

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 857 906**

51 Int. Cl.:

C07D 498/14 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61K 31/5383 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2016 E 18189193 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2021 EP 3428170**

54 Título: **Derivado de piridona policíclica contra la influenza y profármaco del mismo**

30 Prioridad:

28.04.2015 JP 2015090909

03.12.2015 JP 2015236844

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

29.09.2021

73 Titular/es:

SHIONOGI & CO., LTD (100.0%)

**1-8, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, Osaka-shi
Osaka 541-0045, JP**

72 Inventor/es:

**KAWAI, MAKOTO;
TOMITA, KENJI;
AKIYAMA, TOSHIYUKI;
OKANO, AZUSA y
MIYAGAWA, MASAYOSHI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 857 906 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivado de piridona policíclica contra la influenza y profármaco del mismo

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a derivados de piridona policíclica sustituida que tienen actividad inhibidora de la endonucleasa dependiente de cap, profármacos de los mismos, y composiciones farmacéuticas que incluyen los mismos.

Antecedentes de la Invención

10 La influenza es una enfermedad infecciosa respiratoria aguda provocada por la infección con un virus de la influenza. En Japón, cada invierno se reportan millones de pacientes con enfermedad similar a la influenza, y la influenza está acompañada de una alta morbilidad y mortalidad. La influenza es una enfermedad particularmente importante en una población de alto riesgo tal como bebés y ancianos, la tasa de complicaciones con neumonía es alta en personas de edad avanzada, y se produce muerte por influenza en personas mayores en muchos casos.

15 Como fármacos contra la influenza, se conocen Symmetrel (nombre comercial: Amantadina) y Flumadina (nombre comercial: Rimantadina) que inhiben el proceso de nucleación de un virus, y Oseltamivir (nombre comercial: Tamiflu) y Zanamivir (nombre comercial: Relenza), que son inhibidores de la neuraminidasa que suprimen el brote del virus y se liberan de una célula, sin embargo, debido a que se temen problemas de apariciones de cepas resistentes y efectos secundarios, y epidemias en todo el mundo de un virus nuevo de la influenza que tiene alta patogenicidad y mortalidad, se ha deseado el desarrollo de un fármaco contra la influenza que tenga un nuevo mecanismo.

20 Puesto que una endonucleasa dependiente de cap, que es un virus de la enzima derivada de la influenza es esencial para la proliferación del virus, y tiene la actividad enzimática específica del virus que no es poseído por un hospedero, se considera que la endonucleasa es adecuada para un blanco de un fármaco contra la influenza. La endonucleasa dependiente de cap de un virus de la influenza tiene un precursor de ARNm hospedero como un sustrato, y tiene la actividad de la endonucleasa de producir un fragmento de 9 a 13 bases, incluyendo una estructura cap (que no incluye el número de bases de la estructura cap). Este fragmento funciona como un cebador de una polimerasa de ARN del virus, y se utiliza en la síntesis de ARNm que codifica una proteína del virus. Es decir, se considera que una sustancia que inhibe la endonucleasa dependiente de cap inhibe la síntesis de una proteína del virus mediante la inhibición de la síntesis de ARNm del virus y, como resultado, inhibe la proliferación del virus.

30 Como sustancia que inhibe la endonucleasa dependiente de cap, se han reportado flutimida (Documento de patente 1 y Documentos no patente 1 y 2), ácido 2,4-dioxobutanoico 4-sustituido (Documento de patente 2 y Documentos no patente 3 y 4), los compuestos que se describen en los documentos patente 3 a 12 y similares, pero aún no han dado lugar a su uso clínico como fármacos contra la influenza. Los documentos de patente 9 y 12 describen compuestos que tienen una estructura similar a la de la presente invención, pero no describe los compuestos relacionados con la presente invención. También, los documentos de patente 13 a 15 describen compuestos que tienen una estructura similar a aquella de la presente invención como un compuesto que tiene actividad inhibidora de integrasa, sin embargo, los documentos no describen la endonucleasa dependiente de cap. Además, el Documento de patente 16 y 17 describe una invención referente a compuestos que tienen una estructura similar a aquella de la presente invención como un compuesto que tiene actividad inhibidora de la endonucleasa dependiente de cap, que ha sido presentada por los solicitantes, pero no describe los compuestos referentes a la presente invención.

DOCUMENTOS DEL ARTE PREVIO

40 DOCUMENTOS PATENTE

Documento de patente 1: GB2280435

Documento de patente 2: US5475109

Documento de patente 3: US20130090300

Documento de patente 4: W02013/057251

45 Documento de patente 5: W02013/174930

Documento de patente 6: W02014/023691

Documento de patente 7: W02014/043252

Documento de patente 8: W02014/074926

Documento de patente 9: W02014/108406

Documento de patente 10: W02014/108407
 Documento de patente 11: W02014/108408
 Documento de patente 12: W02015/038655
 Documento de patente 13: W02005/016927
 5 Documento de patente 14: W02006/066414
 Documento de patente 15: W02007/049675
 Documento de patente 16: W02010/147068
 Documento de patente 17: W020121039414

DOCUMENTOS NO PATENTE

10 Documento no patente 1: Tetrahedron Lett 1995, 36(12), 2005
 Documento no patente 2: Tetrahedron Lett 1995, 36(12), 2009
 Documento no patente 3: Antimicrobial Agents And Chemotherapy, Diciembre de 1994, páginas 2827-2837
 Documento no patente 4: Antimicrobial Agents And Chemotherapy, Mayo de 1996, páginas 1304-1307

Sumario de la Invención

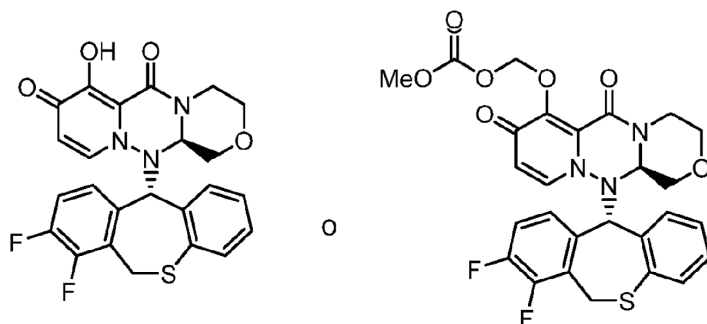
15 PROBLEMAS QUE DEBEN SER RESUELTOS POR LA INVENCIÓN

Un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos que tienen actividades antivirales, que especial
 mente inhiben actividad de crecimiento del virus de la influenza. Otro objeto de la presente invención es proporcionar
 un profármaco preparado a partir de compuestos utilizados para la administración *in vivo* (por ejemplo,
 administración oral), que son absorbidos en forma eficiente en el cuerpo después de la administración y que
 20 muestran alto efecto farmacológico.

MEDIOS PARA SOLUCIONAR LOS PROBLEMAS

La presente invención proporciona las invenciones que se muestran más abajo.

(1) Un compuesto representado por la siguiente fórmula (I):



25 , o su sal farmacéuticamente aceptable.

(2) Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de (1) o su sal farmacéuticamente aceptable.

(3) Una composición farmacéutica de acuerdo al punto (2) para su uso en el tratamiento o prevención de una
 infección con el virus de la influenza.

30 (4) Un compuesto de acuerdo a (1) o su sal farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o
 prevención de la enfermedad provocada por un virus que tiene endonucleasa dependiente de cap.

EFFECTO DE LA INVENCIÓN

El compuesto de acuerdo a la presente invención tiene una actividad inhibidora sobre la endonucleasa dependiente
 de cap. El compuesto más preferido es un profármaco, y el profármaco se vuelve un compuesto original que tiene
 una actividad inhibidora sobre la endonucleasa dependiente de cap *in vivo* después de la administración, de ese
 35 modo es efectivo como agente terapéutico y/o agente preventivo para la enfermedad infecciosa por influenza.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 es un resultado de la medición de concentración plasmática del compuesto III-2, después de la administración oral del compuesto profármaco II-6, cuyo compuesto original es el Compuesto III-2, a rata en condiciones de no ayuno.

- 5 La Figura 2 es un resultado de la medición de concentración plasmática del Compuesto II-6, después de la administración oral del compuesto profármaco II-6, cuyo compuesto original es el Compuesto III-2, a rata en condiciones de no ayuno.

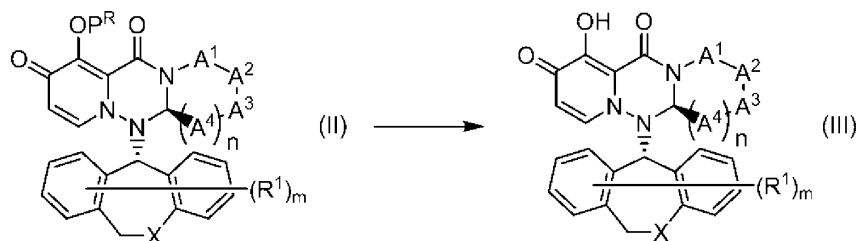
Descripción Detallada de la Invención

El significado de cada término utilizado en la presente descripción se explica a continuación.

- 10 Cada término se utiliza en un sentido unificado, y se utiliza en el mismo sentido cuando se utiliza solo, o cuando se utiliza en combinación de otro término.

El término de “que comprende” significa que no se restringe con componentes y que no excluye los factores no descritos.

