

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 410**

51 Int. Cl.:
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08767561 .7**
96 Fecha de presentación: **05.05.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2142215**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.01.2010**

54 Título: **Terapia de combinación paa el tratamiento de infecciones por VHC**

30 Prioridad:
04.05.2007 US 927581 P
23.05.2007 US 931425 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.05.2012

73 Titular/es:
VERTEX PHARMCEUTICALS INCORPORATED
130 WAVERLY STREET
CAMBRIDGE, MA 02139-4242, US

72 Inventor/es:
KWONG, Ann;
MANI, Nagraj;
ZHOU, Yi y
LIN, Chao

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 381 410 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

Terapia de combinación para el tratamiento de infecciones por VHC.

Antecedentes de la invención

Las infecciones por el virus de la hepatitis C ("VHC") son un problema médico humano apremiante. El VHC está reconocido como el agente causante para la mayoría de los casos de hepatitis no A, no B, con una seroprevalencia humana estimada del 3% globalmente [A. Alberti y col., "Natural History of Hepatitis C," J. Hepatology, 31., (Supl. 1), pág. 17-24 (1999)]. Casi cuatro millones de individuos pueden estar infectados solamente en los Estados Unidos [M.J. Alter y col., "The Epidemiology of Viral Hepatitis in the United States, Gastroenterol. Clin. North Am., 23, pág. 437-455 (1994); M. J. Alter "Hepatitis C Virus Infection in the United States," J. Hepatology, 31, (Supl. 1), pág. 88-91 (1999)].

Tras la primera exposición al VHC sólo aproximadamente el 20% de los individuos infectados desarrolla hepatitis clínica aguda mientras que parece que otros resuelven la infección espontáneamente. En casi el 70% de los casos, sin embargo, el virus establece una infección crónica que persiste durante décadas [S. Iwarson, "The Natural Course of Chronic Hepatitis," FEMS Microbiology Reviews, 14, pág. 201-204 (1994); D. Lavanchy, "Global Surveillance and Control of Hepatitis C," J. Viral Hepatitis, 6, pág. 35-47 (1999)]. Esto habitualmente provoca una inflamación hepática recurrente y que empeora progresivamente, que a menudo conduce patologías más graves tales como cirrosis y carcinoma hepatocelular [M.C. Kew, "Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma", FEMS Microbiology Reviews, 14, pág. 211-220 (1994); I. Saito y col., "Hepatitis C Virus Infection is Associated with the Development of Hepatocellular Carcinoma," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, pág. 6547-6549 (1990)]. Desafortunadamente, no existen tratamientos ampliamente eficaces para el progreso debilitante de infección crónica por VHC.

El genoma de VHC codifica una poliproteína de 3010-3033 aminoácidos [Q.L. Choo, y col., "Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis C Virus," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, pág. 2451-2455 (1991); N. Kato y col., "Molecular Cloning of the Human Hepatitis C Virus Genome From Japanese Patients with Non-A, Non-B Hepatitis," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, pág. 9524-9528 (1990); A. Takamizawa y col., "Structure and Organization of the Hepatitis C Virus Genome Isolated From Human Carriers," J. Virol., 65, pág. 1105-1113 (1991)]. Se asume que las proteínas no estructurales (NS) de VHC proporcionan la maquinaria catalítica esencial para la replicación viral. Las proteínas NS se obtienen por escisión proteolítica de la poliproteína [R. Bartenschlager y col., "Nonstructural Protein 3 of the Hepatitis C Virus Encodes a Serine-Type Proteinase Required for Cleavage at the NS3/4 y NS4/5 Junctions," J. Virol., 67, pág. 3835-3844 (1993); A. Grakoui y col., "Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine Proteinase: Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites," J. Virol., 67, pág. 2832-2843 (1993); A. Grakoui y col., "Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products," J. Virol., 67, pág. 1385-1395 (1993); L. Tomei y col., "NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein", J. Virol., 67, pág. 4017-4026 (1993)].

La proteína NS 3 (NS3) de VHC contiene una actividad serín proteasa que ayuda a procesar la mayoría de las enzimas virales, y por tanto se considera esencial para la replicación e infectividad del virus. Se sabe que mutaciones en la proteasa NS3 del virus de la fiebre amarilla disminuye la infectividad del virus [Chambers, T.J. y col., "Evidence that the N-terminal Domain of Nonstructural Protein NS3 From Yellow Fever Virus is a Serine Protease Responsible for Site-Specific Cleavages in the Viral Polyprotein," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, pág. 8898-8902 (1990)]. Se ha demostrado que los primeros 181 aminoácidos de NS3 (restos 1027-1207 de la poliproteína viral) contienen el dominio serín proteasa de NS3 que procesa los cuatro sitios cadena debajo de la poliproteína de VHC [C. Lin y col., "Hepatitis C Virus NS3 Serine Proteinase: Trans-Cleavage Requirements and Processing Kinetics", J. Virol., 68, pág. 8147-8157 (1994)].

La serín proteasa NS3 de VHC y su cofactor asociado, NS4A, ayudan a procesar todas las enzimas virales, y por tanto se consideran esenciales para la replicación viral. Parece que este procesamiento es análogo al realizado por la aspartil proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana, que también está implicada en el procesamiento de enzimas virales. Los inhibidores de la proteasa de VIH, que inhiben el procesamiento de las proteínas virales, son potentes agentes antivirales en el ser humano, lo que indica que la interrupción en esta fase del ciclo vital del virus produce agentes terapéuticamente activos. Por consiguiente, la serín proteasa NS3 de VHC también es una diana atractiva para el descubrimiento de fármacos.

Hasta recientemente, la única terapia establecida para la enfermedad por VHC era el tratamiento con interferón. Sin embargo, los interferones tienen efectos secundarios significativos [M. A. Wlaker y col., "Hepatitis C Virus: An Overview of Current Approaches and Progress," DDT, 4, pág. 518-29 (1999); D. Moradpour y col., "Current and Evolving Therapies for Hepatitis C," Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 11, pág. 1199-1202 (1999); H. L. A. Janssen y col. "Suicide Associated with Alfa-Interferon Therapy for Chronic Viral Hepatitis," J. Hepatol., 21, pág. 241-243 (1994); P.F. Renault y col., "Side Effects of Alpha Interferon," Seminars in Liver Disease, 9, pág. 273-277 (1989)] e inducen remisión a largo plazo solamente en una fracción (~ 25%) de los casos [O. Weiland, "Interferon Therapy in Chronic Hepatitis C Virus Infection", FEMS Microbiol. Rev., 14, pág. 279-288 (1994)]. Recientes introducciones de las formas pegiladas de interferón (PEG-INTRON® y PEGASYS®) y la terapia de combinación de ribavirina e interferón pegilado (REBETROL®) han provocado mejoras solamente moderadas en las tasas de remisión y una

reducción solamente parcial de los efectos secundarios. Además, las perspectivas de vacunas anti-VHC eficaces siguen siendo inciertas.

- 5 Por tanto, existe la necesidad de terapias anti-VHC más eficaces. Dichos inhibidores tendrían potencial terapéutico como inhibidores de proteasa, particularmente como inhibidores de serín proteasa, y más particularmente como inhibidores de la proteasa NS3 de VHC. Específicamente, dichos compuestos pueden ser útiles como agentes antivirales, particularmente como agentes anti-VHC.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a combinaciones terapéuticas que comprenden VX-950 y el inhibidor de polimerasa, de fórmula (I) como se expone a continuación.

