg x 1 día

* Las dosis clínicas se expresan en términos del Compuesto 2, con la base aproximada del Compuesto 1 equivalente entre paréntesis.

Los pacientes infectados con el VHC fueron sujetos no tratados infectados con GT1 no cirróticos con una carga viral de $\geq 5 \log_{10}$ IU/mL.

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

Ejemplo 24. Resultados del Estudio de Dosis Única Ascendente (SAD) del Compuesto 2

- 15 La farmacocinética del Compuesto 1 y el metabolito del nucleósido 1-7 se midieron después de la dosis única del Compuesto 2. Las concentraciones plasmáticas mínimas de C_{24} (C_{24h}) del metabolito 1-7 en pacientes infectados por el VHC después de una dosis de 600 mg del Compuesto 2 fueron de 25.8 ng/mL, que es más del doble de la dosis de concentración plasmática después de una dosis de 300 mg de Compuesto 2. El metabolito 1-7 (que se muestra en el Esquema 1) solo se puede generar a través de la
- 20 desfosforilación del metabolito 1-4, metabolito 1-5 y metabolito 1-6 del fosfato intracelular, que es la especie activa. Por lo tanto, el metabolito 1-7 puede considerarse un sustituto de la especie activa. Los datos farmacocinéticos para todos los grupos se muestran en la Tabla 34 y la Tabla 35. Los valores se informan como media $\pm$ desviación estándar, excepto para T_{max} donde se informa la media

(rango). Los parámetros farmacocinéticos fueron comparables en pacientes sanos e infectados por el VHC.

Tabla 34. Farmacocinética Humana del Compuesto 1 y del Metabolito 1-7 después de la administración de una Dosis Única del Compuesto 2 en Voluntarios Sanos

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

5 * Basado en el perfil de 24 horas.

Tabla 35. Farmacocinética Humana del Compuesto 1 y del Metabolito 1-7 después de la Administración del Compuesto 2 en Pacientes Infectados con GT1-HCV

	Dosis (mg)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{tot} (ng*h/mL)	T _{1/2} (h)	C _{24h} (ng/mL)
Compuesto 1	100	212 ± 32.0	0.5 (0.5-1.0)	179 ± 54.4	0.54 ± 0.12	--
	300	871 ± 590	0.5 (0.5-1.0)	818 ± 475	0.64 ± 0.20	--
	300	2277 ± 893	0.5 (0.5-1.0)	1856 ± 1025	0.84 ± 0.18	--
	400	2675 ± 2114	1.0 (1.0-2.0)	2408 ± 1013	0.86 ± 0.18	--
	600	3543 ± 1649	1.0 (0.5-1.0)	4132 ± 1127	0.70 ± 0.13	--
Metabolito 1-7	100	50.2 ± 15.4	6.0 (4.0-6.0)	538 ± 103*	8,4 ± 4,3*	3.60 ± 0.40
	300	96.9 ± 38.9	6.0 (3.0-6.0)	1131 ± 273*	8,1 ± 2,4*	10.9 ± 3.51

	300	123 ± 16.6	4.0 (3.0-6.0)	1420 ± 221	--	18.0 ± 8.83
	400	160 ± 36.7	4.0 (4.0-4.0)	2132 ± 120	11.6 ± 1.21	22.5 ± 3.29
	600	198 ± 19.3	4.0 (4.0-6.0)	2176 ± 116	--	25.8 ± 4.08

* Basado en el perfil de 24 horas.

Los perfiles medios de concentración plasmática en el tiempo del Compuesto **1** y del metabolito **1-7** también se calcularon para todas los cohortes de la Parte A y la Parte B del estudio. La FIG. 21 es la concentración plasmática media del Compuesto **1** después de una dosis
única del Compuesto **2** y la FIG. 22 es la concentración plasmática media del metabolito **1-7**
después de una dosis única del Compuesto **2**. Como se muestra en la FIG. 21, el Compuesto **1** se
absorbió rápidamente y se metabolizó rápida/extensamente en todas las cohortes de la Parte B.
Como se muestra en la FIG. 22, el metabolito **1-7** fue un metabolito principal y exhibió
concentraciones plasmáticas sostenidas. La exposición plasmática del Compuesto **1** estuvo
relacionada con la dosis, mientras que la exposición del metabolito **1-7** fue proporcional a la
dosis.

Para los sujetos infectados por el VHC de la Parte B, las mediciones de la cuantificación
del ARN del VHC se realizaron antes, durante y después de la administración del Compuesto **2**.
Las determinaciones de ARN del VHC en plasma se realizaron mediante el uso de un ensayo
comercial validado. La línea de base se definió como la media del Día -1 y el Día 1 (antes de la
dosis). Una dosis única de 300 mg del Compuesto **2** (equivalente a 270 mg del Compuesto **1**) dio
como resultado una actividad antiviral significativa en sujetos infectados por GT1b-VHC. La
reducción máxima media del ARN del VHC 24 horas después de la dosis después de una dosis
única de 300 mg fue de 1,7 log₁₀ UI / ml, y esto se compara con una reducción de 1.7 log₁₀
IU/mL después de 1 día de 400 mg de monoterapia con sofosbuvir en pacientes infectados por el
VHC en GT1a. La reducción máxima media del ARN del VHC 24 horas después de la dosis
seguido de una dosis única de 100 mg fue de 0.8 log₁₀ IU/mL. La reducción máxima media del
ARN del VHC fue de 2,2 log₁₀ IU/mL después de una dosis única de 400 mg. Los análisis
farmacocinéticos/farmacodinámicos individuales para los sujetos individuales de la Parte B del
estudio se muestran en las Figs. 23A-23F. La concentración de metabolito **1-7** se grafica contra
la concentración de reducción de ARN del VHC, y como se muestra en las Figs. 23A-23F, la
reducción del ARN del VHC en plasma se correlaciona con la exposición al metabolito

plasmático 1-7. La respuesta viral se mantiene con las concentraciones plasmáticas del metabolito 1-7 que son mayores que el valor EC₉₅ frente a GT1b. La correlación entre la concentración plasmática y los niveles de reducción de ARN del VHC indica que se podrá lograr una respuesta más profunda con dosis más altas de Compuesto 2.

5

Ejemplo 25. Los niveles mínimos predichos de Metabolito 1-7 en estado estacionario superan los valores del Compuesto 1 EC₉₅ contra aislados clínicos de VHC GT 1-4

Como se muestra en la FIG. 24, se predijeron los niveles plasmáticos mínimos en el estado estacionario (C_{24, ss}) del metabolito 1-7 seguido de la dosificación del Compuesto 2 en humanos (600 mg QD (550 mg de base libre equivalente) y 450 mg QD (400 mg de base libre equivalente)) se predijeron y se compararon con el EC₉₅ del Compuesto 1 *in vitro* en todos los aislamientos clínicos probados para determinar si la concentración plasmática en el estado estacionario es consistentemente más alta que el EC₉₅, lo que resultaría en una alta eficacia contra múltiples aislamientos clínicos *in vivo*. El EC₉₅ para el Compuesto 1 es el mismo que el EC₉₅ del Compuesto 2. Para que el Compuesto 2 sea efectivo, el nivel plasmático en el estado estacionario del metabolito 1-7 debe exceder el EC₉₅.

Como se muestra en la FIG. 24, el EC₉₅ del Compuesto 2 contra todos los aislamientos clínicos evaluados varió de 18 a 24 nM aproximadamente.

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

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

En contraste, el EC₉₅ del estándar de cuidado de nucleótidos sofosbuvir varía de 50 a 265 nM en todos los aislamientos clínicos del VHC evaluados, con un EC₉₅ menor que la concentración predicha en el estado estacionario en la dosis comercial de 400 mg para solo dos aislamientos, GT2a y GT2b. El EC₉₅ para la dosis comercial de 400 mg de sofosbuvir es mayor

que la concentración en estado estacionario predicha para otros aislados clínicos, GT1a, GT1b, GT3a, GT4a y GT4d.