- 15 “Profármaco” en general se refiere a un compuesto representado por la fórmula (II) en la siguiente fórmula de reacción:



en donde P^R es un grupo profármaco;

A¹ es CR^{1A}R^{1B}, S u O;

A² es CR^{2A}R^{2B}, S u O;

- 20 A³ es CR^{3A}R^{3B}, S u O;

A⁴ es cada uno independientemente CR^{4A}R^{4B}, S u O;

el número de heteroátomos entre los átomos que constituyen el anillo que consiste en A¹, A², A³, A⁴, átomo de nitrógeno adyacente a A¹ y átomo de carbono adyacente a A⁴, es 1 o 2; R^{1A} y R^{1B} son cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo, haloalquilo, alquiloxi o fenilo;

- 25 R^{2A} y R^{2B} son cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo, haloalquilo, alquiloxi o fenilo;

R^{3A} y R^{3B} son cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo, haloalquilo, alquiloxi o fenilo;

R^{4A} y R^{4B} son cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo, haloalquilo, alquiloxi o fenilo;

R^{3A} y R^{3B} se pueden tomar junto con el átomo de carbono adyacente para formar un carbociclo no aromático o heterociclo no aromático;

- 30 X es CH₂, S u O;

R¹ es cada uno independientemente halógeno, hidroxilo, alquilo, haloalquilo o alquiloxi;

m es cualquier número entero de 0 a 2; y

n es cualquier número entero de 1 a 2,

- 35 o su sal farmacéuticamente aceptable, y significa un compuesto que muestra actividad inhibidora de endonucleasa dependiente de cap (CEN) y/o efecto inhibidor de CPE convirtiéndose en un compuesto representado por la fórmula (III) por una reacción de descomposición provocada por enzimas metabolizadoras de fármacos, hidrolasas, ácidos gástricos, enterobacteria, etc. en condiciones fisiológicas *in vivo*.

El profármaco más preferiblemente significa un compuesto en el que la biodisponibilidad y/o AUC (área bajo la curva

de concentración en sangre) en la administración *in vivo* se mejora más que aquellas del compuesto representado por la fórmula (III).

5 Por ello, el profármaco es absorbido en forma eficiente en el cuerpo en el estómago y/o intestinos después de la administración *in vivo* (por ejemplo, administración oral) después se convierte en el compuesto representado por la fórmula (III). Por lo tanto, el profármaco preferiblemente muestra un efecto más alto de tratamiento y/o prevención de la influenza que el compuesto representado por la fórmula (III).

La presente invención se caracteriza porque el compuesto aislado por resolución óptica de compuestos tricíclicos sustituidos por el otro grupo tricíclico mejora la actividad inhibidora de la endonucleasa dependiente de cap.

10 La presente invención también se caracteriza porque el presente compuesto es absorbido en forma eficiente en el cuerpo después de la administración (por ejemplo, administración oral), y muestra alta eficacia mediante la introducción de un grupo para formar un profármaco.

15 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen, por ejemplo, sales con metales alcalinos (por ejemplo, litio, sodio, de potasio o similar), metal alcalinotérreo (por ejemplo, calcio, bario o similar), magnesio, metal de transición (por ejemplo, zinc, hierro o similar), amoníaco, bases orgánicas (por ejemplo, trimetilamina, trietilamina, dicitclohexilamina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, meglumina, etilendiamina, piridina, picolina, quinolina o similar) o aminoácidos, o sales con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido carbónico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido yodhídrico o similar) u ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido formica, acético ácido, ácido propiónico, acético tritluoroácido, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido mandélico, ácido glutárico, ácido málico, ácido benzoico, ácido ftálico, ácido ascórbico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico o similar). Especialmente, se incluyen sales con ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico y similares. Estas sales pueden ser formadas por los métodos habituales.

25 Los compuestos de la presente invención o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden formar solvatos (por ejemplo, hidratos o similares) y/o polimorfos de cristal. La presente invención contempla aquellos varios solvatos y polimorfos de cristal. Los "solvatos" pueden ser aquellos en donde cualquier número de moléculas de disolvente (por ejemplo, moléculas de agua o similar) están coordinados con los compuestos de la presente invención. Cuando se permite que los compuestos de la presente invención o su sal farmacéuticamente aceptable reposen en la atmósfera, los compuestos pueden absorber agua, dando como resultado la unión de agua absorbida o formación de hidratos. La recristalización de los compuestos de la presente invención o sus sales farmacéuticamente aceptables puede producir polimorfos de cristal.

Método para producir el compuesto de la presente invención

35 Un general método para producir el compuesto de la presente invención se ejemplificará a continuación. En cuanto a la extracción y purificación, puede llevarse a cabo el tratamiento que se realiza en un experimento normal de la química orgánica.

La síntesis del compuesto de la presente invención puede llevarse a cabo en referencia a los procedimientos conocidos en la técnica.

40 Como compuesto de materia prima, pueden utilizarse compuestos disponibles en comercios, compuestos que se describen en la presente descripción, compuestos que se describen en las referencias citadas en la presente descripción, y otros compuestos conocidos.

45 Cuando uno desea obtener una sal del compuesto de la presente invención, en el caso en que el compuesto de la presente invención se obtiene en una forma de una sal, este puede ser purificado tal como está y, en el caso en que el compuesto de la presente invención se obtiene en una forma libre, puede formarse una sal mediante un método normal disolviendo o suspendiendo el compuesto en un disolvente orgánico apropiado, y añadiendo un ácido o una base.

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

50 El compuesto de la presente invención tiene actividad inhibidora de la endonucleasa dependiente de cap y es útil como agente terapéutico o preventivo de influenza.

55 El compuesto de la presente invención es útil para los síntomas y/o enfermedades que están inducidos por el virus de la influenza. Por ejemplo, son útiles para tratar y/o prevenir, o mejorar síntomas de, síntomas similares a los del catarro que acompañan a la fiebre, escalofríos, cefaleas, dolor muscular, malestar general, etc., síntomas de la inflamación de las vías aéreas tales como faringitis, secreción nasal, congestión nasal, tos, expectoración, etc., síntomas gastrointestinales tales como dolor abdominal, vómitos, diarrea, etc. y, además, complicaciones que

acompañan a la infección secundaria tal como encefalopatía aguda y neumonía.

El compuesto de la presente invención no sólo tiene actividad inhibitoria de la endonucleasa dependiente de cap sino también es útil como un medicamento y tiene alguna o todas de las siguientes excelentes características:

- 5 a) El compuesto es un inhibidor débil de enzimas CYP (por ejemplo, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 y similar).
- b) El compuesto demuestra buena farmacocinética, tal como una alta biodisponibilidad, depuración moderada y similar.
- c) El compuesto tiene una alta estabilidad metabólica.
- 10 d) El compuesto no tiene acción inhibitoria irreversible contra enzimas CYP (por ejemplo, CYP3A4) cuando la concentración está dentro del intervalo que se describe en la presente descripción como las condiciones de medición.
- e) El compuesto no tiene mutagenicidad.
- f) El compuesto está asociado a un bajo riesgo cardiovascular.
- 15 g) El compuesto tiene una alta solubilidad.
- h) El compuesto no tiene fototoxicidad.

Para el propósito de tratar las enfermedades mencionadas anteriormente en seres humanos, los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía oral como un polvo, un gránulo, tabletas, cápsulas, píldoras, un líquido y similar o por vía parenteral como una inyección, supositorios, un fármaco percutáneo, un inhalante y similar.

20 Las dosis eficaces de los presentes compuestos se pueden mezclar con excipientes adecuados para la forma de dosificación, tal como rellenos, aglutinantes, humectantes, disgregantes, y lubricantes, según proceda, para formar preparaciones farmacéuticas, para preparar una inyección, la esterilización se realiza con un vehículo adecuado.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo a la presente invención pueden administrarse por vía oral o por vía parenteral. Para la administración oral, las formas de dosificación comúnmente utilizadas, tal como tableta, gránulo, polvo, y cápsulas, pueden prepararse de acuerdo a métodos convencionales. Para la administración parenteral, cualquier forma de dosificación comúnmente utilizada, tal como una inyección, puede utilizarse adecuadamente. Los compuestos de acuerdo a la presente invención pueden utilizarse adecuadamente como preparaciones orales debido a su alta capacidad de absorción oral.

25

Las dosis eficaces de los compuestos de la presente invención se pueden mezclar con varios excipientes farmacéuticos adecuados para la forma de dosificación, tal como rellenos, aglutinantes, disgregantes, y lubricantes, en su caso, para formar composiciones farmacéuticas.

30

La dosis depende de la afección de la enfermedad, vía de administración, o la edad o el peso del paciente. La dosis oral habitual para adultos es 0.1 a 100 mg/kg por día, preferiblemente 1 a 20 mg/kg por día.

La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención preferiblemente se determina en base a la edad y peso del paciente, tipo y gravedad de la enfermedad, vía de administración y similar. La dosis oral habitual para adultos está en el intervalo 0.05 a 100 mg/kg por día, preferiblemente 0.1 a 10 mg/kg por día. La dosis parenteral para adultos varía significativamente dependiendo de la vía de administración pero habitualmente está en el intervalo 0.005 a 10 mg/kg por día, preferiblemente 0.01 a 1 mg/kg por día. La dosis puede administrarse una vez por día o puede dividirse en múltiples dosis diarias.