- 10 La invención también se refiere usos médicos para tratar la infección por VHC o aliviar uno o más síntomas de la misma en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una combinación terapéutica de la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un régimen farmacéutico para tratar la infección por VHC en un paciente.

15 Descripción detallada de la invención

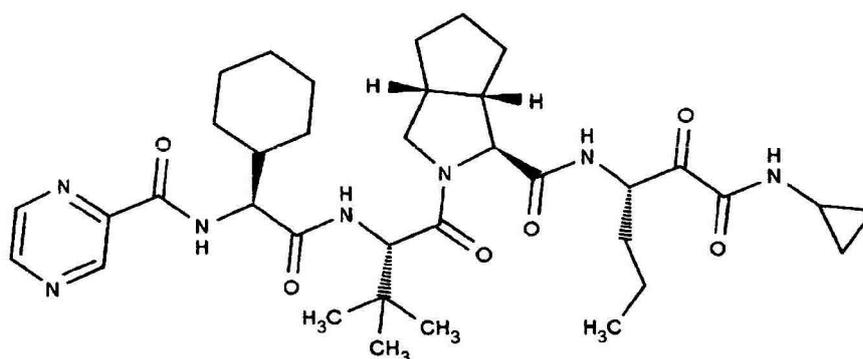
Definiciones

- Para los propósitos de la presente invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª Ed. Además, los principios generales de la química orgánica se describen en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y "March's Advanced Organic Chemistry", 5ª Ed., Ed.: Smith, M.B. y March, J., John Wiley & Sons, Nueva York: 2001. Como se usa en este documento, "paciente" se refiere a un mamífero, incluyendo un ser humano.

- 20 La expresión "inhibidor de polimerasa", como se usa en este documento, se refiere a compuestos que inhiben la actividad de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de VHC. El inhibidor de polimerasa de la siguiente invención es los compuestos de fórmula I.

La expresión "inhibidor de proteasa", como se usa en este documento se refiere a un agente (compuesto o agente biológico) que es eficaz para inhibir la función de la proteasa NS3 de VHC en un mamífero. Los inhibidores de proteasa de la siguiente invención son VX-950.

- 30 Como se usa en el presente documento, "VX-950" se refiere a un inhibidor de VHC mostrado a continuación y descrito en la publicación PCT número WO 02/18369.



- 35 La expresión "combinación terapéutica" como se usa en este documento significa una combinación de una o más sustancias de fármaco activo, es decir, compuestos que tienen una utilidad terapéutica. Típicamente, cada uno de dichos compuestos en las combinaciones terapéuticas de la presente invención estará presente en una composición farmacéutica que comprende ese compuesto y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos en una combinación terapéutica de la presente invención pueden administrarse de forma simultánea o por separado, como parte de un régimen.

- 40 Salvo que se indique otra cosa, se entiende que las estructuras representadas en este documento incluyen todas las formas isoméricas (por ejemplo, enantioméricas, diastereoméricas, y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, los isómeros de doble enlace (Z) y (E), y los isómeros conformacionales (Z) y (E). Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales así como las

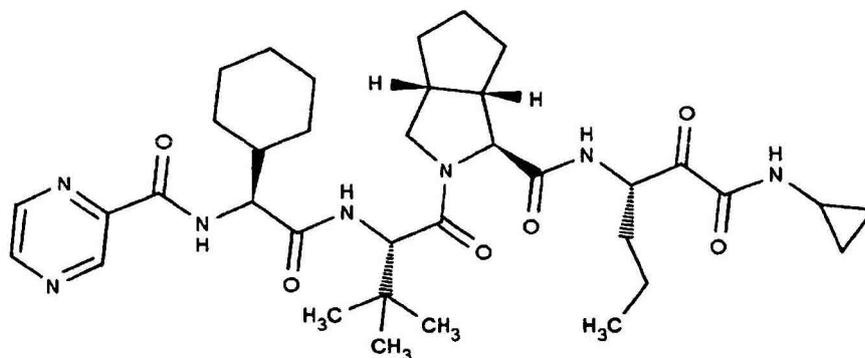
mezclas enantioméricas, diastereoméricas, y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos están dentro del alcance de la invención. Salvo que se indique otra cosa, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la invención están dentro del alcance de la invención. Además, salvo que se indique otra cosa, también se entiende que las estructuras representadas en este documento incluyen compuestos que difieren solamente en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras, excepto por el remplazo de hidrógeno por deuterio o tritio, o el remplazo de un carbono por un carbono ^{13}C - o ^{14}C -enriquecido, están dentro del alcance de esta invención. Dichos compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas analíticas o sondas en ensayos biológicos.

Combinaciones terapéuticas

La presente invención se refiere a combinaciones terapéuticas que comprenden un inhibidor de proteasa y un inhibidor de polimerasa para el tratamiento de VHC, como se expone en la reivindicación 1.

Inhibidores de proteasa

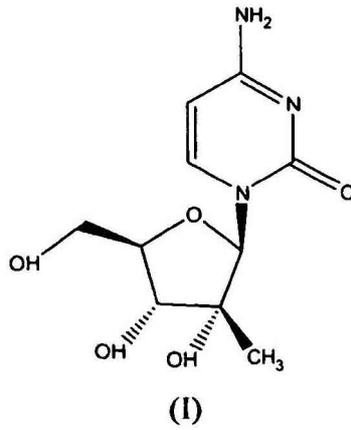
VX-950, un inhibidor de VHC con su estructura mostrada a continuación es el compuesto que se necesita. VX-950 se describe en la publicación PCT número WO 02/18369.



VX-950, un inhibidor de la proteasa NS3-4A potente y específico mostró actividad antiviral sustancial en un ensayo en fase 1b de sujetos infectados con VHC genotipo 1 (Estudio VX04-950-101). El grado al que un sujeto responde al tratamiento y la tasa a la que se observa rebote viral podría deberse en parte a diferencias genotípicas en la sensibilidad al inhibidor de proteasa. La rápida velocidad de replicación de VHC, junto con la poca fidelidad de su polimerasa, da lugar a una acumulación de mutaciones en todo su genotipo [P. Simmonds, "Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus -15 years on," J. Gen. Virol., 85, pág. 3173-88 (2004)]. No se conoce el grado al que la variabilidad de secuencia en la región de proteasa afecta a la eficacia catalítica de la enzima o la unión de un inhibidor. Además, la generación de numerosos genomas virales con una remarcable variación de secuencia presenta problemas potenciales de aparición de virus resistente a los fármacos en sujetos tratados con terapia antiviral. De hecho, la resistencia a fármacos contra fármacos antiviral, tales como inhibidores de proteasa de VIH, está bien documentada [Johnson y col., Top. HIV Med., 12, pág. 119-24 (2004)]. Las mutaciones resistentes a fármacos ya han demostrado desarrollarse in vitro en presencia de inhibidores de proteasa de VHC [Lin y col., "In vitro studies of cross-resistance mutations against two hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061," J. Biol. Chem., 280, pág. 36784-36791 (2005); Lin y col., "In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: Structural analysis indicates different resistance mechanisms," J. Biol. Chem., 279, pág. 17508-17514 (2004); Lu y col., Antimicrob. Agents Chemother., 48, pág. 2260-6 (2004); Trozzi y col., "In vitro selection and characterization of hepatitis C virus serine protease variants resistant to an active-site peptide inhibitor," J. Virol. 77, pág. 3669-79 (2003)]. Se han descubierto mutaciones resistentes al inhibidor de proteasa BILN 2061 en las posiciones R155Q, A156T, y D168V/A/Y en el gen NS3, pero aún no se han observado mutaciones en la región NS4 o en los sitios de escisión de proteasa. También se ha descubierto una mutación de resistencia a VX-950 in vitro en la posición A156S. También se ha demostrado que se desarrollan mutaciones de resistencia cruzada contra VX-950 y BILN 2061 in vitro en la posición 156 (A156V/T) (Lin y col., 2005, supra).