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

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

Los datos que comparan la eficacia y los parámetros farmacocinéticos de estado estacionario en la FIG. 24 demuestra claramente la inesperada importancia terapéutica del Compuesto 2 para el tratamiento de la hepatitis C. De hecho, se pronostica que el nivel plasmático en estado estacionario predicho después de la administración del Compuesto 2 es al menos 2 veces mayor que el EC_{95} para todos los genotipos probados, y es 3 a 5 veces más potente que el GT2. Estos datos indican que el Compuesto 2 tiene una potente actividad antiviral pangenotípica en humanos. Como se muestra en la FIG. 24, el EC_{95} de sofosbuvir en el GT1, GT3 y GT4 es mayor que 100 ng/mL. Por lo tanto, sorprendentemente, el Compuesto 2 es activo contra el VHC en una forma de dosificación que brinda una concentración en estado estacionario inferior (40-50 ng/ml) que la concentración resistente en el estado estable (aproximadamente 100 ng/ml) alcanzada por una forma de dosificación similar a sofosbuvir.

Ejemplo 26. Descripción de la Formulación y Fabricación del Compuesto 2

En la Tabla 36 se presenta una fórmula de lote representativa no limitante para comprimidos de Compuesto 2 (50 mg y 100 mg). Las tabletas se produjeron a partir de una mezcla común utilizando un proceso de compresión directa como se muestra en la FIG. 25. El ingrediente farmacéutico activo (API) se ajusta en función del ensayo tal cual, con el ajuste realizado en el porcentaje de celulosa microcristalina. El API y los excipientes (celulosa microcristalina, lactosa monohidrato y croscarmelosa sódica) se seleccionaron, se colocaron en un mezclador en forma de V (PK Blendmaster, tazón de 0,5 L) y se mezclaron durante 5 minutos a 25 rpm. Luego se seleccionó el estearato de magnesio, se agregó y la mezcla se mezcló durante 2 minutos adicionales. La mezcla común se dividió para su uso en la producción de comprimidos de 50 mg y 100 mg. La mezcla lubricada se comprimió luego a una velocidad de 10 tabletas/minutos utilizando una prensa de tabletas de investigación de un solo golpe (Korsch XP1) y un alimentador de polvo por gravedad. Los comprimidos de 50 mg se produjeron utilizando herramientas cóncavas redondas de 6 mm y fuerzas de 3.5 kN. Los comprimidos de 100 mg se produjeron utilizando herramientas cóncavas estándar redondas de 8 mm y fuerzas de 3.9-4.2 kN.

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

Materia prima	%	g/lote	Mg/unidad	
			Comprimido de 50 mg	Comprimido de 100 mg
Compuesto 2	50.0	180.0	50.0	100.0
Celulosa microcristalina, USP/NF, EP	20.0	72.0	20.0	40.0
Lactosa Monohidrato, USP/NF, BP, EP, JP	24.0	86.4	24.0	48.0
Croscarmelosa de sodio, USP/NF, EP	5.0	18.0	5.0	10.0
Estearato de magnesio, USP/NF, BP, EP JP	1.0	3.6	1.0	2.0
Total			100,0	200.0

El Compuesto 2 se ajustó en función del ensayo tal cual, con el ajuste realizado en el porcentaje de celulosa microcristalina. El Compuesto 2 y excipientes (celulosa microcristalina, lactosa monohidrato y croscarmelosa sódica) se seleccionaron, se colocaron en un mezclador en forma de V (PK Blendmaster, tazón de 0,5 L) y se mezclaron durante 5 minutos a 25 rpm. Luego se seleccionó estearato de magnesio, se agregó y la mezcla se mezcló durante 2 minutos adicionales. La mezcla común se dividió para su uso en la producción de comprimidos de 50 mg y 100 mg. La mezcla lubricada se comprimió luego a una velocidad de 10 tabletas/minutos utilizando una prensa de tabletas de investigación de un solo golpe (Korsch XP1) y un alimentador de polvo por gravedad. Los comprimidos de 50mg se produjeron utilizando herramientas cóncavas redondas de 6 mm y fuerzas de 3,5 kN. Los comprimidos de 100 mg se produjeron utilizando herramientas cóncavas estándar redondas de 8 mm y fuerzas de 3.9-4.2 kN. Las especificaciones de los comprimidos de 50 mg y 100 mg se muestran en la Tabla 37.

Tabla 37. Especificaciones de los Comprimidos de 50 mg y 100 mg de Compuesto 2

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

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

En condiciones de refrigeración (5 °C), tanto los comprimidos de 50 mg como los de 100 mg permanecieron sólidos blancos que no cambiaron de apariencia de T = 0 a T = 6 meses. A lo largo del estudio de 6 meses, no se informaron impurezas superiores al 0,05% para cualquiera de los comprimidos de 50 mg o comprimidos de 100 mg. El contenido de agua después de 6 meses también fue inferior al 3.0% p/p para ambo comprimidos. Se reportaron resultados similares cuando los comprimidos se sometieron a condiciones ambientales (25 °C/60% HR); no se

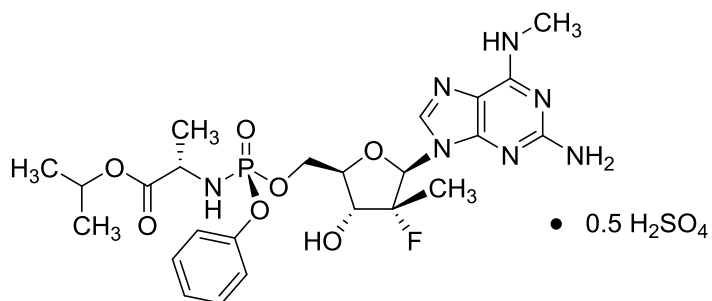
informaron impurezas mayores de 0,05% a lo largo de los 6 meses para ambos comprimidos y el contenido de agua no superó el 3,0% p/p en la marca de los 6 meses. Cuando los comprimidos se sometieron a condiciones aceleradas (40 °C/ 75% de HR), el aspecto de los comprimidos de 50 mg y 100 mg no cambió de un comprimido redondo blanco. Se informó una impureza después de 3 meses, pero la impureza fue de solo el 0.09%. Se informó una segunda impureza después de 6 meses, pero el porcentaje de impureza total fue de solo 0.21% para ambos el comprimido de 50 mg y 100 mg. El contenido de agua fue del 3,4% p/p a los 6 meses para los comprimidos de 50 mg y del 3,2% p/p para los comprimidos de 100 mg.

En un estudio separado, la estabilidad de los comprimidos de 50 mg y 100 mg del Compuesto 2 en condiciones ambientales (25 °C/60% HR) se midió durante 9 meses. La apariencia del comprimido de 50 mg y 100 mg no cambió de un comprimido redondo blanco en el transcurso de 9 meses. Las impurezas en el comprimido de 50 mg fueron inferiores al 0,10% después de 9 meses y las impurezas en el comprimido de 100 mg fueron inferiores al 0,05%. El contenido de agua del comprimido de 50 mg y el comprimido de 100 mg después de 9 meses fue de solo 2.7% p/p y 2.6% p/p, respectivamente.