35

El compuesto de la presente invención puede utilizarse en combinación con otros fármacos o similares (de aquí en adelante referidos como fármacos de combinación) para incrementar la actividad del compuesto, reducir la dosis del compuesto, o similar. En el caso del tratamiento de influenza, el compuesto puede utilizarse combinado con o en una formulación acoplada con inhibidor de neuraminidasa (por ejemplo, Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir, Inabiru y similar); inhibidor de polimerasa de ARN dependiente del ARN (por ejemplo, Favipiravir); inhibidor de la proteína M2 (por ejemplo, Amantadina); inhibidor de unión a Cap PB2 (por ejemplo, VX-787); anticuerpo anti-HA (por ejemplo, MHAA4549A); agonistas inmunes (por ejemplo, Nitazoxanide) también son posibles. En este caso, el tiempo de administración para un compuesto de la presente invención y el fármaco de combinación no es limitado. Los mismos pueden administrarse a los sujetos que deben ser tratados, en un tiempo o en tiempos diferentes. Además, un compuesto de la presente invención y el fármaco de combinación pueden administrarse como dos o más formulaciones que comprenden independientemente cada ingrediente activo o una formulación simple que comprende cada ingrediente activo.

40

45

50

La dosis para los fármacos de combinación se puede seleccionar apropiadamente en referencia a la dosis clínica. La

relación de composición de los compuestos de la presente invención y fármacos co-administrados puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del sujeto a tratar, vía de administración, enfermedad a tratar, síntomas, combinación de los fármacos y similares. Para la administración en seres humanos, por ejemplo, 1 parte en peso de los compuestos de la presente invención puede ser utilizada en combinación con 0.01 a 100 partes en peso de los fármacos administrados conjuntamente.

La presente invención se explicará en mayor detalle más abajo por medio de los Ejemplos, así como Ejemplos de Ensayo de la presente invención, pero la presente invención no se limita a los mismos.

El análisis de AMN obtenido en el ejemplo se llevó a cabo en 300 MHz, y se midió utilizando DMSO-d₆, CDCl₃.

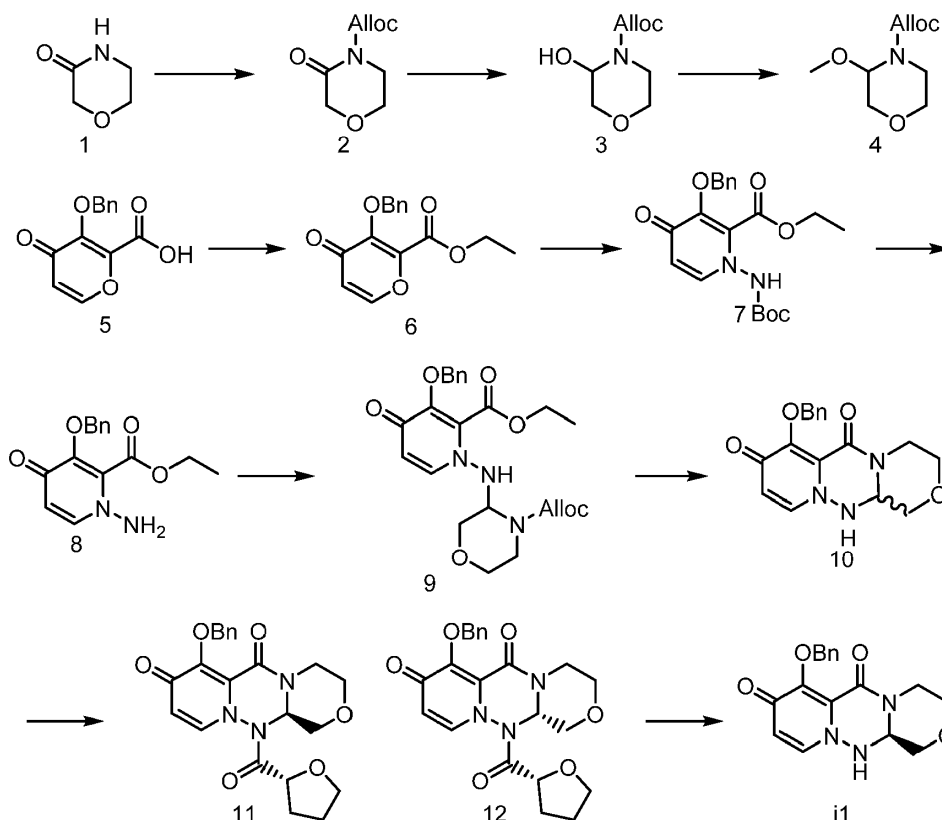
En los ejemplos, el significado de cada abreviatura es como sigue.

- 10 Boc: terc-butoxicarbonilo
 DBU: diazabicycloundeceno
 DMA: N,N-dimetilacetamida
 DMF: N,N-dimetilformamida
 OBn: benciloxi

- 15 THF: tetrahidrofurano
 T3P: anhídrido propil foshonico

El arriba y abajo de la "cuña" y "cuña de línea discontinua" indica la configuración absoluta.

Ejemplo 1-1



20 Primer paso

A una solución del Compuesto 1 (5.0 g, 49.5 mmol) en THF (100 ml) se añadió en gotas 1.62 mol/L de n-butillitio en hexano (30.5 ml, 49.5 mmol) a -78°C bajo atmósfera de nitrógeno, y la mezcla se agitó a -78°C durante 2 horas. Una solución de clorofornato de alilo (5.96 g, 49.5 mmol) en THF (20 ml) se añadió en gotas a la misma, y la mezcla se agitó a -78°C durante 2 horas. La mezcla se desactivó con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio, se calentó hasta temperatura ambiente, y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con

salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y se concentró bajo presión reducida para obtener el Compuesto 2 (5.66 g, 62%).

RMN-¹H (CDCl₃) δ: 3.83 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.92 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 4.26 (s, 2H), 4.78 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 5.30 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 5.44 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 5.93-6.03 (m, 1H),

5 Segundo paso

A una solución del Compuesto 2 (6.6 g, 35.6 mmol) en THF (66 ml) se añadió en gotas 1.03 mol/L de DIBAL-H en hexano (45.0 ml, 46.3 mmol), y la mezcla se agitó a -78°C durante 1 hora. La mezcla se desactivó con acetona, se añadió una solución acuosa de sal de Rochelle a la misma. La mezcla se agitó, y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y se concentró bajo presión reducida para obtener el Compuesto 3 (6.21 g, 93%).

10 RMN-¹H (CDCl₃) δ: 3.44 (br, 1H), 3.50-3.64 (m, 2H), 3.71 (br, 1H), 3.95 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.64 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 5.24 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 5.40 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 5.47 (d, J = 4Hz, 1H), 5.87-6.00 (m, 1H)

Tercer paso

15 A una solución del Compuesto 3 (6.2 g, 33.1 mmol) en metanol (65 ml) se añadió ácido p-toluenosulfónico monohidratado (0.63 g, 3.31 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla se desactivó con una solución acuosa de carbonato hidrogeno de sodio, se concentró, y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y se concentró bajo presión reducida para obtener el Compuesto 4 (5.77 g, 87%).

20 RMN-¹H (CDCl₃) δ: 3.34 (s, 3H), 3.55 (br, 2H), 3.73-3.99 (m, 3H), 4.64 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 5.10-5.20 (m, 1H), 5.25 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.33 (d, J = 16Hz, 1H), 5.88-6.05 (m, 1H).

Cuarto paso

25 A una solución del Compuesto 5 (20.0 g, 81 mmol) en DMF (100 ml) se añadieron yoduro de etilo (22.8 g, 146 mmol) y diazabicicoundeceno (18.4 ml, 122 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla se vertió en solución acuosa al 10% de cloruro de amonio, y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y se concentró bajo presión reducida para obtener el Compuesto 6 (22.3 g, 100%).

RMN-¹H (CDCl₃) δ: 1.23 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 4.28 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 5.16 (s, 2H), 6.57 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.28-7.48 (m, 5H), 8.21 (d, J = 4.0 Hz, 1H).

Quinto paso

30 A una solución del Compuesto 6 (500 mg, 1.82 mmol) en DMA (5.0 ml) se añadieron p-toluenosulfonato de piridinio (1.37 g, 5.47 mmol) y Boc-hidrazina (361 mg, 2.74 mmol), y la mezcla se agitó a 60°C durante 14 horas. A la mezcla se añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y se concentró bajo presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo-metanol) para obtener el Compuesto 7 (519 mg, 73%).

35 RMN-¹H (CDCl₃) δ: 1.24 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 4.26 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 5.28 (s, 2H), 6.40 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.27-7.38 (m, 4H), 7.40-7.45 (m, 2H).

Sexto paso

40 El Compuesto 7 (500 mg, 1.29 mmol) se disolvió en 4mol/l de cloruro de hidrógeno en acetato de etilo (5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se concentró bajo presión reducida. Al residuo obtenido se añadió una solución acuosa saturada de carbonato hidrógeno de sodio, y la mezcla se extrajo con diclorometano. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y se concentró bajo presión reducida para obtener el Compuesto 8 (369 mg, 99%).

45 RMN-¹H (CDCl₃) δ: 1.26 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 4.31 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 5.24 (s, 2H), 6.47 (d, J = 8.0, 1H), 7.28-7.44 (m, 5H), 7.64 (d, J = 8.0, 1H).