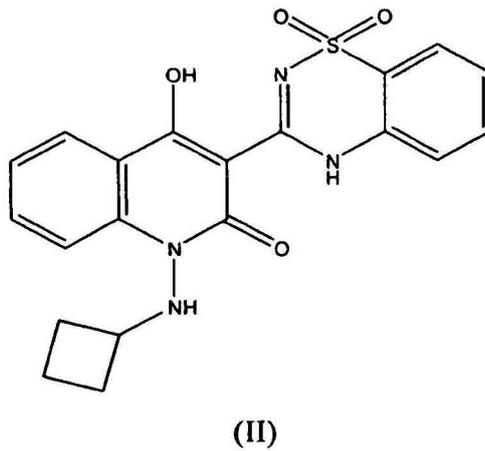
Inhibidores de polimerasa

El inhibidor de polimerasa es el compuesto de fórmula (I)

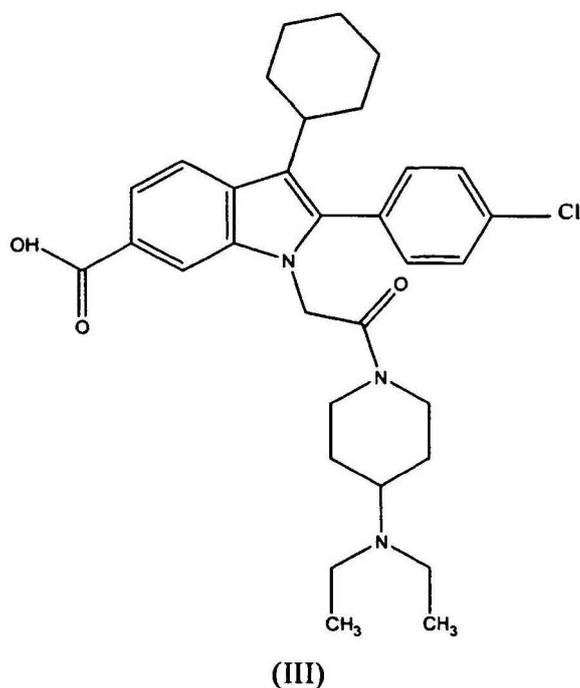


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

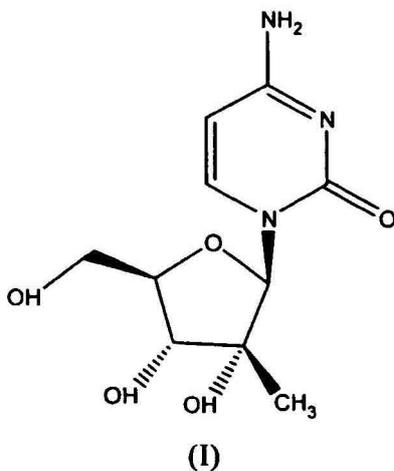
Los inhibidores de polimerasa de Fórmula (II) y (III) no son parte de la combinación reivindicada pero se citan en los ejemplos:



Fórmula (III):



La invención proporciona una combinación terapéutica de VX-950 y el inhibidor de polimerasa de compuesto (I)



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona kits para su uso en el tratamiento de una infección por VHC en un paciente. Los kits de la presente invención comprenden la combinación terapéutica de la presente invención. Los kits comprenden adicionalmente instrucciones para utilizar las combinaciones terapéuticas. Los kits pueden adaptarse a las necesidades de las clases o tipos de pacientes u otros factores clínicamente pertinentes tales como la edad, el peso corporal, enfermedades/afecciones concomitantes, la gravedad y la fase de la infección por VHC, la sensibilidad o no sensibilidad a tratamientos previos, la propensión a los efectos secundarios, etc. Por ejemplo, la combinación terapéutica en un kit puede adaptarse para dosificaciones adecuadas para pacientes que tienen un peso corporal de, por ejemplo, 75 kg. O, la combinación terapéutica en un kit puede adaptarse para dosificaciones adecuadas para pacientes que tienen un peso corporal de, por ejemplo, menos de o igual a 75 kg. O, la combinación terapéutica en un kit puede adaptarse para uso pediátrico, donde la dosificación para niños se varía dependiendo de factores tales como la edad, peso corporal, gravedad de la enfermedad, etc.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para usar las combinaciones terapéuticas de la presente invención para tratar una infección por VHC o aliviar uno o más síntomas de la misma en un paciente.

En una realización, la infección por VHC es genotípica.

En otra realización, el paciente es un paciente virgen al tratamiento.

En otra realización, el paciente es no sensible a monoterapia con interferón.

En otra realización, el paciente es no sensible a terapia de combinación usando ribavirina y un interferón.

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona un uso médico para reducir los niveles de ARN de VHC en un paciente que lo necesite, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una combinación terapéutica de la presente invención.

En una realización de la invención, los niveles de ARN de VHC en el paciente se reducen a un nivel menor del detectable.

- 10 En otro aspecto, la invención proporciona un régimen farmacéutico que comprende administrar a un paciente que lo necesite una combinación terapéutica de la presente invención hasta que el nivel de ARN de VHC en el paciente esté por debajo de un nivel detectable.

Formulaciones, administraciones, y usos

- 15 Si se utilizan sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención en las combinaciones terapéuticas, esas sales se obtienen preferiblemente de ácidos y bases inorgánicos u orgánicos. Entre dichas sales de ácidos se incluyen las siguientes: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canfor sulfonato, ciclopentano-propionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2 hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2 naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, 20 pectinato, persulfato, 3 fenil propionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales de bases incluyen sales de amonio, sales metales alcalinos, tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalino-térreos, tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas, tales como sales de dicitohexilamina, N metil D glucamina, y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, etc.

- 25 Además, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruro, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo, y butilo; dialquilsulfatos, tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo, tales como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. De este modo se obtienen productos solubles o dispersables en agua o aceite.

- 30 Los compuestos utilizados en las composiciones y procedimientos de esta invención también pueden modificarse añadiendo funcionalidades apropiadas para potenciar propiedades biológicas selectivas. Dichas modificaciones son conocidas en la técnica e incluyen aquellas que aumentan la penetración biológica en un sistema biológico dado (por ejemplo, sangre, sistema linfático, sistema nervioso central), aumentan la disponibilidad oral, aumentan la solubilidad para permitir la administración por inyección, alteran el metabolismo y alteran la tasa de excreción.

- 35 Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en estas composiciones incluyen, aunque sin limitación, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias tamponantes tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa 40 sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

Las combinaciones terapéuticas de esta invención están formuladas para administración farmacéutica a un mamífero. En una realización dicho mamífero es un ser humano.

- 45 Dichas composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, por inhalación de una pulverización, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El término "parenteral" como se usa en este documento incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intra-hepática, intralesional e intracraneal. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía oral o intravenosa.

- 50 Las formas inyectables estériles de las composiciones de esta invención pueden ser una suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito,

puede emplearse cualquier aceite fijo suave incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, ya que son aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan habitualmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables incluyendo emulsiones y suspensiones. También pueden usarse otros tensioactivos habitualmente usados, tales como Tween, Span y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan habitualmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras, farmacéuticamente aceptables para los propósitos de formulación.