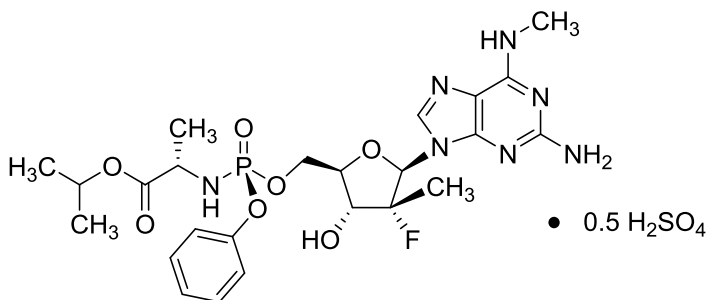
Esta especificación se ha descrito con referencia a modalidades de la invención. Sin embargo, un experto en la técnica aprecia que se pueden realizar diversas modificaciones y cambios sin apartarse del alcance de la invención como se establece en las reivindicaciones a continuación. En consecuencia, la especificación debe considerarse en un sentido ilustrativo en lugar de restrictivo, y todas estas modificaciones están destinadas a ser incluidas dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

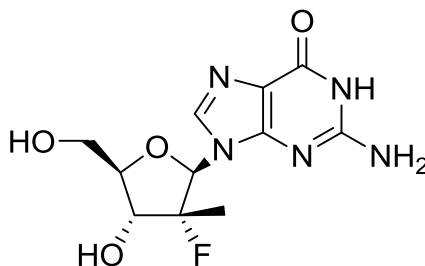
1. Un compuesto de la Fórmula:



2. Una forma de dosificación sólida que comprende



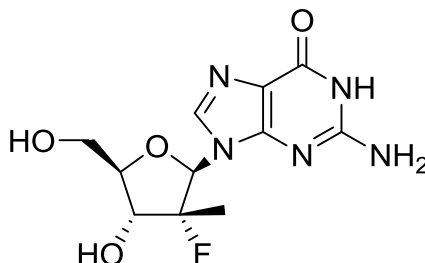
que proporciona un nivel de plasma en el estado estacionario ($C_{24, ss}$) de metabolito



entre aproximadamente 20-60 ng/mL.

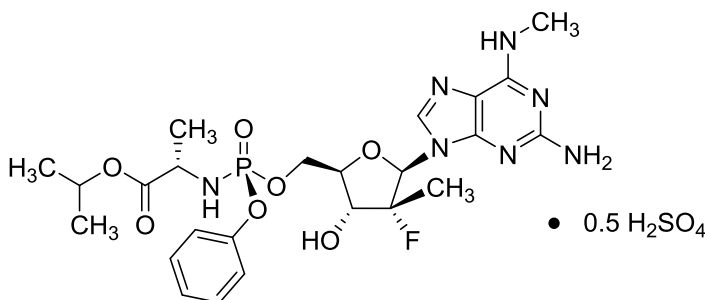
3. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 2, en donde el nivel de plasma en el estado estacionario ($C_{24, ss}$) está entre aproximadamente 20-50 ng/mL.
4. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 2, en donde el nivel de plasma en estado estacionario ($C_{24, ss}$) está entre aproximadamente 20-45 ng/mL.
5. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 2, en donde el nivel de plasma en estado estacionario ($C_{24, ss}$) está entre aproximadamente 20-30 ng/mL.

6. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 2, en donde el nivel de plasma en estado estacionario ($C_{24, ss}$) está entre aproximadamente 20-25 ng/mL.
7. La forma de dosificación sólida de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde el área bajo la curva del metabolito



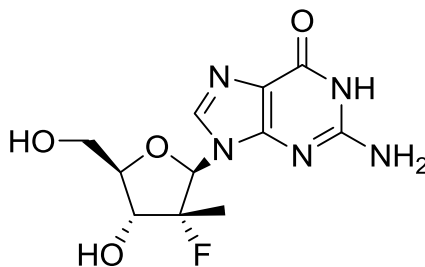
está entre aproximadamente 1,500 ng*h/mL y 3,000 ng*h/mL.

8. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 7, en donde el área bajo la curva está entre aproximadamente 1,800 ng*h/mL y 3,000 ng*h/mL.
9. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 7, en donde el área bajo la curva está entre aproximadamente 2,100 ng*h/mL y 3,000 ng*h/mL.
10. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 7, en donde el área bajo la curva está entre aproximadamente 2,400 ng*h/mL y 3,000 ng*h/mL.
11. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 7, en donde el área bajo la curva está entre aproximadamente 2,700 ng*h/mL y 3,000 ng*h/mL.
12. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 7, en donde el área bajo la curva está entre aproximadamente 2,000 ng*h/mL y 2,200 ng*h/mL.
13. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula



en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

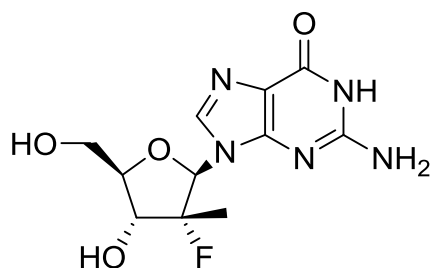
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en una forma de dosificación sólida que suministra aproximadamente 300 mg del compuesto.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en una forma de dosificación sólida que suministra aproximadamente 400 mg del compuesto.
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en una forma de dosificación sólida que suministra aproximadamente 500 mg del compuesto.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en una forma de dosificación sólida que suministra aproximadamente 600 mg del compuesto.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en una forma de dosificación sólida que suministra aproximadamente 700 mg del compuesto.
19. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en una forma de dosificación sólida que suministra aproximadamente 800 mg del compuesto.
20. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 13-19, en donde la forma de dosificación sólida proporciona un nivel de plasma en estado estacionario ($C_{24, ss}$) de metabolito.



entre aproximadamente 20-60 ng/mL.

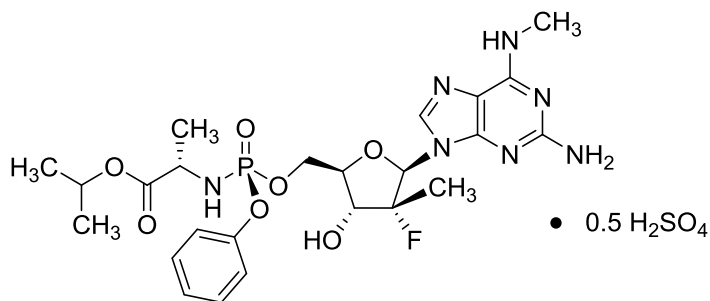
21. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en donde el nivel de plasma mínimo sólido en estado estacionario ($C_{24, ss}$) está entre aproximadamente 20-50 ng/mL.
22. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en donde el nivel de plasma mínimo sólido en estado estacionario ($C_{24, ss}$) está entre aproximadamente 20-45 ng/mL.
23. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en donde el nivel de plasma mínimo sólido en estado estacionario ($C_{24, ss}$) está entre aproximadamente 20-30 ng/mL.
24. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en donde el nivel de plasma mínimo sólido en estado estacionario ($C_{24, ss}$) está entre aproximadamente 20-25 ng/mL.

25. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en donde la forma de dosificación sólida proporciona un nivel de plasma mínimo en estado estacionario (C_{24, ss}) de metabolito.



entre aproximadamente 20-60 ng/mL.

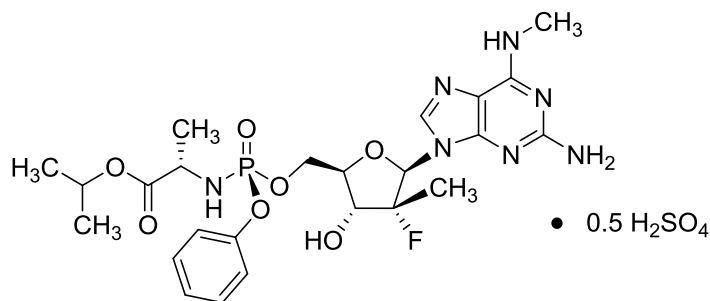
26. La composición farmacéutica de la reivindicación 25, en donde el nivel de plasma en estado estacionario (C_{24, ss}) está entre aproximadamente 40-60 ng/mL.
27. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 13-26, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es adecuado para la administración oral.
28. La composición farmacéutica de la reivindicación 27, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable está en forma de una tableta.
29. Una forma cristalina del compuesto.



en donde el compuesto contiene menos del 0,5% de impurezas cuando se almacena en condiciones ambientales durante al menos seis meses.

30. La forma cristalina de la reivindicación 29, en donde la forma cristalina se almacena a aproximadamente entre 0 y 40 °C.
31. La forma cristalina de la reivindicación 29, en donde la forma cristalina se almacena a aproximadamente 30-80% de humedad relativa.