Séptimo paso

50 A una solución del Compuesto 8 (365 mg, 1.27 mmol) y Compuesto 4 (306 mg, 1.52 mmol) en acetonitrilo (8 ml) se añadió en gotas cloruro de estaño (0.223 ml, 1.90 mmol) a -25°C bajo atmósfera de nitrógeno, y la mezcla se agitó a -25°C durante 45 minutos. La mezcla se desactivó con una solución acuosa saturada de carbonato hidrógeno de sodio, y se añadió diclorometano a la misma. La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se filtró a través de Celite, y el filtrado se extrajo con diclorometano. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera, se secó sobre

sulfato de magnesio anhidro, y se concentró bajo presión reducida para obtener el Compuesto 9 crudo. El Compuesto 9 obtenido se disolvió en THF (8 ml), se añadieron morfolina (1.10 ml, 12.7 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (146 mg, 0.127 mmol) a la misma, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A la mezcla se añadió éter dietílico (16 ml), y el sólido precipitado se filtró y se secó para obtener el

5

Compuesto 10 (418 mg, 100%).
 RMN-¹H (CDCl₃) δ: 2.90-2.99 (m, 1H), 3.13 (t, J = 12.0 Hz, 1H), 3.40-3.46 (m, 1H), 4.00-4.08 (m, 1H), 4.14 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 5.07 (s, 2H), 6.22 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.29-7.40 (m, 3H), 7.56 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.71 (d, J = 8.0 Hz, 1H)

Octavo paso

10 A una suspensión de ácido (R)-2-tetrahidrofurfuroico (855 mg, 7.36 mmol) y el Compuesto 10 (2.00 g, 6.11 mmol) en acetato de etilo (9 ml) se añadieron piridina (4.00 ml, 49.6 mmol) y T3P (50% en acetato de etilo, 11.0 ml, 18.5 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante toda la noche. El sólido precipitado se filtró y se lavó con acetato de etilo (4 ml) y etanol (4 ml). El sólido obtenido se suspendió en etanol (6 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 6.5 horas. La suspensión se filtró y el sólido obtenido se lavó con etanol (2 ml) dos

15

veces para obtener el Compuesto 11 (1.18 g, 45.4%).
 RMN-¹H (DMSO) δ: 1.80-1.94(m, 2H), 1.95-2.14 (m, 2H), 3.21-3.35-(m, 2H), 3.50-3.60 (m, 1H), 3.70-3.82 (m, 3H), 4.00-4.05 (m, 1H), 4.32-4.38 (m, 1H), 5.14 (dd, J=10.8 Hz, 21.6 Hz, 2H), 5.76-5.81 (m, 1H), 6.29 (d, J=4.8Hz, 1H), 7.28-7.39 (m, 3H), 7.48-7.54 (m, 2H), 7.64-7.75(m, 1H)

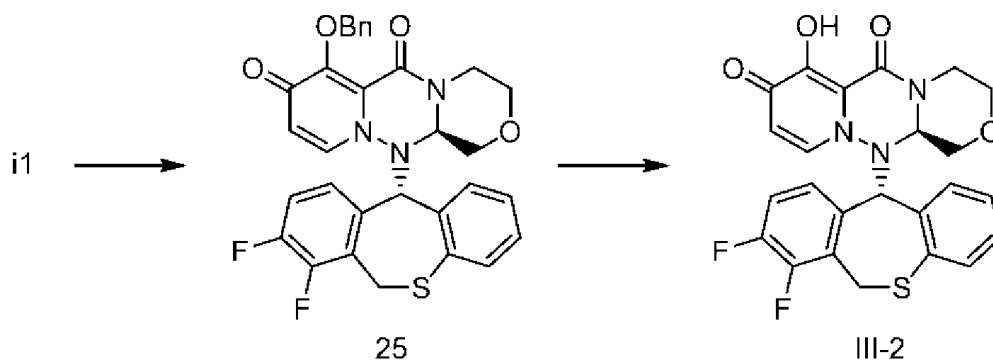
Noveno paso

20 A una suspensión del Compuesto 11 (500 mg, 1.18 mmol) en etanol (3.5 ml) se añadió DBU (0.0035 ml, 0.023 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 30 minutos. A la suspensión obtenida se añadió diisopropiléter (6.5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El sólido precipitado se filtró y se lavó con acetato de etilo (1.5 ml) dos veces para obtener el Compuesto i1 (346 mg, 89.9%).

25

RMN-¹H (DMSO) δ: 2.80-3.00 (m, 1H), 3.10-3.18(m, 1H), 3.38-3.50 (m, 1H), 3.98-4.08(m, 2H), 4.10-4.20 (m, 1H), 4.76-4.84 (m, 1H), 5.04-5.14 (m, 2H), 6.22 (m, J=7.6Hz, 1H), 7.27-7.40 (m, 4H), 7.56-7.60 (m, 2H), 7.70 (d, J=7.6Hz, 1H)

Ejemplo 1-2



Primer paso

30 El Compuesto i1 (1100 g, 3360 mmol) y 7,8-difluoro-6,11-dihidrodibenzotiepina-11-ol (977 g, 3697 mmol) se suspendieron en 50% en peso de T3P en acetato de etilo (3208 g, 5041 mmol) y acetato de etilo (1.1 L). A la mezcla se añadió ácido metanosulfónico (436 ml, 6721 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó a 70°C durante 5.5 horas. A la mezcla se añadió agua bajo baño de agua con hielo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. THF se añadió a la misma y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se

35

40

lavó con agua y solución acuosa al 8% de carbonato hidrógeno de sodio, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentró bajo presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en THF (5.5 l) y se añadió carbonato de potasio (790 g, 5713 mmol) a la misma. La mezcla se calentó hasta 50°C, bromuro de bencilo (240 ml, 2016 mmol) se añadió en gotas a la misma, y la mezcla se agitó a 60°C durante 8.5 horas. A la mezcla se añadió en gotas 2 mol/l de solución acuosa de ácido clorhídrico bajo baño de agua con hielo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con agua y solución acuosa al 8% de carbonato hidrógeno de sodio y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Se añadió un carbono activado (Norit SX-2, 240 g) a la misma, la mezcla se filtró a través de Celite, y el filtrado se concentró bajo presión reducida al residuo obtenido se añadió acetato de etilo y hexano y el sólido precipitado se filtró para obtener el Compuesto 25 (1019 g, 1776 mmol, 53%).

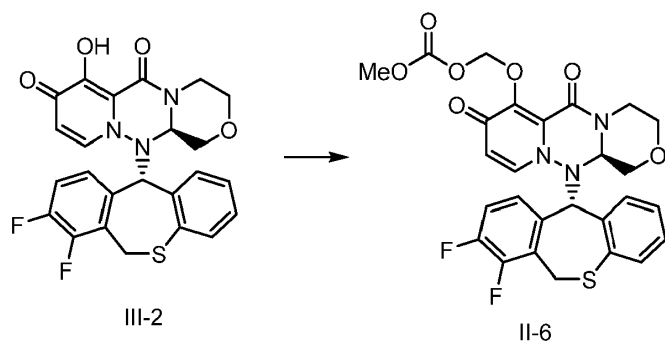
RMN-¹H (CDCl₃) δ: 2.88 (1H, t, J = 11.2 Hz), 3.28-3.39 (2H, m), 3.72 (1H, d, J = 12.6 Hz), 3.86 (1H, d, J = 9.6 Hz), 4.03 (1H, d, J = 13.9 Hz), 4.45 (1H, d, J = 8.6 Hz), 4.67 (1H, d, J = 13.1 Hz), 5.19-5.26 (2H, m), 5.45 (1H, d, J = 10.9 Hz), 5.63 (1H, d, J = 10.9 Hz), 5.77 (1H, d, J = 7.6 Hz), 6.40 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.68 (1H, t, J = 6.9 Hz), 6.94-7.01 (2H, m), 7.03-7.12 (3H, m), 7.29-7.38 (3H, m), 7.61 (2H, d, J=7.1 HZ).

5 Segundo paso

A una solución del Compuesto 25 (1200 g, 2092 mmol) en DMA (3.6 L) se añadió cloruro de litio (443g, 10.5 mol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a 80°C durante 3 horas. A la mezcla se añadieron acetona (1.2 L), 0.5 mol/l de solución acuosa de ácido clorhídrico (6.0 l) y agua (2.4 l) bajo baño de agua con hielo, y la mezcla se agitó durante 1 hora. El sólido precipitado se filtró. El sólido obtenido se disolvió en cloroformo, se añadió éter isopropílico a la misma, y el sólido precipitado se filtró para obtener el Compuesto III-2 (950 g, 1965 mmol, 94%).

RMN-¹H (CDCl₃) δ: 2.99 (1H, dt, J = 17.5, 6.8 Hz), 3.47 (1H, td, J = 11.9, 2.5 Hz), 3.60 (1H, t, J = 10.6 Hz), 3.81 (1H, dd, J = 11.9, 3.3 Hz), 3.96 (1H, dd, J = 11.0, 2.9 Hz), 4.07 (1H, d, J = 13.8 Hz), 4.58 (1H, dd, J = 10.0, 2.9 Hz), 4.67 (1H, dd, J = 13.5, 1.9 HZ), 5.26-5.30 (2H, m), 5.75 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.69 (1H, d, J = 7.7 Hz), 6.83-6.87 (1H, m), 6.99-7.04 (2H, m), 7.07-7.15 (3H, m).

