

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 358**

51 Int. Cl.:

C07H 19/20 (2006.01)

A61K 31/708 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2009 E 09788862 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 2307434**

54 Título: **Compuestos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de infecciones víricas**

30 Prioridad:

02.07.2008 US 133844 P

27.01.2009 US 147722 P

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

05.05.2014

73 Titular/es:

IDENIX PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

**320 Bent Street, Floor 4
Cambridge, MA 02141, US**

72 Inventor/es:

**CRETTON-SCOTT, ERIKA;
GUPTA, KUSUM;
HERNANDEZ-SANTIAGO, BRENDA y
LARSSON, MARITA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 458 358 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

Compuestos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de infecciones víricas

Se proporcionan aquí compuestos y composiciones farmacéuticas, para uso en el tratamiento de infecciones víricas, incluyendo la infección del virus de la hepatitis C en un hospedante que lo necesite.

5 Virus de la familia *Flaviviridae*

La familia *Flaviviridae* de virus comprende al menos tres géneros definidos: pestivirus, que causan enfermedad en el ganado vacuno y en los cerdos; flavivirus, que son la causa principal de enfermedades tales como la fiebre del dengue y la fiebre amarilla; y hepacivirus, cuyo único miembro es el virus de la hepatitis C (VHC). El género flavivirus incluye más de 68 miembros separados en grupos en base a su parentesco serológico (Calisher et al., J. Gen. Virol, 1993, 70, 37-43). Los síntomas clínicos varían e incluyen fiebre, encefalitis y fiebre hemorrágica (Fields Virology, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, Chapter 31, 931-959). Los flavivirus objeto de preocupación a escala mundial que se asocian con la enfermedad humana incluyen el virus de la fiebre hemorrágica del dengue (DHF), el virus de la fiebre amarilla, el virus del síndrome de shock y el virus de la encefalitis japonesa (Halstead, S. B., Rev. Infect. Dis., 1984, 6, 251-264; Halstead, S. B., Science, 239:476-481, 1988; Monath, T. P., New Eng. J. Med., 1988, 319, 641-643).

El género pestivirus incluye el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), el virus de la fiebre porcina clásica (CSFV, denominado también virus del cólera porcino) y el virus de la enfermedad de la frontera (BDV) de las ovejas (Moennig, V. et al. Adv. Vir. Res. 1992, 41, 53-98). Las infecciones por pestivirus de los animales domésticos (ganado, cerdos y ovejas) causan importantes pérdidas económicas en todo el mundo. El virus de la diarrea vírica bovina causa una enfermedad mucosal en el ganado y tiene una importancia económica significativa en la industria ganadera (Meyers, G. and Thiel, H.-J., Advances in Virus Research, 1996, 47, 53-118; Moennig V., et al, Adv. Vir. Res. 1992, 41, 53-98). Los pestivirus humanos no han sido caracterizados tan exhaustivamente como los pestivirus animales. Sin embargo, los análisis serológicos indican una considerable exposición a los pestivirus por parte de los humanos.

Los pestivirus y hepacivirus son grupos de virus estrechamente relacionados dentro de la familia *Flaviviridae*. Otros virus estrechamente relacionados en esta familia incluyen los virus GB A, agentes tipo virus GB A, virus GB B y virus GB C (también denominado virus de la hepatitis G, VHG). El grupo de hepacivirus (virus de la hepatitis C; VHC) consiste en una serie de virus estrechamente relacionados pero distinguibles genotípicamente que infectan a los seres humanos. Hay aproximadamente 6 genotipos de VHC y más de 50 subtipos. Debido a las similitudes entre pestivirus y hepacivirus, combinadas con la escasa capacidad de los hepacivirus para crecer eficientemente en cultivo celular, a menudo se usa el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) como un sustituto para el estudio del virus VHC.

La organización genética de los pestivirus y hepacivirus es muy similar. Estos virus con ARN de cadena positiva tienen un único gran marco de lectura abierto (ORF) que codifica todas las proteínas víricas necesarias para la replicación del virus. Estas proteínas se expresan como una poliproteína que es procesada co-traducionalmente y post-traducionalmente tanto por las proteinasas celulares como por las proteinasas codificadas por el virus para obtener las proteínas víricas maduras. Las proteínas víricas responsables de la replicación del ARN del genoma vírico están localizadas hacia el carboxi terminal. Dos tercios del marco de lectura abierto se califican como proteínas no estructurales (NS). La organización genética y el procesamiento de las poliproteínas de la porción de proteína no estructural del marco de lectura abierto para los pestivirus y hepacivirus son muy similares. Tanto para los pestivirus como para los hepacivirus, las proteínas no estructurales (NS) maduras, en orden secuencial desde el terminal amino de la región codificadora de la proteína no estructural hasta el terminal carboxi del marco de lectura abierto, consisten en p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B.

Las proteínas no estructurales (NS) de pestivirus y hepacivirus comparten dominios de secuencia que son característicos de funciones específicas de la proteína. Por ejemplo, las proteínas NS3 de los virus de ambos grupos poseen motivos en la secuencia de aminoácidos característicos de serina proteinasas y de helicasas (Gorbalenya et al. (1988) Nature 333:22; Bazan and Fletterick (1989) Virology 171:637-639; Gorbalenya et al. (1989) Nucleic Acid Res. 17,3889-3897). Similarmente, las proteínas NS5B de pestivirus y hepacivirus tienen los motivos característicos de las ARN polimerasas dirigidas por ARN (Koonin, E.V. and Dolja, V.V. (1993) Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 28:375-430).

Los papeles y funciones reales de las proteínas NS de pestivirus y hepacivirus en el ciclo vital de los virus son directamente análogos. En ambos casos, la serina proteinasa NS3 es responsable de todos los procesos proteolíticos de los precursores poliproteicos aguas abajo de su posición en el marco de lectura abierto (ORF) (Wiskerchen and Collett (1991) Virology 184:341-350; Bartenschlager et al. (1993) J. Virol. 67:3835-3844; Eckart et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Comm. 192:399-406; Grakoui et al. (1993) J Virol. 67:2832-2843; Grakoui et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10583-10587; Hijikata et al. (1993) J Virol. 67:4665-4675; Tome et al. (1993) J. Virol. 67:4017-4026). La proteína NS4A, en ambos casos, actúa como un cofactor con la serina proteasa NS3 (Bartenschlager et al. (1994) J Virol. 68:5045-5055; Failla et al. (1994) J Virol. 68: 3753-3760; Lin et al. (1994)

68:8147-8157; Xu et al. (1997) J Virol. 71:5312-5322). La proteína NS3 de ambos virus funciona también como una helicasa (Kim et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Comm. 215: 160-166; Jin and Peterson (1995) Arch. Biochem. Biophys., 323:47-53; Warrenner and Collett (1995) J. Virol. 69:1720-1726). Finalmente, las proteínas NS5B de pestivirus y hepacivirus han pronosticado la actividad de las ARN polimerasas dirigidas por ARN (Behrens et al. (1996) EMBO J. 15:12-22; Lehmann et al. (1997) J Virol. 71:8416-8428; Yuan et al.(1997) Biochem. Biophys. Res. Comm. 232:231-235; Hagedorn, PCT WO 97/12033; patentes de Estados Unidos números 5.981.247; 6.248.589 y 6.461.845 Zhong et al.(1998) J. Virol. 72,9365-9369)

Virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) es la causa principal de la enfermedad hepática crónica en todo el mundo. (Boyer, N. et al. J Hepatol. 32:98-112, 2000). El VHC causa un lento crecimiento de la infección vírica y es la principal causa de cirrosis y de carcinoma hepatocelular (Di Besceglie, A. M. and Bacon, B. R., Scientific American, Oct.: 80-85, (1999); Boyer, N. et al. J Hepatol. 32:98-112, 2000). Un estimado de 170 millones de personas están infectadas con VHC en todo el mundo. (Boyer, N. et al. J Hepatol. 32:98-112, 2000). La cirrosis causada por la infección de hepatitis C crónica es responsable de 8.000-12.000 muertes al año en Estados Unidos, y la infección de VHC es la principal indicación para el trasplante de hígado.

Se sabe que el VHC causa al menos el 80 % de las hepatitis post-transfusión y una proporción sustancial de hepatitis agudas esporádicas. Indicios preliminares implican también al VHC en muchos casos de hepatitis crónica "idiopática", cirrosis "criptogénica", y probablemente carcinoma hepatocelular no relacionados con otros virus de hepatitis, tales como el virus de la hepatitis B (VHB). Una pequeña proporción de personas sanas parece que son portadores crónicos de VHC, variando con la geografía y otros factores epidemiológicos. Los números pueden exceder sustancialmente de los de VHB, aunque la información es todavía preliminar; no está claro cuántas de estas personas tienen enfermedad hepática crónica subclínica. (The Merck Manual, 18th ed., (2006)).

El VHC es un virus con envoltura que contiene un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 9,4 kb. El genoma vírico consiste en una región en 5' no traducida (UTR), un marco de lectura abierto largo que codifica un precursor poliproteico de aproximadamente 3011 aminoácidos, y una UTR corta en 3'. La UTR en 5' es la parte más altamente conservada del genoma del VHC y es importante para la iniciación y el control de la traducción de poliproteínas. La traducción del genoma de VHC es iniciada por un mecanismo independiente de cap (proteína aceptora de AMPc) conocido como entrada interna del ribosoma. Este mecanismo implica la unión de ribosomas a una secuencia de ARN conocida como sitio interno de entrada del ribosoma (IRES). Recientemente se ha determinado que una estructura de ARN de pseudonudos es un elemento estructural esencial del IRES de VHC. Las proteínas víricas estructurales incluyen una proteína central de la nucleocápsida (C) y dos glucoproteínas de la envoltura, E1 y E2. El VHC codifica también dos proteinasas, una metaloproteínasa dependiente de cinc codificada por la región NS2-NS3 y una serina proteinasa codificada en la región NS3. Estas proteinasas son necesarias para la escisión de regiones específicas de la poliproteína precursora en péptidos maduros. La mitad carboxílica de la proteína 5 no estructural, NS5B, contiene la ARN polimerasa dependiente de ARN. La función de las proteínas no estructurales restantes, NS4A y NS4B, y la de NS5A (la mitad amino-terminal de la proteína 5 no estructural) permanecen desconocidas.

Un foco importante de la investigación antiviral actual se dirige al desarrollo de métodos mejores de tratamiento de las infecciones crónicas de VHC en los seres humanos (Di Besceglie, A. M. and Bacon, B. R., Scientific American, Oct.: 80-85, (1999)).

A la vista del hecho de que la infección por VHC ha alcanzado niveles epidémicos en todo el mundo, y que tiene efectos trágicos sobre el paciente infectado, sigue existiendo la necesidad de proporcionar nuevos agentes farmacéuticos eficaces para tratar la hepatitis C que tengan baja toxicidad para el hospedante.

Además, dada la amenaza creciente de otras infecciones de flaviviridae, sigue existiendo una gran necesidad de proporcionar nuevos agentes farmacéuticos eficaces para tratar las infecciones de flaviviridae.

En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados aquí tienen las fórmulas que se definen en las reivindicaciones.

En ciertas realizaciones el Compuesto 1 es un profármaco del fármaco parental 2'-C-metil-guanosina. En otras palabras, se puede obtener el fármaco parental a partir del metabolismo del Compuesto 1 en el hígado, y así el fármaco parental es capaz de acumularse en el hígado de un hospedante.

En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados aquí son útiles en la prevención y tratamiento de las infecciones por *Flaviviridae* y de otras enfermedades relacionadas tales como enfermedades con anticuerpos positivos anti-*Flaviviridae* y enfermedades positivas de *Flaviviridae*, inflamación crónica de hígado causada por VHC, cirrosis, fibrosis, hepatitis aguda, hepatitis fulminante, hepatitis crónica persistente, y fatiga. Estos compuestos o formulaciones se pueden usar también profilácticamente para evitar o retrasar el progreso de la enfermedad clínica en individuos que tengan anticuerpos positivos anti-*Flaviviridae* o antígenos positivos de *Flaviviridae* o que hayan sido expuestos a una *Flaviviridae*. En una realización, la *Flaviviridae* es la hepatitis C. En ciertas realizaciones, el compuesto se usa para tratar cualquier virus que se replica mediante una ARN-polimerasa dependiente de ARN.

En una realización, se proporcionan compuestos para uso en un método para el tratamiento de una infección de *Flaviviridae* en un hospedante, incluyendo un ser humano, que incluye administrar una cantidad eficaz de un compuesto proporcionado aquí, administrado sólo o en combinación o en alternancia con otro agente anti-*Flaviviridae*, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 En un aspecto, los compuestos descritos aquí, se proporcionan o se administran en combinación con un segundo agente terapéutico, tal como uno útil para el tratamiento o prevención de infecciones por VHC. Ejemplos de agentes terapéuticos se describen en detalle en las secciones que siguen.

10 En una realización, se proporcionan compuestos para uso en un método para el tratamiento de una infección de *Flaviviridae* en un hospedante, incluyendo un ser humano, que incluye administrar S-(2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-purin-9-il)-3,4-dihidroxi-4-metil-tetrahydro-furan-2-ilmetoxi)-bencilamino-fosforiloxi)-etil éster) en una cantidad de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 150 mg/día, administrado sólo o en combinación o en alternancia con otro agente anti-*Flaviviridae*, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En otra realización, se proporcionan aquí compuestos para uso en un método para el tratamiento de una infección de *Flaviviridae* en un hospedante, incluyendo un ser humano, que incluye administrar S-(2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-purin-9-il)-3,4-dihidroxi-4-metiltetrahydro-furan-2-ilmetoxi)-bencilamino-fosforiloxi)-etil éster) en una cantidad de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 150 mg/día, en combinación o en alternancia con una cantidad terapéuticamente eficaz de ribavirina, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la cantidad de ribavirina administrada es de aproximadamente 800 mg a aproximadamente 1400 mg.

20 En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas, formas farmacéuticas unitarias individuales, y kits adecuados para uso en el tratamiento o prevención de trastornos tales como infecciones de VHC, que comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto descrito en esta memoria y una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un segundo agente terapéutico tal como uno útil para el tratamiento o prevención de las infecciones de VHC.

25 En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos para uso en un método para el tratamiento de un trastorno hepático, que comprende administrar a un individuo que necesite tratamiento, una cantidad eficaz de un compuesto proporcionado en esta memoria.

En algunas realizaciones, se proporcionan aquí:

- 30 (a) compuestos como se describen en esta memoria, y sales y composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos;
- (b) compuestos como se describen en esta memoria, y sales y composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un trastorno hepático incluyendo una infección por *Flaviviridae*, especialmente en individuos con diagnóstico de infección por *Flaviviridae* o que están en riesgo de ser infectados por hepatitis C;
- 35 (c) procedimientos para la preparación de compuestos como se describen en esta memoria;
- (d) formulaciones farmacéuticas que comprenden un compuesto como se describe en esta memoria, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;
- (e) formulaciones farmacéuticas que comprenden un compuesto como se describe en esta memoria, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables junto con uno o más de otros agentes anti-VHC eficaces, opcionalmente en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;
- 40 (f) compuestos para uso en un método para el tratamiento y/o profilaxis de un hospedante infectado con *Flaviviridae* que incluye la administración de una cantidad eficaz de un compuesto como se describe en esta memoria, su sal o composición farmacéuticamente aceptable; y
- (g) compuestos para uso en un método para el tratamiento y/o profilaxis de un hospedante infectado con *Flaviviridae* que incluye la administración de una cantidad eficaz de un compuesto como se describe en esta memoria, su sal o composición farmacéuticamente aceptable, en combinación y/o en alternancia con uno o más agentes eficaces anti-VHC.
- 45

Las *Flaviviridae* que se pueden tratar son, p.ej., las expuestas en general en Fields Virology, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, Chapter 31, 1996. En una realización particular, el miembro de las *Flaviviridae* es VHC. En una realización alternativa, el miembro de las *Flaviviridae* es un flavivirus o pestivirus. Los flavivirus específicos incluyen, sin limitación: Absettarov, Alfuy, Apoi, Aroa, Bagaza, Banzi, Bouboui, Bussuquara, Cacipacore, Carey Island, Dakar bat, Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3, Dengue 4, Edge Hill, Entebbe bat, Gadgets Gully, Hanzalova, Hypr, Ilheus, meningoencefalitis del pavo de Israel, encefalitis japonesa, Jugra, Jutiapa, Kadam, Karshi, Kedougou, Kokobera, Koutango, Kumlinge, Kunjin, enfermedad

50

de la selva de Kyasanur, Langat, Louping ill, Meaban, Modoc, leucoencefalitis de myotis de Montana, encefalitis de Murray valley, Naranjal, Negishi, Ntaya, fiebre hemorrágica de Omsk, Phnom-Penh bat, Powassan, Rio Bravo, Rocio, Royal Farm, encefalitis rusa de primavera-verano, Saboya, encefalitis de S. Luis, Sal Vieja, San Perlita, Saumarez Reef, Sepik, Sokuluk, Spondweni, Stratford, Tembusu, Tyuleni, Uganda S, Usutu, Wesselsbron, West Nile, Yaounde, Fiebre amarilla, y Zika.

Los pestivirus que se pueden tratar están expuestos en general en Fields Virology, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, Chapter 33, 1996. Los pestivirus específicos incluyen, sin limitación: el virus de la diarrea vírica bovina ("BVDV"), el virus de la fiebre porcina clásica ("CSFV," denominado también virus del cólera porcino), y el virus de la enfermedad de la frontera ("BDV").

10 La FIG. 1 proporciona una representación de trazas por HPLC que ilustra la resolución de los dos diastereoisómeros del Compuesto 1 por HPLC de fase inversa – los dos picos de las trazas, pico 1 (diastereoisómero 1) y pico 2 (diastereoisómero 2), corresponden a diastereoisómeros puros del Compuesto 1.

La FIG. 2 proporciona un cromatograma de HPLC representativo del Compuesto 1 y metabolitos patrones obtenido por el método 1 del Ejemplo 14.

15 La FIG. 3 proporciona un cromatograma de HPLC representativo del Compuesto 1 y metabolitos patrones obtenido por el método 2 del Ejemplo 15.

La FIG. 4 proporciona un cromatograma de HPLC representativo del Compuesto 1 y metabolitos patrones obtenido por el método 2 del Ejemplo 16.

20 La FIG. 5 representa el resultado del análisis por MacSynergy™ II (independencia de Bliss) para cinco conjuntos de datos experimentales individuales en el intervalo de confianza del 99,9 %.

La FIG. 6 representa las diferencias entre los efectos anti-VHC aditivos calculados y los observados para todas las combinaciones de fármacos a partir de 5 experimentos independientes, obtenidas con el software CombiTool utilizando el modelo de aditividad de Loewe.

25 Se proporcionan aquí compuestos, composiciones y compuestos para uso en métodos útiles para el tratamiento de trastornos hepáticos tales como la infección por VHC en un sujeto. Se proporcionan además formas farmacéuticas útiles para tales compuestos para uso en tales métodos.

Definiciones

Cuando se refieren a los compuestos proporcionados en esta memoria, los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se indique otra cosa.

30 "Sal farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier sal de un compuesto proporcionado aquí que retiene sus propiedades biológicas y que no es tóxica ni indeseable de ningún otro modo para uso farmacéutico. Dichas sales se pueden derivar de una variedad de contra-iones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la técnica. Dichas sales incluyen: (1) sales de adición de ácido formadas con ácidos orgánicos o inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, sulfámico, acético, trifluoroacético, tricloroacético, propiónico, hexanoico, ciclopentilpropiónico, glicólico, glutámico, pirúvico, láctico, malónico, succínico, sórbico, ascórbico, málico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, pícrico, cinámico, mandélico, ftálico, láurico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etano-disulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, 2-naftalensulfónico, 4-toluenosulfónico, canfórico, canforsulfónico, 4-metilbicyclo[2,2,2]-oct-2-en-1-carboxílico, glucoheptónico, 3-fenilpropiónico, trimetilacético, terc-butilacético, laurilsulfúrico, glucónico, benzoico, glutámico, hidroxinaftoico, salicílico, esteárico, ciclohexilsulfámico, quínico, mucónico y los ácidos similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto parental es (a) reemplazado por un ion metálico, p.ej., un ion de metal alcalino, un ion de metal alcalino-térreo o un ion aluminio, o hidróxidos de metal alcalino o de metal alcalino-térreo, tales como hidróxido de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, litio, zinc, y bario, amoníaco o es (b) coordinado con una base orgánica, tal como aminas orgánicas alifáticas, alicíclicas, o aromáticas, tales como amoníaco, metilamina, dimetilamina, dietilamina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, etilendiamina, lisina, arginina, ornitina, colina, N,N'-dibenciletlen-diamina, cloroprocaina, dietanolamina, procaina, N-bencilfenetilamina, N-metilglucamina piperazina, tris(hidroximetil)-aminometano, hidróxido de tetrametilamonio, y similares.

50 Las sales incluyen además, a modo de ejemplo solamente, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares, y cuando el compuesto contiene una función básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicas, tales como hidroháluros, p.ej. hidrocloruro e hidrobromuro, sulfato, fosfato, sulfamato, nitrato, acetato, trifluoroacetato, tricloroacetato, propionato, hexanoato, ciclopentilpropionato, glicolato, glutarato, piruvato, lactato, malonato, succinato, sorbato, ascorbato, malato, maleato, fumarato, tartrato, citrato, benzoato, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoato, picrato, cinamato, mandelato, ftalato, laurato, metanosulfonato (mesilato), etanosulfonato, 1,2-etano-disulfonato, 2-hidroxietanosulfonato, bencenosulfonato (besilato), 4-clorobencenosulfonato, 2-naftalensulfonato, 4-toluenosulfonato, canforato, canforsulfonato, 4-metilbicyclo[2,2,2]-oct-2-en-1-carboxilato,

glucoheptonato, 3-fenilpropionato, trimetilacetato, terc-butilacetato, laurilsulfato, gluconato, benzoato, glutamato, hidroxinaftoato, salicilato, estearato, ciclohexilsulfamato, quinato, muconato y similares.

5 El término "puro" o "purificado" con respecto a un compuesto proporcionado en esta memoria, incluye una composición que incluye al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, 99,9 % a 100 % en peso, del compuesto, comprendiendo el resto otras especies químicas o diastereoisómeros. Como se usa aquí el término "puro" cuando se aplica a un compuesto quiral, se refiere a un enantiómero o a un diastereoisómero del compuesto quiral sustancialmente libre de su enantiómero o diastereoisómero opuesto (esto es, en exceso enantiomérico o diastereoisomérico). Por ejemplo, la forma "R" pura de un compuesto está sustancialmente libre de la forma "S" del compuesto y está, por lo tanto, en exceso enantiomérico o diastereoisomérico de la forma "S". El término "enantioméricamente o diastereoisoméricamente puro" o "enantiómero o diastereoisómero puro" indica que el compuesto comprende un exceso de un enantiómero o diastereoisómero, p.ej. más de 75 % en peso, más de 80 % en peso, más de 85 % en peso, más de 90 % en peso, más de 91 % en peso, más de 92 % en peso, más de 93 % en peso, más de 94 % en peso, más de 95 % en peso, más de 96 % en peso, más de 97 % en peso, más de 98 % en peso, más de 98,5 % en peso, más de 99 % en peso, más de 99,2 % en peso, más de 99,5 % en peso, más de 99,6 % en peso, más de 99,7 % en peso, más de 99,8 % en peso o más de 99,9 % en peso, del enantiómero o diastereoisómero. En ciertas realizaciones, los pesos se basan en el peso total del compuesto, esto es de todos los enantiómeros o diastereoisómeros del compuesto. En ciertas realizaciones, un enantiómero o diastereoisómero puede estar en exceso en un 30-80 %, o 30-70 %, 30-60 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % o 60 %, o cualquier porcentaje intermedio.

20 Similarmente, el término "aislado" con respecto a un compuesto incluye una composición que incluye al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % a 100 % en peso, del compuesto, comprendiendo el resto otras especies químicas u otros enantiómeros o diastereoisómeros.

25 "Solvato" incluye un compuesto proporcionado aquí o una de sus sales, que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente unido por fuerzas intermoleculares no covalentes. Cuando el disolvente es agua, el solvato es un hidrato.

30 El término "hospedante", como se usa aquí, incluye cualquier organismo unicelular o multicelular en el que se puede replicar el virus, incluyendo líneas celulares y animales, y preferiblemente un ser humano. Alternativamente, el hospedante puede llevar una parte del genoma vírico de la familia *Flaviviridae*, cuya replicación o función puede ser alterada por los compuestos que se proporcionan aquí. El término hospedante incluye específicamente células infectadas, células transfectadas con todo o parte del genoma de las *Flaviviridae* y animales, en particular, primates (incluyendo chimpancés) y los seres humanos. En la mayor parte de las aplicaciones animales, el hospedante es un paciente humano. Sin embargo, en ciertas indicaciones, se esperan aquí claramente, aplicaciones veterinarias (tales como las de chimpancés).

35 Como se usan aquí, los términos "sujeto" y "paciente" se usan aquí de modo intercambiable. Los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal, tal como un mamífero incluyendo un mamífero no primate (p.ej., una vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata, y ratón) y un primate (p.ej., un mono tal como un mono cinomolgus, un chimpancé y un ser humano), y por ejemplo, un ser humano. En una realización, el sujeto es refractario o no sensible a los tratamientos actuales para la infección de hepatitis C. En otra realización, el sujeto es un animal de granja (p.ej., un caballo, una vaca, un cerdo, etc.) o una mascota (p.ej., un perro o un gato). En una realización, el sujeto es un ser humano.

40 Como se usan aquí, los términos "agente terapéutico" y "agentes terapéuticos" se refieren a cualquier agente o agentes que se pueden usar en el tratamiento o prevención de un trastorno o de uno o más síntomas del mismo. En ciertas realizaciones, el término "agente terapéutico" incluye un compuesto proporcionado aquí. En una realización, un agente terapéutico es un agente que se sabe que es útil o que ha sido o está siendo actualmente usado para el tratamiento o prevención de un trastorno o de uno o más síntomas del mismo.

45 "Cantidad terapéuticamente eficaz" incluye una cantidad de un compuesto o composición que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento de la enfermedad. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar dependiendo, entre otros, del compuesto, de la enfermedad y su gravedad, y de la edad, peso, etc., del sujeto a ser tratado.

50 "Tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en una realización, a mejorar una enfermedad o trastorno que existe en un sujeto. En otra realización, "tratar" o "tratamiento" incluye mejorar al menos un parámetro físico, que puede ser indiscernible por el sujeto. En otra realización más, "tratar" o "tratamiento" incluye modular la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente (p.ej., estabilización de un síntoma discernible) o fisiológicamente (p.ej., estabilización de un parámetro físico) o de ambos modos. En otra realización más, "tratar" o "tratamiento" incluye retrasar el inicio de la enfermedad o trastorno.

55 Como se usan aquí, los términos "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente o agentes que se pueden usar en la prevención de un trastorno o de uno o más de sus síntomas. En ciertas realizaciones, el término "agente profiláctico" incluye un compuesto proporcionado aquí. En otras ciertas realizaciones, el término "agente profiláctico" no se refiere a un compuesto proporcionado aquí. Por ejemplo, un

agente profiláctico es un agente que se sabe que es útil, o que ha sido o está siendo actualmente utilizado para prevenir o impedir el inicio, desarrollo, progreso y/o gravedad de un trastorno.

5 Como se usa aquí, la frase "cantidad profilácticamente eficaz" incluye la cantidad de una terapia (p.ej., un agente profiláctico) que es suficiente para dar como resultado la prevención o reducción del desarrollo, recurrencia o inicio de uno o más síntomas asociados con un trastorno, o para aumentar o mejorar el efecto o efectos profilácticos de otra terapia (p.ej., otro agente profiláctico).

10 Como se usa aquí, "composición isotópica" se refiere a la cantidad de cada isótopo presente para un átomo dado, y "composición isotópica natural" se refiere a la composición o abundancia isotópica presente en la naturaleza de un átomo dado. Los átomos que contienen su composición isotópica natural se pueden denominar también aquí átomos "no enriquecidos". A menos que se indique otra cosa, los átomos de los compuestos descritos aquí representan cualquier isótopo estable de dicho átomo. Por ejemplo, a menos que se indique otra cosa, cuando se designa una posición específicamente como "H" o "hidrógeno", se entiende la posición que tiene hidrógeno en su composición isotópica natural.

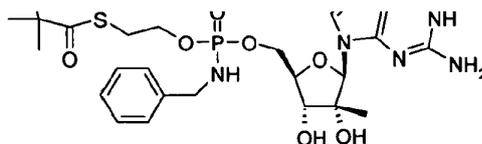
15 Como se usa aquí, "isotópicamente enriquecido" se refiere a un átomo que tiene una composición isotópica distinta de la composición isotópica natural de dicho átomo. "Isotópicamente enriquecido" se puede referir también a un compuesto que contiene al menos un átomo que tiene una composición isotópica distinta de la composición isotópica natural de dicho átomo.

20 Como se usa aquí, "enriquecimiento isotópico" se refiere al porcentaje de incorporación de una cantidad de un isótopo específico de un átomo dado en una molécula en el lugar de la abundancia isotópica natural de dicho átomo. Por ejemplo, un enriquecimiento del 1 % en deuterio en una posición dada significa que el 1 % de las moléculas en una muestra dada contienen deuterio en la posición especificada. Debido a que la distribución natural de deuterio es aproximadamente 0,0156 %, el enriquecimiento de deuterio en cualquier posición en un compuesto sintetizado utilizando materiales de partida no enriquecidos es aproximadamente 0,0156 %. El enriquecimiento isotópico de los compuestos proporcionados aquí se puede determinar utilizando métodos analíticos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen espectrometría de masas y espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Compuestos

Los compuestos proporcionados aquí son derivados de 2'-C-metil-guanosina. Los compuestos son útiles en el tratamiento y/o en la profilaxis de las infecciones de *Flaviviridae* y de hepatitis C.