En una realización, son útiles niveles de dosificación entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día de VX-950 en una terapia de combinación para la prevención y tratamiento de una enfermedad mediada por antiviral, particularmente anti-VHC. En otra realización, son útiles niveles de dosificación entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal por día de VX-950 en una terapia de combinación para la prevención y tratamiento de una enfermedad mediada por antiviral, particularmente anti-VHC. Típicamente, las composiciones farmacéuticas de esta invención se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces al día o como alternativa, en forma de una infusión continua. Dicha administración puede usarse como terapia crónica o aguda. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y el modo particular de administración. Una preparación típica contendrá de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 95% de compuesto activo (p/p). En una realización, dichas preparaciones contienen de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 80% de compuesto activo.

En una realización, son útiles niveles de dosificación entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día de los compuestos inhibidores de polimerasa descritos en este documento en una combinación para la prevención y tratamiento de una enfermedad mediada por antiviral, particularmente anti-VHC. En otra realización, son útiles niveles de dosificación entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal por día de los compuestos inhibidores de polimerasa descritos en este documento en una terapia de combinación para la prevención y tratamiento para la prevención y tratamiento de una enfermedad mediada por antiviral, particularmente anti-VHC. Típicamente, las composiciones farmacéuticas de esta invención se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces al día o como alternativa, en forma de una infusión continua. Dicha administración puede usarse como terapia crónica o aguda. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y el modo particular de administración. Una preparación típica contendrá de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 95% de compuesto activo (p/p). En una realización, dichas preparaciones contienen de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 80% de compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo, aunque sin limitación, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz en polvo. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse en forma de supositorios para administración rectal. Éstas pueden prepararse mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

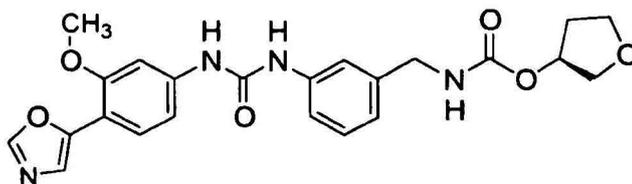
Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden administrarse de forma tópica, especialmente cuando la diana del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, la piel, o el tracto intestinal inferior. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos.

La aplicación tópica en el tracto intestinal inferior puede realizarse en una formulación de supositorio rectal (véase anteriormente) o en una formulación de enema adecuada. También pueden usarse parches transdérmicos tópicos.

Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una pomada adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos. Los vehículos para administración tópica de los compuestos de esta invención incluyen, aunque sin limitación, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxiethyleno, compuesto de polioxiopropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una loción o crema adecuada que contiene los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen, aunque sin limitación, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, ceras de cetil ésteres, alcohol cetearílico, 2 octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Para uso oftálmico, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica, de pH ajustado o, preferiblemente, en forma de soluciones en solución salina estéril isotónica, de pH ajustado, con o sin un conservante tal como cloruro de bencilalconio. Como alternativa, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una pomada tal como vaselina.

- 5 Las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden administrarse por aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica y pueden prepararse en forma de soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.
- 10 La combinación terapéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente otro agente anti-viral, preferiblemente un agente anti-VHC. Dichos agentes anti-virales incluyen, aunque sin limitación, agentes inmunomoduladores, tales como alfa, beta, y gamma-interferones, compuestos de interferón-alfa derivatizados pegilados, y timosina; otros agentes anti-virales, tales como ribavirina, amantadina, y telbivudina; otros inhibidores de proteasas de hepatitis C (inhibidores de NS2-NS3 e inhibidores de NS3-NS4A); inhibidores de otras dianas en el ciclo de vida del VHC, incluyendo inhibidores de helicasa y otros inhibidores de polimerasa; inhibidores de la entrada interna al ribosoma; inhibidores virales de amplio espectro, tales como inhibidores de IMPDH (por ejemplo, compuestos de las patentes de Estados Unidos 5.807.876, 6.498.178, 6.344.465, 6.054.472, WO 97/40028, WO 98/40381, WO 00/56331, y ácido micofenólico y derivados del mismo, e incluyendo, aunque sin limitación, VX-497, VX-148, y/o VX-944); o combinaciones de cualquiera de los anteriores. Véase también W. Markland y col.,
- 15 Antimicrobial & Antiviral Chemotherapy, 44, pág. 859 (2000) y la patente de Estados Unidos N° 6.541.496.
- 20



- De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un uso médico para tratar una infección por VHC o aliviar uno o más síntomas de la misma, en un paciente, que comprende administrar una composición que comprende un inhibidor de polimerasa de Fórmula I y VX-950. En una realización, el paciente está infectado por una variante de VHC.
- 25

Se usan las siguientes definiciones en este documento (refiriéndose las marcas comerciales a productos disponibles en la fecha de presentación de esta solicitud):

- "Peg-Intron" significa PEG-INTRON®, peginterferón alfa-2b, disponible en Schering Corporation, Kenilworth, NJ;
- "Intron" significa INTRON-A®, interferón alfa-2b disponible en Schering Corporation, Kenilworth, NJ;
- 30 "ribavirina" significa 1-beta-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida de ribavirina, disponible en ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA; descrito en The Merck Index, entrada 8365, Vigésima Edición; también disponible como REBETROL® de Schering Corporation, Kenilworth, NJ, o como COPEGASUS® de Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ;
- "Pegasys" significa PEGASYS®, peginterferón alfa-2a disponible en Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ;
- 35 "Roferon" significa ROFERON®, interferón alfa-2a recombinante disponible en Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ;
- "Berefor" significa BEREFOR®, interferón alfa 2 disponible en Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, CT;
- SUMIFERON®, una mezcla purificada de interferones alfa naturales tal como Sumiferon disponible en Sumitomo, Japón;
- 40 WELLFERON®, interferón alfa n1 disponible en Glaxo Wellcome LTd., Gran Bretaña; y
- ALFERON®, una mezcla de interferones alfa naturales fabricada por Interferon Sciences, y disponible en Purdue Frederick Co., CT.
- El término "interferón", como se usa en este documento, significa un miembro de una familia de proteínas específicas de especie altamente homólogas que inhiben la replicación viral y la proliferación celular, y modulan la respuesta inmune, tales como el interferón alfa, interferón beta, o interferón gamma. The Merck Index, entrada 5015, Vigésima Edición.
- 45

La combinación terapéutica de la presente invención puede utilizar interferón alfa 2a natural. O, la combinación terapéutica de la presente invención puede utilizar interferón alfa 2b natural. La combinación terapéutica de la presente invención puede utilizar interferón alfa 2a o 2b recombinante. Además, la invención puede utilizar interferón 2a o 2b pegilado. Los Interferones adecuados para la presente invención incluyen:

- 5 (a) INTRON-A® (interferón-alfa 2B, Schering Plough),
- (b) PEG-INTRON®,
- (c) PEGASYS®,
- (d) ROFERON®,
- (e) BEREFOR®,
- 10 (f) SUMIFERON®,
- (g) WELLFERON®,
- (h) interferón alfa consenso disponible en Amgen, Inc., Newbury Park, CA,
- (i) ALFERON®;
- (j) VIRAFERON®;
- 15 (k) INFERGEN®; y
- (l) ALBUFERON™.