32. Un método para tratar la infección por hepatitis C o una afección que resulta de una infección por hepatitis C, en un huésped que la necesita, que comprende proporcionar una



cantidad efectiva de

opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

33. El método de la reivindicación 32, en donde el compuesto se administra por vía oral.

34. El método de la reivindicación 32, en donde el compuesto se administra a través de liberación controlada.

35. El método de la reivindicación 32, en donde la afección resultante de una infección por hepatitis C ha dado como resultado afecciones positivas para anticuerpos y positivas para antígenos, una inflamación crónica del hígado basada en virus, un cáncer de hígado resultante de hepatitis C avanzada, cirrosis o fatiga.

36. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en donde se administran al menos 300 mg del compuesto.

37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en donde se administran al menos 400 mg del compuesto.

38. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en donde se administran al menos 500 mg del compuesto.

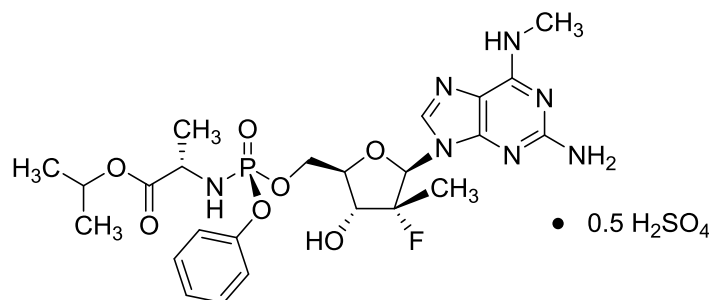
39. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en donde se administran al menos 600 mg del compuesto.

40. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en donde se administran al menos 700 mg del compuesto.

41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en donde se administran al menos 800 mg del compuesto.

42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en donde el compuesto se administra hasta 12 semanas.
43. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en donde el compuesto se administra hasta 8 semanas.
44. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en donde el compuesto se administra hasta 6 semanas.
45. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en donde el compuesto se administra durante al menos 6 semanas.
46. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en donde el compuesto se administra durante al menos 8 semanas.
47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-35, en donde el compuesto se administra durante al menos 12 semanas.
48. El método de cualquiera de las reivindicaciones 42-47, en donde el compuesto se administra una vez al día.
49. El método de cualquiera de las reivindicaciones 42-47, en donde el compuesto se administra cada dos días.
50. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-49, que comprende además administrar el compuesto en combinación con otro agente anti-VHC.
51. El método de la reivindicación 50, en donde el agente anti-VHC adicional se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de proteasa, un inhibidor de NS5A, otro inhibidor de polimerasa de NS5B, un inhibidor sin sustrato, interferón alfa-2a, ribavirina, un inhibidor de helicasa, un oligodesoxinucleótido antisentido, un aptámero, una ribozima resistente a las nucleasas, ARNi, un anticuerpo contra el VHC, un anticuerpo parcial contra el VHC y un anticuerpo de dominio para el VHC.
52. El método de la reivindicación 51, en donde el inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en telaprevir, boceprevir, simeprevir y paritaprevir.
53. El método de la reivindicación 32, en donde el virus de la hepatitis C es el genotipo 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a, 4d, 5a o 6.

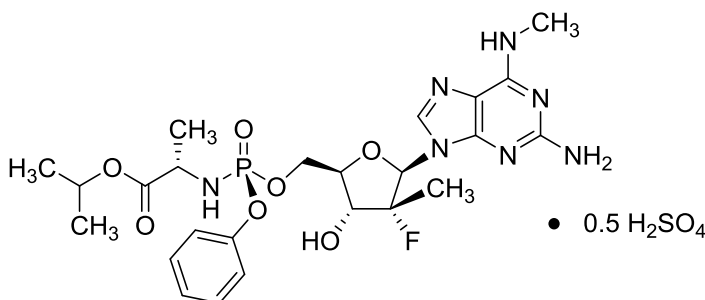
54. El método de la reivindicación 53, en donde el virus de la hepatitis C es el genotipo 1a o 1b.
55. El método de la reivindicación 53, en donde el virus de la hepatitis C es el genotipo 2a o 2b.
56. El método de la reivindicación 53, en donde el virus de la hepatitis C es el genotipo 3a.
57. El método de la reivindicación 53, en el que el virus de la hepatitis C es el genotipo 4a o 4b.
58. El método de la reivindicación 53, en donde el virus de la hepatitis C es el genotipo 5a.
59. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-58, en donde el huésped es un humano.
60. El compuesto de la Fórmula



opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de una infección por hepatitis C o una afección resultante de una infección por hepatitis C, en un huésped que la necesite.

61. El compuesto de la reivindicación 60, en donde el compuesto se administra por vía oral.
62. El compuesto de la reivindicación 60, en donde el compuesto se administra mediante liberación controlada.
63. El compuesto de la reivindicación 60, en donde la afección resultante de una infección por hepatitis C ha dado como resultado afecciones positivas para anticuerpos y positivas para antígenos, una inflamación crónica del hígado basada en virus, un cáncer de hígado resultante de hepatitis C avanzada, cirrosis o fatiga.

64. El Compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 60 a 63, en donde se administran al menos 300 mg del Compuesto.
65. El Compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 60 a 63, en donde se administran al menos 400 mg del Compuesto.
66. El Compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 60 a 63, en donde se administran al menos 500 mg del Compuesto.
67. El Compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 60 a 63, en donde se administran al menos 600 mg del Compuesto.
68. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 60-67, que comprende además administrar el compuesto en combinación con otro agente anti-VHC.
69. El compuesto de la reivindicación 68, en donde el agente anti-VHC adicional se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de proteasa, un inhibidor de NS5A, otro inhibidor de polimerasa de NS5B, un inhibidor sin sustrato, interferón alfa-2a, ribavirina, un inhibidor de helicasa, un oligodesoxinucleótido antisentido, un aptámero, una ribozima resistente a las nucleasas, ARNi, un anticuerpo contra el VHC, un anticuerpo parcial contra el VHC y un anticuerpo de dominio para el VHC.
70. Uso de un compuesto de la Fórmula.



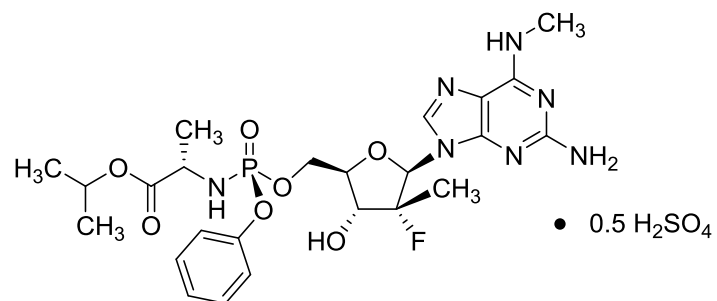
opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección de hepatitis C o una afección resultante de una infección de hepatitis C, en un huésped que lo necesite.

71. El uso de la reivindicación 70, en donde el compuesto se administra por vía oral.

72. El uso de la reivindicación 70, en donde el compuesto se administra mediante liberación controlada.
73. El uso de la reivindicación 70, en donde la afección resultante de una infección por hepatitis C ha dado como resultado afecciones positivas para anticuerpos y positivas para antígenos, una inflamación crónica del hígado basada en virus, un cáncer de hígado resultante de hepatitis C avanzada, cirrosis o fatiga.
74. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 70-73, en donde se administran al menos 300 mg del compuesto.
75. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 70-73, en donde se administran al menos 400 mg del compuesto.
76. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 70-73, en donde se administran al menos 500 mg del compuesto.
77. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 70-73, en donde se administran al menos 600 mg del compuesto.