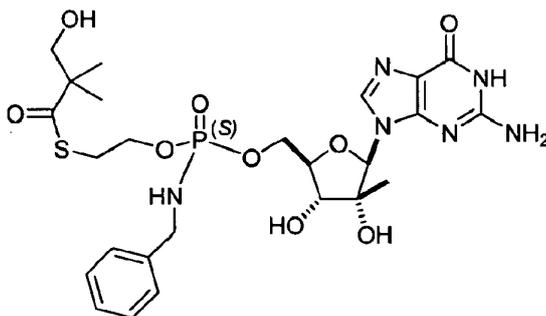
30 En una realización, los compuestos proporcionados aquí son diastereoisómeros o metabolitos del éster de ácido (3-hidroxi-2,2-dimetil-tiopropiónico y S-(2-[(2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-purin-9-il)-3,4-dihidroxi-4-metil-tetrahydro-furan-2-ilmetoxi]-bencilamino-fosforiloxi)-etilo), designado aquí como Compuesto 1. El Compuesto 1 tiene la siguiente estructura:



Compound 1

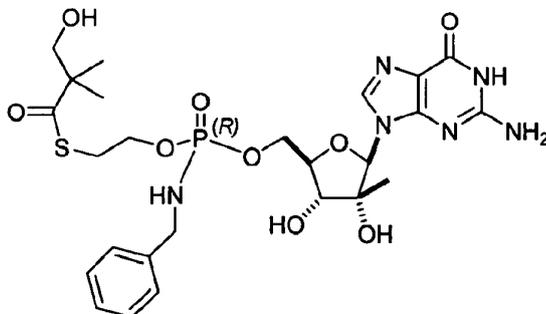
35 Compuesto I

En una realización, se proporciona en esta memoria el Compuesto 1a que tiene la fórmula:



o una de sus sales, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables. En una realización, se proporciona en esta memoria el Compuesto 1a puro. En otra realización, se proporciona aquí el Compuesto 1a diastereoisoméricamente puro.

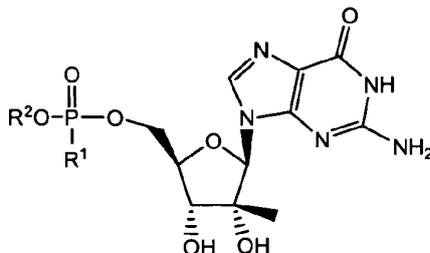
En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 1b que tiene la fórmula:



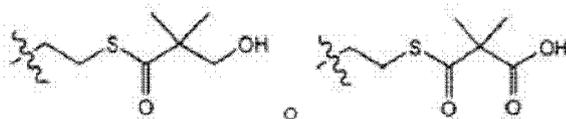
5

o una de sus sales, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables. En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 1b puro. En otra realización, se proporciona aquí el Compuesto 1b diastereoisoméricamente puro.

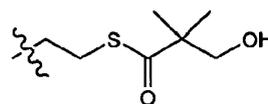
En una realización, se proporciona aquí un compuesto de la fórmula I:



10 o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en



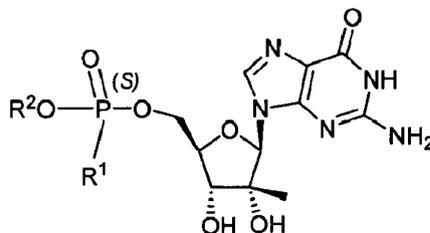
donde R¹ es hidroxilo, amino o bencilamino; y R² es



de tal modo que cuando R¹ es bencilamino, entonces R² es distinto de

En una realización, se proporciona aquí un compuesto puro que tiene la fórmula I.

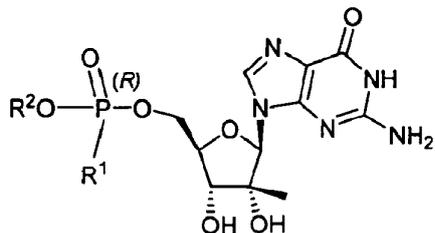
En una realización, se proporciona aquí un compuesto de la fórmula Ia:



15

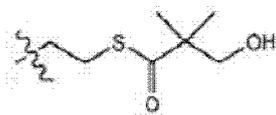
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

En una realización, se proporciona aquí un compuesto de la fórmula Ib:



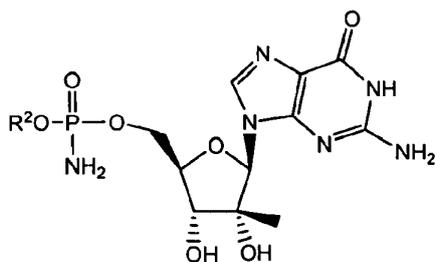
5 o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables. En una realización, se proporciona aquí un compuesto puro que tiene la fórmula Ia o Ib. En una realización, se proporciona aquí un compuesto diastereoisoméricamente puro que tiene la fórmula Ia o Ib.

En una realización, R¹ es hidroxilo, amino o bencilamino. En otra realización, R¹ es amino o bencilamino. En otra realización, R¹ es hidroxilo.



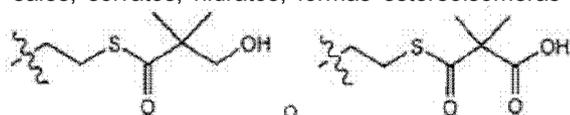
En una realización, R² es,

En una realización, el compuesto proporcionado en esta memoria tiene la fórmula II:



II

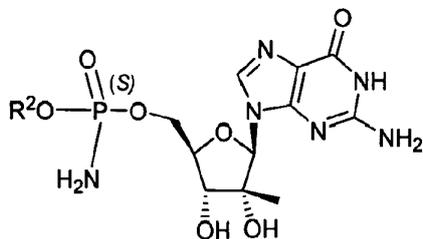
10 o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en



donde R² es,

En una realización, se proporciona aquí un compuesto puro que tiene la fórmula II.

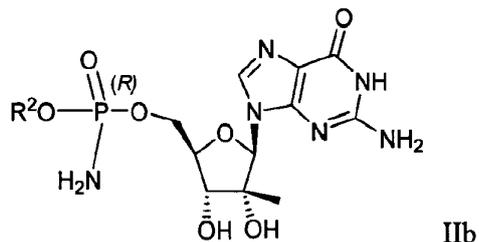
En una realización, el compuesto proporcionado en esta memoria tiene la fórmula IIa:



IIa

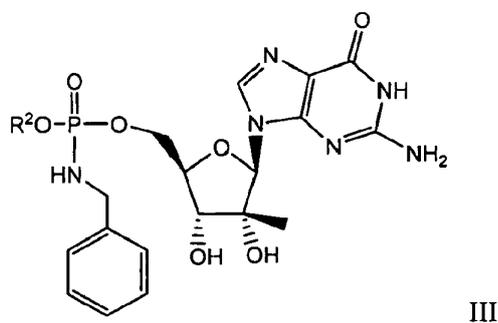
15 o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

En una realización, el compuesto proporcionado en esta memoria tiene la fórmula IIb:

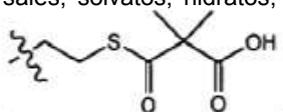


o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables. En una realización, se proporciona aquí un compuesto puro que tiene la fórmula IIa o IIb. En una realización, se proporciona aquí un compuesto diastereoisoméricamente puro que tiene la fórmula IIa o IIb.

En una realización, el compuesto que se proporciona aquí es un compuesto de la fórmula III:



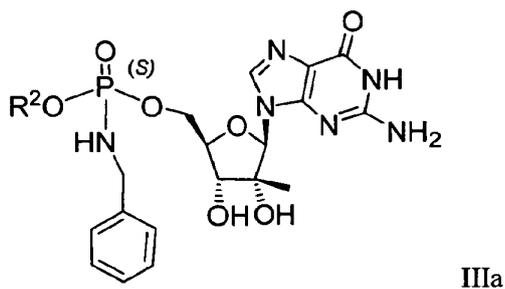
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en



donde R² es,

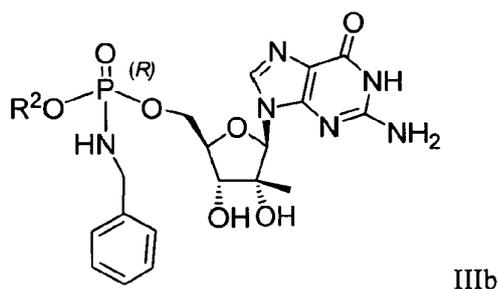
10 En una realización, se proporciona aquí un compuesto puro que tiene la fórmula III.

En una realización, el compuesto que se proporciona aquí es un compuesto de la fórmula IIIa:



o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

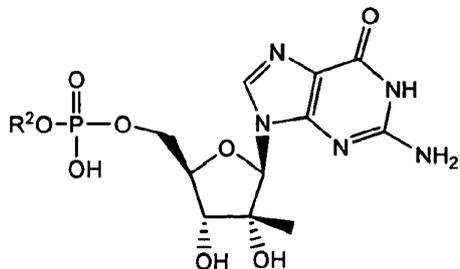
En una realización, el compuesto que se proporciona aquí es un compuesto de la fórmula IIIb:



15

o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables. En una realización, se proporciona aquí un compuesto puro que tiene la fórmula IIIa o IIIb. En una realización, se proporciona aquí un compuesto diastereoisoméricamente puro que tiene la fórmula IIIa o IIIb.

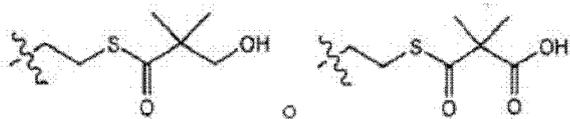
En una realización, el compuesto que se proporciona aquí es un compuesto de la fórmula IV:



5

IV

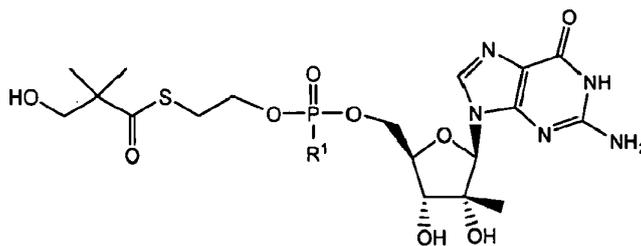
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en



donde R² es

En una realización, se proporciona aquí un compuesto puro que tiene la fórmula IV.

En una realización, el compuesto que se proporciona aquí es un compuesto de la fórmula V:



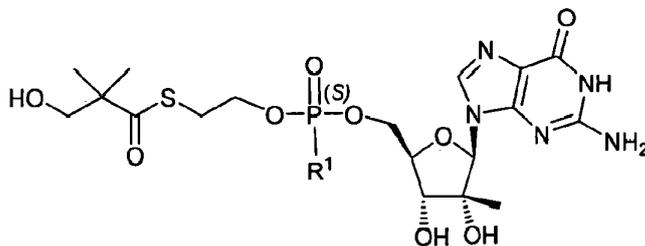
10

V

o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en donde R¹ es hidroxilo o amino.

En una realización, se proporciona aquí un compuesto puro que tiene la fórmula V.

En una realización, el compuesto que se proporciona aquí es un compuesto de la fórmula Va:

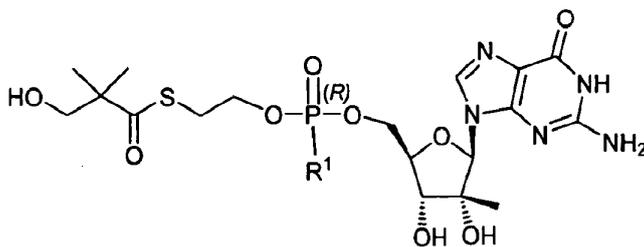


15

Va

o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

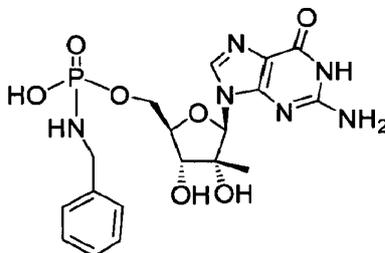
En una realización, el compuesto que se proporciona aquí es un compuesto de la fórmula Vb:



Vb

o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables. En una realización, se proporciona aquí un compuesto puro que tiene la fórmula Va o Vb. En una realización, se proporciona aquí un compuesto diastereoisoméricamente puro que tiene la fórmula Va o Vb.

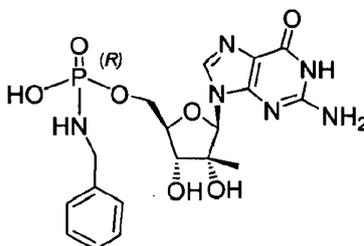
Se describe aquí el Compuesto 2 que tiene la fórmula:



5

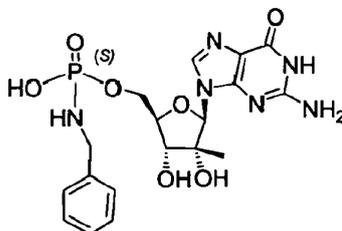
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

Se describe aquí el Compuesto 2a que tiene la fórmula:



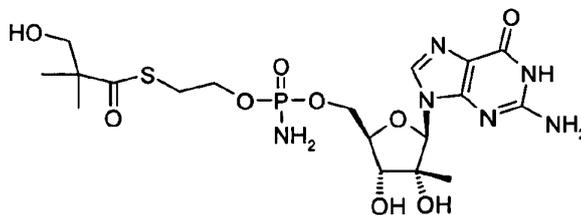
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

10 Se describe aquí el Compuesto 2b que tiene la fórmula:



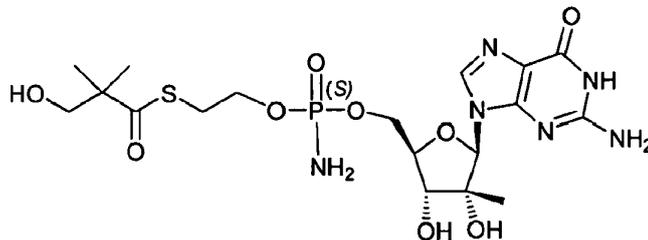
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 3 que tiene la fórmula:



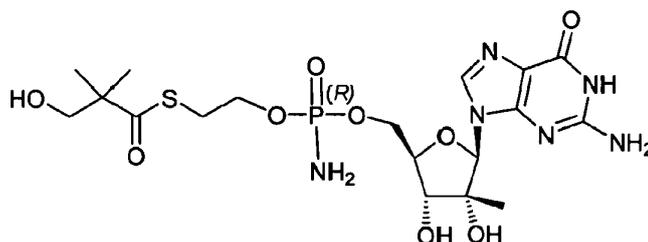
15 o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables. En otra realización, se proporciona aquí el Compuesto 3 puro.

En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 3a que tiene la fórmula:



o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

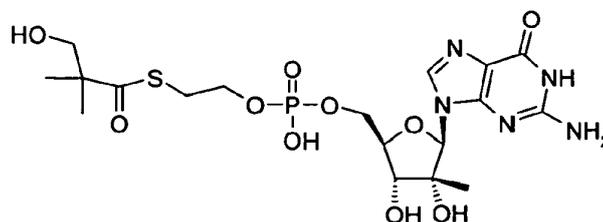
En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 3b que tiene la fórmula:



5

o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables. En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 3a o 3b puro. En otra realización, se proporciona aquí el Compuesto 3a o 3b diastereoisoméricamente puro.

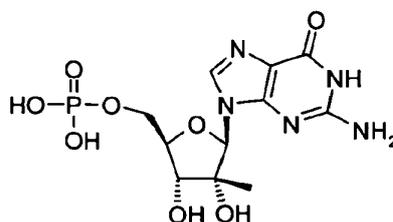
En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 4 que tiene la fórmula:



10

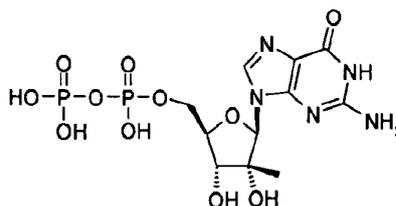
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables. En otra realización, se proporciona aquí el Compuesto 4 puro.

Se describe aquí el Compuesto 5 que tiene la fórmula:



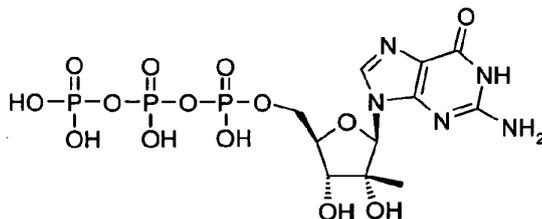
15 o una de sus sales, solvatos, hidratos, o formas tautómeras farmacéuticamente aceptables.

Se describe aquí el Compuesto 6 que tiene la fórmula:



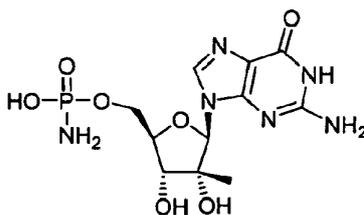
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

Se describe aquí el Compuesto 7 que tiene la fórmula:



o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

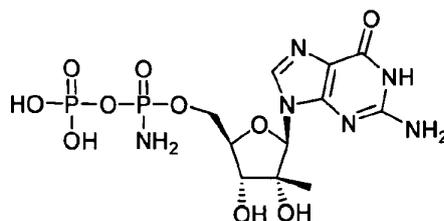
Se describe aquí el Compuesto 8 que tiene la fórmula:



5

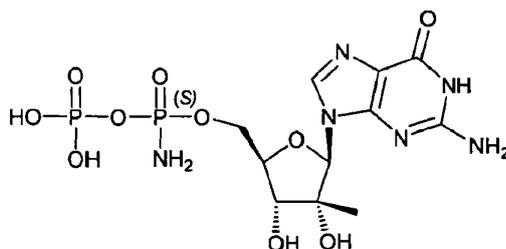
o una de sus sales, solvatos, hidratos, o formas tautómeras farmacéuticamente aceptables.

Se describe aquí el Compuesto 9 que tiene la fórmula:



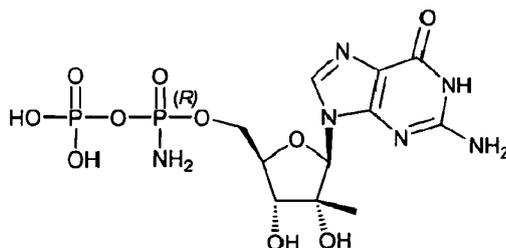
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

10 Se describe aquí el Compuesto 9a que tiene la fórmula:



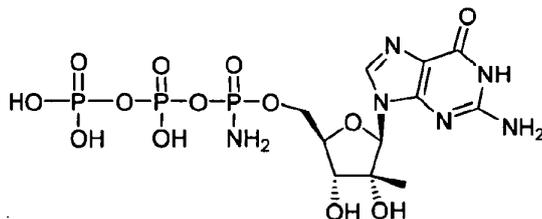
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

Se describe aquí el Compuesto 9b que tiene la fórmula:



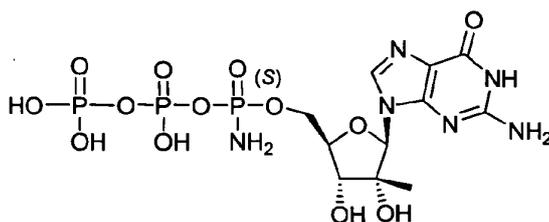
15 o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

Se describe aquí el Compuesto 10 de la fórmula:



o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

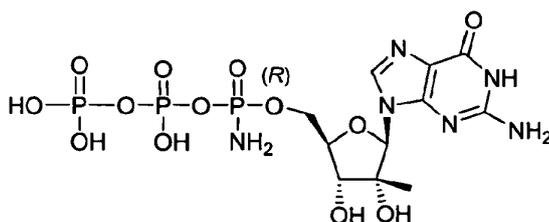
Se describe aquí el Compuesto 10a que tiene la fórmula:



5

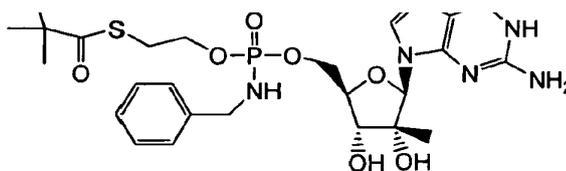
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

Se describe aquí el Compuesto 10b que tiene la fórmula:



o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

10 En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 11 que tiene la fórmula:

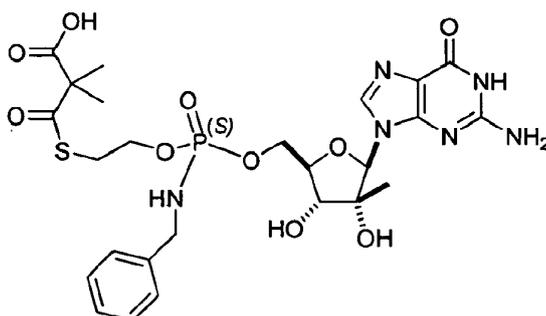


Compound 11

Compuesto 11

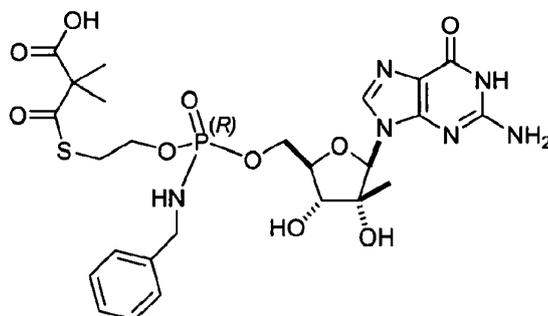
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables. En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 11 puro.

15 En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 11a que tiene la fórmula:



o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables.

En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 11b que tiene la fórmula:

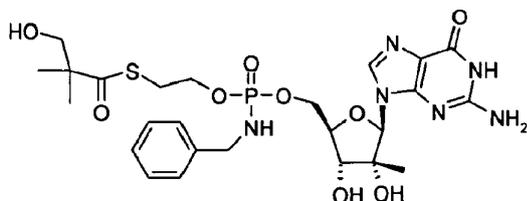


- 5 o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables. En una realización, se proporciona aquí el Compuesto 11a u 11b puro. En otra realización, se proporciona aquí el Compuesto 11a u 11b diastereoisoméricamente puro.

- 10 En ciertas realizaciones, se proporciona aquí un compuesto isotópicamente enriquecido seleccionado del grupo que consiste en compuesto de la fórmula I isotópicamente enriquecido, compuesto de la fórmula Ia isotópicamente enriquecido, compuesto de la fórmula Ib isotópicamente enriquecido, compuesto de la fórmula II isotópicamente enriquecido, compuesto de la fórmula IIa isotópicamente enriquecido, compuesto de la fórmula IIb isotópicamente enriquecido, compuesto de la fórmula III isotópicamente enriquecido, compuesto de la fórmula IIIa isotópicamente enriquecido, compuesto de la fórmula IIIb isotópicamente enriquecido, compuesto de la fórmula IV isotópicamente enriquecido, compuesto de la fórmula V isotópicamente enriquecido, compuesto de la fórmula Va isotópicamente enriquecido, y compuesto de la fórmula Vb isotópicamente enriquecido.

- 15 En ciertas realizaciones, se proporciona aquí un compuesto isotópicamente enriquecido seleccionado del grupo que consiste en Compuesto 1 isotópicamente enriquecido, compuesto 1a isotópicamente enriquecido, compuesto 1b isotópicamente enriquecido, compuesto 3 isotópicamente enriquecido, compuesto 3a isotópicamente enriquecido, compuesto 3b isotópicamente enriquecido, compuesto 4 isotópicamente enriquecido, compuesto 11 isotópicamente enriquecido, compuesto 11a isotópicamente enriquecido, y compuesto 11b isotópicamente enriquecido.

- 20 Se describe aquí un compuesto, solvato, hidrato, una forma estereoisómera o tautómera del mismo, en donde el compuesto es un metabolito del compuesto que tiene la fórmula

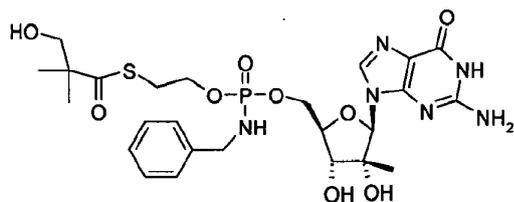


y en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) un compuesto que eluye de una columna C-18 (2) 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, a aproximadamente 2,1 minutos;
- 25 (b) un compuesto que eluye de una columna C-18 (2) 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, a aproximadamente 6,2 minutos,
- (c) un compuesto que eluye de una columna C-18 (2) 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, a aproximadamente 8,0 minutos,
- 30 (d) un compuesto que eluye de una columna C-18 (2) 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, a aproximadamente 9,4 minutos,
- (e) un compuesto que eluye de una columna C-18 (2) 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, a aproximadamente 10,9 minutos,
- (f) un compuesto que eluye de una columna C-18 (2) 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, a aproximadamente 12,4 minutos,
- 35 (g) un compuesto que eluye de una columna C-18 (2) 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, a aproximadamente 13,1 minutos,

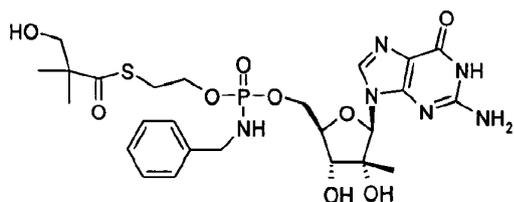
- (h) un compuesto que eluye de una columna C-18 (2) 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, a aproximadamente 17,1 minutos,
- (i) un compuesto que eluye de una columna C-18 (2) 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, a aproximadamente 25,2 minutos, y
- 5 (j) un compuesto que eluye de una columna C-18 (2) 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, a aproximadamente 26,5 minutos, donde los tiempos de retención descritos se obtienen en el método 1 de HPLC como se describe en el Ejemplo 16.

Se describe aquí un compuesto, solvato, hidrato, una forma estereoisómera o tautómera del mismo, en donde el compuesto es un metabolito del compuesto que tiene la fórmula



- 10 › y en donde el compuesto eluye de una columna C-18 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, en aproximadamente 16,4 minutos, con el método 2 de HPLC descrito en el Ejemplo 16.

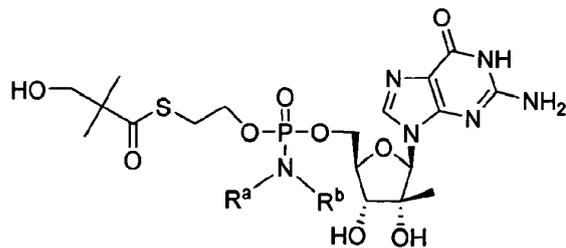
Se describe aquí un compuesto, solvato, hidrato, una forma estereoisómera o tautómera del mismo, en donde el compuesto es un metabolito del compuesto que tiene la fórmula



- 15 › y en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) un compuesto que eluye de una columna C-18, 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, en aproximadamente 38,4 minutos,
- (b) un compuesto que eluye de una columna C-18, 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, en aproximadamente 39,8 minutos,
- 20 (c) un compuesto que eluye de una columna C-18, 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, en aproximadamente 36,8 minutos,
- (d) un compuesto que eluye de una columna C-18, 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, en aproximadamente 26,8 minutos,
- 25 (e) un compuesto que eluye de una columna C-18, 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, en aproximadamente 33,8 minutos,
- (f) un compuesto que eluye de una columna C-18, 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, en aproximadamente 30,9 minutos,
- (g) un compuesto que eluye de una columna C-18, 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, en aproximadamente 4,6 minutos, y
- 30 (h) un compuesto que eluye de una columna C-18, 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula, en aproximadamente 28,1 minutos, donde los tiempos de retención descritos se obtienen en el método 1 de HPLC como se describe en el Ejemplo 15.

Se describen aquí los compuestos de la fórmula VI:

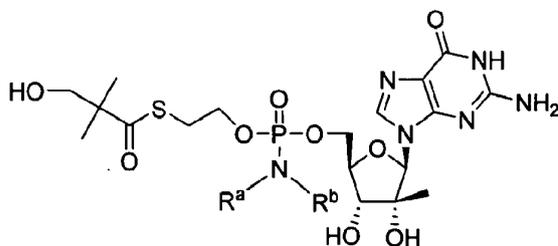


VI

o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en donde R^a y R^b se seleccionan como sigue:

- 5 i) R^a es hidrógeno; y R^b es alquilo, carboxialquilo, alcoxicarbonilalquilo o dialquilaminoalquilo; o
 ii) R^a y R^b junto con el átomo de nitrógeno sobre el que están sustituidos, forman un heterociclo de 3-7 miembros, opcionalmente sustituido con uno o dos grupos alquilo.

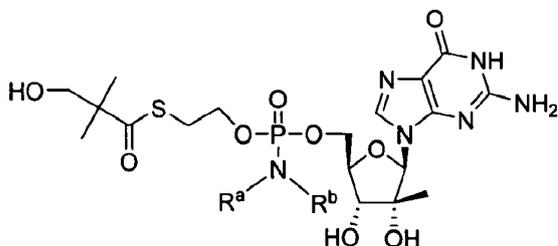
Se describen aquí los compuestos de la fórmula VIa



VIa

- 10 o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en donde las variables son como se describen en otra parte de esta memoria.