Como reconocen los facultativos especializados, los inhibidores de proteasa y polimerasa se administrarían preferiblemente por vía oral. El interferón no se administra típicamente por vía oral. No obstante, nada en este documento limita los procedimientos o combinaciones de esta invención a ninguna forma o régimen de dosificación específico. Por tanto, cada componente de una combinación de acuerdo con esta invención puede administrarse por separado, conjuntamente, o en cualquier combinación de los mismos.

En una realización, el inhibidor de proteasa y el inhibidor de polimerasa se administran en formas de dosificación diferentes. En una realización, cualquier agente adicional se administra como parte de una forma de dosificación única con el inhibidor de proteasa o como una forma de dosificación diferente. Como esta invención implica una combinación de compuestos, las cantidades específicas de cada compuesto pueden depender de las cantidades específicas de cada uno de los otros componentes en la combinación. Como reconocen los facultativos especializados, las dosificaciones de interferón se miden típicamente en UI (por ejemplo, aproximadamente 4 millones de UI a aproximadamente 12 millones de UI).

Por consiguiente, los agentes (actúen como agente inmunomodulador o de otro modo) que pueden usarse en combinación con un compuesto de esta invención incluyen, aunque sin limitación, Albuferon™ (albúmina-interferón alfa) disponible en Human Genome Sciences; PEG-INTRON® (peginterferón alfa-2b, disponible en Schering Corporation, Kenilworth, NJ); INTRON-A®, (interferón alfa-2b disponible en Schering Corporation, Kenilworth, NJ); 1-beta-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida de ribavirina, disponible en ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA; descrito en The Merck Index, entrada 8365, Vigésima Edición); REBETROL® (Schering Corporation, Kenilworth, NJ), COPEGUS® (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ); PEGASYS® (peginterferón alfa-2a disponible en Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ); ROFERON® (interferón alfa-2a recombinante disponible en Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ); BEREFOR® (interferón alfa 2 disponible en Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, CT); SUMIFERON® (una mezcla purificada de interferones alfa naturales tal como Sumiferon disponible en Sumitomo, Japón); WELLFERON® (interferón alfa n1 disponible en Glaxo Wellcome Ltd., Gran Bretaña); ALFERON® (una mezcla de interferones alfa naturales fabricada por Interferon Sciences, y disponible en Purdue Frederick Co., CT); interferón alfa; interferón alfa 2a natural; interferón alfa 2b natural; interferón alfa 2a o 2b pegilado; interferón alfa consenso (Amgen, Inc., Newbury Park, CA); VIRAFERON®; INFERGEN®; REBETRON® (Schering Plough, Interferón-alfa 2B + Ribavirina); interferón alfa pegilado (Reddy, K.R. y col. "Efficacy and Safety of Pegylated (40-kd) Interferon alpha-2a Compared with Interferon alpha-2a in Noncirrhotic Patients with Chronic Hepatitis C (Hepatology, 33, pág. 433-438 (2001); interferón consenso (Kao J.H., y col., "Efficacy of Consensus Interferon in the Treatment of Chronic Hepatitis," J. Gastroenterol. Hepatol., 15, pág. 1418-1423 (2000); interferón linfoblastoide o "natural"; interferón tau (Clayette, P. y col., "IFN-tau, A New Interferon Type I with Antiretroviral activity," Pathol. Biol., (Paris) 47, pág. 553-559 (1999); interleuquina-2 (Davis, G.L. y col., "Future Options for the Management of Hepatitis C," Seminars in Liver Disease, 19, pág. 103-112 (1999); interleuquina-6 (Davis y col. "Future Options for the Management of Hepatitis C," Seminars in Liver Disease, 19, pág. 103-112 (1999); interleuquina-12 (Davis, G.L. y col., "Future Options for the Management of Hepatitis C," Seminars in Liver Disease, 19, pág. 103-112 (1999); y compuestos que potencian el desarrollo de la respuesta de células T auxiliares tipo 1 (Davis y col., "Future Options for the Management of Hepatitis C," Seminars in Liver Disease, 19, pág. 103-112 (1999)). También se incluyen compuestos que estimulan la síntesis de interferón en las células (Tazulakhova, E.B. y col., "Russian Experience in

Screening, analysis, and Clinical Application of Novel Interferon Inducers," J. Interferon Cytokine Res., 21 pág. 65-73) incluyendo, aunque sin limitación, ARN bicatenario, solo o en combinación con tobramicina, e Imiquimod (3M Pharmaceuticals; Sauder, D.N. "Immunomodulatory and Pharmacologic Properties of Imiquimod," J. Am. Acad. Dermatol., 43 pág. S6-11 (2000)).

5 Los compuestos que estimulan la síntesis de interferón en las células (Tazulakhova, E.B. y col., "Russian Experience in Screening, analysis, and Clinical Application of Novel Interferon Inducers," J. Interferon Cytokine Res., 21, pág. 65-73) incluyen, aunque sin limitación, ARN bicatenario, solo o en combinación con tobramicina, e Imiquimod (3M Pharmaceuticals; Sauder, D.N. "Immunomodulatory and Pharmacologic Properties of Imiquimod," J. Am. Acad. Dermatol., 43 pág. S6-11 (2000)).

10 Otros compuestos no inmunomoduladores o inmunomoduladores pueden usarse en combinación con un compuesto de esta invención incluyendo, aunque sin limitación, los especificados en el documento WO 02/18369, que se incorpora en este documento como referencia (véase, por ejemplo, la página 273, líneas 9-22 y página 274, línea 4 a página 276, línea 11).

15 Esta invención también implica administrar un inhibidor de la citocromo P450 monooxigenasa. Los inhibidores de CYP pueden ser útiles para aumentar las concentraciones hepáticas y/o aumentar los niveles sanguíneos de compuestos que se inhiben por CYP.

20 Si una realización de esta invención implica un inhibidor de CYP, puede usarse cualquier inhibidor de CYP que mejore la farmacocinética de la proteasa NS3/4A pertinente en un procedimiento de esta invención. Estos inhibidores de CYP incluyen, aunque sin limitación, ritonavir (documento WO 94/14436), ketoconazol, troleandomicina, 4-metil pirazol, ciclosporina, clometiazol, cimetidina, itraconazol, fluconazol, miconazol, fluvoxamina, fluoxetina, nefazodona, sertralina, indinavir, nelfinavir, amprenavir, fosamprenavir, saquinavir, lopinavir, delavirdina, eritromicina, VX-944, y VX-497. Los inhibidores de CYP preferidos incluyen ritonavir, ketoconazol, troleandomicina, 4-metil pirazol, ciclosporina, y clometiazol. Para formas de dosificación preferidas de ritonavir, véase la patente de Estados Unidos N° 6.037.157, y los documentos citados en la misma: patente de Estados Unidos N° 5.484.801, solicitud de patente de Estados Unidos 08/402.690, y solicitudes internacionales WO 95/07696 y WO 95/09614).

Los procedimientos para medir la capacidad de un compuesto de inhibir la actividad citocromo P450 monooxigenasa son conocidos (véase la patente de Estados Unidos N° 6.037.157, y Yun y col., Drug Metabolism & Disposition, 21, pág. 403-407 (1993)).

30 Tras la mejora del estado de un paciente, puede administrarse una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de esta invención, si es necesario. Posteriormente, puede reducirse la dosificación o frecuencia de la administración, o ambas, en función de los síntomas, hasta un nivel en que se retenga el estado mejorado cuando los síntomas se han aliviado al nivel deseado, si cesa el tratamiento. Los pacientes pueden, sin embargo, requerir un tratamiento intermitente en una base a largo plazo tras cualquier recaída de los síntomas de la enfermedad.