RESUMEN

Una sal de hemisulfato de la estructura:



para tratar un huésped infectado con hepatitis C, así como composiciones farmacéuticas y formas de dosificación, que incluyen las formas de dosificación sólidas de los mismos.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 12020-009WO1	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 18/16301	International filing date (<i>day/month/year</i>) 31 January 2018 (31.01.2018)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 01 February 2017 (01.02.2017)
Applicant ATEA PHARMACEUTICALS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. FIG. 24

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/16301

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 27-28, 48-52, 59, 68-69
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/16301

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC(8) - C07F 9/6521; C07F 9/6558 (2018.01)
 CPC - C07F 9/65215; C07F 9/65586

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)

See Search History Document

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

See Search History Document

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

See Search History Document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2016/0257706 A1 (Atea Pharmaceuticals Inc) 08 September 2016 (08.09.2016); Abstract, p14, p15, p20, p105, para[0068], para [0109], para[0121], para[0122], para[0131], para[0215], para[0397], para[0402], para[0405]	1-26, 29-47, 53-58, 60-67, 70-77
Y	US 2010/0286083 A1 (Bao et al.) 11 November 2010 (11.11.2010); Abstract, para[0021], para[0029], para[0104]	1-26, 32-47, 53-58, 60-67, 70-77
Y	US 2011/0257121 A1 (Chang et al.) 20 October 2011 (20.10.2011); Abstract, Fig 2, para[0024], para[0038], para[0040], para[0109]	29-31
Y	Chang et al. 'Discovery of PSI-353661, a Novel Purine Nucleotide Prodrug for the Treatment of HCV Infection', ACS Med. Chem. Lett. 2011, 2, 130-135; Title, p131, p132, p133, p134	2-12, 20-26
A	US 2011/0015146 A1 (Sofia et al.) 20 January 2011 (20.01.2011); entire document	1-26, 29-47, 53-58, 60-67, 70-77
A	US 2016/0271162 A1 (Idenix Pharmaceuticals LLC) 22 September 2016 (22.09.2016); entire document	1-26, 29-47, 53-58, 60-67, 70-77
A	US 2012/0245335 A1 (Clark) 27 September 2012 (27.09.2012); entire document	1-26, 29-47, 53-58, 60-67, 70-77

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

☐ See patent family 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 application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation 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, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 2018

Date of mailing of the international search report

25 APR 2018

Name and mailing address of the ISA/US
 Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
 Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
 PCT OSP: 571-272-7774

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: BRENT R. BELLOWS, PH.D., ESQ.
KNOWLES INTELLECTUAL PROPERTY
STRATEGIES, LLC
400 PERIMETER CENTER TERRACE, SUITE
200
ATLANTA, GA 30346

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year)

25 APR 2018

Applicant's or agent's file reference
12020-009WO1

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US 18/16301

International filing date (day/month/year)

31 January 2018 (31.01.2018)

Priority date (day/month/year)

01 February 2017 (01.02.2017)

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

IPC(8) - C07F 9/6521; C07F 9/6558 (2018.01)

CPC - C07F 9/65215; C07F 9/65586

Applicant ATEA PHARMACEUTICALS, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis. 1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2 FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Date of completion of this opinion

15 March 2018

Authorized officer

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 18/16301

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed.
 - ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a)).
3. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:
 - a. ☐ forming part of the international application as filed:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 18/16301

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 27-28, 48-52, 59, 68-69

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 27-28, 48-52, 59, 68-69 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 27-28, 48-52, 59, 68-69

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing in the form of an Annex C/ST.25 text file, and such listing was not available to the International Searching Authority in the form and manner acceptable to it; or the sequence listing furnished did not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.

☐ furnish a sequence listing on paper or in the form of an image file complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in the form and manner acceptable to it; or the sequence listing furnished did not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 18/16301

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-26, 29-47, 53-58, 60-67, 70-77	YES
	Claims	None	NO
Inventive step (IS)	Claims	None	YES
	Claims	1-26, 29-47, 53-58, 60-67, 70-77	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-26, 29-47, 53-58, 60-67, 70-77	YES
	Claims	None	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1, 13-19, 32-47, 53-58, 60-67, 70-77 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 2016/0257706 A1 to Atea Pharmaceuticals Inc (hereinafter 'Atea'), in view of US 2010/0286083 A1 to Bao et al. (hereinafter 'Bao').

Regarding claim 1, Atea teaches a free form of the compound of the formula (p20, left col "3rd compound"), but does not teach 0.5 H₂SO₄ salt. However, Atea further teaches the compound may exist in salt (para[0068] "Accordingly, the present invention includes a compound of Formula I-VII, or a pharmaceutically acceptable composition, salt, or prodrug thereof, as described herein"). In addition, Bao teaches analogous compounds (para[0104] "Compound 11", "Compound 14") which can be in sulfuric acid salt (para[0021] "or a salt, a pharmaceutically acceptable salt, a hydrate, a solvate, or a crystalline form thereof", para[0029] "The phrase "pharmaceutically acceptable salt" of a purified compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound. Such salts include: (1) acid addition salts, formed with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid"). Thus, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to formulate the compound by regulating the ratio of the salts by routine experimentation, in order to obtain desired pharmacological activity (Bao: para[0021] "or a salt, a pharmaceutically acceptable salt, a hydrate, a solvate, or a crystalline form thereof", para[0029] "The phrase "pharmaceutically acceptable salt" of a purified compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound") exhibiting the most effective anti-HCV activity (Atea: Abstract "A compound of the structure: or a pharmaceutically acceptable salt or composition thereof for the treatment of a host infected with or exposed to an HCV virus or other disorders more fully described herein", Bao: Abstract "A purified compound having activity against hepatitis C virus is disclosed").

Regarding claim 13, Atea teaches a pharmaceutical composition comprising an effective amount (para[0131] "(e) a pharmaceutical formulation comprising an effective host-treating amount of the Formulas I-VII or a pharmaceutically acceptable salt") of a free form of the compound of the Formula (p20, left col "3rd compound") in a pharmaceutically acceptable carrier (para[0131] "(e) a pharmaceutical formulation comprising an effective host-treating amount of the Formulas I-VII or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof together with a pharmaceutically acceptable carrier"), but does not teach 0.5 H₂SO₄ salt. However, Bao teaches analogous compounds (para[0104] "Compound 11", "Compound 14") which can be in sulfuric acid salt (para[0021] "or a salt, a pharmaceutically acceptable salt, a hydrate, a solvate, or a crystalline form thereof", para[0029] "The phrase "pharmaceutically acceptable salt" of a purified compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound. Such salts include: (1) acid addition salts, formed with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid"). Thus, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to formulate the compound by regulating the ratio of the salts by routine experimentation, in order to obtain desired pharmacological activity (Bao: para[0021] "or a salt, a pharmaceutically acceptable salt, a hydrate, a solvate, or a crystalline form thereof", para[0029] "The phrase "pharmaceutically acceptable salt" of a purified compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound") exhibiting the most effective anti-HCV activity (Atea: Abstract "A compound of the structure: or a pharmaceutically acceptable salt or composition thereof for the treatment of a host infected with or exposed to an HCV virus or other disorders more fully described herein", Bao: Abstract "A purified compound having activity against hepatitis C virus is disclosed").

Regarding claims 14-16, Atea teaches the pharmaceutical composition of claim 13, in a solid dosage form (para [0109] "The B-D-2'-D-2'-a-fluoro-2'-B-C-substituted-2'-modified-N6-substituted purine nucleotides of the invention are typically administered orally, for example in pill or tablet form") that delivers approximately 300, 400, or 500 mg of the compound (para[0405] "Often, to treat, prevent or delay the onset of these infections and/or to reduce the likelihood of an HCV virus infection, or a secondary disease state, condition or complication of HCV, the compositions will be administered in oral dosage form in amounts ranging from about 250 micrograms up to about 500 mg or more at least once a day").

Continues in Supplemental Box

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 18/16301

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Box V(2). Citations and Explanations:

Regarding claims 17-19, Atea teaches the pharmaceutical composition of claim 13, in a solid dosage form (para [0109] "The B-D-2'-D-2'-a-fluoro-2'-B-C-substituted-2-modified-N6-substituted purine nucleotides of the invention are typically administered orally, for example in pill or tablet form"), but does not teach that delivers approximately 600, 700, or 800 mg of the compound. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to regulate the amount of the compound in a single dosage by routine experimentation, in order to provide customized treatment for each patient.