Se describen aquí los compuestos de la fórmula VIb

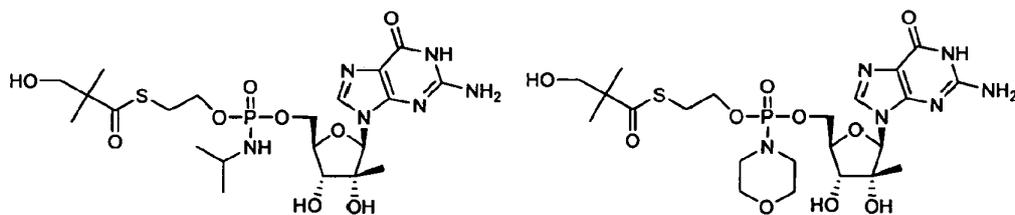


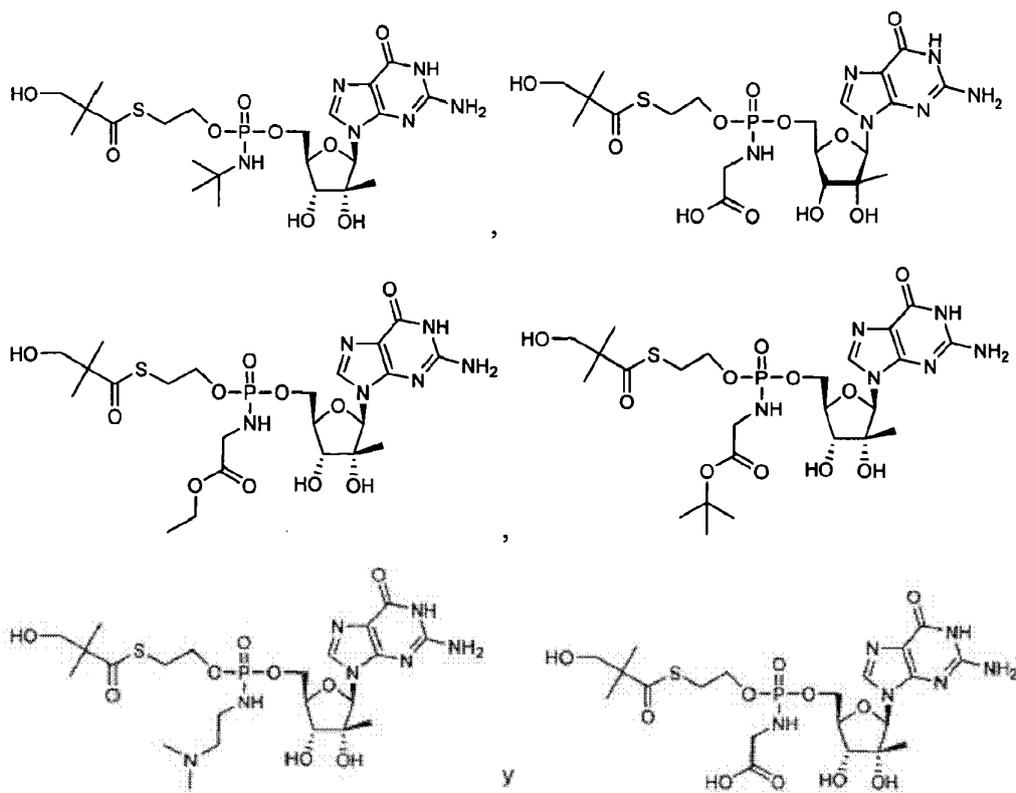
VIb

- 15 o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en donde las variables son como se describen en otra parte de esta memoria.

Por ejemplo, R^a es hidrógeno; y R^b es isopropilo, t-butilo, ciclohexilo, etoxicarbonilmetilo, t-butiloxicarbonilmetilo, carboximetilo o dimetilaminoetilo. Por ejemplo, R^a y R^b junto con el átomo de nitrógeno sobre el que están sustituidos forman un anillo de 4-metilpiperazina o morfolina.

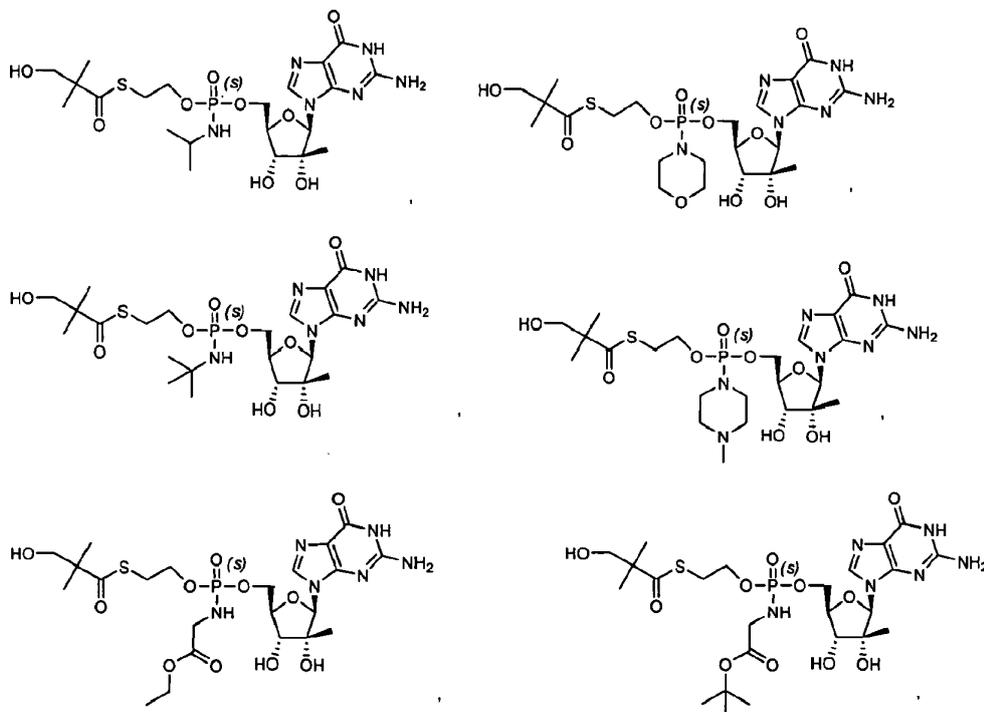
Se describe aquí un compuesto seleccionado de:

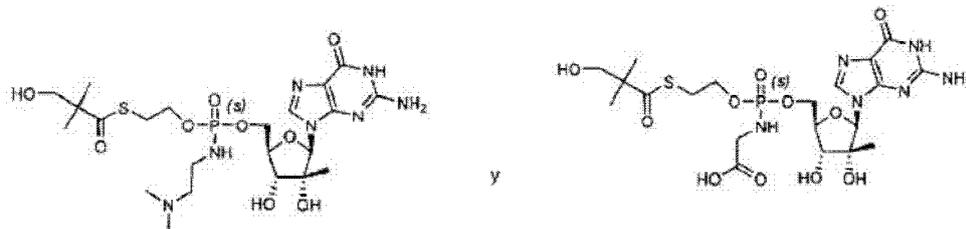




5 o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones, el compuesto proporcionado aquí es un compuesto isotópicamente enriquecido de acuerdo con este párrafo.

Se describe aquí un compuesto seleccionado de:

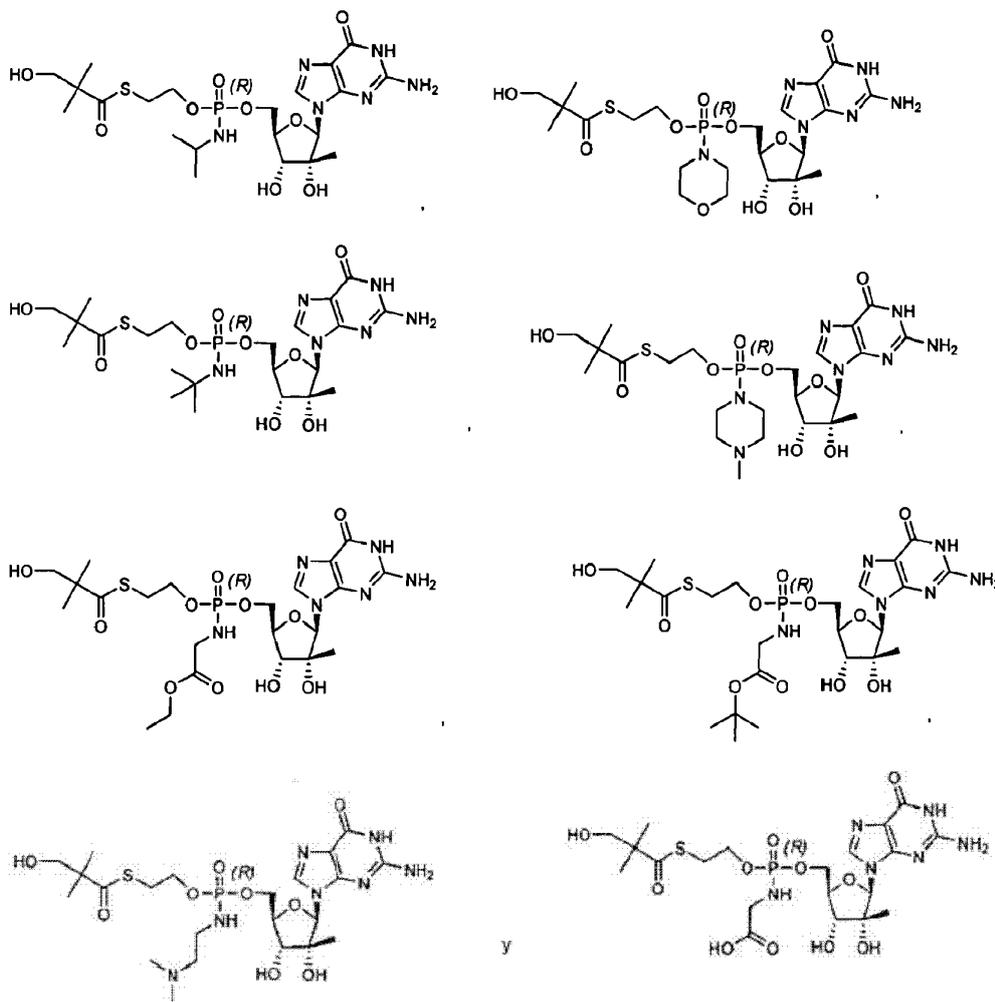




una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con este párrafo.

Se describe aquí un compuesto seleccionado de:

5



10

una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con este párrafo.

15

En ciertas realizaciones, el compuesto proporcionado aquí es un compuesto diastereoisoméricamente puro o una de sus sales, solvatos, hidratos o ésteres farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones, el compuesto proporcionado aquí es un compuesto diastereoisoméricamente puro o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones, el compuesto diastereoisoméricamente puro comprende al menos aproximadamente 80 % en peso del diastereoisómero designado y como máximo aproximadamente 20 % en peso del otro u otros estereoisómeros, al menos aproximadamente 90 % en peso del diastereoisómero designado y como máximo aproximadamente 10 % en peso del otro u otros estereoisómeros, al menos aproximadamente 95 % en peso del diastereoisómero designado y como máximo aproximadamente 5 % en peso del otro u otros estereoisómeros, al menos aproximadamente 96,6 % en peso del diastereoisómero designado y como máximo aproximadamente 3,4 % en peso del otro u otros estereoisómeros, al menos aproximadamente 97 % en peso del diastereoisómero designado y como máximo aproximadamente 3 % en peso del otro u otros estereoisómeros, al

20

menos aproximadamente 99 % en peso del diastereoisómero designado y como máximo aproximadamente 1 % en peso del otro u otros estereoisómeros, o al menos aproximadamente 99,9 % en peso del diastereoisómero designado y como máximo aproximadamente 0,1 % en peso del otro u otros estereoisómeros. En ciertas realizaciones, los pesos se basan en el peso total del compuesto.

- 5 En una realización, los compuestos proporcionados aquí se presentan en una forma sustancialmente pura.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos que se pueden dar como sales, o ésteres que, después de la administración al receptor, proporcionan directa o indirectamente un compuesto proporcionado en esta memoria o que presenta por sí mismo la actividad deseada.

- 10 También se proporcionan en esta memoria análogos isotópicamente enriquecidos de los compuestos proporcionados aquí. El enriquecimiento isotópico (por ejemplo, deuteración) de los productos farmacéuticos para mejorar los perfiles farmacocinéticos ("PK"), farmacodinámicos ("PD"), y de toxicidad, ha sido demostrado previamente con algunas clases de fármacos. Véase, por ejemplo, Lijinsky et. al., *Food Cosmet. Toxicol.*, 20: 393 (1982); Lijinsky et. al., *J. Nat. Cancer Inst.*, 69: 1127 (1982); Mangold et. al., *Mutation Res.* 308: 33 (1994); Gordon et. al., *Drug Metab. Dispos.*, 15: 589 (1987); Zello et. al., *Metabolism*, 43: 487 (1994); Gately et. al., *J. Nucl. Med.*, 27: 388 (1986); Wade D, *Chem. Biol. Interact.* 117: 191 (1999).

- 15 El enriquecimiento isotópico de un fármaco se puede usar, por ejemplo, para (1) reducir o eliminar los metabolitos indeseados, (2) aumentar la semivida del fármaco padre, (3) disminuir el número de dosis necesarias para alcanzar un efecto deseado, (4) disminuir la cantidad de una dosis necesaria para alcanzar un efecto deseado, (5) aumentar la formación de metabolitos activos, si se forma alguno, y/o (6) disminuir la producción de metabolitos perjudiciales en tejidos específicos y/o crear un fármaco más eficaz y/o un fármaco más seguro para terapia de combinación, tanto si se pretende la terapia de combinación como si no.

- 20 El reemplazamiento de un átomo por uno de sus isótopos a menudo dará como resultado un cambio en la velocidad de reacción de una reacción química. Este fenómeno es conocido como el efecto isotópico cinético ("KIE"). Por ejemplo, si se rompe un enlace C-H durante una etapa de determinación de la velocidad en una reacción química (esto es la etapa con la más alta energía del estado de transición), el reemplazo de dicho hidrógeno por un deuterio producirá una disminución en la velocidad de reacción y el proceso se hará más lento. Este fenómeno es conocido como el efecto isotópico cinético del deuterio ("DKIE"). (Véase, p.ej., Foster et al., *Adv. Drug Res.*, vol. 14, pp. 1-36 (1985); Kushner et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 77, pp. 79-88 (1999)).

- 25 La magnitud del DKIE se puede expresar como la relación entre las velocidades de una reacción dada en la que se rompe un enlace C-H, y la misma reacción cuando el hidrógeno es reemplazado por deuterio. El DKIE puede variar de aproximadamente 1 (ningún efecto isotópico) hasta números muy grandes, tales como 50 o más, que indican que la reacción puede ser cincuenta veces, o más veces, más lenta cuando el hidrógeno es reemplazado por deuterio. Los altos valores de DKIE pueden ser debidos en parte a un fenómeno conocido como tunelización, que es una consecuencia del principio de incertidumbre. La tunelización se atribuye a la pequeña masa de un átomo de hidrógeno, y tiene lugar porque los estados de transición que implican un protón se pueden formar a veces en ausencia de la energía de activación requerida. Puesto que el deuterio tiene más masa que el hidrógeno, estadísticamente tiene muchas menos probabilidades de sufrir este fenómeno.

- 30 El tritio ("T") es un isótopo radioactivo del hidrógeno, usado en investigación, reactores de fusión, generadores de neutrones y radiofármacos. El tritio es un átomo de hidrógeno que tiene 2 neutrones en el núcleo y tiene un peso atómico cercano a 3. Se presenta naturalmente en el ambiente a muy bajas concentraciones, en su mayor parte se encuentra como T₂O. El tritio se desintegra lentamente (período de semidesintegración = 12,3 años) y emite una partícula beta de baja energía que no puede penetrar la capa exterior de la piel humana. La exposición interna es el principal peligro asociado con este isótopo, pero debe ser ingerido en grandes cantidades para que represente un riesgo importante para la salud. En comparación con el deuterio, se debería consumir una menor cantidad de tritio antes de que alcance un nivel peligroso. El reemplazo de hidrógeno por tritio ("T") da como resultado un enlace más fuerte que el deuterio y produce efectos isotópicos numéricamente más grandes. Similarmente, el reemplazo de otros elementos por isótopos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, ¹³C o ¹⁴C para reemplazar a carbono, ³³S, ³⁴S, o ³⁶S para reemplazar a azufre, ¹⁵N para nitrógeno, y ¹⁷O u ¹⁸O para oxígeno, proporcionará efectos isotópicos cinéticos similares.

- 35 Por ejemplo, se utilizó el DKIE para disminuir la hepatotoxicidad de halotano presumiblemente al limitar la producción de especies reactivas tales como cloruro de trifluoroacetilo. Sin embargo, este método puede no ser aplicable a todas las clases de fármacos. Por ejemplo, la incorporación de deuterio puede llevar a un cambio metabólico. El concepto de cambio metabólico asegura que los elementos xenógenos, cuando son secuestrados por enzimas de Fase I, se pueden unir transitoriamente y volver a unirse en una variedad de conformaciones antes de la reacción química (p.ej., oxidación). Esta hipótesis es avalada por el tamaño relativamente extenso de los sitios de unión de muchas enzimas de Fase I y la naturaleza promiscua de muchas reacciones metabólicas. El cambio metabólico puede llevar potencialmente a diferentes proporciones de metabolitos conocidos así como a metabolitos totalmente nuevos. Este nuevo perfil metabólico puede conferir más o menos toxicidad.

El cuerpo animal expresa una variedad de enzimas con el fin de eliminar sustancias extrañas, tales como los agentes terapéuticos, de su sistema de circulación. Ejemplos de tales enzimas incluyen las enzimas del citocromo P450 ("CYP"), esterasas, proteasas, reductasas, deshidrogenasas, y monoaminooxidasas, que reaccionan con estas sustancias extrañas y las convierten en intermedios o metabolitos más polares para excreción renal. Algunas de las reacciones metabólicas más comunes de los compuestos farmacéuticos incluyen la oxidación de un enlace carbono-hidrógeno (C-H) a un enlace pi carbono-oxígeno (C-O) o carbono-carbono (C-C). Los metabolitos resultantes pueden ser estables o inestables en condiciones fisiológicas, y pueden tener perfiles farmacocinéticos, farmacodinámicos, y de toxicidad aguda y a largo plazo sustancialmente diferentes con respecto a los compuestos parentales. Para muchos fármacos, dichas oxidaciones son rápidas. Por lo tanto estos fármacos requieren a menudo la administración de dosis diarias múltiples o altas.

Por lo tanto, el enriquecimiento isotópico en ciertas posiciones de un compuesto proporcionado en esta memoria producirá un KIE detectable que afectará a los perfiles farmacocinéticos, farmacológicos, y/o toxicológicos de un compuesto proporcionado aquí en comparación con un compuesto similar que tiene una composición isotópica natural.

15 Preparación de compuestos

Los compuestos proporcionados aquí se pueden preparar, aislar u obtener por cualquier método evidente para los expertos en la técnica. Se describen ejemplos de métodos de preparación en los ejemplos que siguen. El Compuesto 1 se puede preparar por métodos descritos en la solicitud de Estados Unidos N° 12/005.937, presentada el 27 de diciembre de 2007.

Se debe apreciar que los compuestos proporcionados en esta memoria tienen varios centros quirales y pueden existir y ser aislados en formas ópticamente activas y diastereoisómeras. Algunos compuestos pueden presentar polimorfismo. Se debe entender que cualquier forma racémica, ópticamente activa, diastereoisómera, polimórfica, o estereoisómera, o mezclas de las mismas, de un compuesto proporcionado en esta memoria, que tiene las propiedades útiles descritas en esta memoria, está dentro del alcance de la materia que se reivindica. Es bien conocido en la técnica cómo preparar las formas ópticamente activas (por ejemplo, por resolución de la forma racémica por técnicas de recristalización, por síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, por síntesis quiral, o por separación cromatográfica utilizando una fase estacionaria quiral).

Los ejemplos de métodos para obtener materiales diastereoisoméricamente puros son conocidos en la técnica, e incluyen al menos los siguientes y cualquier combinación de los mismos:

- 30 i) cristalización fraccionada - una técnica por la que se separan los diastereoisómeros mediante cristalización fraccionada en virtud de la diferencia en sus solubilidades;
- ii) destilación fraccionada - una técnica por la que se separan los diastereoisómeros mediante destilación fraccionada en virtud de la diferencia en sus puntos de ebullición;
- 35 iii) separación cromatográfica - una técnica por la que se separan los diastereoisómeros en una fase móvil líquida en virtud de sus diferentes interacciones con una fase estacionaria;
- iv) síntesis química asimétrica - una técnica sintética por la que se sintetiza el diastereoisómero deseado a partir de un precursor aquiral en condiciones que producen asimetría (esto es, quiralidad) en el producto, lo que se puede conseguir utilizando catalizadores quirales o auxiliares quirales.

Los compuestos proporcionados en esta memoria se pueden preparar por una de las técnicas descritas aquí o por una combinación de técnicas, si fuera necesario.

Métodos de ensayo

Los compuestos se pueden valorar en cuanto a su actividad sobre el VHC según cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica. Además, los compuestos se pueden valorar en cuanto a su acumulación en las células del hígado de un sujeto según cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, se puede administrar un compuesto al sujeto, y se puede analizar una célula hepática del sujeto para determinar el compuesto o uno de sus derivados, p.ej. un nucleósido, fosfato de nucleósido o trifosfato de nucleósido derivado del mismo.

En una realización, un compuesto proporcionado aquí se administra a células, tales como células hepáticas, *in vivo* o *in vitro*, y se miden los niveles de trifosfato de nucleósido liberado intracelularmente, que indica la liberación del correspondiente compuesto y la trifosforilación en la célula. El nivel de trifosfato de nucleósido intracelular se puede medir utilizando métodos analíticos conocidos en la técnica.

Usos en los métodos

En una realización, los compuestos proporcionados aquí pueden tener una mejor liberación al hígado. En algunas realizaciones, los compuestos permiten liberar al hígado un 5'-monofosfato de un nucleósido activo, lo que puede mejorar la formación de un compuesto trifosforilado activo.

5 En una realización, se proporcionan aquí compuestos para uso en métodos para el tratamiento y/o profilaxis de un hospedante infectado con *Flaviviridae*, que incluye la administración de una cantidad eficaz de un compuesto proporcionado aquí, o una de sus sales, estereoisómeros, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables. En una realización, se proporcionan aquí compuestos para uso en métodos para tratar una infección de VHC en un sujeto. En ciertas realizaciones, los métodos engloban la etapa de administrar al sujeto que lo necesite una cantidad de un compuesto eficaz para el tratamiento o prevención de una infección de VHC en combinación con un segundo agente eficaz para el tratamiento o prevención de la infección. El compuesto puede ser cualquier compuesto descrito en esta memoria, y el segundo agente puede ser cualquier segundo agente descrito en la técnica o en esta memoria. En ciertas realizaciones, el compuesto está en la forma de una composición farmacéutica o forma farmacéutica, como se ha descrito en las secciones anteriores.

15 Los miembros de la familia *Flaviviridae* que pueden ser tratados se exponen en general en Fields Virology, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, Chapter 31, 1996. En una realización particular, el miembro de las *Flaviviridae* es el VHC. En una realización alternativa, el miembro de las *Flaviviridae* es un flavivirus o pestivirus. Los flavivirus específicos incluyen, sin limitación: Absettarov, Alfuy, Apoi, Aroa, Bagaza, Banzi, Bouboui, Bussuquara, Cacipacore, Carey Island, Dakar bat, Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3, Dengue 4, Edge Hill, Entebbe bat, Gadgets Gully, Hanzalova, Hypr, Ilheus, meningoencefalitis del pavo de Israel, encefalitis japonesa, Jugra, Jutiapa, Kadam, Karshi, Kedougou, Kokobera, Koutango, Kumlinge, Kunjin, enfermedad de la selva de Kyasanur, Langat, Louping ill, Meaban, Modoc, leucoencefalitis de myotis de Montana, encefalitis de Murray valley, Naranjal, Negishi, Ntaya, fiebre hemorrágica de Omsk, Phnom-Penh bat, Powassan, Rio Bravo, Rocio, Royal Farm, encefalitis rusa de primavera-verano, Saboya, encefalitis de S. Luis, Sal Vieja, San Perlita, Saumarez Reef, Sepik, Sokuluk, Spondweni, Stratford, Tembusu, Tyuleniy, Uganda S, Usutu, Wesselsbron, West Nile, Yaounde, Fiebre amarilla, y Zika.

Los pestivirus que se pueden tratar están expuestos en general en Fields Virology, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, Chapter 33, 1996. Los pestivirus específicos incluyen, sin limitación: el virus de la diarrea vírica bovina ("BVDV"), el virus de la fiebre porcina clásica ("CSFV," denominado también virus del cólera porcino), y el virus de la enfermedad de la frontera ("BDV")

En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser cualquier sujeto infectado, o en riesgo de infección con el VHC. La infección o el riesgo de infección se puede determinar según cualquier método considerado adecuado por los profesionales expertos en la técnica. En una realización, los sujetos son seres humanos infectados con VHC y/o VHB.

35 En ciertas realizaciones, el sujeto no ha recibido nunca ninguna terapia ni profilaxis para una infección de VHC y/o de VHB. En otras realizaciones, el sujeto ha recibido previamente terapia o profilaxis para una infección de VHC y/o de VHB. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el sujeto no ha respondido a una terapia de VHC y/o de VHB. Por ejemplo, con la terapia actual de interferón, hasta el 50 % o más de los sujetos con VHC no responden a la terapia. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto que recibió terapia pero continuó sufriendo la infección vírica o uno o más síntomas de la misma. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto que recibió terapia pero no alcanzó una respuesta virológica sostenida. En ciertas realizaciones, el sujeto ha recibido terapia para una infección de VHC pero no ha presentado, por ejemplo, una reducción de 2 log₁₀ en los niveles de ARN de VHC después de 12 semanas de terapia. Se cree que los sujetos que no han presentado más de 2 log₁₀ de reducción en el ARN de VHC en suero después de 12 semanas de terapia tienen una posibilidad de 97-100 % de no responder al tratamiento.

45 En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto que discontinuó una terapia de VHC debido a uno o más efectos adversos asociados con la terapia. En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto para el que la terapia actual no está indicada. Por ejemplo, ciertas terapias para VHC se asocian con sucesos neuropsiquiátricos. El interferón (IFN)-alfa más ribavirina se asocia con una alta tasa de depresión. Los síntomas depresivos han sido ligados a un peor resultado en una serie de trastornos médicos. Los sucesos neuropsiquiátricos que son fatales o que ponen en peligro la vida, incluyendo el suicidio, las ideas suicidas u homicidas, depresión, recaídas de adicción/sobredosis de drogas, y comportamiento agresivo han tenido lugar en sujetos con y sin un trastorno psiquiátrico previo durante la terapia de VHC. La depresión inducida por interferón es una limitación para el tratamiento de la hepatitis C crónica, especialmente para sujetos con trastornos psiquiátricos. Los efectos secundarios psiquiátricos son comunes con la terapia de interferón y son responsables de aproximadamente 10 % a 20 % de las discontinuaciones de la terapia actual para la infección de VHC.

Por consiguiente, se proporcionan compuestos para uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección de VHC en sujetos en los que el riesgo de sucesos neuropsiquiátricos, tales como depresión, hace que esté contraindicado el tratamiento con la terapia actual del VHC. En una realización, se proporcionan compuestos para uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección de VHC en sujetos en los que un suceso

neuropsiquiátrico, tal como depresión, o riesgo de depresión, indica la discontinuación de tratamiento con la terapia actual del VHC. Además se proporcionan compuestos para uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección de VHC en sujetos en los que un suceso neuropsiquiátrico, tal como depresión, o riesgo de depresión, indica una reducción de la dosis en la terapia actual del VHC.

- 5 La terapia actual está contraindicada también en sujetos que son hipersensibles al interferón o a la ribavirina, o a ambos, o a cualquier otro componente de un producto farmacéutico para la administración de interferón o ribavirina. La terapia actual no está indicada en sujetos con hemoglobinopatías (p.ej., talasemia mayor, anemia de células falciformes) y en otros sujetos que tienen riesgo de efectos secundarios hematológicos con la terapia actual. Los efectos secundarios hematológicos comunes incluyen supresión de la médula ósea, neutropenia y trombocitopenia.
- 10 Además, la ribavirina es tóxica para los glóbulos rojos y se asocia con la hemólisis. Por consiguiente, en una realización, se proporcionan compuestos para uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección de VHC en sujetos hipersensibles al interferón o a la ribavirina, o a ambos, en sujetos con una hemoglobinopatía, por ejemplo sujetos con talasemia mayor y sujetos con anemia de células falciformes, y en otros sujetos en riesgo de efectos secundarios hematológicos con la terapia actual.
- 15 En ciertas realizaciones, el sujeto ha recibido una terapia de VHC y ha discontinuado dicha terapia antes de la administración de los compuestos para uso en un método proporcionado en esta memoria. En otras realizaciones, el sujeto ha recibido terapia y continúa recibiendo dicha terapia junto con la administración de los compuestos para uso en un método proporcionado en esta memoria. Los compuestos para uso en dichos métodos pueden ser co-
- 20 administrados con otra terapia para VHC según el criterio de los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, los compuestos para uso en los métodos o composiciones proporcionados en esta memoria pueden ser co-

administrados con una dosis reducida de la otra terapia para VHC.

En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos para uso en métodos de tratamiento a un sujeto que es refractario al tratamiento con interferón. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto que no ha respondido al tratamiento con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en interferón, interferón α , interferón α pegilado, interferón más ribavirina, interferón α más ribavirina e interferón α pegilado más ribavirina.

25 En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto que ha respondido deficientemente al tratamiento con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en interferón, interferón α , interferón α pegilado, interferón más ribavirina, interferón α más ribavirina e interferón α pegilado más ribavirina. Se puede usar también una forma pro-fármaco de ribavirina, tal como taribavirina.