35 También debe entenderse que una dosificación y régimen de tratamiento específicos para cualquier paciente particular dependerán de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, y el criterio del médico que esté tratando y la gravedad de la enfermedad particular que se esté tratando. La cantidad de ingredientes activos también dependerá del compuesto descrito particular y la presencia o ausencia y la naturaleza del agente anti-viral adicional en la composición.

40 La invención hace posible un procedimiento para tratar a un paciente infectado con un virus caracterizado por una serín proteasa codificada por el virus que es necesaria para el ciclo de vida del virus, mediante la administración a dicho paciente de una composición farmacéuticamente aceptable de esta invención. En una realización, el paciente padece una infección por VHC. Dicho tratamiento puede erradicar completamente la infección vírica o reducir la gravedad de la misma. En otra realización, el paciente es un ser humano.

45 El uso de esta invención puede comprender adicionalmente la administración a dicho paciente de un agente anti-viral, preferiblemente un agente anti-VHC. Dichos agentes anti-virales incluyen, aunque sin limitación, agentes inmunomoduladores, tales como alfa-, beta-, y gamma-interferones, compuestos de interferón-a derivatizados pegilados, y timosina; otros agentes anti-virales, tales como ribavirina, amantadina, y telbivudina; otros inhibidores de proteasas de hepatitis C (inhibidores de NS2-NS3 e inhibidores de NS3-NS4A); inhibidores de otras dianas en el ciclo de vida de VHC, incluyendo, aunque sin limitación, inhibidores de helicasa y otros inhibidores de polimerasa; inhibidores de la entrada interna al ribosoma; inhibidores virales de amplio espectro, tales como inhibidores de IMPDH (por ejemplo, VX-497 y otros inhibidores de IMPDH descritos en las patentes de Estados Unidos 5.807.876 y 6.498.178, ácido micofenólico y derivados del mismo); inhibidores de citocromo P-450, tales como ritonavir, o combinaciones de cualquiera de los anteriores.

55 Dicho agente adicional puede administrarse a dicho paciente como parte de una forma de dosificación única que comprende tanto un compuesto de esta invención como un agente anti-viral adicional. Como alternativa, el agente

adicional puede administrarse por separado del compuesto de esta invención, como parte de una forma de dosificación múltiple, en la que dicho agente adicional se administra antes de, junto con o después de una composición que comprende un compuesto de esta invención.

5 La presente invención también puede utilizarse como un procedimiento para pre-tratar una sustancia biológica pretendida para su administración a un paciente, que comprende la etapa de poner en contacto dicha sustancia biológica con una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un compuesto de esta invención. Dichas sustancias biológicas incluyen, aunque sin limitación, sangres y componentes de la misma tales como plasma, plaquetas, subpoblaciones de células sanguíneas y similares; órganos tales como los riñones, el hígado, el corazón, los pulmones, etc.; el esperma y los óvulos; médula ósea y componentes de la misma, y otros fluidos a
10 infundir en un paciente, tal como solución salina, dextrosa, etc.

La invención también puede utilizarse como procedimiento para tratar materiales que pueden entrar potencialmente en contacto con un virus caracterizado por una serín proteasa codificada por el virus necesaria para su ciclo de vida. Este procedimiento comprende la etapa de poner en contacto dicho material con un compuesto de acuerdo con la invención. Dichos materiales incluyen, aunque sin limitación, instrumentos y prendas quirúrgicos (por ejemplo, ropas, guantes, delantales, túnicas, máscaras, lentes oculares, calzado, etc.); instrumentos y prendas de laboratorio (por ejemplo, ropas, guantes, delantales, túnicas, máscaras, lentes oculares, calzado, etc.); aparatos y materiales para la recogida de sangre; y dispositivos invasivos tales como, por ejemplo, derivaciones y endoprótesis.

IV. Preparaciones y ejemplos

20 Para que la invención descrita en este documento pueda entenderse más completamente, se exponen los siguientes ejemplos.

VI. ENSAYOS PARA DETECTAR Y MEDIR LAS PROPIEDADES DE INHIBICIÓN DE LOS COMPUESTOS

A. Células de replicón VHC

Se propagaron células Huh-7 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, JRH Biosciences, Lenexa, Kansas) suplementado con FBS (suero bovino fetal) inactivado por calor al 10%, L-glutamina 2 mM, y aminoácidos no esenciales (JRH). Las células se transfectaron con un ARN del replicón VHC transcrito in vitro idéntico al replicón I377neo/NS3-3'/wt como se describe por Lohmann y col. (1999). Los clones celulares estables se seleccionaron y mantuvieron en presencia de 250 µg/ml de G418 (Invitrogen, Carlsbad, California). Uno de los clones, el 24-2, se usó como tipo silvestre en los posteriores ensayos de replicón VHC para estudios de combinación. Los replicones variantes de la proteasa NS3 de VHC se construyeron en el entorno del replicón de tipo silvestre mADE como se ha descrito previamente [Chao Lin y col., "In Vitro Resistance Studies of Hepatitis C Virus Serine Protease Inhibitors, VX-950 and BILN 2061: Structural Analysis Indicates Different Resistance Mechanisms," Journal of Biological Chemistry, 279(17); pág. 17508-17514 (2004)]. Las células de replicón se propagaron en DMEM suplementado con FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales, y 250 µg/ml de G418. Las células se dividieron dos veces por semana en medio fresco después de alcanzar la confluencia. Hay aproximadamente 200-300 copias de ARN de VHC por célula de replicón 24-2.

El ARN del replicón VHC de las células se midió usando el kit Quantigene Discover XL (Panomics Inc., Fremont California) según las instrucciones del fabricante. En resumen, las células de replicón tratadas con compuesto se lisaron e inmovilizaron en placas de captura usando oligonucleótidos específicos de VHC (diseñados en base a la región 5' UTR de la secuencia genómica 1b de VHC AJ238799 en la base de datos GenBank) durante una noche y las cantidades relativas de ARN capturado se midieron usando conjuntos de sondas oligonucleotídicas según las instrucciones del fabricante.

B. Ensayo CI_{50} de 2 días del replicón VHC

En el día previo al ensayo, se sembraron 10.000 células de replicón por pocillo de una placa de 96 pocillos y se dejó que se adhirieran y crecieran durante una noche en DMEM (Invitrogen, Carlsbad, California) suplementado con FBS inactivado por calor al 10% (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), L-glutamina 2 mM (Invitrogen), aminoácidos no esenciales (Invitrogen) y 250 µg/ml de G418 (Invitrogen). El siguiente día, se retiró el medio y se añadieron los agentes antivirales que se diluyeron en serie en DMEM que contenía FBS al 2% y DMSO al 0,5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) sin G418. Las células de replicón se incubaron con los agentes antivirales durante 48 h. El ARN del replicón VHC de las células se midió usando el kit Quantigene Discover XL (Panomics Inc., Fremont California) según las instrucciones del fabricante. En resumen, las células de replicón tratadas con compuesto se lisaron e inmovilizaron en placas de captura usando oligonucleótidos específicos de VHC durante una noche y las cantidades relativas de ARN capturado se midieron usando conjuntos de sondas oligonucleotídicas según las instrucciones del fabricante. Salvo que se indique otra cosa, cada dato puntual representa el promedio de tres réplicas. La CI_{50} es la concentración del compuesto a la que el nivel de ARN del replicón VHC en las células se reduce en un 50% en comparación con los controles de células de replicón no tratadas. Para controlar el efecto de los compuestos sobre la proliferación celular o la viabilidad celular, las células de replicón se trataron con compuestos diluidos en serie durante 48 h, después de lo cual se determinó la viabilidad celular usando un ensayo CellTiter Glo (Promega,

Madison, Wisconsin). Cada CC_{50} se obtiene de al menos dos réplicas y es la concentración del compuesto a la que la cantidad de células viables se reduce en un 50% en comparación con controles de células no tratadas. La CI_{50} y la CC_{50} se determinaron usando un ajuste de curva de 4 parámetros en el programa SoftMax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, California).