Regarding claim 32, Atea teaches a method to treat hepatitis C infection, in a host in need thereof, comprising providing an effective amount (para[0121] "The invention disclosed herein is a compound, method, and composition for the treatment of infections in or exposure to humans and other host animals of the HCV virus that includes the administration of an effective amount of a compound of Formula I-VII as described herein or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof", p20, left col "3rd compound") of a free form of the compound, but does not teach 0.5 H₂SO₄ salt. However, Atea further teaches the compound may exist in salt (para[0068] "Accordingly, the present invention includes a compound of Formula I-VII, or a pharmaceutically acceptable composition, salt, or prodrug thereof, as described herein"). In addition, Bao teaches analogous compounds (para[0104] "Compound 11", "Compound 14") which can be in sulfuric acid salt (para[0021] "or a salt, a pharmaceutically acceptable salt, a hydrate, a solvate, or a crystalline form thereof", para[0029] "The phrase "pharmaceutically acceptable salt" of a purified compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound. Such salts include: (1) acid addition salts, formed with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid"). Thus, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to formulate the compound by regulating the ratio of the salts by routine experimentation, in order to obtain desired pharmacological activity (Bao: para[0021] "or a salt, a pharmaceutically acceptable salt, a hydrate, a solvate, or a crystalline form thereof", para[0029] "The phrase "pharmaceutically acceptable salt" of a purified compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound") exhibiting the most effective anti-HCV activity (Atea: Abstract "A compound of the structure: or a pharmaceutically acceptable salt or composition thereof for the treatment of a host infected with or exposed to an HCV virus or other disorders more fully described herein", Bao: Abstract "A purified compound having activity against hepatitis C virus is disclosed").

Regarding claim 33, Atea teaches the method of claim 32, wherein the compound is administered orally (para[0109] "The B-D-2'-D-2'-a-fluoro-2'-B-C-substituted-2-modified-N6-substituted purine nucleotides of the invention are typically administered orally").

Regarding claim 34, Atea teaches the method of claim 32, wherein the compound is administered via controlled release (para[0397] "The 5'-stabilized B-D-2'-D-2'-a-fluoro-2'-B-C-substituted-2-modified-N6-substituted purine nucleotide can be administered if desired as any salt or prodrug that upon administration to the recipient is capable of providing directly or indirectly the parent compound, or that exhibits activity itself. Nonlimiting examples are the pharmaceutically acceptable salts and a compound, which has been modified at a function group, such as a hydroxyl or amine function, to modify the biological activity, pharmacokinetics, half-life, controlled delivery").

Regarding claim 35, Atea teaches the method of claim 32, wherein the condition resulting from a hepatitis C infection has resulted in a viral-based chronic liver inflammation (para[0122] "The compounds and compositions can also be used to treat conditions related to or occurring as a result of a HCV viral exposure. For example, the active compound can be used to treat HCV antibody positive and HCV antigen positive conditions, viral-based chronic liver inflammation").

Regarding claims 36-41, Atea teaches the method of claim 32, wherein at least 300, 400, 500, 600, 700, or 800 mg of the compound is administered (para[0405] "Often, to treat, prevent or delay the onset of these infections and/or to reduce the likelihood of an HCV virus infection, or a secondary disease state, condition or complication of HCV, the compositions will be administered in oral dosage form in amounts ranging from about 250 micrograms up to about 500 mg or more at least once a day, for example, at least 25, 50, 100, 150, 250 or 500 milligrams, up to four times a day").

Regarding claims 42-44, Atea in view of Bao teaches the method of claim 32, but does not teach wherein the compound is administered for up to 12/8/6 weeks. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to regulate the dosage regimen and monitor the conditions of patients by routine experimentation, in order to provide maximum beneficial effect to the patients (Atea: para[0402] "It is also well within the routine skill to modify the route of administration and dosage regimen of a particular compound in order to manage the pharmacokinetics of the present compounds for maximum beneficial effect in patients").

Regarding claims 45-47, Atea in view of Bao teaches the method of claim 32, but does not teach wherein the compound is administered for at least 6/8/12 weeks. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to maintain the dosage for several weeks and monitor the conditions of patients by routine experimentation, in order to provide maximum beneficial effect to the patients (Atea: para[0402] "It is also well within the routine skill to modify the route of administration and dosage regimen of a particular compound in order to manage the pharmacokinetics of the present compounds for maximum beneficial effect in patients").

Regarding claims 53-57, Atea teaches the method of claim 32, wherein the hepatitis C virus is Genotype 1a, 2a, 3a, or 4a (p105, Table 2 1st column, "HCV Genotype", "1a", "2a", "3a", "4a").

Continues in Supplemental Box

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US 18/16301

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Box V(2). Citations and Explanations:

Regarding claim 58, Atea teaches the method of claim 53, but does not teach wherein the hepatitis C virus is Genotype 5a. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to apply the compound disclosed by Atea to HCV Genotype 5a by routine experimentation, in order to elucidate the efficacy of the compound toward various HCV Genotypes.

Regarding claim 60, Atea teaches a free form of the compound of formula (p20, left col "3rd compound"), for use in the treatment of a hepatitis C infection, in a host in need thereof (para[0121] "The invention disclosed herein is a compound, method, and composition for the treatment of infections in or exposure to humans and other host animals of the HCV virus that includes the administration of an effective amount of a compound of Formula I-VII as described herein or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof"), but does not teach 0.5 H₂SO₄ salt. However, Atea further teaches the compound may exist in salt (para[0068] "Accordingly, the present invention includes a compound of Formula I-VII, or a pharmaceutically acceptable composition, salt, or prodrug thereof, as described herein"). In addition, Bao teaches analogous compounds (para[0104] "Compound 11", "Compound 14") which can be in sulfuric acid salt (para[0021] "or a salt, a pharmaceutically acceptable salt, a hydrate, a solvate, or a crystalline form thereof", para[0029] "The phrase "pharmaceutically acceptable salt" of a purified compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound. Such salts include: (1) acid addition salts, formed with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid"). Thus, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to formulate the compound by regulating the ratio of the salts by routine experimentation, in order to obtain desired pharmacological activity (Bao: para[0021] "or a salt, a pharmaceutically acceptable salt, a hydrate, a solvate, or a crystalline form thereof", para[0029] "The phrase "pharmaceutically acceptable salt" of a purified compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound") exhibiting the most effective anti-HCV activity (Atea: Abstract "A compound of the structure: or a pharmaceutically acceptable salt or composition thereof for the treatment of a host infected with or exposed to an HCV virus or other disorders more fully described herein", Bao: Abstract "A purified compound having activity against hepatitis C virus is disclosed").

Regarding claim 61, Atea teaches the compound of claim 60, wherein the compound is administered orally (para[0109] "The B-D-2'-D-2'-a-fluoro-2'-B-C-substituted-2'-modified-N6-substituted purine nucleotides of the invention are typically administered orally").

Regarding claim 62, Atea teaches the compound of claim 60, wherein the compound is administered via controlled release (para[0397] "The 5'-stabilized B-D-2'-D-2'-a-fluoro-2'-B-C-substituted-2'-modified-N6-substituted purine nucleotide can be administered if desired as any salt or prodrug that upon administration to the recipient is capable of providing directly or indirectly the parent compound, or that exhibits activity itself. Nonlimiting examples are the pharmaceutically acceptable salts and a compound, which has been modified at a function group, such as a hydroxyl or amine function, to modify the biological activity, pharmacokinetics, half-life, controlled delivery").

Regarding claim 63, Atea teaches the compound of claim 60, wherein the condition resulting from a hepatitis C infection has resulted in a viral-based chronic liver inflammation (para[0122] "The compounds and compositions can also be used to treat conditions related to or occurring as a result of a HCV viral exposure. For example, the active compound can be used to treat HCV antibody positive and HCV antigen positive conditions, viral-based chronic liver inflammation").