- 30 En ciertas realizaciones, el sujeto tiene, o está en riesgo de tener co-infección de VHC con el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana). Por ejemplo, en los Estados Unidos, el 30 % de los sujetos con VIH están co-infectados con VHC y las pruebas indican que las personas infectadas con VIH tienen una evolución mucho más rápida de su infección de hepatitis C. Maier and Wu, 2002, World J Gastroenterol 8:577-57. Los compuestos para uso en los métodos proporcionados aquí se pueden usar para tratar o prevenir la infección por VHC en tales sujetos. Se cree que la eliminación de VHC en estos sujetos reducirá la mortalidad debida a la etapa final de la enfermedad hepática.
- 35 De hecho, el riesgo de enfermedad hepática progresiva es más alto en los sujetos con inmunodeficiencia severa definida por el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) que en los que no la tienen. Véase, p.ej., Lesens et al., 1999, J Infect Dis 179:1254-1258. En una realización, los compuestos proporcionados en esta memoria han demostrado que inhiben el VIH en sujetos con VIH. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se proporcionan
- 40 compuestos para uso en métodos de tratamiento o prevención de la infección de VIH y de la infección de VHC en sujetos que lo necesiten.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones se administran a un sujeto después de un trasplante de hígado. La hepatitis C es una causa principal de trasplante de hígado en los Estados Unidos, y muchos sujetos que sufren trasplante de hígado siguen siendo VHC positivos después del trasplante. En una realización, se

45 proporcionan compuestos para uso en métodos de tratamiento a dichos sujetos con VHC recurrente con un compuesto o composición proporcionados en esta memoria. En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos para uso en métodos de tratamiento a un sujeto antes, durante o después del trasplante de hígado para prevenir la infección recurrente de VHC.

- 50 En ciertas realizaciones, los compuestos de la fórmula I proporcionados en esta memoria son útiles como marcadores o patrones para evaluar el metabolismo del Compuesto 1 en un sujeto, incluyendo un ser humano.

Segundos agentes terapéuticos

- En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones proporcionados aquí se pueden usar en un método de tratamiento de un trastorno hepático, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto proporcionado en esta memoria y administrar además una cantidad efectiva de un segundo agente eficaz para tratar el trastorno, tal como una infección por VHC, a un sujeto que lo necesite. El segundo agente puede ser cualquier agente conocido por los expertos en la técnica como eficaz para el tratamiento del trastorno, incluyendo los aprobados actualmente por la FDA.
- 55

En ciertas realizaciones, un compuesto proporcionado aquí se administra en combinación con un segundo agente. En otras realizaciones, un compuesto proporcionado aquí se administra en combinación con dos segundos agentes. En otras realizaciones más, un compuesto proporcionado aquí se administra en combinación con dos o más segundos agentes.

- 5 Como se usa aquí, el término "en combinación" incluye el uso de más de una terapia (p.ej., uno o más agentes profilácticos y/o agentes terapéuticos). El uso del término "en combinación" no restringe el orden en el que se administren las terapias (p.ej., agentes profilácticos y/o agentes terapéuticos) a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, una primera terapia (p.ej., un agente profiláctico o terapéutico tal como un compuesto proporcionado aquí) se puede administrar antes (p.ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 10 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), concomitantemente, o posteriormente (p.ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) a la administración de una segunda terapia (p.ej., un agente profiláctico o terapéutico) a un sujeto con un trastorno.
- 15 Como se usa aquí, el término "sinérgico" incluye una combinación de un compuesto proporcionado en esta memoria y otra terapia (p.ej., un agente profiláctico o terapéutico) que ha sido o está siendo actualmente usada para prevenir, controlar o tratar un trastorno, cuya combinación es más eficaz que los efectos aditivos de las terapias individuales. Un efecto sinérgico de una combinación de terapias (p.ej., una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos) puede permitir el uso de dosis más bajas de una o más de las terapias y/o la administración menos frecuente de dichas terapias a un sujeto que lo necesite. La posibilidad de utilizar dosis más bajas de una terapia (p.ej., un agente 20 profiláctico o terapéutico) y/o de administrar dicha terapia con menos frecuencia puede reducir cualquier toxicidad asociada con la administración de dicha terapia a un sujeto sin reducir la eficacia de dicha terapia en la prevención o tratamiento de un trastorno. En adición, un efecto sinérgico puede dar como resultado una mejor eficacia de los agentes en la prevención o tratamiento de un trastorno. Finalmente, un efecto sinérgico de una combinación de 25 terapias (p.ej., una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos) puede evitar o reducir los efectos secundarios adversos o indeseados asociados con el uso de cualquiera de las terapias sola.

Los compuestos activos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con otro agente terapéutico, en particular un agente anti-VHC o anti hepatitis B. Los compuestos activos se pueden administrar a dosis seleccionadas por un profesional experto en la técnica. Por ejemplo, las dosis dadas pueden depender de las tasas de absorción, inactivación y excreción del fármaco así como de otros factores conocidos por los expertos en la 30 técnica. Se debe observar que las dosis pueden variar también con la gravedad de la enfermedad a ser aliviada. Se debe entender además que para cualquier sujeto particular, las dosis y programas específicos pueden ser ajustados a lo largo del tiempo según las necesidades individuales y a criterio del profesional que administra o supervisa la administración de las composiciones. En ciertas realizaciones, es útil un compuesto anti-VHC (o anti-pestivirus o 35 anti-flavivirus) que presenta una EC_{50} de 10-15 μM , o preferiblemente inferior a 1-5 μM .

Se ha reconocido que pueden aparecer variantes de flavivirus, pestivirus o VHC resistentes a los fármacos después de un tratamiento prolongado con un agente antiviral. La resistencia a fármacos aparece más típicamente por mutación de un gen que codifica una enzima usada en la replicación vírica. La eficacia de un fármaco frente a la infección vírica se puede prolongar, aumentar, o restablecer administrando el compuesto en combinación con un 40 segundo, o quizás un tercer compuesto antiviral que induce una mutación diferente de la causada por el fármaco inicial. Alternativamente, la farmacocinética, biodistribución u otros parámetros del fármaco se pueden alterar por dicha terapia de combinación. En ciertas realizaciones, se puede usar la terapia de administración concomitante porque puede inducir un estrés múltiple simultáneo sobre el virus.

Cualquiera de los tratamientos virales descritos en la sección de los antecedentes se pueden usar en combinación con los compuestos descritos en esta memoria descriptiva. 45

Ejemplos de segundos agentes para el tratamiento de VHC

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con un inhibidor de la proteasa del virus de la hepatitis C. Los inhibidores de la proteasa útiles incluyen, pero no se limitan a TMC435350 (Medivir/Tibotec, Huddinge, Sweden); ITMN-191 (R-7227; InterMune Pharma., Inc., Brisbane, CA), 50 ACH-806 (GS-9132; Achillion Pharma., Inc., New Haven, CT), ACH-1095 (Achillion Pharma., Inc.), BI 12202 (Boehringer Ingelheim, Ingelheim Germany), ciluprevir (BILN-2061; Boehringer Ingelheim), MK-7009 (Merck Pharma., Inc., Whitehouse Station, NJ), boceprevir (SCH 503034; Schering-Plough, Kenilworth, NJ), SCH 446211 (SCH6; Schering-Plough), SCH 351633 (Schering-Plough), y telaprevir (VX-950; Vertex Pharma., Inc., Cambridge, MA).

55 En ciertas realizaciones, los inhibidores de la proteasa del virus de la hepatitis C útiles incluyen, pero no se limitan a inhibidores de la proteasa NS3 basados en sustratos (documento WO 98/22496; Attwood et al., Antiviral Chemistry and Chemotherapy 1999, 10, 259-273; publicación de patente alemana DE 19914474; y documento WO 98/17679), incluyendo alfacetoamidas e hidrazinoureas, y los inhibidores que terminan en un electrófilo tal como un ácido borónico o fosfonato (documento WO 99/07734); inhibidores de la proteasa NS3 no basados en sustratos tales como

derivados de 2,4,6-trihidroxi-3-nitro-benzamida (Sudo K. et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 238, 643-647; Sudo K. et al. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 1998, 9, 186), incluyendo RD3-4082 y RD3-4078, el primero sustituido sobre la amida con una cadena de 14 carbonos y el último procesando un grupo para-fenoxifenilo; y Sch 68631, una fenantrenoquinona (Chu M. et al., *Tetrahedron Letters* 37:7229-7232, 1996).

En ciertas realizaciones, los inhibidores de la proteasa del virus de la hepatitis C útiles incluyen, pero no se limitan a eglina c (Qasim M.A. et al., *Biochemistry* 36:1598-1607, 1997); inhibidores de la cisteína proteasa para inhibir la endopeptidasa 2 del VHC (Patente de Estados Unidos N° 6.004.933); inhibidores sintéticos de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C (Patente de Estados Unidos N° 5.990.276); tripéptidos inhibidores (Patentes de Estados Unidos Números 6.534.523, 6.410.531, y 6.420.380, y WO 02/060926); péptidos de diarilo (documento WO 02/48172 y Patente de Estados Unidos N° 6.911.428); e imidazolidinonas (documentos WO 02/08198, WO 02/48157, y Patentes de Estados Unidos Números 6.727.366 y 6.838.475).

En ciertas realizaciones, los inhibidores de la serina proteasa del virus de la hepatitis C útiles incluyen, pero no se limitan a los inhibidores de la serina proteasa de VHC proporcionados en la Patente de Estados Unidos N° 6.872.805; documento WO 2006000085; Patente de Estados Unidos N° 7.208.600; Patente de Estados Unidos publicación N° 2006/0046956; documento WO 2007/001406 (Chiron); Patente de Estados Unidos publicación N° 2005/0153877; documento WO 2006/119061 (Merck); documento WO 00/09543; Patente de Estados Unidos N° 6.323.180; documento WO 03/064456; Patente de Estados Unidos N° 6.642.204; documento WO 03/064416; Patente de Estados Unidos N° 7.091.184; documento WO 03/053349; Patente de Estados Unidos N° 6.867.185; documento WO 03/099316; Patente de Estados Unidos N° 6.869.964; documento WO 03/099274; Patente de Estados Unidos N° 6.995.174; documento WO 2004/032827; Patente de Estados Unidos N° 7.041.698; documento WO 2004/043339, Patente de Estados Unidos N° 5.538.865; documento WO 02/008251; Patente de Estados Unidos N° 7.169.760; Patente de Estados Unidos publicación N° 2005/176648; documento WO 02/08187; documento WO 02/008256; documento WO 98/17679; Patente de Estados Unidos N° 6.265.380; documento WO 02/48116; Patente de Estados Unidos N° 6.653.295; y Patente US 6.878.722.

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con un derivado de tiazolidina que muestra una inhibición relevante en un ensayo de HPLC de fase inversa con una proteína de fusión NS3/4A y sustrato NS5A/5B (Sudo K. et al., *Antiviral Research*, 1996, 32, 9-18). Los derivados de tiazolidina útiles incluyen, pero no se limitan a RD-1-6250 (que tiene un resto de cinamoilo condensado sustituido con una cadena alquílica larga), RD4 6205, y RD4 6193.

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con una tiazolidina y/o con una benzanilida (Kakiuchi N. et al. *J. EBS Letters* 421, 217-220; Takeshita N. et al. *Analytical Biochemistry*, 1997, 247, 242-246).

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con una fenantrenoquinona que tiene actividad frente a la proteasa en un ensayo SDS-PAGE y ensayo de autorradiografía, aislada del caldo de cultivo de fermentación de *Streptomyces* sp. Las fenantrenoquinonas útiles incluyen, pero no se limitan a SCH 68631 (Chu M. et al., *Tetrahedron Letters*, 1996, 37, 7229-7232) y SCH 351633 (Chu M. et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9, 1949-1952).

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con un inhibidor de la helicasa (Patente de Estados Unidos N° 5.633.358; documento WO 97/36554);

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con un inhibidor nucleótido de la polimerasa. Los inhibidores nucleótidos de la polimerasa útiles incluyen, pero no se limitan a gliotoxina (Ferrari R. et al. *Journal of Virology*, 1999, 73, 1649-1654), y cerulenina (Lohmann V. et al., *Virology*, 1998, 249, 108-118);

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con antivirales basados en ARN interferente (ARNi). Los antivirales basados en ARNi útiles incluyen, pero no se limitan a antivirales basados en ARN interferente corto (siARN), tales como Sirna-034 y otros descritos en los documentos WO/03/070750, WO 2005/012525, y en la Publicación de patente de Estados Unidos N° US 2004/0209831, y antivirales basados en microARN, tales como miR-122 (Pan Q-W. et al., *World J. Gastroenterol.*, 2007, 13, 4431-4436).

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con un oligodesoxinucleótido antisentido con fosforotioato (S-ODN) complementario a tramos de secuencia en la región no codificadora 5' (NCR) del virus (Alt M. et al., *Hepatology*, 1995, 22, 707-717), o los nucleótidos 326-348 que comprenden el extremo 3' de la NCR y los nucleótidos 371-388 localizados en la región codificadora del núcleo del ARN de VHC (Alt M. et al., *Archives of Virology*, 1997, 142, 589-599; Galderisi U. et al., *Journal of Cellular Physiology*, 1999, 181, 251-257).

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con un inhibidor de la traducción dependiente del IRES (Publicación de la patente japonesa JP-08268890; Publicación de la patente japonesa JP-10101591).

5 En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con una ribozima. Las ribozimas útiles incluyen, pero no se limitan a ribozimas resistentes a la nucleasa (Maccjak, D. J. et al., *Hepatology* 1999, 30, abstract 995), HEPTAZYME® (Ribozyme Pharma. Inc., Boulder, CO), y las ribozimas descritas en las Patentes de Estados Unidos Números 6.043.077, 5.869.253, y 5.610.054.

10 En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con cualquiera de los compuestos descritos por Idenix Pharmaceuticals en las publicaciones internacionales números WO 01/90121, WO 01/92282, WO 2004/003000, 2004/002422, y WO 2004/002999.

15 En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con uno o más análogos de nucleósidos. Los análogos de nucleósidos útiles incluyen, pero no se limitan a los análogos de nucleósidos descritos en los documentos PCT/CA00/01316 (WO 01/32153) y PCT/CA01/00197 (WO 01/60315); WO 02/057425); WO 02/057287; Patentes de Estados Unidos Números 7.202.224, 7.125.855, 7.105.499, y 6.777.395; PC17 EP01/09633 (WO 02/18404); Publicaciones de patentes de Estados Unidos números 2006/0040890, 2005/0038240, y 2004/0121980; Patentes de Estados Unidos Números 6.846.810, 6.784.166, y 6.660.721; Publicaciones PCT números WO 01/79246, WO 02/32920, y WO 02/48165; US 2005/0009737; publicación de patente de Estados Unidos N° 2005/0009737; y Patentes de Estados Unidos Números 7.094.770 y 6.927.291.

20 En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con uno o más segundos agentes. Los segundos agentes útiles incluyen, pero no se limitan a 2'-fluoronucleósidos (documento WO 99/43691), 1-amino-alkilciclohexanos (Patente de Estados Unidos N° 6.034.134), lípidos alquílicos (Patente de Estados Unidos N° 5.922.757), vitamina E y otros antioxidantes (Patente de Estados Unidos N° 5.922.757), escualeno, amantadina, ácidos biliares (Patente de Estados Unidos N° 5.846.964), ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspartico, (Patente de Estados Unidos N° 5.830.905), bencenodicarboxamidas (Patente de Estados Unidos N° 5.633.388), derivados de ácido poliadenílico (Patente de Estados Unidos N° 5.496.546), 2',3'-didesoxiinosina (Patente de Estados Unidos N° 5.026.687), bencimidazoles (Patente de Estados Unidos N° 5.891.874), extractos de plantas (Patentes de Estados Unidos Números 5.837.257, 5.725.859, y 6.056.961), y piperidenos (Patente de Estados Unidos N° 5.830.905).

30 En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con un interferón anti virus de la hepatitis C. Los interferones útiles incluyen, pero no se limitan a INTRON A® (interferón alfa-2b; Schering-Plough, Inc.) y PEGASYS® (Peginterferón alfa-2a; Hoffmann-LaRoche, Inc., Nutley, NJ); ROFERON A® (interferón alfa-2a recombinante; Hoffmann-LaRoche, Inc.), INFERGEN® (interferón de consenso; interferón alfacon-1; Three Rivers Pharma., Cranberry Township, PA PEG-INTRON® (interferón alfa-2b pegilado; Schering-Plough, Inc.), y PEGASYS® (interferón alfa-2a pegilado; Hoffmann-LaRoche, Inc.).

35 En ciertas realizaciones, los interferones anti virus de la hepatitis C útiles incluyen, pero no se limitan a INFERGEN®, IL-29 (PEG-Interferón lambda; ZymoGenetics, Inc., Seattle, WA), ACTIMMUNE® (interferón gamma-1b; Intermune, Inc.), R7025 (Maxy-alpha; Maxygen, Redwood City, CA), BELEROFON (Nautilus Biotech., Evry, France), Interferón alfa oral (Amarillo Biosciences, Inc., Amarillo, TX), LOCTERON® (BLX-883; OctoPlus, Inc., Cambridge, MA), interferón omega (Intarcia Therapeutics, Inc. Hayward, CA), MULTIFERON® (Viragen, Inc., Plantation, FL), OMNIFERON™ (Viragen, Inc.), interferón medusa (Flamel Technologies, Inc., Venissieux Cedex, France), WELLFERON® (GlaxoSmithKline, Philadelphia, PA), ALBUFERON® (Human Genome Sciences, Inc., Rockville, MD), REBETRON® (Schering-Plough, Inc.), y REBIF® (interferón β-1a; Serono, Inc., Rockland, MA).

45 En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con un inhibidor de la polimerasa del virus de la hepatitis C. Los inhibidores de la polimerasa útiles incluyen, pero no se limitan a REBETOL® (ribavirina; Schering-Plough, Inc.), levovirina (ICN Pharma., Costa Mesa, CA), VIRAMIDINE® (Valeant Pharma. International, Aliso Viejo, CA), MK-0608 (7-desaza-2'-C-metiladenosina; Merck Pharma. Inc.), 7-desaza-MK-0608 (7-desaza-7-fluoro-2'-C-metiladenosina; Merck Pharma. Inc.), NM 283 (valopicitabina; Idenix Pharma., Inc., Cambridge, MA), PSI-6130 (2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina; Hoffmann-LaRoche, Inc.), 2'-O-metilcitidina (Carroll, S.S. et al., *J Biol. Chem.*, 2003, 278, 11979-11984), 2'-C-metiladenosina (Tomassini, J.E. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49, 2050-2058; Migliaccio, G. et al., *J Biol. Chem.*, 2003, 278, 49164-49170), 2'-C-metilguanosina (Migliaccio, G. et al., *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 49164-49170; Eldrup, A.B. et al., *J Med. Chem.*, 2004, 47, 2283-2295), R1479 (4'-azidocitidina; Hoffmann-LaRoche, Inc.), ANA598 (Anadys Pharma. Inc., San Diego, CA), R1626 (Hoffmann-LaRoche, Inc.), RO-0622 (análogo de 4'-azido-2'-desoxinucleósido, Roche Palo Alto, LLC, Palo Alto, CA), GL-59728 (Genelabs Technologies, Inc., Redwood City, CA), GL-60667 (Genelabs Technologies, Inc.), y R7128 (Pharmasset, Inc., Princeton, NJ).

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con un inhibidor no nucleósido de la polimerasa del virus de la hepatitis C. Los inhibidores no nucleósidos de la polimerasa útiles incluyen, pero no se limitan a BILB1941 (Boehringer Ingelheim), HVC-796 (ViroPharma, Inc., Exton, PA), DKA

compuesto 30 (Summa, V. et al., J Med. Chem., 2004, 47, 14-17; Summa, V. et al., J Med Chem., 2004, 47, 5336-5339), un derivado de bencimidazol-5-carboxamida (Beaulieu, P.L. et), un derivado de indol-N-acetamida (Di Marco, S. et al., J. Biol. Chem., 2005, 280, 29765-29770; Harper, S. et al., J. Med Chem., 2005, 48, 1314-1317), un derivado de benzotiadiazina (Dhanak, D. et al., J Biol. Chem., 2002, 277, 38322-38327; Tomei, L. et al., J. Virol., 2004, 78, 938-946), un derivado de fenilalanina (Wang, M. et al., J Biol. Chem., 2003, 278, 9489-9495), un derivado de ácido tiofen-2-carboxílico (Chan, L. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004, 14, 793-796; Biswal, B.K. et al., J Biol. Chem., 2005, 280, 18202-18210), un derivado de dihidropirona (De Clercq, E., Nat. Rev. Fármaco Dis., 2007, 6, 1001-1018), el derivado de ácido tetrahidropiranoindolil-acético HCV-371 (Howe, A.Y. et al., Antimicrob. Agents Chemother., 2004, 48, 4813-4821), y una serie de 5-hidroxi-3(2H)-piridazinonas (Zhou, Y. et al., Antiviral Res., 2007, 74, A38, abstract 27; Zhou, Y. et al., Antiviral Res., 2007, 74, A51-A52, abstract 59).

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con ribavarina y un interferón anti virus de la hepatitis C. Los interferones útiles incluyen, pero no se limitan a INTRON A® (interferón alfa-2b) y PEGASYS® (Peginterferón alfa-2a); ROFERON A® (interferón alfa-2a recombinante), INFERGEN® (interferón de consenso; interferón alfacon-1), PEG-INTRON® (interferón alfa-2b pegilado) y PEGASYS® (interferón alfa-2a pegilado).

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con un inhibidor de la ciclofilina B anti virus de la hepatitis C. Los inhibidores de la ciclofilina B útiles incluyen, pero no se limitan a NIM-811 (Novartis, East Hanover, NJ), ciclosporina A (CsA; Novartis), SCY-635 (Scynexis, Inc., Research Triangle Park, NC), y DEBIO-025 (Debiopharm Grupo, Lausanne, Switzerland).

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con un inhibidor de la α -glucosidasa anti virus de la hepatitis C. Los inhibidores de α -glucosidasa útiles incluyen, pero no se limitan a celgosivir (Migenix, Inc., Vancouver, Canada).

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con una vacuna anti virus de la hepatitis C. Las vacunas útiles incluyen, pero no se limitan a TG4040, PeviPROTM, CGI-5005, VHC/MF59, GV1001, IC41, e INNO0101 (E1).

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con anticuerpos monoclonales o policlonales anti virus de la hepatitis C. Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, pero no se limitan a AB68 y XTL-6865 (anteriormente HepX-C; XTL Biopharma., Rehovot, Israel). Los anticuerpos policlonales útiles incluyen, pero no se limitan a cicavir.

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con un inmunomodulador anti virus de la hepatitis C. Los inmunomoduladores útiles incluyen, pero no se limitan a ZADAXIN® (timalfasin; SciClone Pharma. International, Foster City, CA), CEPLENE™ (Maxim Pharma. Inc., San Diego, CA), CELLCEPT® (Hoffmann-LaRoche, Inc.), CIVACIR® (Nabi Biopharma., Rockville, MD), CPG 10101 (Pfizer, Inc., New York, NY), ANA773 (Anadys Pharma. Inc.), ANA971 (Anadys Pharma. Inc.), ANA975 (Anadys Pharma. Inc.), NOV-205 (Novelos Terapéuticos, Inc., Newton, MA), y Oglufanide (Implicit Bioscience, Inc., Woodside, CA).

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos proporcionados aquí se pueden administrar en combinación con otros segundos agentes. Los segundos agentes útiles incluyen, pero no se limitan a Nexavar, doxorubicina, PI-88, amantadina, JBK-122, VGX-410C, MX-3253 (Ceglosivir), Suvus (BIVN-401 o virostat), PF-03491390 (anteriormente IDN-6556), G126270, UT-231B, EMZ702, ACH-0137171, MitoQ, ANA975, AVI-4065, Bavituxinab (Tarvacin), Alinia (nitrazoxanida), merimepodib (VX-497; Vertex Pharma., Inc.), summetrel (Endo Pharma. Holdings, Inc., Chadds Ford, PA), ISIS 14803 (Isis Pharma., Inc., Carlsbad, CA), y PYN17,

Composiciones farmacéuticas y compuestos para uso en los métodos de administración

Los compuestos proporcionados aquí se pueden formular en composiciones farmacéuticas utilizando los métodos disponibles en la técnica y los descritos en esta memoria. Dichos compuestos se pueden utilizar en algunas realizaciones para mejorar la administración del fármaco al hígado.

En ciertas realizaciones, se puede formular o envasar un segundo agente con el compuesto proporcionado aquí. Naturalmente, el segundo agente solamente será formulado con el compuesto proporcionado aquí cuando, según el criterio de los expertos en la técnica, dicha co-formulación no interfiera con la actividad de cualquier agente ni con el método de administración. En ciertas realizaciones, el compuesto proporcionado aquí y el segundo agente se formulan por separado. Se pueden empaquetar juntos, o por separado, según conveniencia del profesional experto en la técnica.

En la práctica clínica los agentes activos proporcionados aquí se pueden administrar por cualquier vía convencional, en particular oralmente, parenteralmente, rectalmente o por inhalación (p.ej. en forma de aerosoles). En ciertas realizaciones, el compuesto proporcionado aquí se administra oralmente.

Se puede hacer uso, como composiciones sólidas para administración oral, de comprimidos, píldoras, cápsulas de gelatina dura, polvos o gránulos. En estas composiciones, el producto activo se mezcla con uno o más diluyentes o adyuvantes inertes, tales como sacarosa, lactosa o almidón.

5 Estas composiciones pueden comprender sustancias aparte de los diluyentes, por ejemplo un lubricante, tal como estearato de magnesio, o un recubrimiento para liberación controlada.

Se puede hacer uso, como composiciones líquidas para administración oral, de soluciones que son farmacéuticamente aceptables, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes, tales como agua o parafina líquida. Estas composiciones pueden comprender también otras sustancias aparte de los diluyentes, por ejemplo productos humectantes, edulcorantes o aromatizantes.

10 Las composiciones para administración parenteral pueden ser emulsiones o soluciones estériles. Se puede hacer uso, como disolvente o vehículo, de propilenglicol, un polietilenglicol, aceites vegetales, en particular aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables, por ejemplo oleato de etilo. Estas composiciones pueden contener también adyuvantes, en particular agentes humectantes, isotonzantes, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes. La esterilización se puede realizar de diversos modos, por ejemplo utilizando un filtro bacteriológico, por radiación o por calor. Las composiciones se pueden preparar también en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en el momento del uso en agua estéril o en cualquier otro medio estéril inyectable.

Las composiciones para administración rectal son supositorios o cápsulas rectales que contienen además del principio activo, excipientes tales como manteca de cacao, glicéridos semisintéticos o polietilenglicoles.

20 Las composiciones pueden ser también aerosoles. Para el uso en forma de aerosoles líquidos, las composiciones pueden ser soluciones estériles estables o composiciones sólidas disueltas en el momento del uso en agua estéril apirógena, en solución salina o cualquier otro vehículo farmacéuticamente aceptable. Para uso en forma de aerosoles secos destinados a ser inhalados directamente, el principio activo se divide finamente y se combina con un diluyente o vehículo sólido soluble en agua, por ejemplo dextrano, manitol o lactosa.

25 En una realización, una composición proporcionada aquí es una composición farmacéutica o una forma farmacéutica unitaria individual. Las composiciones farmacéuticas y las formas farmacéuticas unitarias individuales proporcionadas aquí comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos (p.ej., un compuesto proporcionado aquí, u otro agente profiláctico o terapéutico), y típicamente uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización específica y en este contexto, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o del gobierno de un estado o listada en la Farmacopea de los Estados Unidos o en otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en los seres humanos. El término "vehículo" incluye un diluyente, adyuvante (p.ej., adyuvante de Freund (completo e incompleto)), excipiente, o vehículo con el que se administra el compuesto terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los aceites de petróleo, aceites animales, vegetales o de origen sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se puede usar agua como vehículo cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se pueden emplear también como vehículos, particularmente para las soluciones inyectables. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados están descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin.

40 Las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas típicas comprenden uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica de la farmacia, y los ejemplos no limitantes de excipientes adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada desecada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. El que un excipiente particular sea o no adecuado para incorporación en una composición farmacéutica o forma farmacéutica depende de una variedad de factores bien conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan al modo en que la forma farmacéutica será administrada a un sujeto y a los ingredientes activos específicos de la forma farmacéutica. La composición o forma farmacéutica unitaria individual, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes de pH.

50 Las composiciones libres de lactosa proporcionadas aquí pueden comprender excipientes que son bien conocidos en la técnica y están listados, por ejemplo, en la Farmacopea de Estados Unidos (USP) SP (XXI)/NF (XVI). En general, las composiciones libres de lactosa comprenden un ingrediente activo, un aglutinante/agente de carga, y un lubricante en cantidades farmacéuticamente compatibles y farmacéuticamente aceptables. Las formas farmacéuticas libres de lactosa a modo de ejemplo, comprenden un ingrediente activo, celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado, y estearato de magnesio.

Se incluyen además aquí composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas anhidras que comprenden ingredientes activos, puesto que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, la adición de agua (p.ej., 5 %) es ampliamente aceptada en la técnica farmacéutica como un medio para simular el

almacenaje a largo plazo con el fin de determinar características tales como la vida en almacenaje o la estabilidad de las formulaciones con el tiempo. Véase p.ej., Jens T. Carstensen, *Drug Stability: Principles & Practice*, 2d. Ed., Marcel Dekker, NY, NY, 1995, pp. 379 80. En efecto, el agua y el calor aceleran la degradación de algunos compuestos. Por lo tanto, el efecto del agua sobre una formulación puede ser de gran importancia puesto que comúnmente se encuentra humedad y agua durante la fabricación, manipulación, empaquetado, almacenaje, distribución, y uso de las formulaciones.

Las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas anhidras proporcionadas aquí se pueden preparar utilizando ingredientes anhidros o que contienen baja humedad y condiciones de bajo contenido en agua o baja humedad. Las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas que comprenden lactosa y al menos un ingrediente activo que comprende una amina primaria o secundaria pueden ser anhidras si se espera un contacto sustancial con agua y/o con humedad durante la fabricación, empaquetado, y/o almacenaje.