15 Ejemplo 2



A una suspensión del compuesto III-2 (1.00 g, 2.07 mmol) en DMA (5 ml) se añadieron clorometil metil carbonato (0.483 g, 3.10 mmol), carbonato de potasio (0.572 g, 4.14 mmol) y yoduro de potasio (0.343 g, 2.07 mmol) y la mezcla se agitó a 50°C durante 6 horas. A la mezcla se añadió DMA (1 ml) y la mezcla se agitó durante 6 horas. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, se añadió DMA (6 ml) a la misma, y la mezcla se agitó a 50°C durante 5 minutos. La mezcla se filtró. Al filtrado obtenido se añadieron 1 mol/l de solución acuosa de ácido clorhídrico (10 ml) y agua (4 ml) y la mezcla se agitó durante 1 hora. El sólido precipitado se filtró y se secó bajo presión reducida a 60°C durante 3 horas para obtener el compuesto II-6 (1.10g, 1.93 mmol, 93%).

RMN-¹H (DMSO-D₆) δ: 2.91-2.98 (1H, m), 3.24-3.31 (1H, m), 3.44 (1H, t, J = 10.4 Hz), 3.69 (1H, dd, J = 11.5, 2.8 Hz), 3.73 (3H, s), 4.00 (1H, dd, J = 10.8, 2.9 Hz), 4.06 (1H, d, J = 14.3 Hz), 4.40 (1H, d, J = 11.8 Hz), 4.45 (1H, dd, J = 9.9, 2.9 Hz), 5.42 (1H, dd, J = 14.4, 1.8 Hz), 5.67 (1H, d, J = 6.5 Hz), 5.72-5.75 (3H, m), 6.83-6.87 (1H, m), 7.01 (1H, d, J = 6.9 Hz), 7.09 (1H, dd, J = 8.0, 1.1 Hz), 7.14-7.18 (1H, m), 7.23 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.37-7.44 (2H, m).

Puesto que el compuesto II-6 de la presente invención es un profármaco y por lo tanto tiene las ventajas de que la capacidad de absorción oral es alta, se exhibe buena biodisponibilidad, se exhibe buena depuración, y la transitividad pulmonar es alta, puede ser un excelente medicamento.

Puesto que el compuesto III-2 original de la presente invención tiene los efectos tal como alta actividad inhibidora sobre la endonucleasa dependiente de la estructura cap, y alta selectividad debido a una enzima específica del virus, puede ser un medicamento que tiene efectos secundarios reducidos.

Además, los compuestos II-6 y III-2 de la presente invención también tienen las ventajas de que la estabilidad de metabolismo es alta, la solubilidad es alta, la capacidad de absorción oral es alta, se exhibe buena biodisponibilidad, se exhibe buena depuración, la transitividad pulmonar es alta, una vida media es larga, una tasa de unión a la no-proteína es alta, la inhibición del canal hERG es baja, la inhibición del CYP es baja, el efecto inhibidor de CPE (efecto citopático) es reconocido, y/o se exhibe negatividad en un ensayo de fototoxicidad, una prueba de Ames y una prueba de toxicidad genética, o toxicidad tal como no se provoca daño hepático, Por lo tanto, los compuestos en conexión con la presente invención pueden ser excelentes medicamentos.

Ejemplo de prueba 1: Medición de la actividad inhibidora de la endonucleasa dependiente de cap (CEN)

1) Preparación del sustrato

Se compró 30merRNA(5'-pp-[m2'-O]GAA UAU(-Cy3) GCA UCA CUA GUA AGC UUU GCU CUA-BHQ2-3': fabricado por Japan Bio Services Co., LTD.) en el que G en un extremo 5' está modificado por difosfato, un grupo hidroxilo en la posición 2' está modificado por metoxilación, U sexto de un extremo 5' está etiquetado con Cy3, y un extremo 3' está etiquetado con BHQ2, y se añadió una estructura cap utilizando el sistema ScriptCap fabricado por EPICENTRE (un producto era m7G[5']-ppp-[5']-[m2'-O]GAA UAU(-Cy3) GCA UCA CUA GUA AGC UUU GCU CUA(-SHQ2)-3'). Este fue separado y purificado por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizada, y se usó como un sustrato.

2) Preparación de la enzima

RNP fue preparada a partir de una partícula de virus utilizando el método estándar (Documento de Referencia: VIROLOGY(1976) 73, p327-338 OLGA M. ROCHOVANSKY). Específicamente, el virus A/WSN/33 (1 x 103 PFU/ml, 200 µl) se inoculó en un huevo de gallina embrionado de 10 días. Después de la incubación a 37°C durante 2 días, se recuperó el líquido alantoideo de los huevos de gallina. Una partícula de virus se purificó por ultracentrifugación usando 20% de sacarosa, se solubilizó utilizando Triton X-100 y lisolecitina, y se recogió una fracción de RNP (50-70% de fracción de glicerol) mediante ultracentrifugación usando un gradiente de densidad de glicerol 30-70%, y se utilizó como una solución enzimática (que contenía aproximadamente 1 nM de complejo PB1-PB2-PA).

3) Reacción enzimática

Una solución de la reacción enzimática (2.5 µl) (composición: 53 mM de hidrocloreto Tris (pH 7.8), 1 mM de MgCl₂, 1.25mM de ditiotreitól, 80 mM de NaCl, 12.5% de glicerol, 0.15 µl de solución enzimática) se dispensó en una placa de 384 pocillos de polipropileno. A continuación, 0.5 µl de una solución del compuesto de prueba que se había diluido en serie con sulfóxido de dimetilo (DMSO) se añadió a la placa. Como control positivo (PC) o un control negativo (NC), se añadió 0.5 µl de DMSO a la placa respectivamente. Cada placa era de pocillo mixto. A continuación, se añadieron 2 µl de una solución de sustrato (1.4 nM de ARN de sustrato, 0.05% de Tween 20) para iniciar una reacción. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos, se recogió 1 µl de la solución de reacción y se añadió a 10 µl de una solución de formamida Hi-Di (que contenía GeneScan 120 Liz Size Standard como marcador de dimensionamiento: fabricado por Applied Biosystems (ABI)) con el fin de detener la reacción. Para NC, la reacción se detuvo con antelación añadiendo EDTA (4.5 mM) antes de la iniciación de la reacción (todas las concentraciones descritas anteriormente son concentraciones finales).

3) Medición de la relación de inhibición (valor IC₅₀)

La solución para la cual se detuvo la reacción se calentó a 85°C durante 5 minutos, se enfrió rápidamente en hielo durante 2 minutos, y se analizó con un analizador genético ABI PRIZM 3730. Un pico del producto de endonucleasa dependiente de cap se cuantificó mediante el software de análisis ABI Genemapper, se obtuvo una relación de inhibición de reacción CEN (%) de un compuesto de prueba mediante el establecimiento de intensidades fluorescentes de PC y NC para que sean 0% de inhibición y 100% de inhibición, respectivamente, se obtuvo un valor de IC₅₀ usando el software de ajuste de curvas (XLfit 2.0: Modelo 205 (fabricado por IDBS) etc.).

Ejemplo de prueba 2: ensayo de confirmación del efecto inhibidor de CPE

<Material>

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

- 0.5% de BSA E-MEM (preparado añadiendo kanamicina y BSA a MEM (medio esencial mínimo) (Invitrogen))

- HBSS (Solución de sal equilibrada de Hanks)

- célula MOBK

Las células se ajustaron al número de células adecuado (3 x 10⁵/ml) con 2% de FCS E-MEM.

- célula MDCK

Después de lavar con HBSS dos veces, las células se ajustaron al número de células apropiado (5 x 10⁵ / ml) con 0.5% de BSA E-MEM.

- Solución de tripsina

La tripsina de páncreas porcino (SIGMA) se disolvió en PBS (-), y se filtró con un filtro de 0.45 µm.

- EnVision (Perkin Elmer)

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

- Solución de SDS al 10%

<Procedimiento de operación>

- Dilución y dispensación de la muestra de prueba

5 Como medio de cultivo, se utilizó FCS E-MEM al 2% en el uso de células MDCK, y se utilizó BSA E-MEM al 0.5% en el uso de células MDCK. En lo sucesivo, para la dilución de virus, las células y una muestra de prueba, se utilizó el mismo medio de cultivo.

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

10 En el uso de células MDCK, se añadió tripsina a las células para ser una concentración final de 3 µg/ml, sólo para medir la actividad anti-Flu

- Dilución y dispensación del virus de la influenza

15 Un virus de la influenza se diluyó con un medio de cultivo a una concentración apropiada de antemano, y cada 50 µl/pocillo se dispensó en una placa de 96 pocillos que contenía una sustancia de prueba. Cada 50 µl/pocillo de un medio de cultivo se dispensaron en una placa que contenía una sustancia de prueba para medir la citotoxicidad.

- Dilución y dispensación de la célula

Cada 100 µl/pocillo de las células que habían sido ajustadas al número de células apropiadas se dispensaron en una placa de 96 pocillos que contenía una muestra de prueba.

20 Esto se mezcló con un mezclador de placas, y se incubó en una incubadora de CO2 durante 3 días para medir la actividad anti-Flu y medir la citotoxicidad.

- Dispensación de WST-8

Las células en la placa de 96 pocillos que habían sido incubadas durante 3 días se observaron visualmente bajo un microscopio, y se comprobaron la apariencia de las células, la presencia o ausencia de un cristal de la sustancia de prueba. El sobrenadante se retiró de forma que las células no fueran absorbidas de la placa.