5 C. Análisis de sinergia y antagonismo

Los efectos de combinaciones fármaco-fármaco se evaluaron usando el modelo de independencia Bliss [W. R. Greco y col., "The search for synergy: a critical review from a response surface perspective," *Pharmacol. Rev.*, 47, pág. 331-385 (1995)]. Los datos experimentales se analizaron usando MacSynergy, un procedimiento analítico tridimensional desarrollado por Prichard y Shipman [M. N. Prichard y C. Shipman, Jr., "A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions," *Antivir. Res.*, 14, pág. 181-205 (1990)]. En este modelo, el efecto aditivo teórico se calcula a partir de las curvas de respuesta a dosis de compuestos individuales por la ecuación $Z = X + Y(1 - X)$, donde X e Y representan la inhibición producida por el fármaco 1 solo y el fármaco 2 solo, respectivamente, y Z representa el efecto producido por la combinación de fármaco 1 y fármaco 2. La superficie aditiva teórica se sustrae de la superficie experimental real, produciendo una superficie que aparecería como un plano horizontal al 0% de inhibición si la combinación fuera simplemente aditiva. Cualquier pico por encima de este plano indicaría sinergia, mientras que cualquier depresión por debajo indicaría antagonismo. Se usan intervalos de confianza del 95% para la superficie experimental de respuesta a dosis para evaluar los datos estadísticamente. El volumen del pico o la depresión se calcula para cuantificar la sinergia o antagonismo global producido.

Usando los ensayos anteriores, se determina que las combinaciones terapéuticas de la presente invención son inhibidores útiles de la replicación del VHC.

Ejemplo 1: Se ensayaron combinaciones de VX-950 e inhibidores de polimerasa en un formato de tablero de damas en un ensayo de replicación de 2 días con cuantificación de ADNb. Los resultados se muestran en la Tabla 6. La combinación de VX-950 y el inhibidor de polimerasa de fórmula I produjo un efecto de aditivo a moderadamente sinérgico. La combinación de VX-950 y el inhibidor de polimerasa de fórmula II produjo un efecto de aditivo a moderadamente sinérgico. La combinación de VX-950 y el inhibidor de polimerasa de fórmula III produjo un efecto aditivo.

Tabla 6: Ensayo de replicación de 2 días con cuantificación de ADNb

Inhibidor de Proteasa	Inhibidor de Polimerasa	Resultado Combo Damero	CI_{50} de VX-950	CI_{50} del Inhibidor de Polimerasa	Sinergia	Log Volumen
VX-950	Fórmula I	Aditivo/Sinergia moderada	0,42 μ M	7,21 μ M	21,95	3,15
VX-950	Fórmula II	Aditivo/Sinergia moderada	0,34 μ M	1,04 μ M	45,13	6,48
VX-950	Fórmula III	Aditivo	0,31 μ M	0,70 μ M	0,37	0,05

Ejemplo 2: La sensibilidad de las variantes de la proteasa NS3 a ribavirina e interferón se evaluó en un ensayo de CI_{50} de replicación de VHC de 2 días. Las variantes son las siguientes: en la posición 36, la valina de tipo silvestre se mutó en una alanina (V36A) o una metionina (V36M), la treonina de tipo silvestre en la posición 54 se mutó en una alanina (T54A), la arginina de tipo silvestre en la posición 155 se mutó en lisina (R155K), la arginina de tipo silvestre en la posición 155 se mutó en treonina (R155T) y la arginina de tipo silvestre en la posición 155 se mutó en metionina (R155M). Como se muestra en la Tabla 7, los resultados indican la sensibilidad de las variantes a ribavirina e interferón. El factor de cambio es la proporción de la CI_{50} del mutante de proteasa NS3 a la CI_{50} de tipo silvestre para el mismo inhibidor. La sensibilidad de los replicones con la alanina de tipo silvestre en la posición 156 mutada en treonina (A156T) y la alanina de tipo silvestre en la posición 156 mutada en valina (A156V) se comparable al tipo silvestre (Lin, y col., 2005, *supra*).

40

Tabla 7: Ensayo de CI_{50} de replicación VHC de 2 días de variantes NS3 y ribavirina o interferón

Replicones		Otros Inhibidores			
Dominio proteasa		IFN- α (unidades/ml)		Ribavirina (μ M)	
Con1 Sec.	Cambios	CI_{50} prom. (μ M)	Factor de cambio	CI_{50} prom. (μ M)	Factor de cambio
Tipo silvestre (mADE)	-	$11,6 \pm 1,1$	1,0	$57,8 \pm 17,6$	1,0
Val 36	V36M	$11,3 \pm 5,9$	1,0	$32,9 \pm 17,8$	0,6
	V36A	$10,3 \pm 6,0$	0,9	$43,1 \pm 21,3$	0,7
Arg 155	R155K	$15,2 \pm 12,3$	1,3	$37,2 \pm 17$	0,6
	R155T	$4,8 \pm 3,3$	0,4	$32,4 \pm 17,7$	0,6
	R155M	$4,9 \pm 1,0$	0,4	$38,9 \pm 4,7$	0,7
Val 36/Arg 155	V36M-R155K	$10,1 \pm 5,9$	0,9	$40,6 \pm 6,1$	0,7
	V36M-R155T	$3,1 \pm 0,2$	0,3	$36,4 \pm 1,3$	0,6
	V36A-R155K	$6,8 \pm 0,5$	0,6	$35,8 \pm 2,2$	0,6
	V36A-R155T	$3,9 \pm 2,1$	0,3	$41,7 \pm 21,6$	0,7
Thr 54	T54A	$3,9 \pm 0,5$	0,3	$21,7 \pm 11,1$	0,4

5 Ejemplo 3: La sensibilidad de variantes de la proteasa NS3 a VX-950 [Sarrazin, y col., "Dynamic Hepatitis C Virus Genotypic and Phenotypic Changes in Patients Treated With the Protease Inhibitor Telaprevir," Gastroenterology 132, pág. 1767-1777 (2007), que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad] y los inhibidores de polimerasa de Fórmula I, II y III se evaluó en un ensayo de CI_{50} de replicación VHC de 2 días. Las variantes son las siguientes: en la posición 36, la valina de tipo silvestre se mutó en una alanina (V36A) o una metionina (V36M), la treonina de tipo silvestre en la posición 54 se mutó en una alanina (T54A), la arginina de tipo silvestre en la posición 155 se mutó en lisina (R155K), la alanina de tipo silvestre en la posición 156 se mutó en treonina (A156T) y la alanina de tipo silvestre en la posición 156 se mutó en valina (A156V). También se ensayó la variante V36M + R155K, que tiene dos mutaciones. Como se muestra en la Tabla 8, los resultados indican la sensibilidad de las variantes a VX-950 y a la Fórmula I, II y III. El factor de cambio es la proporción de la CI_{50} del mutante de proteasa NS3 a la CI_{50} del tipo silvestre para el mismo inhibidor.