Una composición farmacéutica anhidra se debe preparar y almacenar de tal modo que se mantenga su naturaleza anhidra. Por consiguiente, las composiciones anhidras se pueden empaquetar utilizando materiales que se sabe que evitan la exposición al agua de tal modo que pueden ser incluidos en kits de formulaciones adecuados. Los ejemplos de empaquetados adecuados incluyen, pero no se limitan a láminas herméticamente selladas, plásticos, envases de dosis unitarias (p.ej., viales), plaquetas de blíster, y plaquetas de tiras.

Se proporcionan además composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos que reducen la velocidad a la que se descompone un ingrediente activo. Dichos compuestos, que se denominan aquí "estabilizantes," incluyen, pero no se limitan a antioxidantes tales como ácido ascórbico, tampones de pH, o tampones salinos.

Las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas unitarias individuales pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir excipientes convencionales tales como las calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Dichas composiciones y formas farmacéuticas contendrán una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico o terapéutico, en ciertas realizaciones, en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para conseguir la forma para la administración apropiada al sujeto. La formulación debe ser adecuada para el modo de administración. En cierta realización, las composiciones farmacéuticas o formas farmacéuticas unitarias individuales son estériles y en forma adecuada para la administración a un sujeto, por ejemplo, un sujeto animal, tal como un sujeto mamífero, por ejemplo, un sujeto humano.

Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con la vía de administración que se pretende. Ejemplos de vías de administración incluyen, pero no se limitan a parenteral, p.ej., administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular, subcutánea, oral, bucal, sublingual, inhalación, intranasal, transdérmica, tópica, transmucosal, intra-tumoral, intra-sinovial y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a seres humanos. En una realización, una composición farmacéutica se formula de acuerdo con los procedimientos rutinarios para administración subcutánea a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Si es necesario, la composición puede incluir también un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaina para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Los ejemplos de formas farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a: comprimidos; comprimidos en forma de cápsulas; cápsulas, tales como cápsulas de gelatina blanda elástica; sellos; pastillas; comprimidos para chupar; dispersiones; supositorios; pomadas; cataplasmas (emplastos); pastas; polvos; apósitos; cremas; escayolas; soluciones; parches; aerosoles (p.ej., pulverizadores o inhaladores nasales); geles; formas farmacéuticas líquidas adecuadas para administración oral o mucosal a un sujeto, incluyendo suspensiones (p.ej., suspensiones líquidas acuosas o no acuosas, emulsiones aceite en agua, o emulsiones líquidas agua en aceite), soluciones, y elixires; formas farmacéuticas líquidas adecuadas para administración parenteral a un sujeto; y sólidos estériles (p.ej., sólidos cristalinos o amorfos) que se pueden reconstituir para obtener formas farmacéuticas líquidas adecuadas para administración parenteral a un sujeto.

La composición, forma, y tipo de las formas farmacéuticas proporcionadas aquí variará típicamente dependiendo de su uso. Por ejemplo, una forma farmacéutica utilizada en el tratamiento inicial de una infección vírica puede contener mayores cantidades de uno o más de los ingredientes activos que comprende, que una forma farmacéutica utilizada en el tratamiento de mantenimiento de la misma infección. Similarmente, una forma farmacéutica parenteral puede contener menores cantidades de uno o más de los ingredientes activos que comprende, que una forma farmacéutica oral utilizada para tratar la misma enfermedad o trastorno. Estos y otros modos en los que las formas farmacéuticas específicas englobadas aquí variarán de una a otra serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Véase, p.ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20th ed., Mack Publishing, Easton PA (2000).

En general, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o en mezcla conjunta en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o como un concentrado libre de agua en un envase herméticamente sellado, tal como una ampolla o sobre indicando la cantidad del agente activo. Cuando la composición se va a administrar por perfusión, se puede dispensar con un frasco de perfusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico, estéril. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua para inyección o solución salina, estéril, de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Las formas farmacéuticas típicas comprenden un compuesto proporcionado aquí, o una de sus sales, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables que está dentro del intervalo de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1000 mg al día, dados como una dosis única una vez al día por la mañana o como dosis divididas a lo largo del día tomadas con alimentos. Las formas farmacéuticas particulares pueden tener aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 2,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 100, 200, 250, 500 o 1000 mg del compuesto activo.

Formas farmacéuticas orales

Las composiciones farmacéuticas que son adecuadas para administración oral se pueden presentar como formas farmacéuticas discretas, tales como, pero sin limitarse a ellas, comprimidos (p.ej., comprimidos masticables), comprimidos en forma de cápsulas, cápsulas, y líquidos (p.ej., jarabes aromatizados). Dichas formas farmacéuticas contienen cantidades predeterminadas de ingredientes activos, y se pueden preparar por métodos de farmacia bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase en general, Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing, Easton PA (2000).

En ciertas realizaciones, las formas farmacéuticas orales son sólidas y se preparan en condiciones anhidras con ingredientes anhidros, como se ha descrito en detalle en las secciones anteriores. Sin embargo, el alcance de las composiciones proporcionadas aquí se extiende más allá de las formas farmacéuticas orales sólidas anhidras. Por ello, se describen aquí otras formas.

Las formas farmacéuticas orales típicas se preparan combinando el ingrediente o ingredientes activos en una mezcla íntima con al menos un excipiente según técnicas de composición farmacéutica convencionales. Los excipientes pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración. Por ejemplo, los excipientes adecuados para uso en formas farmacéuticas orales líquidas o en aerosol incluyen, pero no se limitan a agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, y agentes colorantes. Los ejemplos de excipientes adecuados para uso en formas farmacéuticas sólidas orales (p.ej., polvos, comprimidos, cápsulas, y comprimidos en forma de cápsulas) incluyen, pero no se limitan a almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, y agentes de disgregación.

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas farmacéuticas unitarias orales más ventajosas, en cuyo caso se emplean excipientes sólidos. Si se desea, los comprimidos se pueden recubrir por técnicas convencionales acuosas o no acuosas. Dichas formas farmacéuticas se pueden preparar por cualquiera de los métodos de farmacia. En general, las composiciones farmacéuticas y las formas farmacéuticas se preparan mezclando uniformemente e íntimamente los ingredientes activos con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y dando forma después al producto en la presentación deseada si fuera necesario.

Por ejemplo, se puede preparar un comprimido por compresión o por moldeo. Los comprimidos por compresión se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada los ingredientes activos en una forma fluida tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un excipiente. Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto pulverizado humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los ejemplos de excipientes que se pueden usar en formas farmacéuticas orales incluyen, pero no se limitan a aglutinantes, agentes de carga, disgregantes, y lubricantes. Los aglutinantes adecuados para uso en composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a almidón de maíz, almidón de patata, u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, alginato de sodio, ácido algínico, otros alginatos, tragacanto pulverizado, goma guar, celulosa y sus derivados (p.ej., etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica), polivinilpirrolidona, metilcelulosa, almidón pregelatinizado, hidroxipropilmetilcelulosa, (p.ej., Nos. 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina, y mezclas de los mismos.

Los ejemplos de agentes de carga adecuados para uso en las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas descritas aquí incluyen, pero no se limitan a talco, carbonato de calcio (p.ej., gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa pulverizada, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, y mezclas de los mismos. El aglutinante o agente de carga de las composiciones farmacéuticas representa típicamente de aproximadamente 50 a aproximadamente 99 por ciento en peso de la composición farmacéutica o forma farmacéutica.

Las formas adecuadas de celulosa microcristalina incluyen, pero no se limitan a los materiales comercializados como AVICEL PH 101, AVICEL PH 103, AVICEL RC 581, AVICEL PH 105 (disponibles de FMC Corporation, American Viscose Division, Avicel Sales, Marcus Hook, PA), y mezclas de los mismos. Un aglutinante específico es una mezcla de celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica comercializada como AVICEL RC 581. Los excipientes o aditivos anhidros o de baja humedad adecuados incluyen AVICEL PH 103™ y Almidón 1500 LM.

Se utilizan disgregantes en las composiciones para obtener comprimidos que disgreguen cuando se exponen a un entorno acuoso. Los comprimidos que contienen demasiado disgregante se pueden disgregar durante el almacenaje, mientras que los que contienen demasiado poco no se disgregan a la velocidad deseada ni en las condiciones deseadas. Por lo tanto, se debe utilizar para preparar las formas farmacéuticas orales sólidas, una cantidad suficiente de disgregante que no sea demasiado grande ni demasiado pequeña para alterar de forma perjudicial la liberación de los ingredientes activos. La cantidad de disgregante usada varía en base al tipo de formulación, y es fácilmente discernible por los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas típicas comprenden de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 por ciento en peso de disgregante, específicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 por ciento en peso de disgregante.

Los disgregantes que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a agar agar, ácido alginico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilina potásica, almidón glicolato de sodio, almidón de patata o tapioca, almidón pregelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas, y mezclas de los mismos.

Los lubricantes que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, laurilsulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (p.ej., aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de soja), estearato de zinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, y mezclas de los mismos. Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice siloide (AEROSIL 200, fabricado por W.R. Grace Co. de Baltimore, MD), un aerosol coagulado de sílice sintética (comercializado por Degussa Co. de Plano, TX), CAB O SIL (un producto de dióxido de sílice pirogénico comercializado por Cabot Co. de Boston, MA), y mezclas de los mismos. Si se utilizan, los lubricantes se usan típicamente en una cantidad inferior a aproximadamente 1 por ciento en peso de las composiciones farmacéuticas o formas farmacéuticas a las que se incorporan.

En una realización a modo de ejemplo, el Compuesto 1 se disuelve/dispersa en polietilenglicol y laurilsulfato de sodio y se llena en cápsulas duras de hipromelosa. En una realización, la cápsula comprende aproximadamente 1-150 mg de Compuesto 1. En otra realización, la cápsula comprende aproximadamente 5-50 mg de Compuesto 1. En otra realización, la cápsula comprende aproximadamente 5 mg de Compuesto 1. En otra realización, la cápsula comprende aproximadamente 25 mg de Compuesto 1.

Formas farmacéuticas de liberación retardada

Ingredientes activos tales como los compuestos proporcionados aquí se pueden administrar por medios de liberación controlada o por dispositivos de administración que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a los descritos en las Patentes de Estados Unidos Números: 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; y 4.008.719; 5.674.533; 5.059.595; 5.591.767; 5.120.548; 5.073.543; 5.639.476; 5.354.556; 5.639.480; 5.733.566; 5.739.108; 5.891.474; 5.922.356; 5.972.891; 5.980.945; 5.993.855; 6.045.830; 6.087.324; 6.113.943; 6.197.350; 6.248.363; 6.264.970; 6.267.981; 6.376.461; 6.419.961; 6.589.548; 6.613.358; 6.699.500. Dichas formas farmacéuticas se pueden usar para proporcionar liberación lenta o controlada de uno o más ingredientes activos utilizando, por ejemplo, hidropropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos multicapas, micropartículas, liposomas, microesferas, o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Las formulaciones adecuadas de liberación controlada conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo las descritas en esta memoria, se pueden seleccionar fácilmente para uso con los ingredientes activos proporcionados aquí. Por lo tanto se engloban aquí las formas farmacéuticas unitarias individuales adecuadas para administración oral tales como, pero sin limitarse a ellas, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina, y comprimidos en forma de cápsulas que están adaptadas para liberación controlada.

Todos los productos farmacéuticos de liberación controlada tienen el objetivo común de mejorar la terapia del fármaco con respecto a sus homólogos no controlados. Idealmente, el uso de una preparación de liberación controlada diseñada óptimamente en un tratamiento médico se caracteriza porque se emplea un mínimo de fármaco para curar o controlar la enfermedad en una cantidad de tiempo mínima. Las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen la extensión de la actividad del fármaco, la reducción de la frecuencia de la dosis, y el aumento del cumplimiento por parte del sujeto. En adición, las formulaciones de liberación controlada se pueden usar para modificar el tiempo de inicio de la acción u otras características, tales como los niveles sanguíneos del fármaco, y pueden afectar de este modo a la aparición de efectos secundarios (p.ej., adversos).

La mayor parte de las formulaciones de liberación controlada se diseñan para liberar inicialmente una cantidad de fármaco (ingrediente activo) que produzca rápidamente un efecto terapéutico, y liberar de forma gradual y continua

5 otras cantidades de fármaco para mantener este nivel de efecto terapéutico o profiláctico durante un largo período de tiempo. Con el fin de mantener este nivel constante de fármaco en el cuerpo, se debe liberar el fármaco de la forma farmacéutica a una velocidad que reemplace a la cantidad de fármaco que se metaboliza y se excreta del cuerpo. La liberación controlada de un ingrediente activo se puede estimular por varias condiciones que incluyen, pero no se limitan a pH, temperatura, enzimas, agua, u otras condiciones o compuestos fisiológicos.

10 En ciertas realizaciones, el fármaco se puede administrar utilizando perfusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración. En una realización, se puede usar una bomba (véase, Sefton, CRC Crit. Ref Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J Med. 321:574 (1989)). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos. En otra realización más, un sistema de liberación controlada se puede colocar en un sujeto en un sitio apropiado determinado por un profesional experto, esto es, de modo que se requiera solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, p.ej., Goodson, Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Otros sistemas de liberación controlada se exponen en la revisión de Langer (Science 249:1527-1533 (1990)). El ingrediente activo puede estar disperso en una matriz sólida interna, p.ej., poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de butilo), poli(cloruro de vinilo) plastificado o no plastificado, nylon plastificado, poli(tereftalato de etileno) plastificado, caucho natural, poliisopreno, poliisobutileno, polibutadieno, polietileno, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, gomas de silicona, polidimetilsiloxanos, copolímeros de carbonato de silicona, polímeros hidrófilos tales como hidrogeles de ésteres de ácido acrílico y metacrílico, colágeno, poli(alcohol vinílico) reticulado y poli(acetato de vinilo) hidrolizado parcialmente reticulado, que está rodeada por una membrana polimérica exterior, p.ej., polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno/propileno, copolímeros de etileno/acrilato de etilo, copolímeros de etileno/acetato de vinilo, gomas de silicona, polidimetilsiloxanos, goma de neopreno, polietileno clorado, cloruro de polivinilo, copolímeros de cloruro de vinilo con acetato de vinilo, cloruro de vinilideno, etileno y propileno, tereftalato de polietileno ionómero, goma de butilo gomas de epiclorohidrina, copolímero de etileno/alcohol vinílico, terpolímero de etileno/acetato de vinilo/alcohol vinílico, y copolímero de etileno/viniloxietanol, que es insoluble en los fluidos corporales. El ingrediente activo se difunde entonces a través de la membrana polimérica exterior en una etapa de control de la velocidad de liberación. El porcentaje de ingrediente activo en dichas composiciones parenterales es dependiente en gran medida de la naturaleza específica del mismo, así como de las necesidades del sujeto.

Formas farmacéuticas parenterales

30 En una realización, se proporcionan formas farmacéuticas parenterales. Las formas farmacéuticas parenterales se pueden administrar a sujetos por diversas vías que incluyen, pero no se limitan a las vías subcutánea, intravenosa (incluyendo inyección en embolada), intramuscular, e intraarterial. Debido a que su administración evita típicamente las defensas naturales de los sujetos frente a contaminantes, las formas farmacéuticas parenterales son típicamente, estériles o capaces de ser esterilizadas antes de la administración a un sujeto. Los ejemplos de formas farmacéuticas parenterales incluyen, pero no se limitan a soluciones listas para inyección, productos secos listos para ser disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable para inyección, suspensiones listas para inyección, y emulsiones.

40 Los vehículos adecuados que se pueden usar para preparar formas farmacéuticas parenterales son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: agua para inyección USP; vehículos acuosos tales como, pero sin limitarse a ellos, inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, e inyección de Ringer lactada; vehículos miscibles con agua tales como, pero sin limitarse a ellos, alcohol etílico, polietilenglicol, y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos tales como, pero sin limitarse a ellos, aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, y benzoato de bencilo.

45 En las formas farmacéuticas parenterales se pueden incorporar también compuestos que aumentan la solubilidad de uno o más de los ingredientes activos descritos aquí.

Formas farmacéuticas transdérmicas, tópicas y mucosales

50 Se proporcionan también formas farmacéuticas transdérmicas, tópicas, y mucosales. Las formas farmacéuticas transdérmicas, tópicas, y mucosales incluyen, pero no se limitan a soluciones oftálmicas, pulverizaciones, aerosoles, cremas, lociones, pomadas, geles, soluciones, emulsiones, suspensiones, u otras formas conocidas por los expertos en la técnica. Véase, p.ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th, 18th y 20th eds., Mack Publishing, Easton PA (1980, 1990 & 2000); e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia (1985). Las formas farmacéuticas adecuadas para tratar los tejidos mucosales dentro de la cavidad oral pueden ser formuladas como lavados bucales o como geles orales. Además, las formas farmacéuticas transdérmicas incluyen parches "tipo reservorio" o "tipo matriz", que se pueden aplicar a la piel y se pueden mantener durante un período específico de tiempo para permitir la penetración de una cantidad deseada de ingredientes activos.

55 Los excipientes adecuados (p.ej., vehículos y diluyentes) y otros materiales que se pueden usar para obtener las formas farmacéuticas transdérmicas, tópicas, y mucosales englobadas aquí, son bien conocidos por los expertos en la técnica farmacéutica, y dependen del tejido particular al que se aplica una composición farmacéutica o forma farmacéutica dada. Teniendo en cuenta este hecho, los excipientes típicos incluyen, pero no se limitan a agua,

acetona, etanol, etilenglicol, propilenglicol, butano-1,3-diol, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, aceite mineral, y mezclas de los mismos para formar lociones, tinturas, cremas, emulsiones, geles o pomadas, que no sean tóxicas y que sean farmacéuticamente aceptables. Se pueden añadir también mojanteres o humectantes a las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas si se desea. Los ejemplos de dichos ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica. Véase, p.ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th, 18th y 20th eds., Mack Publishing, Easton PA (1980, 1990 & 2000).

Dependiendo del tejido específico a tratar, se pueden usar componentes adicionales antes, conjuntamente, o posteriormente al tratamiento con los ingredientes activos proporcionados. Por ejemplo, se pueden usar mejoradores de la penetración para ayudar a la liberación de los ingredientes activos al tejido. Los mejoradores de la penetración adecuados incluyen, pero no se limitan a: acetona; diversos alcoholes tales como etanol, oleilo, y tetrahidrofurilo; sulfóxidos de alquilo tales como dimetilsulfóxido; dimetilacetamida; dimetilformamida; polietilenglicol; pirrolidonas tales como polivinilpirrolidona; grados de Kollidon (Povidona, Polividona); urea; y diversos ésteres de azúcares solubles o insolubles en agua tales como Tween 80 (polisorbato 80) y Span 60 (monoestearato de sorbitán).

El pH de una composición farmacéutica o forma farmacéutica, o del tejido al que se aplica la composición farmacéutica o forma farmacéutica, se puede ajustar también para mejorar la liberación de uno o más ingredientes activos. Similarmente, la polaridad de un vehículo disolvente, su fuerza iónica, o tonicidad se pueden ajustar para mejorar la liberación. Se pueden añadir compuestos tales como estearatos a las composiciones farmacéuticas o formas farmacéuticas para alterar de forma ventajosa la hidrofiliidad o lipofiliidad de uno o más ingredientes activos de forma que se mejore la liberación. A este respecto, los estearatos pueden servir como un vehículo lipídico para la formulación, como un agente emulsionante o tensioactivo, y como un agente para mejorar la liberación o para mejorar la penetración. Se pueden usar diferentes sales, hidratos o solvatos de los ingredientes activos para ajustar además las propiedades de la composición resultante.

Dosis y formas farmacéuticas unitarias

En la terapéutica humana, el doctor determinará la posología que considere más apropiada, según un tratamiento preventivo o curativo y según la edad, peso, etapa de la infección y otros factores específicos, para el sujeto a tratar. En ciertas realizaciones, las dosis son de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg al día para un adulto, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 250 mg al día o de aproximadamente 10 a 50 mg al día para un adulto. En ciertas realizaciones, las dosis son de aproximadamente 5 a aproximadamente 400 mg al día o 25 a 200 mg al día por adulto. En ciertas realizaciones, se contemplan también dosis de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 mg al día.

En aspectos adicionales, se proporcionan compuestos para uso en métodos de tratamiento o prevención de una infección de VHC en un sujeto administrando a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de un compuesto proporcionado aquí, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. La cantidad de compuesto o composición que será eficaz en la prevención o tratamiento de un trastorno o de uno o más síntomas del mismo variará con la naturaleza y gravedad de la enfermedad o condición, y con la vía por la que se administra el ingrediente activo. La frecuencia y la dosis variarán también según factores específicos para cada sujeto dependiendo de la terapia específica (p.ej., agentes terapéuticos o profilácticos) administrada, la gravedad del trastorno, enfermedad, o condición, la vía de administración, así como la edad, cuerpo, peso, respuesta, y la historia médica del sujeto. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de las curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales.

En ciertas realizaciones, los ejemplos de dosis de una composición incluyen cantidades en miligramos o microgramos del compuesto activo por kilogramo del sujeto o peso de la muestra (p.ej., aproximadamente 10 microgramos por kilogramo a aproximadamente 50 miligramos por kilogramo, aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 25 miligramos por kilogramo, o aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 10 miligramos por kilogramo). Para las composiciones proporcionadas aquí, en ciertas realizaciones, la dosis administrada a un sujeto es de 0,140 mg/kg a 3 mg/kg de peso corporal del sujeto, basado en el peso del compuesto activo. En ciertas realizaciones, la dosis administrada a un sujeto está entre 0,20 mg/kg y 2,00 mg/kg, o entre 0,30 mg/kg y 1,50 mg/kg de peso corporal del sujeto.

En ciertas realizaciones, el intervalo de dosis diaria recomendado de una composición proporcionada aquí para las enfermedades descritas aquí está dentro del intervalo de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1000 mg al día, dado como una dosis única una vez al día o como dosis divididas a lo largo del día. En una realización, la dosis diaria se administra dos veces al día en dosis igualmente divididas. En ciertas realizaciones, un intervalo de dosis diaria debe ser de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 200 mg al día, en otras realizaciones, entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 150 mg al día, en otras realizaciones, entre aproximadamente 25 y aproximadamente 100 mg al día. Puede ser necesario en algunos casos utilizar dosis del ingrediente activo fuera de los intervalos descritos aquí, como será evidente para los expertos en la técnica. Además, se hace notar que el clínico o el médico responsable del tratamiento conocerá cómo y cuándo interrumpir, ajustar, o terminar la terapia dependiendo de la respuesta del sujeto.

Para diferentes enfermedades y condiciones, pueden ser aplicables diferentes cantidades terapéuticamente eficaces como será fácilmente conocido por los expertos en la técnica. Similarmente, cantidades suficientes para prevenir, controlar, tratar o mejorar dichos trastornos, pero insuficientes para causar, o suficientes para reducir, efectos adversos asociados con la composición proporcionada aquí, están englobadas también en los programas de dosificación y posología descritos anteriormente. Además, cuando se administran a un sujeto dosis múltiples de una composición proporcionada aquí, no es necesario que todas las dosis sean iguales. Por ejemplo, la dosis administrada al sujeto se puede aumentar para mejorar el efecto profiláctico o terapéutico de la composición o se puede disminuir para reducir uno o más efectos secundarios que un sujeto particular esté experimentando.

En cierta realización, la dosis de la composición proporcionada aquí, basada en el peso del compuesto activo, administrada para prevenir, tratar, controlar, o mejorar un trastorno, o uno o más síntomas del mismo en un sujeto es 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, o 15 mg/kg o más de peso corporal de un sujeto. En otra realización, la dosis de la composición o una composición proporcionada aquí administrada para prevenir, tratar, controlar, o mejorar un trastorno, o uno o más síntomas del mismo en un sujeto es una dosis unitaria de 0,1 mg a 200 mg, 0,1 mg a 100 mg, 0,1 mg a 50 mg, 0,1 mg a 25 mg, 0,1 mg a 20 mg, 0,1 mg a 15 mg, 0,1 mg a 10 mg, 0,1 mg a 7,5 mg, 0,1 mg a 5 mg, 0,1 a 2,5 mg, 0,25 mg a 20 mg, 0,25 a 15 mg, 0,25 a 12 mg, 0,25 a 10 mg, 0,25 mg a 7,5 mg, 0,25 mg a 5 mg, 0,5 mg a 2,5 mg, 1 mg a 20 mg, 1 mg a 15 mg, 1 mg a 12 mg, 1 mg a 10 mg, 1 mg a 7,5 mg, 1 mg a 5 mg, o 1 mg a 2,5 mg.

En ciertas realizaciones, el tratamiento o prevención se puede iniciar con una o más dosis de carga de un compuesto o composición proporcionados aquí seguida por una o más dosis de mantenimiento. En dichas realizaciones, la dosis de carga puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 60 a aproximadamente 400 mg al día, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mg al día durante un período de un día a cinco semanas. La dosis de carga puede ir seguida por una o más dosis de mantenimiento. En ciertas realizaciones, cada dosis de mantenimiento es, independientemente, aproximadamente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 200 mg al día, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 150 mg al día, o entre aproximadamente 25 y aproximadamente 80 mg al día. Las dosis de mantenimiento se pueden administrar diariamente y se pueden administrar como dosis únicas, o como dosis divididas.

En ciertas realizaciones, se puede administrar una dosis de un compuesto o composición proporcionados aquí para alcanzar una concentración de equilibrio del ingrediente activo en la sangre o suero del sujeto. La concentración de equilibrio se puede determinar por medida según las técnicas disponibles para los expertos o se puede basar en las características físicas del sujeto tales como altura, peso y edad. En ciertas realizaciones, se administra una cantidad suficiente de un compuesto o composición proporcionados aquí para alcanzar una concentración de equilibrio en la sangre o suero del sujeto de aproximadamente 300 a aproximadamente 4000 ng/mL, de aproximadamente 400 a aproximadamente 1600 ng/mL, o de aproximadamente 600 a aproximadamente 1200 ng/mL. En algunas realizaciones, se pueden administrar dosis de carga para alcanzar concentraciones de equilibrio en sangre o suero de aproximadamente 1200 a aproximadamente 8000 ng/mL, o de aproximadamente 2000 a aproximadamente 4000 ng/mL durante uno a cinco días. En ciertas realizaciones, se pueden administrar dosis de mantenimiento para alcanzar una concentración de equilibrio en la sangre o suero del sujeto de aproximadamente 300 a aproximadamente 4000 ng/mL, de aproximadamente 400 a aproximadamente 1600 ng/mL, o de aproximadamente 600 a aproximadamente 1200 ng/mL.

En ciertas realizaciones, se puede repetir la administración de la misma composición y las administraciones se pueden separar por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, o 6 meses. En otras realizaciones, se puede repetir la administración del mismo agente profiláctico o terapéutico y la administración se puede separar por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, o 6 meses.

En ciertos aspectos, se proporcionan aquí dosis unitarias que comprenden un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en una forma adecuada para la administración. Dichas formas se han descrito en detalle anteriormente. En ciertas realizaciones, la dosis unitaria comprende 1 a 1000 mg, 5 a 250 mg o 10 a 50 mg de ingrediente activo. En realizaciones particulares, las dosis unitaria comprende aproximadamente 1, 5, 10, 25, 50, 100, 125, 250, 500 o 1000 mg de ingrediente activo. Se pueden preparar dichas dosis unitarias según métodos familiares para los expertos en la técnica.

Las dosis de los segundos agentes son para ser usadas en las terapias de combinación proporcionadas aquí. En ciertas realizaciones, se usan en las terapias de combinación proporcionadas aquí, dosis más bajas que las que han sido o están siendo utilizadas actualmente para prevenir o tratar la infección de VHC. Las dosis recomendadas de los segundos agentes se pueden obtener del conocimiento de los expertos. Para estos segundos agentes que están aprobados para uso clínico, las dosis recomendadas están descritas, por ejemplo, en Hardman et al., eds., 1996, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Basis Of Therapeutics 9th Ed, Mc-Graw-Hill, New York; Physician's Desk Reference (PDR) 57th Ed., 2003, Medical Economics Co., Inc., Montvale, NJ.

En diversas realizaciones, las terapias (p.ej., un compuesto proporcionado aquí y el segundo agente) se administran con menos de 5 minutos de separación, con menos de 30 minutos de separación, 1 hora de separación, con aproximadamente 1 hora de separación, con aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas de separación, con

aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de separación, con aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de separación, con aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de separación, con aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de separación, con aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de separación, con aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de separación, con aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de separación, con aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de separación, con aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de separación, con aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de separación, con aproximadamente 12 horas a 18 horas de separación, 18 horas a 24 horas de separación, 24 horas a 36 horas de separación, 36 horas a 48 horas de separación, 48 horas a 52 horas de separación, 52 horas a 60 horas de separación, 60 horas a 72 horas de separación, 72 horas a 84 horas de separación, 84 horas a 96 horas de separación, o 96 horas a 120 horas de separación. En diversas realizaciones, las terapias se administran con no más de 24 horas de separación o no más de 48 horas de separación. En ciertas realizaciones, dos o más terapias se administran dentro de la misma visita del paciente. En otras realizaciones, el compuesto proporcionado aquí y el segundo agente se administran concurrentemente.

En otras realizaciones, el compuesto proporcionado aquí y el segundo agente se administran con aproximadamente 2 a 4 días de separación, con aproximadamente 4 a 6 días de separación, con aproximadamente 1 semana de separación, con aproximadamente 1 a 2 semanas de separación, o con más de 2 semanas de separación.

En ciertas realizaciones, se puede repetir la administración del mismo agente y las administraciones se pueden separar por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, o 6 meses. En otras realizaciones, se puede repetir la administración del mismo agente y las administraciones se pueden separar por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, o 6 meses.

En ciertas realizaciones, un compuesto proporcionado aquí y un segundo agente se administran a un paciente, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano, en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que el compuesto proporcionado aquí pueda actuar junto con el otro agente para obtener un mayor beneficio que si fueran administrados de otra manera. Por ejemplo, el segundo agente activo se puede administrar al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden a diferentes puntos de tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, se deberían administrar suficientemente próximos en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. En una realización, el compuesto proporcionado aquí y el segundo agente activo ejercen sus efectos a tiempos que se solapan. Cada segundo agente activo se puede administrar por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En otras realizaciones, el compuesto proporcionado aquí se administra antes, concurrentemente o después de la administración del segundo agente activo.