25 El Kit WST-8 se diluyó 10 veces con un medio de cultivo, y cada 100 µl se dispensaron en cada pocillo. Después de mezclar con un mezclador de placas, las células se incubaron en un incubador de CO2 durante 1 a 3 horas.

Después de la incubación, con respecto a la placa para medir la actividad anti-Flu, cada 10 µl/pocillo de una solución de SDS al 10% se dispensó con el fin de inactivar un virus.

- Medición de absorbancia

30 Después de que la placa de 96 pocillos se mezcló, se midió la absorbancia con EnVision en dos longitudes de onda de 450 nm/620 nm.

< Cálculo de cada valor de punto de medición>

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

35 • Cálculo de la concentración de inhibición efectiva para alcanzar el 50% de muerte de células infectadas con influenza (CE50)

$$EC50 = 10^z$$

$$Z = (50\% - \% \text{ alto}) / (\% \text{ alto} - \% \text{ bajo}) \times \{ \log(\text{concentración alta}) - \log(\text{concentración baja}) \} + \log(\text{concentración alta})$$

40 Compuesto III-2: CEN IC50 = 1.93 nM, CPE EC50 = 1.13 nM

En base a los resultados anteriores, el compuesto III-2 original exhibe alta actividad inhibitoria de la endonucleasa dependiente de cap (CEN) y/o alto efecto inhibitorio de CPE y por lo tanto pueden ser un agente útil para el tratamiento y/o prevención del síntoma y/o enfermedad inducida por la infección con virus de la influenza.

Los ejemplos de prueba biológica para compuestos de la presente invención se describen a continuación.

45 Ejemplo de Prueba 3: Prueba de inhibición de CYP

Utilizando microsoma hepático humano agrupado comercialmente disponible, y empleando, como marcadores, destilación con 7-O-etoxiresorufina (CYP1A2), metil-hidroxilación con tolbutamida (CYP2C9), 4'-hidroxilación con mefenitofna (CYP2C19), O-demetilación con dextrometorfano (CYP206), e hidroxilación con terfenadina (CYP3A4) como reacciones del metabolismo de sustrato típicas de las principales cinco formas enzimáticas de CYP humanas (CYP1A2, 2C9, 2C19, 206, 3A4), se evaluó un grado inhibitor de cada cantidad de producción de metabolitos por un compuesto de la presente invención.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: sustrato, 0.5 $\mu\text{mol/l}$ de etoxiresorufina (CYP1A2), 100 $\mu\text{mol/l}$ de tolbutamida (CYP2C9), 50 $\mu\text{mol/l}$ de S-mefenitoinmefenitoina (CYP2C19), 5 $\mu\text{mol/l}$ de dextrometorfano (CYP206), 1 $\mu\text{mol/l}$ de terfenadina (CYP3A4); tiempo de reacción, 15 minutos; temperatura de reacción, 37°C; enzima, microsoma hepático humano agrupado 0.2 mg de proteína/ml; concentración de un compuesto de la presente invención, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/l}$ (cuatro puntos).

Cada uno de los cinco tipos de sustratos, microsoma hepático humano, o un compuesto de la presente invención en 50 mmol/L de solución amortiguadora Hepes como una solución de reacción se añadió a una placa de 96 pocillos en la composición como se describió anteriormente. Se añadió NADPH, como un cofactor para iniciar las reacciones del metabolismo como marcadores y, después de la incubación a 37°C durante 15 minutos, se añadió una solución de metanol/acetronitrilo = III (v/v) para detener la reacción. Después de la centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos, se cuantificó la resorufina (metabolito CYP1 A2) en el sobrenadante por un contador de múltiple etiqueta fluorescente y se cuantificó el hidróxido de toltributamida (metabolito CYP2C9P), 4'-hidróxido de mefenitoina (metabolito CYP2C19), dextrometorfano (metabolito CYP206), y alcohol de terfenadina (metabolito CYP3A4) mediante LC/MS/MS.

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

25 Resultado

Compuesto III-2: cinco clases >20 $\mu\text{mol/l}$

Ejemplo de prueba 4: prueba BA

Materiales y métodos para experimentos para evaluar la absorción oral

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

30 (2) Condición de crianza: a los ratones o ratas SD se les permitió el libre acceso a alimento sólido y agua de grifo esterilizada.

(3) Ajuste de la dosis y agrupación: la administración intravenosa y la administración oral se realizaron con la dosificación predeterminada. La agrupación se estableció de la siguiente manera. (la dosis se cambió por compuesto)

35 Administración oral 1 a 30 mg/kg (n = 2 a 3) Administración intravenosa 0.5 a 10 mg/kg (n = 2 a 3)

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

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

40 (6) Artículos de evaluación: se recogió sangre en serie y la concentración de un compuesto de la presente invención en el plasma se midió por LC/MS/MS.

(7) Análisis estadístico: Acerca de transición de la concentración de un compuesto de la presente invención en el plasma, el área bajo la concentración de plasma frente a la curva de tiempo (AUC) se calculó por programa de método no lineal de mínimos cuadrados, WinNonlin (una marca registrada), y la biodisponibilidad (SA) de un compuesto de la presente invención se calculó a partir de las AUC del grupo de administración oral y el grupo de administración intravenosa.

Resultado

Compuesto II-6: 14.9%

Compuesto III-2: 4.2%

50 Con base en los resultados anteriores, el profármaco habla mejorado la biodisponibilidad distinta del compuesto

original.

Par lo tanto, el compuesto de la presente invención tiene una excelente capacidad de absorción oral y puede ser un agente útil para el tratamiento y/o prevención del síntoma y/o enfermedad inducida por la infección con virus de la influenza.

5 Ejemplo de prueba 5: Prueba de estabilidad de metabolismo

Usando microsomas hepáticos humanos agrupados disponibles en el mercado, se hizo reaccionar un compuesto de la presente invención durante un tiempo constante, y una velocidad restante se calculó mediante la comparación de una muestra sometida a reacción y una muestra no sometida a reacción, por lo tanto, se evaluó un grado de metabolismo en el hígado.

10 Se realizó una reacción (reacción oxidativa) a 37°C durante o minuto o 30 minutos en presencia de 1 mmol/l de NADPH en 0.2 ml de una solución amortiguadora (50 mmol/l de Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/l de cloruro de potasio, 10 mmol/l de cloruro de magnesio) que contenía 0.5 mg de proteína 1 ml de microsomas de hígado humano. Después de la reacción, 50 µl de la solución de reacción se añadió a 100 µl de una mezcla de metanol 1 acetónitrilo = 1/1 (v/v), se mezcló y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El compuesto de la presente invención en el sobrenadante se cuantificó mediante LC/MS/MS o extracción en fase sólida (SPE)/MS, y se calculó una cantidad restante del compuesto de la presente invención después de la reacción, dejando que la cantidad de un compuesto a 0 minuto del tiempo de reacción sea 100%. La reacción de hidrólisis se realizó en ausencia de NADPH y la reacción glucuronidación fue en presencia de 5 mM de UDP-ácido glucurónico en lugar de NADPH, seguido de operaciones similares.

20 Resultado el % de inhibición se muestra en 2µmol/l del compuesto de ensayo.

Compuesto III-2: 90.1%

Ejemplo de prueba 6: prueba MBI fluorescente CYP3A4

25 La prueba MBI fluorescente CYP3A4 es una prueba de la investigación de la mejora de la inhibición de CYP3A4 de un compuesto de la presente invención por una reacción de metabolismo, y la prueba se llevó a cabo usando, como enzima CYP3A4 expresada en *Escherichia coli* y empleando, como un índice, una reacción en la que 7-benciloxitri fluorometilcumarina(7-BFC) se desbencila por la enzima CYP3A4 para producir un metabolito, 7-hidroxitri fluorometilcumarina (HFC) que emite luz fluorescente.

30 Las condiciones de reacción fueron las siguientes: sustrato, 5.6 µmol/l de 7-BFC; tiempo de pre-reacción, 0 o 30 minutos; tiempo de reacción, 15 minutos; temperatura de reacción, 25°C (temperatura ambiente); contenido de CYP3A4 (expresado en *Escherichia coli*), en pre-reacción 62.5 pmol/ml, en reacción 6.25 pmol/ml (en dilución de 10 veces); concentración del fármaco de prueba de un compuesto de la presente invención, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 µmol/l (seis puntos).

35 Una enzima en una solución amortiguadora de K-Pi (pH 7.4) y una solución de un compuesto de la presente invención como una solución de pre-reacción se añadieron a una placa de 96 pocillos en la composición anterior de pre-reacción, una parte de la misma se transfirió a otra placa de 96 pocillos de modo que estuviera diluida 1/10 con un sustrato y una solución amortiguadora de K-Pi, se añadió NADPH como co-factor para iniciar una reacción como un índice (sin preincubación) y, después de un tiempo predeterminado de una reacción, se añadió acetónitrilo/0.5 mol/l de Tris (aminometano trishidroxi) = 4/1 (V/V) para detener la reacción. Además, NADPH se añadió a una solución de preincubación restante para iniciar una preincubación (con preincubación) y, después de un tiempo predeterminado de una preincubación, una parte se transfirió a otra placa de modo que estuviera diluida 1/10 con un sustrato y una solución amortiguadora de K-Pi para iniciar una reacción como un índice. Después de un tiempo predeterminado de una reacción, se añadió acetónitrilo/0.5 mol/l de Tris (aminometano trishidroxi) = 4/1 (V/V) para detener la reacción. Para la placa sobre la que se había realizado cada reacción de índice, se midió un valor fluorescente de 7-HFC que es un metabolito con un lector de placas fluorescente. (Ex = 420 nm, Em = 535 nm).