10

Tabla 8: Ensayo de Cl₅₀ de replicón VHC de 2 días de variantes NS3 y VX-950, Fórmula I, II y III

Replicón	Inhibidores de Polimerasa de VHC							
	Inhibidor de Proteasa de VHC		Formula I		Formula II		Formula III	
	VX-950		Cl ₅₀ prom. ± DESVEST	Factor de cambio	Cl ₅₀ prom. ± DESVEST	Factor de cambio	Cl ₅₀ prom. ± DESVEST	Factor de cambio
Tipo silvestre	0,46 ± 0,101	1 ± 0,2	1,343 ± 0,473	1,0	0,347 ± 0,108	1,0	0,313 ± 0,032	1,0
V36M	3,38 ± 0,775	7,3 ± 1,7	1,589 ± 0,361	1,2	0,36 ± 0,164	1,0	0,227 ± 0,064	0,7
V36A	3,567 ± 1,05	7,7 ± 2,3	2,148 ± 0,874	1,6	0,571 ± 0,093	1,6	0,369 ± 0,066	1,2
R155K	3,587 ± 0,283	7,8 ± 0,6	2,371 ± 0,678	1,8	0,45 ± 0,023	1,3	0,39 ± 0,065	1,2
V36M+R155K	30,61 ± 0,637	>65,2	2,716 ± 1,384	2,0	0,578 ± 0,331	1,7	0,419 ± 0,197	1,3
T54A	3,043 ± 0,819	6,6 ± 1,8	1,976 ± 0,388	1,5	0,564 ± 0,111	1,6	0,337 ± 0,045	1,1
A156T	>30*	>65,2	1,27 ± 0,185	0,9	0,326 ± 0,003	0,9	0,306 ± 0,01	1,0
A156V	>30*	>65,2	1,313 ± 0,216	1,0	0,264 ± 0,045	0,8	0,297 ± 0,066	0,9

OTRAS REALIZACIONES

Debe apreciarse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, se pretende que la anterior descripción ilustre y no limite el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Vertex Pharmaceuticals Incorporated

<120> TERAPIA DE COMBINACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES POR VHC

<130> VPI/07-115; 125805/00481

10

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 695

<212> PRT

15

<213> Virus de la hepatitis C

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> Marca de histidina

ES 2 381 410 T3

<400> 1

Met Ser His His His His His His Ala Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr
 1 5 10 15

Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr
 20 25 30

Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr
 35 40 45

Ala Thr Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr
 50 55 60

Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro
 65 70 75 80

Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro
 85 90 95

Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser
 100 105 110

Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg
 115 120 125

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr
 130 135 140

Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ala Gly His Ala
 145 150 155 160

Val Gly Leu Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Thr Lys Ala
 165 170 175

Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro

180							185					190			
Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Ser	Ser	Pro	Pro	Ala	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Gln
		195					200					205			
Val	Ala	His	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Lys	Val
	210					215					220				
Pro	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Gln	Gly	Tyr	Lys	Val	Leu	Val	Leu	Asn	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Phe	Gly	Ala	Tyr	Met	Ser	Lys	Ala	His
				245					250					255	
Gly	Val	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Thr	Gly	Val	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr	Gly
			260					265					270		
Ser	Pro	Ile	Thr	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Gly	Lys	Phe	Leu	Ala	Asp	Gly	Gly
		275					280					285			
Cys	Ser	Gly	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ile	Ile	Cys	Asp	Glu	Cys	His	Ser
	290					295					300				
Thr	Asp	Ala	Thr	Ser	Ile	Leu	Gly	Ile	Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Ala
305					310					315					320
Glu	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Val	Val	Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro
				325					330					335	
Gly	Ser	Val	Thr	Val	Ser	His	Pro	Asn	Ile	Glu	Glu	Val	Ala	Leu	Ser
			340					345					350		
Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly	Lys	Ala	Ile	Pro	Leu	Glu	Val
		355					360					365			
Ile	Lys	Gly	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Phe	Cys	His	Ser	Lys	Lys	Lys	Cys
	370					375					380				
Asp	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Ile	Asn	Ala	Val	Ala
385					390					395					400
Tyr	Tyr	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Ser	Val	Ile	Pro	Thr	Asn	Gly	Asp	Val
				405					410					415	
Val	Val	Val	Ser	Thr	Asp	Ala	Leu	Met	Thr	Gly	Phe	Thr	Gly	Asp	Phe
			420					425					430		
Asp	Ser	Val	Ile	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	Thr	Gln	Thr	Val	Asp	Phe
		435					440					445			
Ser	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Thr	Ile	Glu	Thr	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Asp
	450					455					460				

Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro
 465 470 475 480

Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe
 485 490 495

Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr
 500 505 510

Glu Leu Met Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn
 515 520 525

Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly
 530 535 540

Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr
 545 550 555 560

Lys Gln Ser Gly Glu Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr
 565 570 575

Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp
 580 585 590

Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu
 595 600 605

Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr Leu Thr His Pro
 610 615 620

Ile Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val
 625 630 635 640

Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala
 645 650 655

Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu
 660 665 670

Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Gln Glu
 675 680 685

Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
 690 695

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> péptido generado sintéticamente

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)

10

<223> ácido (alfa) aminobutírico

<400> 2

Glu Asp Val Val Xaa Cys Ser Met Ser Tyr
1 5 10

5 <210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido generado sintéticamente

10 <400> 3

Lys Lys Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys
1 5 10 15

15 <210> 4
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 4

Lys Lys Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys
1 5 10 15

Pro Ala Ile Ile Pro Lys Lys
20

20 <210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> ácido (alfa) aminobutírico

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12) .. (12)
 <223> Asp(EDANS)

<400> 5

Glu Asp Val Val Xaa Cys Ser Met Ser Tyr Thr Asp Lys Lys Lys
1 5 10 15

35 <210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (1) .. (1)

<223> FITC-ácido 2-aminohexanoico

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (6) .. (6)

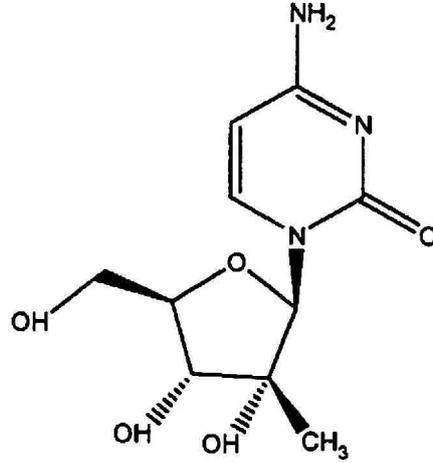
<223> ácido (alfa) aminobutírico

<400> 6

Xaa Glu Asp Val Val Xaa Cys Ser Met Ser Tyr Thr Lys Lys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1.- Una combinación terapéutica que comprende VX-950 y el compuesto de fórmula (I)



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2.- Un kit que comprende: (i) una combinación terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1; y (ii) instrucciones para utilizar dicha combinación.
- 3.- La combinación terapéutica de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una infección por VHC o aliviar uno o más síntomas de la misma en un paciente.
- 4.- La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la infección por VHC es genotípica.
- 10 5.- La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, en la que dicho paciente es un paciente virgen al tratamiento y/o en la que dicho paciente es no sensible a monoterapia con interferón y/o en la que dicho paciente es no sensible a una terapia de combinación que usa ribavirina y un interferón.
- 6.- La combinación terapéutica de la reivindicación 1 para su uso en la reducción de los niveles de ARN de VHC en un paciente que lo necesite.
- 15 7.- La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dichos niveles de ARN de VHC en un paciente se reducen a un nivel menor del detectable.