En ciertas realizaciones, el compuesto proporcionado aquí y el segundo agente se administran cíclicamente a un paciente. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente (p.ej., un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, seguido por la administración de un segundo agente y/o un tercer agente (p.ej., un segundo y/o tercer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo y repetir esta administración secuencial. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencias a una o más de las terapias, puede evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias, y/o puede mejorar la eficacia del tratamiento.

En ciertas realizaciones, el compuesto proporcionado aquí y el segundo agente activo se administran en un ciclo de menos de aproximadamente 3 semanas, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez cada 10 días o aproximadamente una vez cada semana. Un ciclo puede comprender la administración de un compuesto proporcionado aquí y el segundo agente mediante perfusión durante aproximadamente 90 minutos cada ciclo, aproximadamente 1 hora cada ciclo, aproximadamente 45 minutos cada ciclo. Cada ciclo puede comprender al menos 1 semana de descanso, al menos 2 semanas de descanso, al menos 3 semanas de descanso. El número de ciclos administrados es de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 ciclos, más típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 ciclos, y más típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 ciclos.

En otras realizaciones, las tandas de tratamiento se administran concurrentemente a un paciente, esto es, las dosis individuales del segundo agente se administran por separado pero todavía dentro de un intervalo de tiempo tal que el compuesto proporcionado aquí pueda trabajar conjuntamente con el segundo agente activo. Por ejemplo, se puede administrar un componente una vez por semana en combinación con los otros componentes que se pueden administrar una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En otras palabras, los regímenes posológicos se llevan a cabo concurrentemente incluso si los agentes terapéuticos no se administran simultáneamente o durante el mismo día.

El segundo agente puede actuar de modo aditivo o sinérgico con el compuesto proporcionado aquí. En una realización, el compuesto proporcionado aquí se administra concurrentemente con uno o más segundos agentes en la misma composición farmacéutica. En otra realización, un compuesto proporcionado aquí se administra concurrentemente con uno o más segundos agentes en composiciones farmacéuticas separadas. Todavía en otra realización, un compuesto proporcionado aquí se administra antes o posteriormente a la administración de un segundo agente. También se contempla la administración de un compuesto proporcionado aquí y un segundo agente por la misma vía o diferentes vías de administración, p.ej., oral y parenteral. En ciertas realizaciones, cuando

el compuesto proporcionado aquí se administra concurrentemente con un segundo agente que potencialmente produce efectos secundarios adversos, incluyendo toxicidad pero sin limitarse a ella, se puede administrar con ventaja el segundo agente activo a una dosis que está por debajo del umbral al que se produce el efecto secundario adverso.

5 Ejemplos de dosis y compuestos para uso en métodos de tratamiento

10 En una realización, se proporcionan aquí compuestos para uso en métodos para el tratamiento de una infección de *Flaviviridae* en un hospedante, incluyendo un ser humano, que incluyen administrar el Compuesto 1 en una cantidad de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 150 mg/día, administrado solo o en combinación o en alternancia con otro agente anti-*Flaviviridae*, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la cantidad de Compuesto 1 administrada es de aproximadamente 5 mg/día a aproximadamente 100 mg/día. En ciertas realizaciones, la cantidad de Compuesto 1 administrada es aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mg/día. En ciertas realizaciones, la cantidad de Compuesto 1 administrada es aproximadamente 5, 10, 25, 50, 75, o 100 mg/día.

15 En ciertas realizaciones, se proporcionan aquí compuestos para uso en métodos para el tratamiento de una infección de *Flaviviridae* en un hospedante, incluyendo un ser humano, que incluyen administrar el Compuesto 1 en una cantidad de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 150 mg/día, en combinación o en alternancia con una cantidad terapéuticamente eficaz de ribavirina, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la cantidad de ribavirina administrada es de aproximadamente 800 mg a aproximadamente 1400 mg. En una realización, los métodos comprenden administrar el Compuesto 1 en una cantidad de aproximadamente 5 mg/día a aproximadamente 100 mg/día y ribavirina en una cantidad de aproximadamente 800 mg a aproximadamente 1400 mg. En ciertas realizaciones, la cantidad de Compuesto 1 administrada es aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mg/día y la cantidad de ribavirina es aproximadamente 800 mg, 1000 mg, 1200 mg o 1400 mg. En ciertas realizaciones, la cantidad de Compuesto 1 administrada es aproximadamente 5, 10, 25, 50, 75, o 100 mg/día y la cantidad de ribavirina es aproximadamente 800 mg, 1000 mg, 1200 mg o 1400 mg.

Kits

30 Se proporcionan también kits para uso en métodos de tratamiento de un trastorno hepático tal como las infecciones de VHC. Los kits pueden incluir un compuesto o composición de esta memoria, un segundo agente o composición, e instrucciones con información a los profesionales sanitarios con respecto al uso para tratar el trastorno. La instrucciones pueden estar en forma impresa o en la forma de un medio electrónico tal como un disco flexible, CD, o DVD, o en la forma de una dirección de una página web en la que se pueden obtener dichas instrucciones. Una dosis unitaria de un compuesto o composición proporcionados aquí, o de un segundo agente o composición, puede incluir una dosis tal que cuando se administre a un sujeto, se puedan mantener en el sujeto durante al menos 1 día, niveles plasmáticos terapéuticamente o profilácticamente eficaces del compuesto o composición. En algunas realizaciones, un compuesto o composición se pueden incluir como una composición farmacéutica acuosa estéril o como una composición de polvo seco (p.ej., liofilizado).

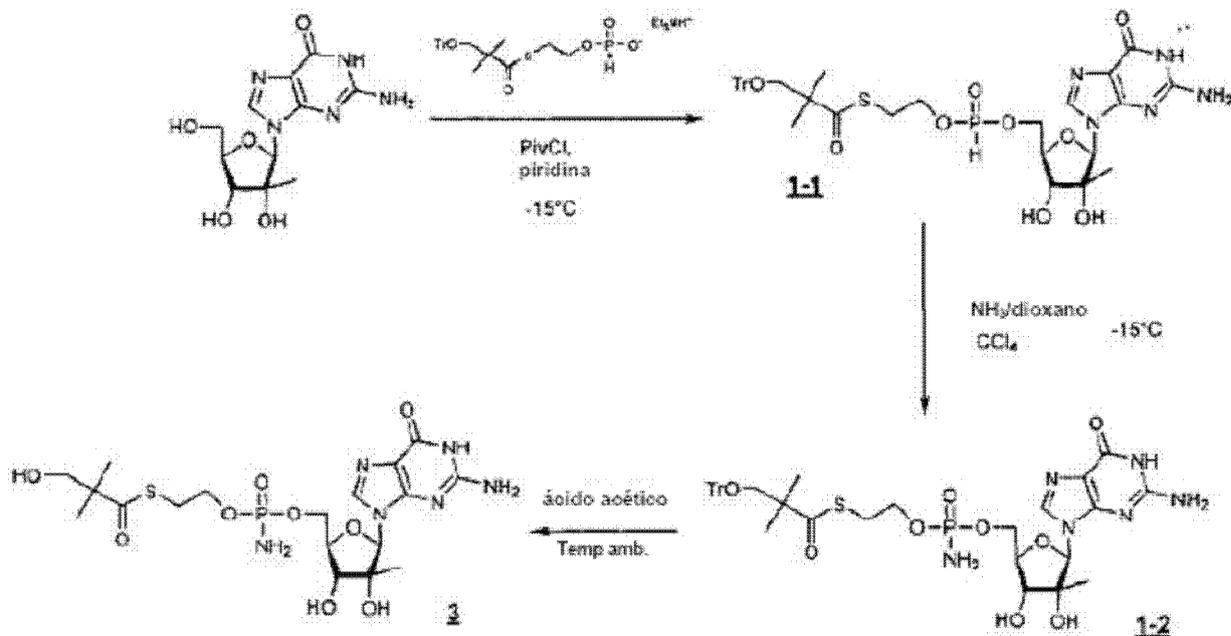
40 En algunas realizaciones, se proporciona un empaquetado adecuado. Como se usa aquí, "empaquetado" incluye una matriz sólida o material habitualmente usado en un sistema y capaz de mantener dentro de límites fijados un compuesto de esta memoria y/o un segundo agente adecuado para administración a un sujeto. Dichos materiales incluyen frascos de vidrio y plástico (p.ej., polietileno, polipropileno, y policarbonato), viales, papel, plástico, y sobres laminados con hoja de plástico y similares. Si se emplean técnicas de esterilización mediante haz de electrones, el material de empaquetado debe tener una densidad suficientemente baja para permitir la esterilización de los contenidos.

45 Los siguientes ejemplos ilustran la síntesis de los compuestos representativos proporcionados aquí. Estos ejemplos no pretenden, ni deben ser considerados, como limitantes del alcance de la materia que se reivindica. Debe quedar claro que el alcance de la materia que se reivindica se puede practicar de manera distinta a la que se describe particularmente en esta memoria.

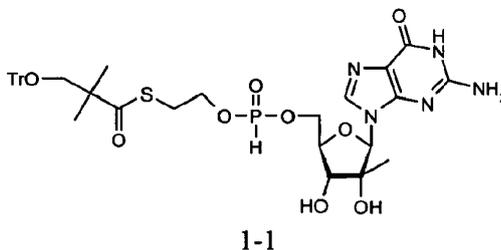
Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de derivado hidroxitBuSato-fosforamidato de 2'-C-metil-guanosina (Compuesto 3)



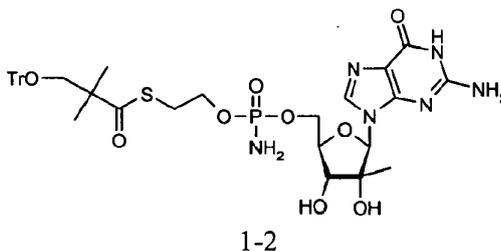
5 Etapa 1: {9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(trifenilmetiloxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil) H-fosfonato



10 A una solución en agitación de 9-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)guanina (4,87 mmol) y sal S-(2-fosfito-etil)2,2-dimetil-3-trifenilmetiloxi-tiopropionato de trietilamina (6,34 mmol) en piridina (75 mL) a -15 °C, se añadió gota a gota cloruro de pivaloilo (9,74 mmol) bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a -15 °C durante 2 horas. Se añadieron diclorometano y solución de NH₄Cl. Se separó la fase orgánica, se lavó con solución de NH₄Cl, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El material crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice (DCM (diclorometano)/MeOH) para dar el compuesto del título.

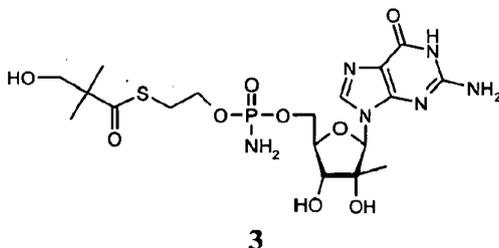
15 Fórmula molecular C₃₇H₄₂N₅O₉PS. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm) 0,80 (s, 3H), 1,13 (s, 6H), 3,04 (s, 2H), 3,14 (m, 2H), 3,97-4,08 (m, 4H), 4,28-4,38 (m, 2H), 5,35-5,10 (m, 2H), 5,77 (s, 1H), 6,52 (brs, 2H), 6,87-6,89 (m, 2H), 7,11-7,43 (m, 15H), 7,75 (s, 1H), ³¹P NMR (DMSO-d₆, 162 MHz) δ (ppm) 9,20 (s) 9,47 (s). Barrido ES⁺ 764 (M+H)⁺

Etapa 2: {9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(trifenilmetiloxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil) fosforamidato



A una solución enfriada (-45 °C) del compuesto 1-1 (0,76 mmol) en tetracloruro de carbono (8 mL) se añadió una solución 0,5 M de NH₃ en dioxano (3,80 mmol, 8 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 3 horas entre -15 °C y -10 °C. Los compuestos volátiles se evaporaron a vacío. El residuo obtenido se co-evaporó con diclorometano y se utilizó sin purificación en la siguiente etapa. Sólido beige. Fórmula molecular C₃₇H₄₃N₆O₉PS. Barrido ES⁺ 779 (M+H)⁺

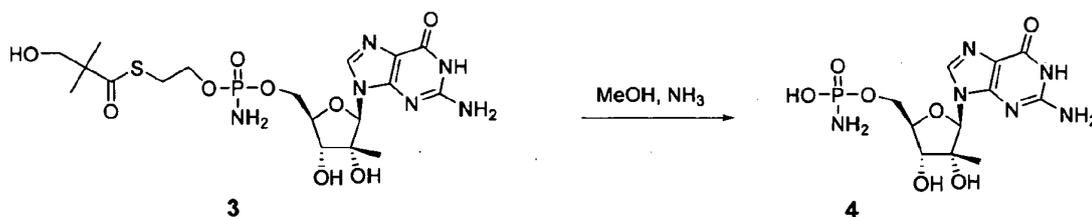
5 Etapa 3: Derivado hidroxitBuSato-fosforamidato de 2'-C-metilguanosa



10 Se agitó el compuesto 1-2 (0,78 mmol) a temperatura ambiente en AcOH acuoso al 80 % (31 mL) durante 8 horas. Se añadió EtOAc (20 mL) y se concentró la capa acuosa a presión reducida. Se purificó el material crudo por cromatografía C18 (agua/acetonitrilo) para dar el compuesto del título. Polvo blanco. Fórmula molecular C₁₈H₂₉N₆O₉PS. ¹H NMR (D₂O-d₆, 400 MHz) δ (ppm) 0,96 (s, 3H), 1,02 (2s, 6H), 3,00-3,07 (m, 2H), 3,47 (2s, 2H), 3,98-4,03 (m, 2H), 4,14-4,18 (m, 1H), 4,24-4,38 (m, 3H), 5,88 (2s, 1H), 7,85 (s, 1H) ³¹P NMR (D₂O-d₆, 162 MHz) δ (ppm) 12,93-13,04 (2s, 1P). Barrido ES⁺ 537 (M+H)⁺

Ejemplo de referencia 2

Preparación de {9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il fosforamidato (Compuesto 4)

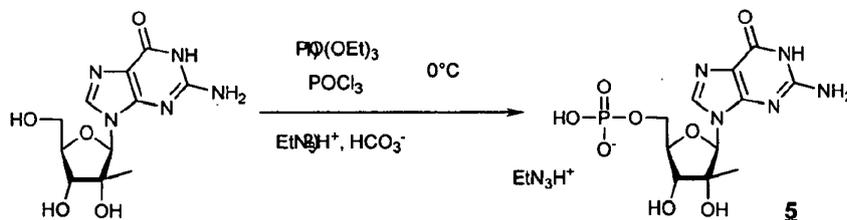


15 Se disolvió {9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(hidroxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil) fosforamidato (Compuesto 3) (0,20 mol) en una solución de metanol saturado con NH₃ (4 mL), a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 30 min y a temperatura ambiente durante 2 horas. Se evaporó el disolvente y el material crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice de fase inversa (C 18) eluyendo con un gradiente 0-3 % de metanol para dar el compuesto del título (Compuesto 4) como un sólido blanco. Fórmula molecular C₁₁H₁₇N₆O₇P. ¹H NMR (d₆-DMSO, 400 MHz) δ (ppm) 0,79 (s, 3H), 3,82-3,88 (m, 2H), 4,25-3,35 (m, 2H), 4,81 (brs, 1H), 5,63 (s, 1H), 6,85 (brs, 2H), 7,80 (s, 1H). ³¹P NMR (DMSO-d₆, 162 MHz) δ (ppm) 7,58 (s, 1P).

20

Ejemplo de referencia 3

Preparación de [(2R)-2-metil-β-D-ribofuranosil]guanina 5'-monofosfato (Compuesto 5)



25 A una solución en agitación de 9-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)guanina (0,33 mmol) en trietilfosfato (825 μL), se añadió cloruro de fosforilo (75 μL, 1,07 mmol) a 0 °C. Se agitó esta mezcla de reacción durante la noche a 5 °C. Se sofocó cuidadosamente la reacción con TEAB (bromuro de trietilamonio) 1 M (pH = 7,5, 15 mL), se agitó durante 20 min a 0 °C, después se diluyó con agua y acetato de etilo. Se concentró la fase acuosa a presión reducida. Se sometió el material crudo a cromatografía DEAE-Sephadex eluyendo con TEAB. Se reunieron las fracciones deseadas, se concentraron a presión reducida y se co-evaporaron con una mezcla de agua/metanol, y finalmente se co-evaporaron con agua. El residuo resultante se purificó por HPLC semi-preparativa. Las fracciones que contienen el producto esperado se concentraron a presión reducida, se co-evaporaron con una mezcla de agua/metanol y se liofilizaron del agua. Se eluyó la sal monofosfato de trietilamonio con agua en una columna de resina Dowex Na⁺ para dar después de liofilización la sal de sodio. Sólido blanco. Fórmula molecular C₁₁H₁₅N₅O₈PNa. ¹H NMR (D₂O,

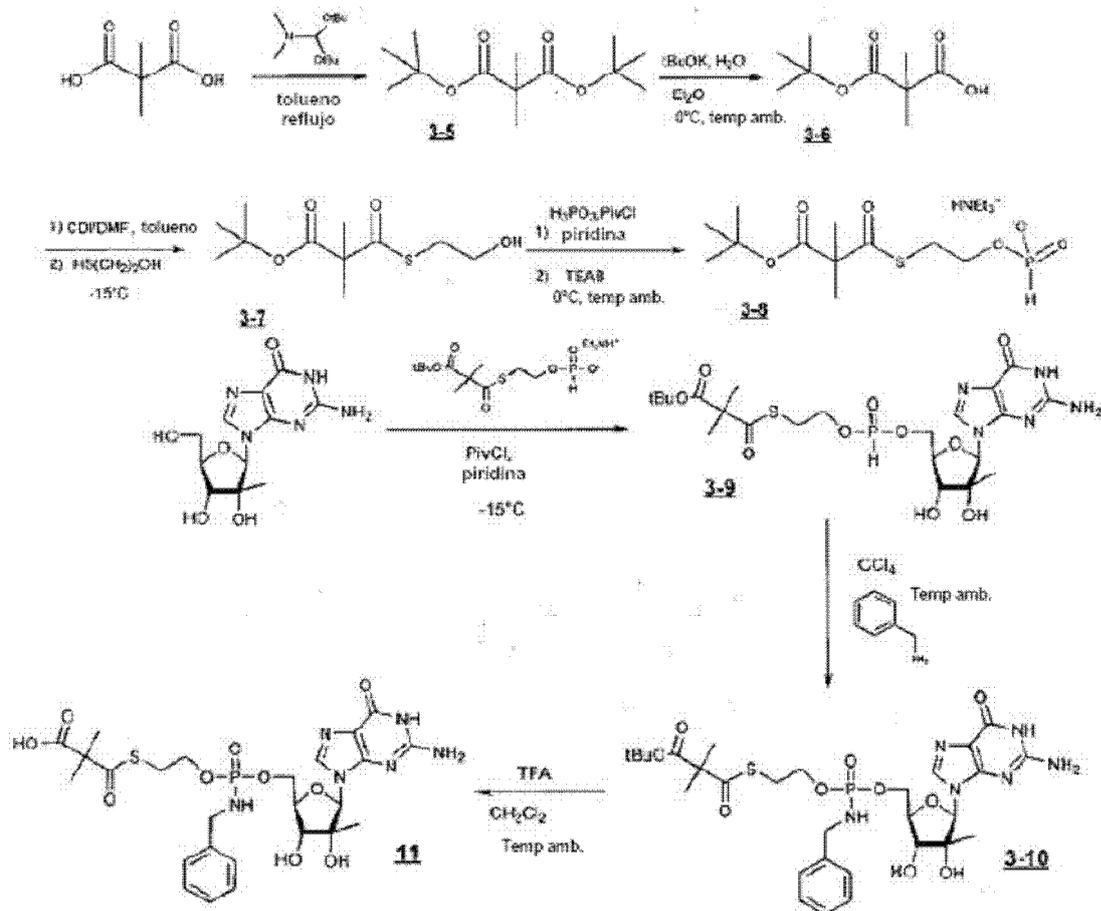
30

35

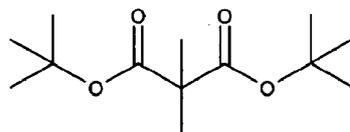
400 MHz) δ (ppm) 0,83 (s, 3H), 4,05-4,11 (m, 3H), 4,21-4,24 (m, 1H), 5,79 (m, 1H), 7,94 (m, 1H). ^{31}P NMR (D_2O , 121 MHz) δ (ppm) -0,42 (s, 1P). LRFAB-MS (GT): 422 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$

Ejemplo 4

5 Preparación de {9-[(2R)2-C-metil- β -D-eritro-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(carboxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil)encilamina fosforamidato (Compuesto 11)

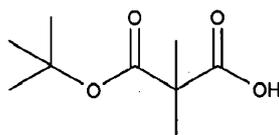


Etapas 1: éster di-terc-butílico de ácido 2,2-dimetilmalónico



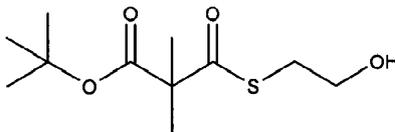
10 El Compuesto 3-5 se sintetizó a partir del ácido dimetilmalónico siguiendo el procedimiento descrito en Synthesis, 1983, 135. Aceite amarillo. Fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_4$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ (ppm) 1,26 (s, 6H), 2,89 (s, 18H).

Etapas 2: éster terc-butílico de ácido 2,2-dimetilmalónico



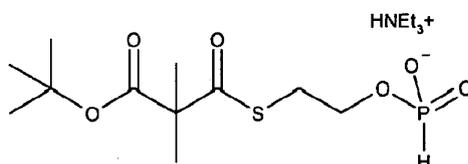
15 El Compuesto 3-6 se sintetizó a partir del compuesto 5 siguiendo el procedimiento descrito en J.Org. Chem, 2004, 69, 6185. Sólido blanco. Fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ (ppm) 1,22 (s, 6H), 1,37 (s, 9H).

Etapa 3: éster terc-butílico de ácido 2-(2-hidroxi-etilsulfanilcarbonyl)-2-metil-propiónico



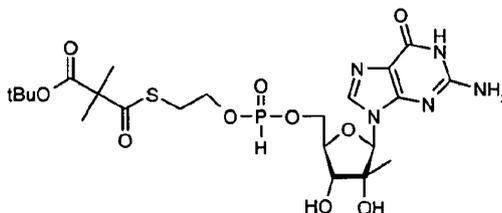
5 A una solución en agitación del compuesto 3-6 (1,30 mmol) en una mezcla anhidra de tolueno (6 mL) y DMF (dimetilformamida) (455 μ L), se añadió 1,1'-carbonildiimidazol (1,69 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 min, se diluyó con tolueno/DMF (93/7, v/v), se enfrió hasta $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se trató con 2-mercaptoetanol (1,69 mmol). Se agitó la mezcla durante 3 horas entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se eliminaron los disolventes a presión reducida. Se recogió el residuo en DCM y se lavó con agua. Se separaron los compuestos orgánicos, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto del título. Aceite amarillo. Fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{S}$. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 1,22 (s, 6H), 1,37 (s, 9H), 2,60 (m, 2H), 2,80 (m, 2H).

Etapa 4: éster terc-butílico de ácido S-(2-fosfito-etil)-2,2-dimetil-sulfanilcarbonyl propiónico trietilamina



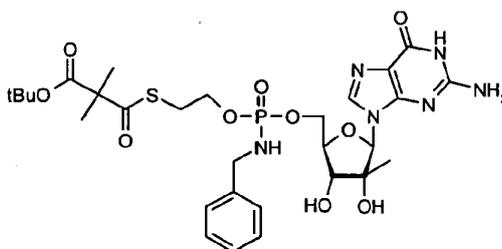
15 El compuesto 3-7 (1,3 mmol) disuelto en piridina (6 mL) se añadió a ácido fosforoso (13 mmol). Se enfrió la mezcla de reacción hasta $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se añadió cloruro de pivaloilo (7,15 mmol). Se dejó que la mezcla se calentara hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. Se sofocó cuidadosamente la reacción con TEAB acuoso 1 M (3 mL), se diluyó con EtOAc (50 mL) y se lavó con TEAB 0,5 M (15 mL). Se separaron los compuestos orgánicos, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a presión reducida, se co-evaporaron con tolueno y se purificaron por cromatografía en gel de sílice (DCM+TEA (triethylamina) al 1 %/DCM, MeOH al 10 %, TEA al 1 %) para dar el compuesto del título. Aceite amarillo. Fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{NO}_6\text{PS}$. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 1,19 (s, 9H), 1,30 (s, 6H), 3,62 (m, 2H), 3,94 (m, 2H). ^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz) δ (ppm) 4,25 (s, 1P).

Etapa 5: {9-[(2R)2-C-metil- β -D-eritro-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(terc-butylcarboxi-terc-butyl-S-acil-2-tioetil) H-fosfonato



25 El compuesto 3-9 se sintetizó a partir de 9-(2-C-metil- β -D-ribofuranosil)guanina y sal de trietilamina del éster terc-butílico de ácido S-(2-fosfito-etil)-2,2-dimetil-sulfanilcarbonyl propiónico siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 1-1. Aceite amarillo pálido. Fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{PS}$ - Barrido ES^+ 592 (M+H) $^+$

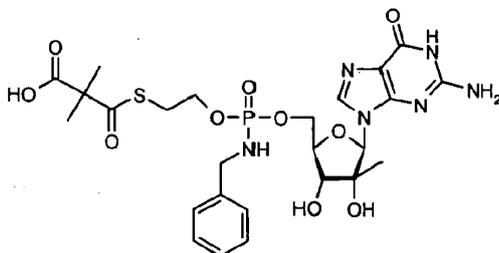
Etapa 6: {9-[(2R)2-C-metil- β -D-eritro-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(terc-butylcarboxi-terc-butyl-S-acil-2-tioetil)bencilamina fosforamidato



30 A una solución en agitación del compuesto 3-9 (0,84 mmol) en tetracloruro de carbono (8,4 mL) se añadió gota a gota bencilamina (8,4 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 3 horas a temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc (100 mL) y se lavó con HCl 1 N (50 mL). Se separaron los compuestos orgánicos, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a presión reducida. Se purificó el material crudo por cromatografía en gel

de sílice (metanol/diclorometano) para dar el compuesto del título. Sólido blanco. Fórmula molecular $C_{29}H_{41}N_6O_{10}PS$. Barrido $ES^+ 697 (M+H)^+$

Etapa 7: {9-[(2R)-2-C-metil-βD-eritro-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(carboxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil)encilamina fosforamidato



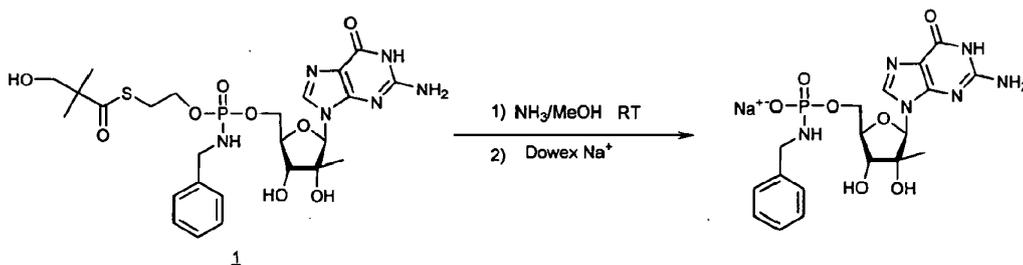
5

A una solución en agitación del compuesto 3-10 (0,07 mmol) en DCM (1 mL) se añadió TFA (ácido trifluoroacético) (2,24 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora, se añadió después TFA (1,12 mmol) y se dejó la mezcla en agitación durante 1 hora más. Se evaporó el disolvente. Se purificó el material crudo por HPLC preparativa para dar el compuesto del título. Sólido blanco. Fórmula molecular $C_{25}H_{33}N_6O_{10}PS$. ^{31}P NMR (DMSO- d_6 , 162 MHz) δ (ppm) 9,64-9,90 (2s, 1P). Barrido $ES^+ 642 (M+H)^+$

10

Ejemplo de referencia 5

[(2R)-2-metil-β-D-ribofuranosil]guanina-N-bencilaminil-5'-monofosfato (sal) (Compuesto 2, sal sódica)



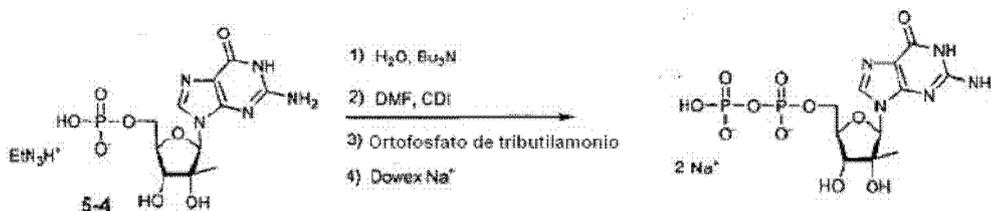
15

Se agitó el Compuesto 1 (0,24 mmol) en $NH_3/MeOH$ (7 N) (10 mL) a temperatura ambiente durante 5 horas. Se evaporó la mezcla, se purificó el residuo obtenido por cromatografía en gel de sílice (agua/acetoniitrilo) y se eluyó con agua sobre una columna de resina Dowex Na^+ para dar después de liofilización la sal sódica. Sólido blanco. Fórmula molecular $C_{18}H_{23}N_6O_7P$. 1H NMR (DMSO- $d_6 + D_2O$, 400 MHz) δ (ppm) 0,79 (s, 3H), 3,75-4,15 (m, 6H), 5,70 (s, 1H), 7,09-7,15 (m, 5H), 8,07 (s, 1H). ^{31}P NMR (DMSO- $d_6 + D_2O$, 162 MHz) δ (ppm) 6,31 (s, 1P). Barrido $ES^+ 489 (M+Na)^+$

20

Ejemplo de referencia 6

[(2R)-2-metil-β-D-ribofuranosil]guanina 5'-difosfato



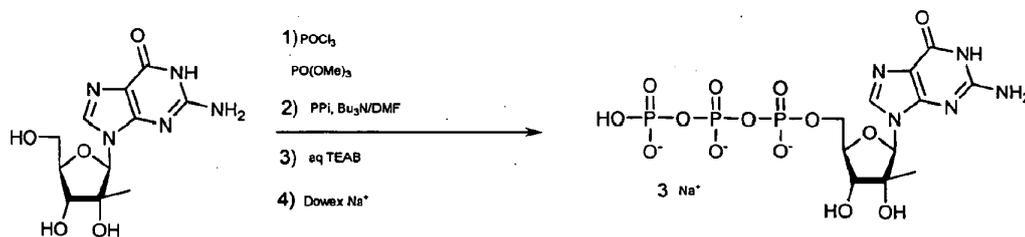
25

Se disolvió el compuesto 5-4 (0,276 mmol) en agua (0,7 mL) con Bu_3N (1,1 mmol). Se concentró la mezcla a presión reducida, se co-evaporó tres veces con piridina y dos veces con tolueno. Se añadió DMF (2,25 mL) seguida por 1,1-carbodiimidazol (1,68 mmol). Se agitó la mezcla durante 16 horas y se añadió TEAB (7 mL). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas, se hidrolizó con agua (pH neutro) y se concentró a presión reducida. El material crudo se eluyó con TEAB a través de una columna Sephadex-DEAE-A25 5 (Fluka) y se purificó por HPLC preparativa. El polvo blanco obtenido se eluyó con agua sobre una columna de resina Dowex Na^+ para dar después de liofilización la sal sódica. Sólido blanco. Fórmula molecular $C_{11}H_{15}N_5Na_2O_{11}P_2$. 1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) 0,90 (s, 3H), 4,13-4,24 (m, 4H), 5,87 (s, 1H), 7,99 (s, 1H). ^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz) δ (ppm) -11,15, -10,45 (2d, 2P).