Regarding claims 64-67, Atea teaches the compound of claim 60, wherein at least 300, 400, 500, or 600 mg of the compound is administered (para[0405] "Often, to treat, prevent or delay the onset of these infections and/or to reduce the likelihood of an HCV virus infection, or a secondary disease state, condition or complication of HCV, the compositions will be administered in oral dosage form in amounts ranging from about 250 micrograms up to about 500 mg or more at least once a day, for example, at least 25, 50, 100, 150, 250 or 500 milligrams, up to four times a day").

Regarding claim 70, Atea teaches use of a free form of the compound of formula (p20, left col "3rd compound"), in the preparation of a medicament for the treatment of a hepatitis C infection (para[0129] "(c) use of Formulas I-VII, and pharmaceutically acceptable salts and prodrugs thereof in the manufacture of a medicament for treatment of a hepatitis C virus infection"), in a host in need thereof (para[0121] "The invention disclosed herein is a compound, method, and composition for the treatment of infections in or exposure to humans and other host animals of the HCV virus that includes the administration of an effective amount of a compound of Formula I-VII as described herein or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof"), but does not teach 0.5 H₂SO₄ salt. However, Atea further teaches the compound may exist in salt (para[0068] "Accordingly, the present invention includes a compound of Formula I-VII, or a pharmaceutically acceptable composition, salt, or prodrug thereof, as described herein"). In addition, Bao teaches analogous compounds (para[0104] "Compound 11", "Compound 14") which can be in sulfuric acid salt (para[0021] "or a salt, a pharmaceutically acceptable salt, a hydrate, a solvate, or a crystalline form thereof", para[0029] "The phrase "pharmaceutically acceptable salt" of a purified compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound. Such salts include: (1) acid addition salts, formed with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid"). Thus, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to formulate the compound by regulating the ratio of the salts by routine experimentation, in order to obtain desired pharmacological activity (Bao: para[0021] "or a salt, a pharmaceutically acceptable salt, a hydrate, a solvate, or a crystalline form thereof", para[0029] "The phrase "pharmaceutically acceptable salt" of a purified compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound") exhibiting the most effective anti-HCV activity (Atea: Abstract A compound of the structure: or a pharmaceutically acceptable salt or composition thereof for the treatment of a host infected with or exposed to an HCV virus or other disorders more fully described herein", Bao: Abstract "A purified compound having activity against hepatitis C virus is disclosed").

Continues in Supplemental Box

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US 18/16301

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Box V(2). Citations and Explanations:

Regarding claim 71, Atea teaches the use of claim 70, wherein the compound is administered orally (para[0109] "The B-D-2'-D-2'-a-fluoro-2'-B-C-substituted-2-modified-N6-substituted purine nucleotides of the invention are typically administered orally").

Regarding claim 72, Atea teaches the use of claim 70, wherein the compound is administered via controlled release (para[0397] "The 5'-stabilized B-D-2'-D-2'-a-fluoro-2'-B-C-substituted-2-modified-N6-substituted purine nucleotide can be administered if desired as any salt or prodrug that upon administration to the recipient is capable of providing directly or indirectly the parent compound, or that exhibits activity itself. Nonlimiting examples are the pharmaceutically acceptable salts and a compound, which has been modified at a function group, such as a hydroxyl or amine function, to modify the biological activity, pharmacokinetics, half-life, controlled delivery").

Regarding claim 73, Atea teaches the use of claim 70, wherein the condition resulting from a hepatitis C infection has resulted in a viral-based chronic liver inflammation (para[0122] "The compounds and compositions can also be used to treat conditions related to or occurring as a result of a HCV viral exposure. For example, the active compound can be used to treat HCV antibody positive and HCV antigen positive conditions, viral-based chronic liver inflammation").

Regarding claims 74-77, Atea teaches the use of claim 70, wherein at least 300, 400, 500, or 600 mg of the compound is administered (para[0405] "Often, to treat, prevent or delay the onset of these infections and/or to reduce the likelihood of an HCV virus infection, or a secondary disease state, condition or complication of HCV, the compositions will be administered in oral dosage form in amounts ranging from about 250 micrograms up to about 500 mg or more at least once a day, for example, at least 25, 50, 100, 150, 250 or 500 milligrams, up to four times a day").

Claims 29-31 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 2011/0257121 A1 to Chang et al. (hereinafter 'Chang121'), in view of Atea.

Regarding claim 29, Chang121 teaches a crystalline form of an analogous compound, possessing -OMe substituent on the purine ring (Abstract "Disclosed herein is a compound represented by formula 1 or its hydrate thereof in crystalline or crystal-like form", Fig 2. "ORTEP drawing of 1H₂O with 30% probability thermal ellipsoids"), wherein the compound contains less than 0.5% impurities (para[0109] "1 can be further purified by crystallization of the mixture or by chromatographic separation, as illustrated below", para[0024] "Thus, "purified" embraces, and at least 99.9% purity"), but does not teach the compound possessing -NHMe substituent on the purine ring, 0.5 H₂SO₄ salt, and storing under ambient conditions for at least six months. However, Chang121 further teaches the compound can be in sulfuric acid salt (para[0038] "The term "co-crystallates" include co-crystallates of 1 in combination with salts, which embraces pharmaceutically acceptable salts", para[0040] "Examples of pharmaceutically acceptable salts include, but are not limited to: (1) acid addition salts, formed with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid") and Atea teaches the compound possessing -NHMe substituent on the purine ring (p20, left col "3rd compound"). Thus, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to formulate the compound by regulating the ratio of the salts by routine experimentation, in order to obtain the compound exhibiting desired properties. In addition, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to store the under ambient conditions for at least six months and check the purity by routine experimentation, in order to investigate the stability of the crystalline compound.

Regarding claim 30, Chang121 in view of Atea teaches the crystalline form of claim 29, but does not teach wherein the crystalline form is stored at approximately between 0 and 40 °C. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to store the compound at ambient temperature by routine experimentation, in order to avoid unwanted decomposition.

Regarding claim 31, Chang121 in view of Atea teaches the crystalline form of claim 29, but does not teach wherein the crystalline form is stored at approximately 30-80% relative humidity. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to store the compound at ambient humidity by routine experimentation, in order to avoid unwanted oxidation by water.

Continues in Supplemental Box

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US 18/16301

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Box V(2). Citations and Explanations:

Claims 2-12, 20-26 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Atea, in view of Bao, further in view of the journal article entitled 'Discovery of PSI-353661, a Novel Purine Nucleotide Prodrug for the Treatment of HCV Infection' by Chang et al. (hereinafter 'Chang130').