45 La adición de solamente DMSO que es un disolvente que disuelve un compuesto de la presente invención a un sistema de reacción se adoptó como control (100%), se calculó la actividad remanente (%) en cada concentración de un compuesto de la presente invención añadido como solución, y se calculó IC₅₀ por presunción inversa mediante un modelo logístico usando una concentración y una tasa de inhibición. Cuando una diferencia entre los valores de IC₅₀ es 5 mol/L o más, esto se define como (+) y, cuando la diferencia es 3 mol/l o menos, esto se define como (-).

50 Resultado

Compuesto III-2: (-)

Ejemplo de prueba 7: Prueba de Ames por fluctuación

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

20 µl bacilo de tifoidea de rata almacenado por congelación (cepa Salmonella typhimurium TA98, cepa TA100) se inoculó en 10 ml de un medio nutritivo líquido (caldo nutriente Oxoid NO.2 al 2.5%), y esto se cultivó antes de agitar a 37°C durante 10 horas. 9 ml de una solución bacteriana de la cepa TA98 se centrifugó (2000 xg, 10 minutos) para eliminar una solución de cultivo. La bacteria se suspendió en 9 ml de una solución amortiguadora Micro F (K₂HPO₄: 3.5 g/L, KH₂PO₄: 1 g/L, (NH₄)₂SO₄: 1 g/L, citrato trisódico dihidratado: 0.25 g/L, MgSO₄ • 7H₂O: 0.1 g/L), la suspensión se añadió a 110 ml de un medio de exposición (solución amortiguadora Micro F que contenía Biotina: 8 mg/ml, histidina: 0.2 g/ml, glucosa: 8 mg/ml). La cepa TA 100 se añadió a 120 ml de medio de exposición respecto de 3.16 ml de la solución bacteriana para preparar una solución bacteriana de prueba. Cada 12 µl de solución de DMSO de un compuesto de presente invención (dilución de varias etapas a partir de la dosis máxima de 50 mg / ml en relación de 2 a 3 veces), se mezclaron DMSO como control negativo, y 50 µg/ml de solución de 4-nitroquinolina-1-óxido DMSO para la cepa TA98, 0.25 µg/ml de solución de 2-(2-furil)-3-(5-nitro-2-furil)acrilamida DMSO para la cepa TA 100 bajo la condición de no activación de metabolismo, 40 mg / ml de solución de DMSO 2-aminoantraceno para la cepa TA98, 20 mg/ml de solución de DMSO 2-aminoantraceno para la cepa TA 100 bajo la condición de activación de metabolismo como control positivo, y 588 µl de la solución bacteriana de prueba (una solución mixta de 498µl de la solución bacteriana de prueba y 90 µl de mezcla 89 bajo la condición de activación de metabolismo), y este fue cultivado con agitación a 37°C durante 90 minutos. 460 µl de la solución bacteriana expuesta a un compuesto de la presente invención se mezcló con 2300 µl de un medio indicador (solución amortiguadora Micro F que contenía biotina: 8 µg/ml, histidina: 0.2 µg/ml, glucosa: 8 mg/ml, Bromo Cresol Purple: 37.5 µg/ml), cada 50 µl se distribuyó en microplacas de 48 pocillos/dosis, y esto se sometió a cultivo estacionario a 37°C durante 3 días. Puesto que un pocillo que contenía una bacteria que ha obtenido la capacidad de proliferación por mutación de un aminoácido (histidina) por sintetización del gen enzimático se convierte de purpura a amarillo debido a un cambio de pH, se cuenta el pocillo de proliferación de bacterias que se había convertido en amarillo en 48 pocillos por dosis, y se evaluó mediante la comparación con un grupo control negativo. (-) significa que la mutagenicidad es negativa y (+) es positiva.

25 Resultado

Compuesto III-2: (-)

Ejemplo de prueba 8: prueba de hERG

Con el propósito de evaluar el riesgo de una prolongación del intervalo QT de electrocardiograma del compuesto de presente invención, se estudiaron los efectos del compuesto de la presente invención sobre la corriente K⁺ de rectificador retardada (I_{Kr}), que desempeña un papel importante en el proceso de repolarización ventricular usando células HEK293 que expresan el canal de gen relacionado éter-a-go-go humano (hERG).

Después de que se retuvo una célula en un potencial de membrana de -80 mV por el método de sujeción de parche de células totales utilizando un sistema de sujeción de parche automatizado (PatchXpress 7000A, Axon Instruments Inc.), se registró I_{Kr} inducido por la estimulación de impulsos de despolarización a +40 mV durante 2 segundos y, además, la estimulación de impulso de repolarización a -50 mV durante 2 segundos. Después de que se estabilizó la corriente generada, la solución extracelular (NaCl 135 mmol/l, KCl: 5.4 mmol/l, NaH₂PO₄: 0.3 mmol/l, CaCl₂•2H₂O: 1.8 mmol/l, MgCl₂ • 6H₂O: 1 mmol/l, glucosa: 10 mmol/l, HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico): 10 mmol/l, pH = 7.4), en la que el compuesto de la presente invención había sido disuelta a una concentración objetivo, se aplicó a la célula a temperatura ambiente, durante 10 minutos. A partir del registro de I_{Kr} se midió un valor absoluto de la corriente pico de cola sobre la base del valor de la corriente en el potencial de membrana restante utilizando software de análisis (DataXpress ver, 1, Molecular Devices Corporation). Además, se calculó el % de inhibición en relación con la corriente pico de cola antes de la aplicación del compuesto de la presente invención, y se comparó con el grupo de vehículo aplicado (0.1% de solución de sulfóxido de dimetilo) para evaluar la influencia del compuesto de la presente invención en I_{Kr}.

45 Resultado el % de inhibición se mostró en 0.3 a 10 µM del compuesto de prueba. Compuesto III-2: 7.9%

Ejemplo de prueba 9: ensayo de solubilidad

La solubilidad del compuesto de la presente invención se determinó en condiciones de adición de DMSO al 1 %. Una solución de 10 mmol/l del compuesto se preparó con DMSO, y se añadió 2 µl de la solución del compuesto de la presente invención, respectivamente, a 198 µl de solución JP-1 (se añadió agua a 2.0 g de cloruro de sodio y 7.0 ml de ácido clorhídrico para llegar a 1000ml) y solución JP-2 (se añadió 1 volumen de agua a 1 volumen de la solución que 3.40 g de fosfato dihidrógeno de potasio y 3.55 g de fosfato hidrógeno de disodio anhidro para llegar a 1000 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora en temperatura ambiente, y la mezcla se filtró. El filtrado se diluyó diez veces con metanol 1 agua = 1/1 (v / v), y la concentración del compuesto en el filtrado se midió con LC / MS o SPE / MS por el método de calibración absoluta.

55 Resultado

Compuesto III-2: 42.2 µmol/l

Ejemplo de prueba 10: prueba de solubilidad de polvo

Cantidades apropiadas del compuesto de la presente invención se colocaron en viales y se añadió 200µl de fluido JP-1st (se añadió agua a 2.0 g de cloruro de sodio en 7.0 ml de ácido clorhídrico para alcanzar 1000 ml), Fluido JP-2nd (se añadió agua a 500 ml de solución amortiguadora de fosfato con un pH de 6.8) y 20 mmol/l de taurocolato de sodio (TCA) / Fluido JP-2nd (se añadió Fluido JP-2nd a 1.08g de TCA en Fluido JP-2nd para alcanzar 100ml) a cada vial. Cuando el compuesto estaba completamente disuelto, se añadió cantidad apropiada del compuesto. Después de agitar durante 1 hora a 37°C, la mezcla se filtró y se añadió 100 µl de etanol a 100 µl de cada Filtrado (doble dilución). La ampliación de dilución era cambiada si era necesario. Después de que se confirmó si habrá burbujas de aire y se precipita en los viales, los viales se agitaron con un tapón hermético. La concentración de compuesto se determinó con HPLC por el método de calibración absoluta.

10 Resultado

Compuesto III-2: solución JP-1; 7.1 µg/ml, solución JP-2; 4.4 µg/ml, 20 mmol/L solución TCA/JP-2; 16.1 µg/ml

Ejemplo de prueba 11: prueba de Ames

La prueba de Ames se condujo utilizando Salmonellas (*Salmonella typhimurium*) TA 98, TA 100, TA 1535 y TA 1537 y *Escherichia coli* WP2uvrA como cepas de prueba con o sin activación metabólica en el método de pre-incubación para controlar la presencia o ausencia de la mutagenicidad génica de los compuestos de la presente invención.