30

Ejemplo de referencia 7

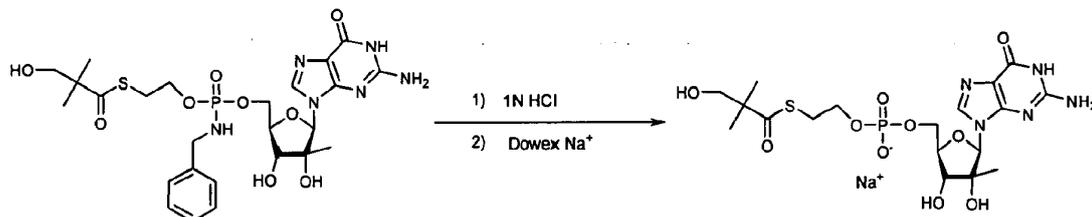
[(2R)-2-metil-β-D-ribofuranosil]guanina 5'-trifosfato (sal sódica)



5 A una solución de 9-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)guanina (0,40 mmol) en trietilfosfato (1 mL), se añadió cloruro de fosforilo (1,08 mmol) a 0 °C. Se agitó esta mezcla de reacción durante la noche a 5 °C. Se disolvió pirofosfato de tributilamonio (PPI/Bu₃N 1/1,5, 1 g, 2,19 mmol) en DMF anhidra (2 mL). Se añadieron 2,4 mL de esta solución a la mezcla de reacción. Se agitó entonces la mezcla a 0 °C durante 1 min. Se sofocó cuidadosamente la reacción con TEAB 1 M (pH = 7,5, 5 mL), se agitó durante 20 min a 0 °C, y después se diluyó con agua y acetato de etilo. Se concentró la fase acuosa a presión reducida. Se sometió el material crudo a cromatografía en DEAE-Sephadex (eluida con TEAB). Se reunieron las fracciones deseadas, se concentraron a presión reducida y se co-evaporaron con una mezcla de agua/metanol, y finalmente se co-evaporaron con agua. El residuo resultante se purificó por HPLC semi-preparativa. Se eluyó la sal trifosfato de trietilamonio tres veces con agua en una columna de resina Dowex Na⁺ para dar después de liofilización la sal sódica. Polvo blanco. Fórmula molecular C₂₉H₆₃N₈Na₃O₁₄P₃. ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ (ppm) 0,91 (s, 3H), 4,14-4,36 (m, 4H), 5,88 (s, 1H), 8,01 (s, 1H). ³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) δ (ppm) -11,20,-10,65 (2d, 2P), -22,74 (t, 1P).

Ejemplo 8

O-(Hidroxil-terc-butil-S-acil-2-tioetil)-2'-C-metilguanosin-5'-il-fosfato (sal sódica)



20 Se disolvió el Compuesto 1 (0,11 mmol) en HCl acuoso 1 N y se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía C18 en gel de sílice (eluido con agua/acetonitrilo) y se eluyó con agua sobre una columna de resina Dowex Na⁺ para dar la sal sódica después de liofilización. Polvo blanco. ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ (ppm) 0,94-0,98 (m, 9H), 2,94 (t, J= 6,8 Hz, 2H), 3,43 (s, 2H), 3,77 (t, J= 7,2 Hz, 2H), 4,12-4,30 (m, 4H), 5,88 (s, 1H), 7,94 (s, 1H). ³¹P NMR (D₂O, 126 MHz) δ (ppm) -0,08 (s, P).

Ejemplo 9

Purificación del Compuesto 1 crudo con una relación de P diastereoisómero > 1,00:1,00

El Compuesto 1 crudo se purificó por cromatografía de fase inversa (Bakerbond preparada RP-sílice C-18 40 μm - lavada con gradiente de 100 % de acetonitrilo hasta 100 % de H₂O). Se disolvió el crudo en tetrahidrofurano, H₂O y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio.

30 Elución bajo un vacío suave con un gradiente en etapas:

MeCN (acetonitrilo) al 1,5 %/H₂O

MeCN al 5 %/H₂O

MeCN al 10 %/H₂O

MeCN al 15 %/H₂O

35 MeCN al 18 %/H₂O

MeCN al 20 %/H₂O

MeCN al 25 %/H₂O

Se obtuvo el Compuesto 1 puro después de varias fracciones de MeCN al 25 %. Las fracciones químicamente puras (mezcla de diastereoisómeros > 1,00:1,00) se conservaron a 2-6 °C durante 15 h y después de este tiempo los sólidos precipitados (predominantemente el diastereoisómero 2) se filtraron y se secaron a vacío a 32-38 °C, llegando al diastereoisómero 2 puro, (pureza diastereoisomérica: 98 %).

- 5 La pureza química del sólido se comprobó por HPLC utilizando el Método A, descrito más adelante. La pureza diastereoisomérica se comprobó por HPLC quiral y ³¹P NMR.

Ejemplo 10

Aislamiento del Compuesto 1, diastereoisómero 1:

- 10 Se separó el Compuesto 1, diastereoisómero 1 utilizando cromatografía en columna (gel de sílice C18) de fase inversa en un sistema de purificación CombiFlash. Se disolvió una mezcla de diastereoisómeros (1 g, diastereoisómeros 2/1 83/17, pureza química = 97,3 %) en THF (tetrahidrofurano)/agua (3:1, 4 mL). Se cargó la solución sobre una columna C18 pre-equilibrada (RediSep reutilizable Rf C18, 130 g) y se eluyó con gradiente de metanol/agua (40/60 a 50/50, caudal = 50 mL/min). El primer isómero eluido fue el diastereoisómero 1. Se comprobaron las fracciones por HPLC en cuanto a las purezas, química y diastereoisomérica, del diastereoisómero 1. Se reunieron las fracciones limpias y se evaporaron a vacío para obtener el diastereoisómero 1. Neto = 290 mg; ambas purezas, química y diastereoisomérica, >99 % (AUC, HPLC Método A y HPLC Método B, respectivamente).

HPLC Método A: Pureza química

- 20 Columna: Zorbax Eclipse XDB-C8; 4,6 x 75 mm 3,5 micras
Fase móvil A: Acetonitrilo
Fase móvil B: tampón de acetato de amonio 0,01 M, pH = 4,4
Temperatura de la columna: 28 °C
Caudal: 1,4 mL/min
Detección: UV 254 nm, UV 272 nm

Gradiente:

Tiempo	Fase móvil A	Fase móvil B
0	5	95
5,5	80	20
10	80	20

Método B: Método HPLC para resolver los diastereoisómeros del Compuesto 1

- 30 Columna: Agilent Eclipse XDB C18; 4,6 x 150 mm 5 micras
Fase móvil A: Metanol
Fase móvil B: Agua
Caudal: 1,0 mL/min
Detección: UV 272 nm

Gradiente:

Tiempo	Fase móvil A	Fase móvil B
0	40	60
20	55	45

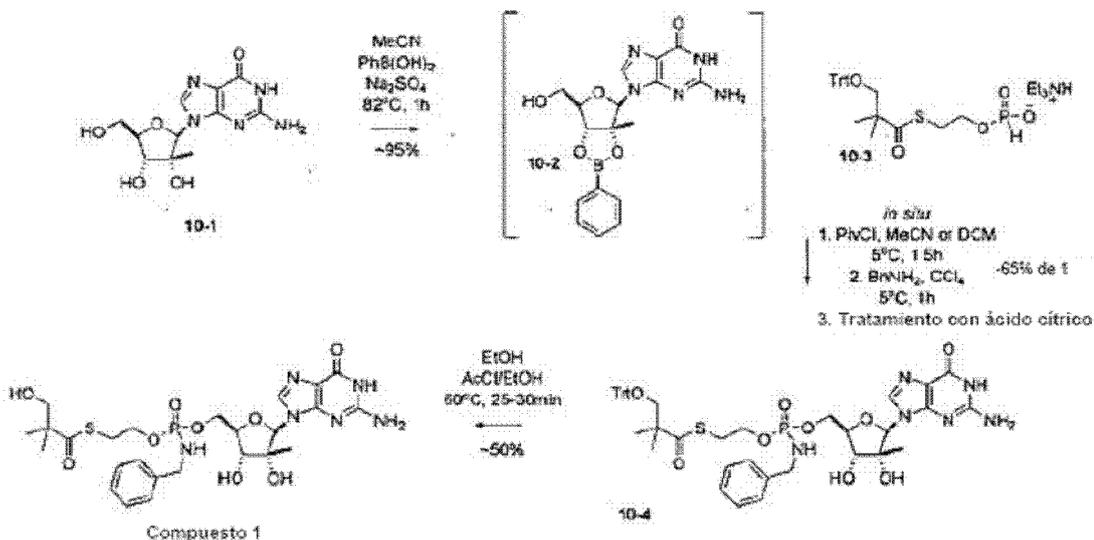
35 Tiempo de retención:

- Compuesto 1, diastereoisómero 2: 16,5 ± 0,5 min
Compuesto 1, diastereoisómero 1: 14,4 ± 0,5 min

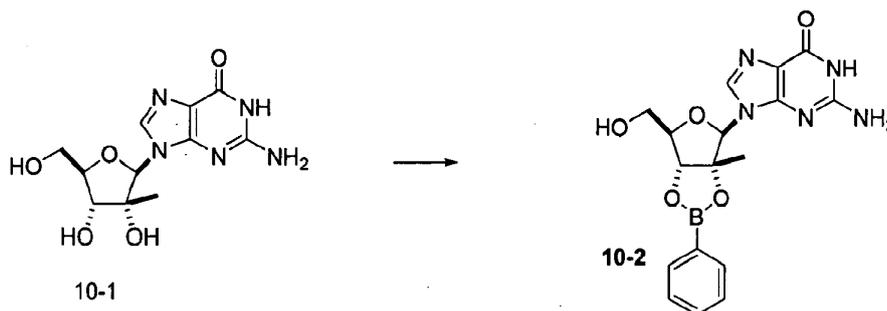
- 40 La Figura 1 proporciona un cromatograma de HPLC que ilustra la resolución de los dos diastereoisómeros del Compuesto 1 - los dos picos en el cromatograma, pico 1 y pico 2, corresponden a los diastereoisómeros 1 y 2 del Compuesto 1.

Ejemplo 11

A. Preparación del Compuesto 1



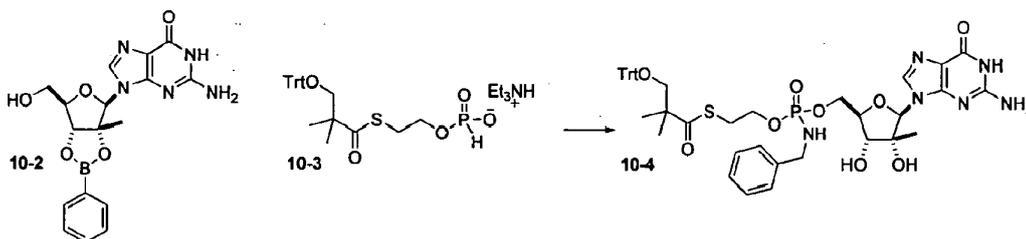
5 El Compuesto 1 se sintetiza como una mezcla de diastereoisómeros con fósforo en la relación 1:1. El rendimiento global aislado desde 2'-C-metil-guanosina hasta Compuesto 1 es típicamente 30-35 %.



Material	Grado	FW (masa molecular) g·mol ⁻¹	Cantidad	Densidad g·ml ⁻¹	Cantidad mol	Eq.
2'-C-metil-guanosina	97 %	297,1	242 g	-	0,791	1,0
PhB(OH)_2	98 %	122,1	103,4 g	-	0,831	1,05
Acetonitrilo anhidro	98 %	-	1,47 L	-	-	-
Na_2SO_4 anhidro	99 %	142,0	281 g	-	1,980	2,5
Na_2SO_4 anhidro	99 %	142,0	112 g	-	0,791	1,0

10 Se suspendió 2'-C-metil-guanosina en acetonitrilo bajo argón y se añadió sulfato de sodio anhidro (2,5 eq.). Después de agitar durante cinco minutos, se añadió ácido bencenoborónico en una porción y se mantuvo la mezcla a reflujo durante 1 h. El análisis de la mezcla de reacción por ¹H-NMR (preparación de la muestra de NMR: aproximadamente 0,1 ml de una alícuota de reacción se secó al aire bajo flujo de argón para eliminar el acetonitrilo, el residuo se disolvió en d₆-DMSO) indicó una relación de producto:material de partida >96:4.

Después de 2 h a reflujo, se enfrió la mezcla a 25 °C bajo argón y se añadió sulfato de sodio anhidro adicional (1,0 eq.). La mezcla resultante se utilizó directamente para la siguiente etapa.



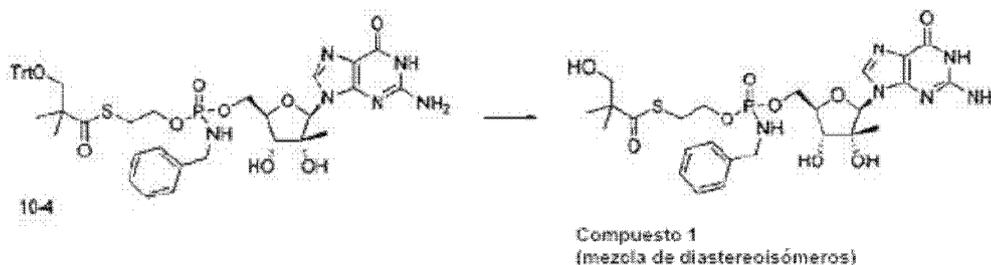
Material	Grado	FW g/mol	Cantidad	Densidad g/ml	Cantidad mol	Eq.
2,3-PhB-2'-C-metil-guanosina	-	-	Mezcla	-		1
Fosfonato 10-3	-	585,7	695 g	-	1,186	1,5
Acetonitrilo anhidro	98 %	-	526 mL	-	-	-
Piridina anhidra	99,5 %	79,1	690 mL	0,978	8,54	10,8
Cloruro de pivaloilo	98 %	120,6	497 mL	0,98	3,95	5,0
Bencilamina	98 %	107,2	1,30 L	0,98	11,86	15
Tetracloruro de carbono	99,5 %	153,8	918 mL	1,59	9,49	12

- 5 Se disolvió el fosfonato 10-3 en acetonitrilo (526 mL) y se añadió a la mezcla cruda de 2'-C-metil-guanosina-boronato 10-2 bajo argón. Se enfrió entonces esta mezcla a 5 °C bajo argón. Por separado, se trató piridina con cloruro de pivaloilo bajo argón y la mezcla resultante se añadió gota a gota (a lo largo de 1,5 h) al matraz de reacción de boronato-fosfonato, manteniendo la temperatura interna por debajo de 8 °C. Después de agitar a 8 °C durante 30 min, el análisis por HPLC (Test20; 254 nm) indicó una relación de ~1,5:1 de producto P-H a 2'-C-metil-guanosina.
- 10 Se dejó que la mezcla de reacción se calentara gradualmente hasta 14 °C durante los siguientes 50 min en cuyo punto el análisis por HPLC (Test20; 254 nm) indicó una relación de ~6,5:1 de producto P-H a 2'-C-metil-guanosina. No se añadió cloruro de pivaloilo adicional.
- 15 La temperatura interna de la reacción se redujo y después se mantuvo por debajo de 8 °C antes de que se añadiera bencilamina gota a gota (1 h) dando una suspensión espesa. Se añadió entonces tetracloruro de carbono durante 15 min asegurando que la temperatura interna permanecería por debajo de 15 °C. La reacción fue ligeramente exotérmica. El análisis por HPLC (Test20; 272 nm) después de 15 min indicó el consumo completo del intermedio P-H (tiempo de retención (Tr) 5,26 min) y la formación del producto (Tr 5,73 min). La mezcla de reacción se mantuvo durante la noche a 4 °C bajo argón.
- 20 Se añadió TBME (éter de terc-butilo y metilo) (3 L) y la mezcla resultante se vertió sobre una solución acuosa de ácido cítrico (22 % p/v, 9,3 L). Se utilizó TBME adicional (4,4 L) para lavar el vaso de reacción. Se agitó la mezcla bifásica durante 45 min a temperatura ambiente para efectuar la escisión del boronato. Se observaron sólidos residuales en la fase acuosa, por lo que se añadió 1 L adicional de solución de ácido cítrico para llevar a cabo una separación de fases adecuada.
- 25 Se separaron las dos fases y se observó que la fase acuosa tenía pH 4 sin que se observara ningún producto por análisis de HPLC. La capa orgánica se alcalinizó a pH 8 con bicarbonato de sodio acuoso (5 % p/v; 4,7 L) y se separaron las capas después de la adición de salmuera saturada (2 L). No se observó producto en la capa acuosa de bicarbonato por análisis de HPLC.
- 30 Se añadió TBME adicional (7,4 L) a la capa orgánica para inducir la precipitación adicional de producto y se agitó la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente.
- La filtración a vacío y posterior análisis de HPLC indicaron una pequeña cantidad de producto en el filtrado de TBME. Se lavó la torta del filtro con agua (8 L, ningún producto en el filtrado), TBME (4 L, producto despreciable en el filtrado) y etanol (2 L, producto observado en el filtrado).

Se secó el sólido en una estufa de vacío (<35 °C) utilizando absorbente Drierita para obtener 465 g de fosforamidato 10-4 de color amarillo pálido.

AUC por HPLC Test20 @ 272 nm: 92 % - dos impurezas principales Tr 4,5 min (2,5 %) y Tr 5,1 min (3,5 %) derivadas del lote de fosfonato 10-3.

5 Rendimiento: 67 %. ³¹P NMR relación 9,93 ppm:9,78 ppm =1,1:1,0.



Material	Grado	FW g/mol-1	Cantidad	Densidad g/ml-1	Cantidad mol	Eq.
Fosforamidato 10-4	-	868,9	317 g	-	0,365	1
AcCl	99 %	78,5	53 mL	1,105	0,730	2,0
EtOH anhidro	98 %	-	4,7 L	-	-	-

10 Se disolvió el fosforamidato 10-4 en etanol anhidro (4,0 L) bajo argón. Se añadió cuidadosamente por separado cloruro de acetilo a etanol anhidro (600 mL) – altamente exotérmico - bajo argón. La solución de HCl en etanol producida de este modo se añadió a la solución de fosforamidato con lo cual la temperatura interna subió de 18 °C a 20 °C. Se utilizaron 100 mL adicionales de etanol anhidro para enjuagar el resto de la solución de HCl hacia la mezcla de reacción.

15 Se calentó la mezcla de reacción a 60 °C durante 30 min y después de este tiempo el análisis de HPLC (Test20 @ 254 o 272 nm) indicó la conversión completa del material de partida (Tr 5,7 min) en un producto principal (Tr 3,32 min).

Después de un tiempo total de reacción de 45 min se enfrió la mezcla a 25-30 °C y se añadió bicarbonato de sodio sólido (2,3 Kg), manteniendo la temperatura interna a 25-30 °C mientras se agitaba durante 1 h. Se hizo seguimiento del pH utilizando tiras indicadoras de pH Colorfast y se encontró que era pH 5-6.

20 Se filtró la mezcla a través de Celita y se lavó con etanol (4 L) y tetrahidrofurano (1,5 L). Se concentró el filtrado a vacío a 35 °C para dar un sólido (356 g). Por trituración con TBME (1,5 L) durante 15 min a 35 °C para eliminar el subproducto de tritilo se obtuvo un sólido que se filtró, se lavó con TBME (750 mL) y se secó para dar el producto 10-5 crudo (268 g; 78 % por HPLC Test20 AUC @ 272 nm). No se observó ningún producto en el filtrado por análisis de HPLC.

25 Se purificaron 268 g del Compuesto 1 crudo por cromatografía de fase inversa (3 Kg de sílice RP preparada Bakerbond 40 µm C-18 - lavada con gradiente de 100 % de acetonitrilo hasta 100 % de H₂O). Se disolvió el crudo en tetrahidrofurano (225 mL), H₂O (75 mL) y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (75 mL). Se obtuvieron 135 g, >98 % de pureza por HPLC Test20 AUC @ 272 nm (59 % de rendimiento).

Los datos analíticos típicos se muestran a continuación:

Compuesto 1: C₂₅H₃₅N₆O₉PS 626,62 g/mol⁻¹

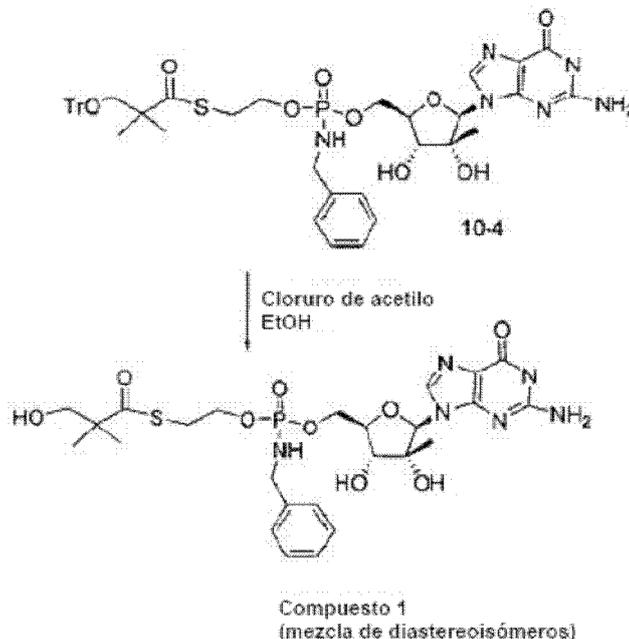
30 AUC de HPLC (Método Test20): 99 % @ 272 nm, Tr 3,32 min

m/z (ESI⁺): 627,05 [M+H]⁺ 100 %; 1253,55 [2M+H]⁺ 20 %

35 ¹H NMR δ_H (400 MHz, d₆-DMSO): 0,85 (3H, s, CH₃), 1,11 (6H, s, (CH₃)₂C), 3,05 (2H, m, CH 2S), 3,44 (2H, d, J 5,5Hz, CH₂OH), 3,89-4,02 (6H, m, H-3', H-4', CH₂O, CH₂Ph), 4,14-4,20 (1H, m, H-5'), 4,22-4,30 (1H, m, H-5''), 4,97 (1H, t, J 5,5Hz, CH₂OH) 5,22 (1H, s, OH-2'), 5,43, 5,46 (2 x 0,5H, 2 x d, 2 x J 6,4Hz, OH-3'), 5,68 (1H, m, P-N-H), 5,78 (1H, s, H-1'), 6,56 (2H, br-s, NH₂), 7,20-7,24 (1H, m, Ar-H), 7,28-7,34 (4H, m, 4 x Ar-H), 7,80, 7,81 (2 x 0,5H, 2 x s, H-8), 10,69 (1H, br-s, N-H)

³¹P NMR δ_P (162 MHz, d₆-DMSO): 9,78, 9,92 (1P, 2 x s, relación 1,00:1,09)

B. Preparación de Compuesto 1, diastereoisómero 2



Procedimiento 1

5 Síntesis del Compuesto 1 (mezcla de diastereoisómeros) - reacción de des-tritilación mediada por cloruro de acetilo/etanol:

Compuestos químicos	Vendedor/Grado	FW	Cantidad	mmol	Eq.
Compuesto 4-2	Preparado por procedimientos conocidos	868	229,0 g	264	1,0
Cloruro de acetilo (d= 1,105)	Fluka/ 98+ %	78,5	37,5 mL	527	1,5
Etanol	Aldrich/ anhidro	46	3,3 L	disolvente	14,5 mL/g
Sulfato de sodio	J.T. Baker/ anhidro	142	65 g	458	1,7
Bicarbonato de sodio	J.T. Baker/ polvo	84	1,2 kg	Para neutralización	

10 A una suspensión del compuesto 10-4 (229,0 g, 264 mmol, 89 % de pureza, relación de diastereoisómeros TrO-A:TrO-B 2:1) en etanol anhidro (3,3 L) se añadió cloruro de acetilo (37,5 mL, 527 mmol) por medio de un embudo de adición a lo largo de un período de 5 minutos. La mezcla resultante se calentó a 60 °C con una manta de calefacción y se mantuvo a 60 °C durante 1 hora. La HPLC indicó que la reacción era completa (Método A, AUC, 272 nm, solamente se detectó menos del 0,5 % de compuesto 10-4).

Tratamiento: Se enfrió la mezcla de reacción sobre un baño de hielo a 28 °C; se añadió sulfato de sodio anhidro (65 g). Se separó entonces el baño de enfriamiento. Se añadió bicarbonato de sodio polvo (1,2 kg) en porciones durante

un período de 1 hora. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos; el pH de la mezcla era ~7. Se

15 separó entonces el sólido insoluble mediante filtración a vacío. Se lavó la torta del filtro con etanol (700 mL) y THF (700 mL). Se concentró el filtrado en un rotavapor hasta un volumen de aproximadamente 200 mL. Se añadió al residuo éter de terc-butilo y metilo (TBME) (1 L). Se separó de la solución un sólido pegajoso y se adhirió a los lados del matraz. Se dejó entonces la mezcla en reposo en refrigeración (4 °C) durante la noche.

20 Se decantó el TBME de la mezcla anterior. Se añadió TBME adicional (200 mL) para lavar el residuo sólido agitando por rotación durante 5 minutos. Se decantó el TBME para obtener el crudo.

Aislamiento/purificación del Compuesto 1, diastereoisómero 2:

Se suspendió el material crudo anterior en THF (520 mL) y agua (30 mL). Se añadió una pequeña cantidad (aproximadamente 5 mL) de solución saturada de bicarbonato de sodio para ajustar el pH a 7,5 (de partida pH=6,

- 5 papel de pH). Se agitó la mezcla por rotación en el matraz de fondo redondo durante 15 minutos. Se añadió más THF (280 mL) a la mezcla. Después de agitar durante 5 minutos, se recogió el sólido por filtración a vacío. Se lavó la torta del filtro con THF (120 mL) y agua (140 mL) y se secó en una estufa a vacío a 40 °C. Se obtuvo el Compuesto 1, diastereoisómero 2 como un sólido blanco. Neto = 55,0 g, pureza química = 97 % (AUC, HPLC Método A, véase el Ejemplo 10); pureza diastereoisomérica = 97,7 %. (AUC, HPLC).

Procedimiento 2

Síntesis del Compuesto 1 (mezcla de diastereoisómeros) - reacción de des-tritilación mediada por cloruro de acetilo/etanol:

Compuestos químicos	Vendedor/Grado	FW	Cantidad	mmol	Eq.
Compuesto 10-4	Preparado por procedimientos conocidos	868	231,0 g	266	1,0
Cloruro de acetilo (d= 1,105)	Fluka/ 98+ %	78,5	37,8 mL	530	1,5
Etanol	Aldrich/ anhidro	46	2,46 L	disolvente	10 mL/g
Sulfato de sodio	J.T. Baker/ anhidro	142	70 g	492	1,8
Bicarbonato de sodio	J.T. Baker/ polvo	84	2,0 kg	Para neutralización	

- 10 A una suspensión del compuesto 10-4 (231,0 g, 266 mmol, 90 % de pureza, relación de diastereoisómeros TrO-A:TrO-B 2,3:1) en etanol anhidro (2,46 L) se añadió cloruro de acetilo (37,8 mL, 530 mmol) por medio de un embudo de adición a lo largo de un período de 5 minutos. La mezcla resultante se calentó a 60 °C con una manta de calefacción y se mantuvo a 60 °C durante 1 hora. El resultado de la HPLC indicó que la reacción era completa (Método A, AUC, 272 nm, solamente se detectó menos del 1,5 % de compuesto 10-4).

- 15 Tratamiento: Se enfrió la mezcla de reacción sobre un baño de hielo a 30 °C; se añadió sulfato de sodio anhidro (70 g). Se separó entonces el baño de enfriamiento. Se añadió bicarbonato de sodio polvo (2,0 kg) en porciones durante

un período de 1 hora. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos, el pH de la mezcla era 6~7.