Regarding claim 2, Atea teaches a solid dosage form (para [0109] "The B-D-2'-D-2'-a-fluoro-2'-B-C-substituted-2'-modified-N6-substituted purine nucleotides of the invention are typically administered orally, for example in pill or tablet form") comprising a free form of the compound (p20, left col "3rd compound") that provides an analogous metabolite, possessing a monophosphate (p14-p15 "Scheme 1", p15, "1st compound", para[0215] "The metabolism of the B-D-2'-deoxy-2'-a-fluoro-2'-B-methyl-N6-methyl-2,6-diaminopurine nucleoside phosphoramidate involves the production of a 5'-monophosphate"), but does not teach 0.5 H₂SO₄ salt of the compound, that provides a steady-state trough plasma level (C_{24,ss}) of metabolite depicted between approximately 20-60 ng/mL. However, Atea further teaches the compound may exist in salt (para[0068] "Accordingly, the present invention includes a compound of Formula I-VII, or a pharmaceutically acceptable composition, salt, or prodrug thereof, as described herein") and Bao teaches analogous compounds (para[0104] "Compound 11", "Compound 14") which can be in sulfuric acid salt (para[0021] "or a salt, a pharmaceutically acceptable salt, a hydrate, a solvate, or a crystalline form thereof", para[0029] "The phrase "pharmaceutically acceptable salt" of a purified compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound. Such salts include: (1) acid addition salts, formed with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid"). Thus, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to formulate the compound by regulating the ratio of the salts by routine experimentation, in order to obtain desired pharmacological activity (Bao: para[0021] "or a salt, a pharmaceutically acceptable salt, a hydrate, a solvate, or a crystalline form thereof", para[0029] "The phrase "pharmaceutically acceptable salt" of a purified compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound") exhibiting the most effective anti-HCV activity (Atea: Abstract "A compound of the structure: or a pharmaceutically acceptable salt or composition thereof for the treatment of a host infected with or exposed to an HCV virus or other disorders more fully described herein", Bao: Abstract "A purified compound having activity against hepatitis C virus is disclosed"). Furthermore, Chang130 teaches an anti-HCV compound (Title "Discovery of PSI-353661, a Novel Purine Nucleotide Prodrug for the Treatment of HCV Infection", p134, left col 2nd para "the single diastereomer 23b (PSI-353661)", free form of the analogous compound disclosed by Bao (Chang130: p131, "Scheme 1. Compound 23", p132, "Table 2. Compd 23, R1 -OMe, R2 iPr"), provides the metabolite disclosed by Atea (Chang130: p133, "Scheme 3. Compound 35") further metabolizing to the metabolite depicted (p133, "Scheme 3. Compound 1", p131, "Compound 1") and a plasma level concentration of the metabolite (p133, right col ln5-7 "At the 6 h time point, the major metabolite in plasma is the nucleoside 1", p134, "Table 5. Radio Counts of Tritiated 23 (33) and Metabolites in Rat Plasma and Liver Samples", "plasma", "6h", "1", "3848"), but does not teach a steady-state trough plasma level (C_{24,ss}) of the metabolite between approximately 20-60 ng/mL. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to identify the metabolite depicted and measure C_{24,ss} by routine experimentation, in order to elucidate all possible metabolites and the concentration of the metabolite at 24 hours post dose at steady-state, because the measurement of C_{24,ss} is the conventional method to understand pharmacokinetics of the drug.

Regarding claims 3-6, Atea in view of Bao further in view of Chang130 teaches the solid dosage form of claim 2, wherein the steady-state trough plasma level (C_{24,ss}) is between approximately 20-25 ng/mL (see the discussion set forth above as to claim 2).

Regarding claims 7-12, Atea in view of Bao further in view of Chang130 teaches the solid dosage form of claim 2, but does not teach wherein the area under the curve of metabolite is between approximately 2,700 ng*h/mL and 3,000 ng*h/mL or between approximately 2,000 ng*h/mL and 2,200 ng*h/mL. However, Chang130 further teaches the peak area of metabolites (p134, "Table 5. Radio Counts of Tritiated 23 (33) and Metabolites in Rat Plasma and Liver Samples", "peak area", "1"). Thus, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to measure the area under the curve of metabolite by routine experimentation, in order to support the results disclosed by Chang130.

Regarding claim 20, Atea in view of Bao teaches the pharmaceutical composition of claim 13, wherein the solid dosage form (Atea: para [0109] "The B-D-2'-D-2'-a-fluoro-2'-B-C-substituted-2'-modified-N6-substituted purine nucleotides of the invention are typically administered orally, for example in pill or tablet form") provides an analogous metabolite, possessing a monophosphate (Atea: p14-p15 "Scheme 1", p15, "1st compound", para[0215] "The metabolism of the B-D-2'-deoxy-2'-a-fluoro-2'-B-methyl-N6-methyl-2,6-diaminopurine nucleoside phosphoramidate involves the production of a 5'-monophosphate"), but does not teach wherein the solid dosage form provides a steady-state trough plasma level (C_{24,ss}) of metabolite depicted between approximately 20-60 ng/mL. However, Chang130 teaches an anti-HCV compound (Title "Discovery of PSI-353661, a Novel Purine Nucleotide Prodrug for the Treatment of HCV Infection", p134, left col 2nd para "the single diastereomer 23b (PSI-353661)", free form of the analogous compound disclosed by Bao (Chang130: p131, "Scheme 1. Compound 23", p132, "Table 2. Compd 23, R1 -OMe, R2 iPr"), provides the metabolite disclosed by Atea (Chang130: p133, "Scheme 3. Compound 35") further metabolizing to the metabolite depicted (p133, "Scheme 3. Compound 1", p131, "Compound 1") and a plasma level concentration of the metabolite (p133, right col ln5-7 "At the 6 h time point, the major metabolite in plasma is the nucleoside 1", p134, "Table 5. Radio Counts of Tritiated 23 (33) and Metabolites in Rat Plasma and Liver Samples", "plasma", "6h", "1", "3848"), but does not teach a steady-state trough plasma level (C_{24,ss}) of the metabolite between approximately 20-60 ng/mL. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to identify the metabolite depicted and measure C_{24,ss} by routine experimentation, in order to elucidate all possible metabolites and the concentration of the metabolite at 24 hours post dose at steady-state, because the measurement of C_{24,ss} is the conventional method to understand pharmacokinetics of the drug.

Continues in Supplemental Box

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 18/16301

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Box V(2). Citations and Explanations:

Regarding claims 21-24, Atea in view of Bao further in view of Chang130 teaches the pharmaceutical composition of claim 20, wherein the solid steady-state trough plasma level (C_{24,ss}) is between approximately 20-25 ng/mL (see the discussion set forth above as to claim 20).

Regarding claim 25, Atea in view of Bao teaches the pharmaceutical composition of claim 17, wherein the solid dosage form (Atea: para [0109] "The B-D-2'-D-2'-a-fluoro-2'-B-C-substituted-2'-modified-N6-substituted purine nucleotides of the invention are typically administered orally, for example in pill or tablet form") provides an analogous metabolite, possessing a monophosphate (Atea: p14-p15 "Scheme 1", p15, "1st compound", para[0215] "The metabolism of the B-D-2'-deoxy-2'-a-fluoro-2'-B-methyl-N6-methyl-2,6-diaminopurine nucleoside phosphoramidate involves the production of a 5'-monophosphate"), but does not teach wherein the solid dosage form provides a steady-state trough plasma level (C_{24,ss}) of metabolite depicted between approximately 20-60 ng/mL. However, Chang130 teaches an anti-HCV compound (Title "Discovery of PSI-353661, a Novel Purine Nucleotide Prodrug for the Treatment of HCV Infection", p134, left col 2nd para "the single diastereomer 23b (PSI-353661)", free form of the analogous compound disclosed by Bao (Chang130: p131, "Scheme 1. Compound 23", p132, "Table 2. Compd 23, R1 -OMe, R2 iPr"), provides the metabolite disclosed by Atea (Chang130: p133, "Scheme 3. Compound 35") further metabolizing to the metabolite depicted (p133, "Scheme 3. Compound 1", p131, "Compound 1") and a plasma level concentration of the metabolite (p133, right col ln5-7 "At the 6 h time point, the major metabolite in plasma is the nucleoside 1", p134, "Table 5. Radio Counts of Tritiated 23 (33) and Metabolites in Rat Plasma and Liver Samples", "plasma", "6h", "1", "3848"), but does not teach a steady-state trough plasma level (C_{24,ss}) of the metabolite between approximately 20-60 ng/mL. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to identify the metabolite depicted and measure C_{24,ss} by routine experimentation, in order to elucidate all possible metabolites and the concentration of the metabolite at 24 hours post dose at steady-state, because the measurement of C_{24,ss} is the conventional method to understand pharmacokinetics of the drug.

Regarding claim 26, Atea in view of Bao further in view of Chang130 teaches the pharmaceutical composition of claim 25, wherein the steady-state trough plasma level (C_{24,ss}) is between approximately 40-60 ng/mL (see the discussion set forth above as to claim 25).

Claims 1-26, 29-47, 53-58, 60-67, 70-77 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.