15

Resultado

Compuesto III-2: (-)

Ejemplo de prueba 12: prueba de hemólisis liviana

El compuesto de la presente invención se disolvió a concentraciones diana y se mezcló con una suspensión 2.5 % en v / v de glóbulos rojos sanguíneos preparada a partir de una muestra de sangre desfibrinada de oveja en una microplaca a concentraciones de 0.0008 a 0.1 % en p/v. Las mezclas se expusieron a 10 J/cm² de irradiación UV dentro de un intervalo de longitud de onda de 290 a 400 nm, UVA y UVB utilizando lámparas fluorescentes ultravioleta, lámparas GL20SE y FL20S-BLB fabricadas por Sankyo Denki Co., Ltd. y Panasonic Corporation, respectivamente. Después de la finalización de la irradiación, las mezclas se centrifugaron, y se recogió un sobrenadante de la mezcla y se colocó en una microplaca. La fototoxicidad se evaluó midiendo la absorbancia en longitud de onda de 540 nm y 630 nm en el sobrenadante. Los datos de absorbancia en longitud de onda de 540 nm y 630 nm se utilizaron como indicadores de daño de biomembrana (% de fotohemólisis) e hiperoxidación de la membrana de lípidos (formación de metahemoglobina), respectivamente. Los criterios de fototoxicidad fueron los siguientes; se juzgó que era no fototóxica (-) cuando se observó que el % de fotohemólisis <10 y el cambio máximo en la absorbancia en 630 nm (ΔOD) <0.05. Se juzgó que era no fototóxica (+) cuando la fotohemólisis era de más de 10% y el cambio máximo en la absorbancia a 630 nm (ΔOD) era de más de 0.05.

20

25

30

Resultado

Compuesto III-2: (-)

Las Figuras 1 y 2 muestran un resultado de la medición de la concentración plasmática del Compuesto III-2 y Compuesto II-6 después de la administración oral del compuesto profármaco II-6, cuyo compuesto original es el Compuesto III-2, a la rata en condiciones de no ayuno.

35

Además, la concentración del Compuesto II-6 en todas las muestras plasmáticas fue un límite de determinación o menos. Por ello, se descubrió que el compuesto profármaco II-6, cuyo compuesto original es el Compuesto III-2 ha cambiado rápidamente al Compuesto III-2 *in vivo* después de la administración (ver la Figura 2).

40

En base a los resultados de prueba anteriores, se reveló que el compuesto convertido en un profármaco fue absorbido en el cuerpo después de la administración oral, y se convirtió rápidamente en un compuesto original en la sangre. Por ello, el compuesto de la presente invención puede ser un agente útil para el tratamiento y/o prevención del síntoma y/o enfermedad inducida por la infección con virus de la influenza.

Ejemplo de Prueba 13: Prueba de administración intravenosa

45

Materiales experimentales examinados y método de prueba de administración intravenosa

(1) animales utilizados: se usaron ratas SD

(2) condiciones de cría: a las ratas SD se les permitió tomar libremente alimento sólido y agua del grifo esterilizada.

(3) Dosificación y agrupación: una dosis predeterminada fue administra por vía intravenosa. Los grupos fueron establecidos de la siguiente manera. (La dosificación varió para cada compuesto)

50

Administración intravenosa 0.5 - 1 mg/kg (n = 2-3)

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

5 (5) Método de administración: la administración intravenosa se realizó a través de la vena de la cola mediante una jeringa con una aguja.

(6) Punto final: la sangre se recolectó a medida que pasa el tiempo, y la concentración de plasma del compuesto de la presente invención se midió usando LC/MS/MS.

10 (7) Análisis estadístico: para la transición de la concentración de plasma del compuesto de la presente invención, la eliminación total del cuerpo (CL_{tot}) y la vida media de eliminación (t_{1/2}, z) se calcularon usando el programa de mínimos cuadrados no lineales WinNonlin ®

Resultados

Compuesto No. III-2:

CL_{tot}: 16.4 ml/min/kg

t_{1/2}, z: 3.4 horas

15 De los resultados anteriores, se encontró que el compuesto III-2 es un compuesto que tiene una eliminación total del cuerpo baja y una vida media larga.

Por lo tanto, el compuesto de la presente invención tiene una excelente durabilidad, puede ser un agente útil para el tratamiento y/o prevención de síntomas y/o enfermedad inducida por infección con virus de la influenza.

Ejemplo de Formulación

20 Los siguientes Ejemplos de Formulación solamente se ejemplifican y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo de Formulación 1: Tabletas

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

25 Ejemplo de Formulación 2: Cápsulas

Los compuestos de la presente invención, lactosa y estearato de calcio se mezclan en forma uniforme para obtener medicamentos en polvo en la forma de polvos o finos gránulos. Los medicamentos en polvo se vierten en recipientes de cápsula para dar cápsulas.

Ejemplo de Formulación 3: Gránulos

30 Los compuestos de la presente invención, lactosa y estearato de calcio se mezclan en forma uniforme y la mezcla se comprime y se moldea. Después, la misma se tritura, se granula y se tamiza para dar tamaños apropiados de gránulos.

Ejemplo de Formulación 4: Tabletas de desintegración por vía oral

35 Los compuestos de la presente invención y celulosa cristalina se mezclan, se granulan y se fabrican las tabletas para dar tabletas de desintegración por vía oral.

Ejemplo de Formulación 5: Jarabes secos

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

Ejemplo de Formulación 6: Inyecciones

40 Los compuestos de la presente invención y tampón de fosfato se mezclan para dar la inyección.

Ejemplo de Formulación 7: Infusiones

Los compuestos de la presente invención y solución amortiguadora de fosfato se mezclan para dar la inyección.

Ejemplo de Formulación 8: Inhalaciones

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

Ejemplo de Formulación 9: Ungüentos

Los compuestos de la presente invención y petrolato se mezclan para dar ungüentos.

Ejemplo de Formulación 10: Parches

- 5 Los compuestos de la presente invención y base tal como apósito adhesivo o similar se mezclan para dar parches.

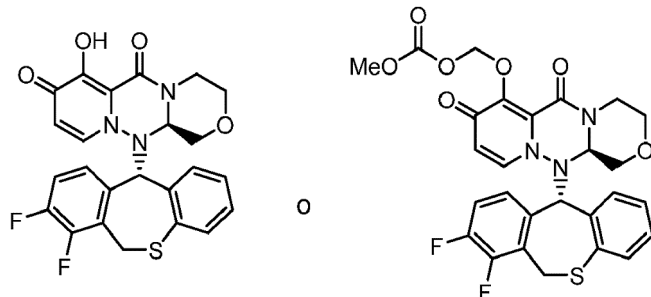
Aplicabilidad Industrial

El compuesto de la presente invención tiene actividad inhibidora de endonucleasa dependiente de cap (CEN) después de la absorción en el cuerpo. El compuesto de la presente invención puede ser un agente útil para el tratamiento y/o prevención del síntoma y/o enfermedad inducida por la infección con el virus de la influenza.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto presentado por la siguiente fórmula:



o su sal farmacéuticamente aceptable.

5 2. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la Reivindicación 1 o su sal farmacéuticamente aceptable.

3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la Reivindicación 2, para uso en el tratamiento o prevención de una infección por el virus de la influenza.

10 4. Un compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1 o su sal farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad provocada por un virus que tiene una endonucleasa dependiente de cap.

Figura 1

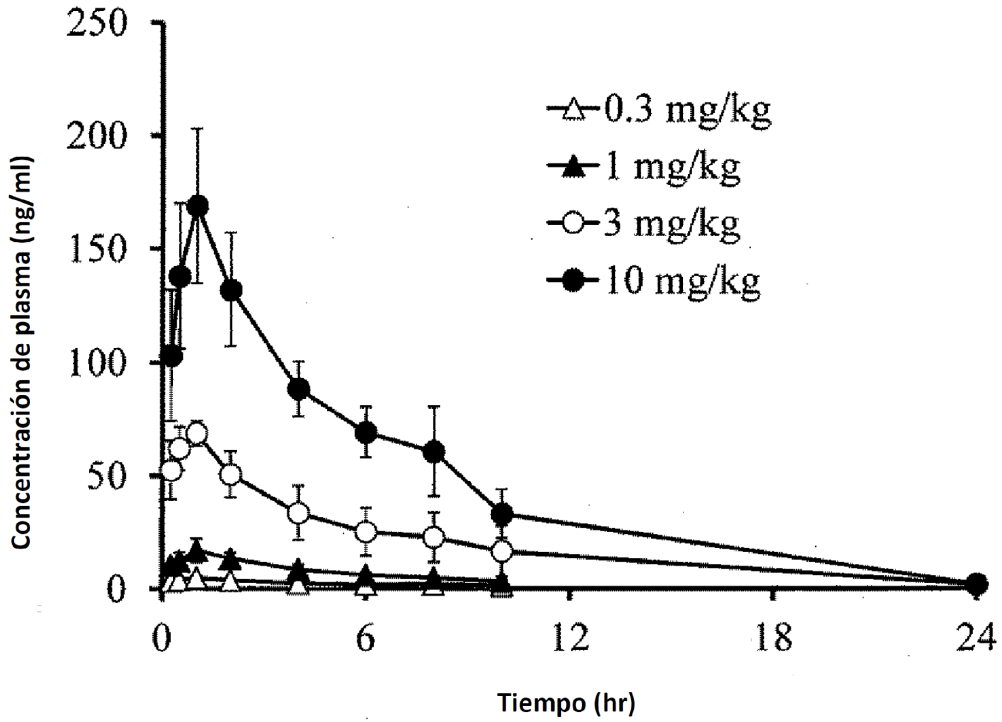


Figura 2

Tiempo (hr)	Concentración de plasma (ng/ml)			
	0.3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg
0.25	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
0.5	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
4	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
6	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
10	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
24	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ: Debajo del límite inferior de cuantificación (<0.500 ng/ml)