- 20 Se separó entonces el sólido insoluble mediante filtración a vacío. Se lavó la torta del filtro con etanol (600 mL) y THF (600 mL). Se concentró el filtrado en un rotavapor hasta un volumen de aproximadamente 200 mL. Se recogió el residuo con TBME (1 L), se hizo rotar la mezcla en un baño de agua a 35 °C durante 30 minutos. Se separó de la solución un sólido pegajoso y se adhirió a los lados del matraz. Se dejó entonces la mezcla en reposo en refrigeración (4 °C) durante la noche.

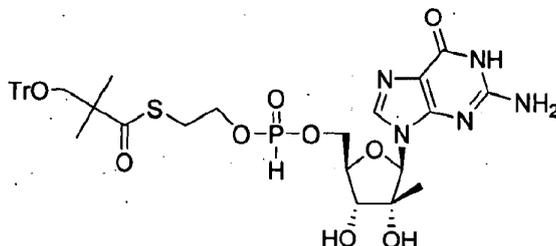
Se decantó el TBME de la mezcla anterior. Se añadió TBME adicional (400 mL) para lavar el residuo sólido agitando por rotación durante 5 minutos. Se decantó el TBME para obtener el crudo.

- 25 Aislamiento/purificación del Compuesto 1, diastereoisómero 2:

- Se suspendió el material crudo anterior en THF (400 mL) y agua (40 mL). Se añadió una pequeña cantidad (aproximadamente 7 mL) de solución saturada de bicarbonato de sodio para ajustar el pH a 7,5 (de partida pH=6, papel de pH). Se agitó la mezcla en el matraz de fondo redondo durante 30 minutos. Se recogió el sólido por filtración a vacío. Se añadió más THF (200 mL) a la mezcla para facilitar la transferencia del material. Se lavó la torta del filtro con THF (40 mL) y agua (100 mL) y se secó en una estufa a vacío a 40 °C. Se obtuvo el Compuesto 1, diastereoisómero 2 como un sólido blanco. Neto = 50,0 g, pureza química = 97 %, (AUC, HPLC Método A, véase el Ejemplo 10); pureza diastereoisomérica = 94 %. El material se purificó adicionalmente como sigue: se trituró con acetonitrilo/agua (50 mL/450 mL) para mejorar la pureza diastereoisomérica; se disolvió en THF/agua (3:1, 360 mL) y se filtró a través de un lecho de celita para eliminar una impureza polar (Tr= 0,7 min, HPLC método A); segunda trituración con acetonitrilo/agua (50 mL/450 mL) para eliminar una impureza desconocida observada por ¹H-NMR (δ = 11,7 ppm). Se obtuvo el diastereoisómero 2 final limpio con ambas purezas, química y diastereoisomérica >99 %. Neto = 38,5 g.

Ejemplo de referencia 12

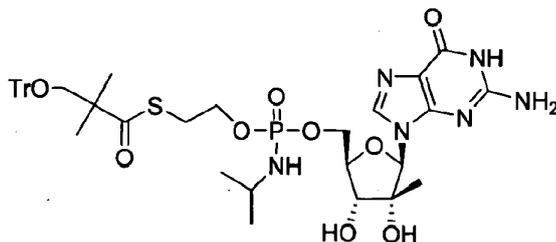
{9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(trifenilmetiloxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil) H-fosfonato, Compuesto 11-1



- 5 A una solución en agitación de 9-(2-C-metil-β-D-ribofuranosil)guanina (4,87 mmol) y sal de trietilamina de S-(2-fosfito-etil)2,2-dimetil-3-trifenilmetiloxi-tiopropionato (6,34 mmol) en piridina (75 mL) a -15 °C se añadió gota a gota cloruro de pivaloilo (9,74 mmol) bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a -15 °C durante 2 horas. Se añadieron diclorometano y solución de NH₄Cl. Se separó la fase orgánica, se lavó con solución de NH₄Cl, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El material crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice (DCM/MeOH) para dar el compuesto del título 11-1, Fórmula molecular: C₃₇H₄₂N₅O₉PS. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm) 0,80 (s, 3H), 1,13 (s, 6H), 3,04 (s, 2H), 3,14 (m, 2H), 3,97-4,08 (m, 4H), 4,28-4,38 (m, 2H), 5,35-5,10 (m, 2H), 5,77 (s, 1H), 6,52 (brs, 2H), 6,87-6,89 (m, 2H), 7,11-7,43 (m, 15H), 7,75 (s, 1H), 10,67 (brs, 1H). ³¹P NMR (DMSO-d₆, 162 MHz) δ (ppm) 9,20 (s) 9,47 (s). Barrido ES⁺ 764 (M+H)⁺
- 10

Compuesto 11-2a

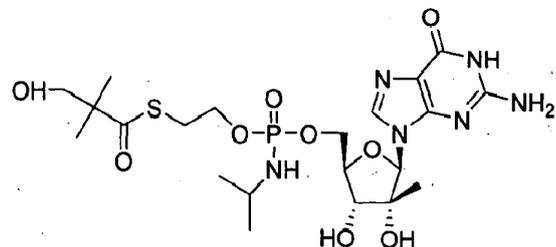
- 15 {9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(trifenilmetiloxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil)isopropil fosforamidato



- A una solución del compuesto 11-1 (0,98 mmol) en tetracloruro de carbono (10 mL) se añadió isopropilamina (4,9 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 3 horas a temperatura ambiente. Los compuestos volátiles se evaporaron a vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice (DCM/MeOH) para dar el compuesto del título. Sólido beige. Fórmula molecular: C₄₀H₄₉N₆O₉PS. Barrido ES⁺ 821 (M+H)⁺
- 20

Compuesto 11-3a

{9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(hidroxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil)-N-isopropil fosforamidato

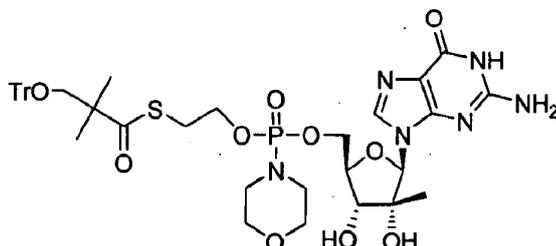


- Se agitó una solución de compuesto 11-2a (0,5 mmol) en diclorometano (2 mL) con ácido trifluoroacético (160 μL) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se purificó entonces la mezcla por cromatografía en gel de sílice (DCM/MeOH) para dar el compuesto del título. Polvo blanco. Fórmula molecular: C₂₁H₃₅N₆O₉PS. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm) 0,81 (s, 3H), 1,04 (m, 6H), 1,09 (s, 6H), 3,07 (t, J= 6,49 Hz, 2H), 3,42 (m, 2H), 3,87-3,91 (m, 2H), 3,95-3,98 (m, 2H), 4,17-4,20 (m, 2H), 4,92-4,98 (m, 2H), 5,17 (s, 1H), 5,38-5,43 (m, 1H), 6,53 (s, 2H), 7,76 (s, 1H), 10,65 (brs, 1H). ³¹P NMR (DMSO-d₆, 162 MHz) δ (ppm) 8,79-8,91 (2s, 1P). Barrido ES⁺ 579 (M+H)⁺
- 25

30

Compuesto 11-2b

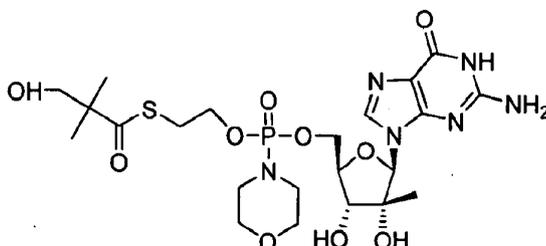
{9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(trifenilmetiloxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil)morfolinil fosforamidato



- 5 El compuesto 11-2b se sintetizó a partir de compuesto 11-1 y morfolina siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 11-2a. Sólido beige. Fórmula molecular: $C_{41}H_{49}N_6O_{10}PS$. Barrido ES^+ 849 (M+H)⁺

Compuesto 11-3b

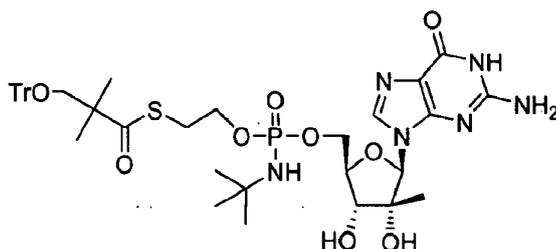
éster de ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-tiopropiónico y S-[[9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin]-5'-il]-[(morfolin-1-il)-fosfinoiloxi]-etilo}



- 10 El compuesto 11-3b se sintetizó a partir de compuesto 11-2b siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 11-3a. Polvo blanco. Fórmula molecular: $C_{22}H_{35}N_6O_{10}PS$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 0,82 (s, 3H), 1,10 (s, 6H), 3,00 (m, 4H), 3,08-3,11 (m, 2H), 3,42 (m, 2H), 3,48-3,58 (m, 4H), 3,95-4,00 (m, 4H), 4,20 (m, 2H), 4,91-4,94 (m, 1H), 5,20 (s, 1H), 5,46 (m, 1H), 6,52 (s, 2H), 7,75 (2s, 1H), 10,64 (brs, 1H). ^{31}P NMR (DMSO- d_6 , 162 MHz) δ (ppm) 7,61-7,75 (2s, 1P). Barrido ES^+ 607 (M+H)⁺

15 Compuesto 11-2c

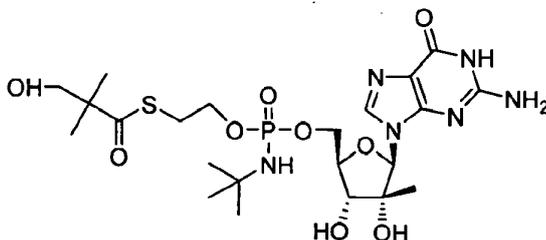
{9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(trifenilmetiloxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil)terc-butil fosforamidato



El compuesto 11-2c se sintetizó a partir del compuesto 11-1 y terc-butilamina siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 11-2a. Sólido beige. Fórmula molecular: $C_{41}H_{51}N_6O_9PS$. Barrido ES^+ 835 (M+H)⁺

20 Compuesto 11-3c

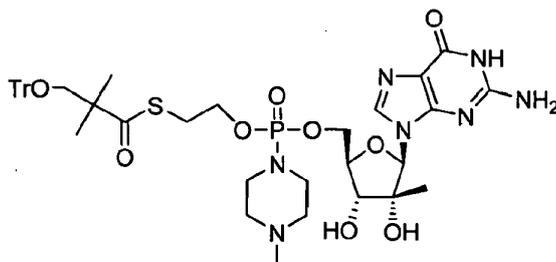
{9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(hidroxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil)-N-terc-butil fosforamidato



El compuesto 11-3c se sintetizó a partir del compuesto 11-2c siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 11-3c. Polvo blanco. Fórmula molecular: $C_{22}H_{37}N_6O_9PS$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 0,81 (s, 3H), 1,09 (s, 6H), 1,17 (s, 9H), 3,06 (t, $J = 6,45$ Hz, 2H), 3,41 (m, 2H), 3,86-3,90 (m, 2H), 3,99 (m, 2H), 4,12 (m, 1H), 4,82-4,92 (m, 2H), 5,15 (s, 1H), 5,35-5,39 (m, 1H), 6,52 (s, 2H), 7,77 (s, 1H), 10,42 (brs, 1H). ^{31}P NMR (DMSO- d_6 , 162 MHz) δ (ppm) 7,42-7,46 (2s, 1P). Barrido ES^+ 593 (M+H) $^+$

Compuesto 11-2d

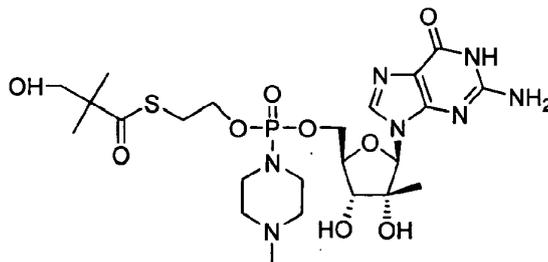
{9-[(2R)2-C-metil- β -D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(trifenilmetiloxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil)N-metilpiperazil fosforamidato



10 El compuesto 11-2d se sintetizó a partir del compuesto 11-1 y N-metilpiperazina siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 11-2a. Sólido beige. Fórmula molecular: $C_{42}H_{52}N_7O_9PS$. Barrido ES^+ 862 (M+H) $^+$

Compuesto 11-3d

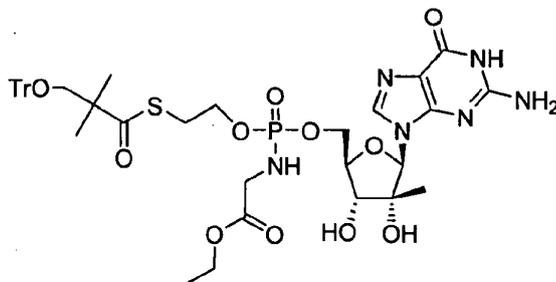
éster de ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-tiopropiónico y S-[[9-[(2R)2-C-metil- β -D-ribo-furanosil]-guanin]-5'-il-[(4-metil-piperazin-1-il)-fosfinoiloxi]-etilo}



15 El compuesto 11-3d se sintetizó a partir del compuesto 11-2d siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 11-3a. Polvo blanco. Fórmula molecular: $C_{23}H_{38}N_7O_9PS$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 0,83 (s, 3H), 1,11 (s, 6H), 2,50 (m, 3H), 2,52-2,65 (m, 4H), 2,90-3,02 (m, 2H), 3,05-3,12 (m, 4H), 3,42 (m, 2H), 3,95-4,02 (m, 4H), 4,21-4,24 (m, 2H), 4,64 (m, 1H), 5,22 (s, 1H), 5,45 (m, 1H), 6,62 (s, 2H), 7,74 (s, 1H), 10,73 (s, 1H). ^{31}P NMR (DMSO- d_6 , 162 MHz) δ (ppm) 7,25-7,32 (2s, 1P). Barrido ES^- 618 (M+H) $^-$

Compuesto 11-2e

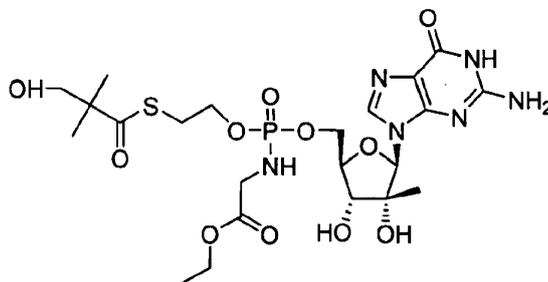
éster etílico de ácido {9-[(2R)2-C-metil- β -D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(trifenilmetiloxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil)-acético fosforamidato



25 El compuesto 11-2e se sintetizó a partir del compuesto 11-1 y éster etílico de glicina siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 11-2a. Sólido beige. Fórmula molecular: $C^{41}H_{49}N_6O_{11}PS$. Barrido ES^+ 864 (M+H) $^+$

Compuesto 11-3e

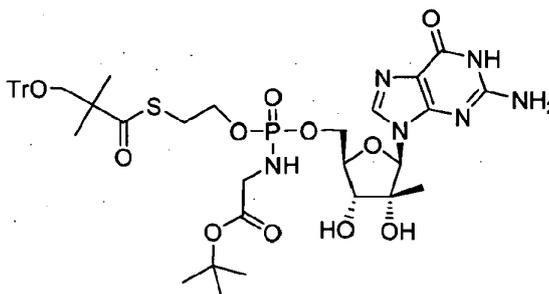
éster etílico de ácido {9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(hidroxi-terc-butyl-S-acil-2-tioetil)-N-acético fosforamidato



- 5 El compuesto 11-3e se sintetizó a partir del compuesto 11-2e siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 11-3a. Polvo blanco. Fórmula molecular: $C_{22}H_{35}N_6O_{11}PS$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 0,81 (s, 3H), 1,10 (s, 6H), 1,12-1,17 (m, 3H), 3,05-3,07 (m, 2H), 3,29 (m, 1H), 3,42 (m, 2H), 3,53-3,57 (m, 2H), 3,85-3,96 (m, 4H), 4,07 (q, J = 7,00 Hz, 2H), 4,15 (m, 1H), 4,24 (m, 1H), 4,92 (td, J = 5,50 Hz y J = 1,30 Hz, 1H), 5,15 (s, 1H), 5,36-5,41 (m, 1H), 5,40-5,55 (m, 1H), 6,52 (s, 2H), 7,73 (s, 1H), 10,63 (brs, 1H). ^{31}P NMR (DMSO- d_6 162 MHz) δ (ppm) 9,07-9,19 (2s, 1P). Barrido ES^+ 623 (M+H) $^+$
- 10

Compuesto 11-2f

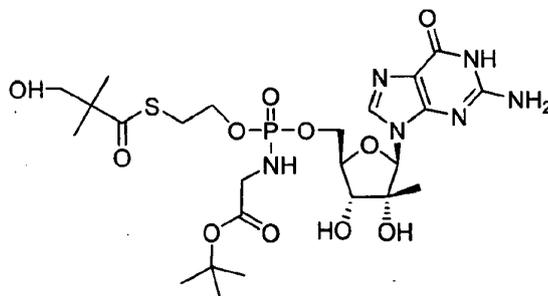
éster terc-butílico de ácido {9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(trifenilmetiloxi-terc-butyl-S-acil-2-tioetil)-acético fosforamidato



- 15 El compuesto 11-2f se sintetizó a partir del compuesto 11-1 y éster terc-butílico de glicina siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 11-2a. Sólido beige. Fórmula molecular: $C_{43}H_{53}N_6O_{11}PS$. Barrido ES^+ 893 (M+H) $^+$

Compuesto 11-3f

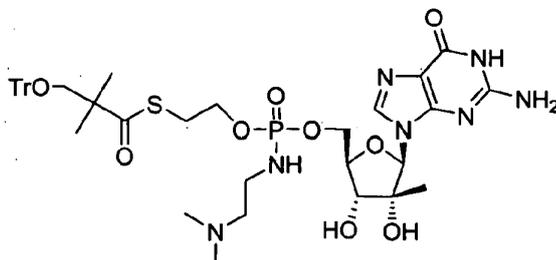
éster terc-butílico de ácido {9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(hidroxi-terc-butyl-S-acil-2-tioetil)-N-acético fosforamidato



- 20 El compuesto 11-3f se sintetizó a partir del compuesto 11-2f siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 11-3a. Polvo blanco. Fórmula molecular: $C_{24}H_{39}N_6O_{11}PS$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 0,81 (s, 3H), 1,10 (s, 6H), 1,37 (s, 9H), 3,05-3,07 (m, 2H), 3,29 (s, 1H), 3,40-3,44 (m, 4H), 3,93-3,97 (m, 4H), 4,13-4,15 (m, 1H), 4,22-4,25 (m, 1H), 4,92 (td, J = 5,50 Hz y J = 1,47 Hz, 1H), 5,15 (s, 1H), 5,36-5,44 (m, 2H), 6,51 (s, 2H), 7,74 (s, 1H), 10,63 (s, 1H). ^{31}P NMR (DMSO- d_6 , 162 MHz) δ (ppm) 9,08-9,26 (2s, 1P). Barrido ES^+ 651 (M+H) $^+$
- 25

Compuesto 11-2g

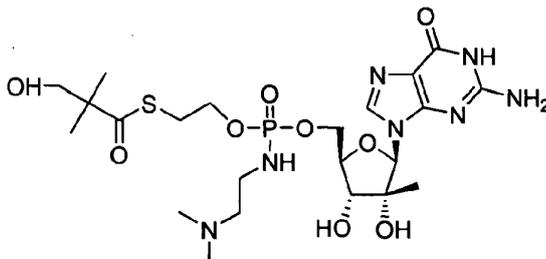
{9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(trifenilmetiloxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil)-dimetilamino-etil fosforamidato



- 5 El compuesto 11-2g se sintetizó a partir del compuesto 11-1 y dimetil-amino-etilamina siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 11-2a. Fórmula molecular: $C_{41}H_{57}N_7O_9PS$. Barrido $ES^+ 850 (M+H)^+$

Compuesto 11-3g

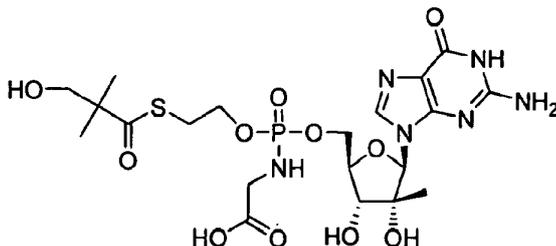
{9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(hidroxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil)-N-dimetil-amino-etil fosforamidato



- 10 El compuesto 11-3g se sintetizó a partir del compuesto 11-2g siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 11-3a. Polvo blanco. Fórmula molecular: $C_{22}H_{38}N_7O_9PS$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 0,83 (s, 3H), 1,11 (s, 6H), 2,67 (s, 6H), 3,08-3,10 (m, 2H), 3,10-3,12 (m, 4H), 3,42-3,45 (m, 2H), 3,94-4,01 (m, 4H), 4,15-4,26 (m, 2H), 4,95 (m, 1H), 5,22 (m, 1H), 5,41-5,47 (m, 2H), 6,63 (s, 2H), 7,30 (m, 1H), 7,77 (s, 1H), 10,76 (s, 1H). ^{31}P NMR (DMSO- d_6 , 162 MHz) δ (ppm) 9,31-9,40 (2s, 1P). Barrido $Es^- 608 (M+H)^+$

Compuesto 11-3h

{9-[(2R)2-C-metil-β-D-ribo-furanosil]-guanin}-5'-il-O-(hidroxi-terc-butil-S-acil-2-tioetil)-N- ácido acético fosforamidato



- 20 A una solución en agitación del compuesto 11-3f (0,16 mmol) en diclorometano (2 mL) se añadió TFA (35 eq.). Se agitó la mezcla de reacción durante 30 minutos a 50 °C y a temperatura ambiente durante 16 horas. Después se evaporó la mezcla y se purificó por cromatografía en gel de sílice (DCM/MeOH) para dar el compuesto del título. Polvo blanco. Fórmula molecular: $C_{20}H_{31}N_6O_{11}PS$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 0,80 (s, 3H), 1,09 (s, 6H), 2,95 (t, J = 6,50 Hz, 2H), 3,28 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 3,67-3,69 (m, 2H), 3,84-3,86 (m, 2H), 4,19-4,20 (m, 1H), 4,27 (m, 1H), 4,89 (s, 1H), 5,08 (t, J = 5,70 Hz, 1H), 5,64 (s, 1H), 6,31 (s, 1H), 6,71 (s, 2H), 7,79 (s, 1H), 10,55 (s, 1H).

Ejemplo 13

Actividad biológica del Compuesto 1, diastereoisómero 1 y diastereoisómero 2

La actividad biológica del Compuesto 1, diastereoisómero 1 y diastereoisómero 2 se midió monitorizando la expresión de la proteína NS4A por el ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y por el ensayo de la luciferasa como se describe a continuación:

Ensayo de replicón con luciferasa

El ensayo de replicón de VHC con luciferasa mide la capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir la replicación del VHC en cultivo celular después de 3 días de tratamiento en una línea de células de hepatoma humano (Huh-7) que llevan el replicón del genotipo 1b de VHC y un gen de fusión de luciferasa-fosfotransferasa de neomicina. La inhibición de la replicación de VHC se midió mediante la cuantificación de la expresión de la proteína luciferasa. El replicón de VHC con luciferasa se construyó fundiendo un gen de luciferasa con el amino terminal del gen de la fosfotransferasa de neomicina del replicón ZS11 de VHC. El replicón ZS11 de VHC (Zhu Q, Guo J-T, y Seeger C, 2003) se deriva del replicón SP1, pero contiene tres mutaciones adaptadas al cultivo celular: E1202G (NS3), S2204I (NS5A), y D2254E (NS5A). Estas mutaciones permiten una replicación eficiente *in vitro*. El gen reportero de luciferasa se amplificó a partir del vector pGL4,13[luc2/SV40] (Promega Corp.). El replicón que resulta de la fusión de luciferasa-neomicina (ZS11-luc) se transfectó de forma estable a células Huh-7, dando la línea celular Zluc.

El ensayo de replicón con luciferasa se resume como sigue: Se sembraron placas de cultivo de tejido de 96 pocillos blancas sólidas (BD Falcon) con células Zluc. Se prepararon soluciones recientes del compuesto antiviral en medio de cultivo como stocks concentrados 2X. Se prepararon ocho diluciones adicionales de fármaco al triple a partir de estos stocks en medio de cultivo para un total de 9 diluciones. Como mínimo cuatro horas después se sembraron las células Zluc, se inició el tratamiento con el fármaco añadiendo un volumen de cada dilución de fármaco concentrada 2X a un volumen de células/medio en las placas de cultivo de tejidos. Se incubaron entonces las células durante 3 días a 37 °C/5 % de CO₂.

Se separó entonces el medio/compuesto de las placas y se añadió a cada pocillo el reactivo de ensayo de Luciferasa ONE-glo (Promega). Se agitaron las placas de ensayo durante 3 minutos a temperatura ambiente y se midió la actividad de la luciferasa en cada pocillo con un tiempo de lectura de 1 segundo en el contador multietiqueta Victor³V utilizando un filtro con un corte a 700 nm (Perkin Elmer). Se calcularon los valores EC₅₀ de las curvas dosis-respuesta a partir de las ecuaciones que definen la recta de mejor ajuste determinadas por el software de Microsoft Excel y XLfit 4.1.

Ensayo de replicón de VHC (ELISA de NS4A)

El ensayo de replicón de VHC mide la capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir la replicación del VHC en cultivo celular después de 3 días de tratamiento en una línea de células de hepatoma humano (Huh-7) que llevan el replicón del genotipo 1b de VHC (células GS4.1). La inhibición de la replicación de VHC se midió mediante la cuantificación de la proteína vírica NS4A utilizando un ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La línea celular GS4.1 (Zhu, Guo y Seeger 2003) se derivó de la línea celular de hígado humano Huh-7 y posee de forma estable el replicón bicistrónico SP1 ΔS de VHC que contiene proteínas no estructurales de NS3 a NS5B de la cepa con1 de VHC, genotipo 1b, bajo el control del promotor IRES de EMCV (virus de la encefalomiocarditis). Adicionalmente, el replicón contiene el gen de la fosfotransferasa de neomicina bajo el control del promotor VHC (Fuente: Dr. Christoph Seeger, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA).

El ensayo ELISA de NS4A se resume como sigue. Se sembraron placas de cultivo de tejidos de noventa y seis pocillos con células GS4.1. Se prepararon soluciones recientes del compuesto antiviral en medio de cultivo como stocks concentrados 2X. Se prepararon ocho diluciones adicionales de fármaco al triple, a partir de estos stocks en medio de cultivo para un total de 9 diluciones. Como mínimo cuatro horas después se sembraron las células GS4.1, se inició el tratamiento con el fármaco añadiendo un volumen de cada dilución de fármaco concentrada 2X a un volumen de células/medio en las placas de cultivo de tejidos. Se incubaron entonces las células durante 3 días a 37 °C/5 % de CO₂.

Se separó entonces el medio/compuesto de las placas y se fijaron las células con acetona:metanol, se lavaron tres veces con una solución de lavado, y después se bloquearon durante 1 hora con suero fetal bovino al 10 % en una solución salina equilibrada. Se lavaron las células tres veces y se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti NS4A de la hepatitis C (Virogen Corp.) durante 2 horas a 37 °C. Se lavaron las células tres veces y se incubaron con un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Zymed) durante 1 hora a 37 °C. Después, se lavaron las células tres veces y se expusieron a una solución que contenía orto-fenilendiamina (Zymed) y peróxido de hidrógeno (EMD Biosciences) durante 30 minutos en la oscuridad. Se paró la reacción con ácido sulfúrico diluido (Mallinckrodt Chemicals) y se midió la absorbancia en un contador multietiqueta Victor³V 1420 (Perkin Elmer). Se calcularon los valores EC₅₀ de las curvas dosis-respuesta a partir de las ecuaciones que definen la recta de mejor ajuste determinadas por el software de Microsoft Excel y XLfit 4.1.

Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad mide la viabilidad de las células después de tratamiento con un compuesto de ensayo durante 3 días en células GS4.1 o en células Zluc. La lectura del ensayo es la biorreducción del compuesto de tetrazolio MTS amarillo hasta un producto de formazan púrpura. Esta conversión está mediada por NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato) o NADH y es directamente proporcional al número de células vivas en un cultivo. El ensayo de citotoxicidad se resume como sigue. Se sembraron placas de cultivo de tejidos de noventa y

5 seis pocillos con células GS4.1 o Zluc. Se prepararon soluciones recientes del compuesto antiviral en medio de cultivo, como stocks concentrados 2X. Se prepararon ocho diluciones adicionales de fármaco al triple, a partir de estos stocks en medio de cultivo para un total de 9 diluciones. Como mínimo cuatro horas después se sembraron las células, se inició el tratamiento con el fármaco añadiendo un volumen de cada dilución de fármaco concentrada 2X a un volumen de células/medio en las placas de cultivo de tejidos. Se incubaron entonces las células durante 3 días a 37 °C/5 % de CO₂. Después de 3 días de tratamiento, se realizó el ensayo de proliferación celular con CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) añadiendo la solución de MTS a cada pocillo. Se incubaron entonces las placas a 37 °C/5 % de CO₂ durante 3,5 horas. Se leyeron entonces las placas en un contador multietiqueta Victor³V 1420 (Perkin Elmer) y se determinaron las concentraciones CC₅₀ utilizando el software de Microsoft Excel y XLfit 4.1.

Compuesto	NS4A - Ensayo ELISA			Ensayo de Luciferasa		
	EC50 (nM)	CC50 (µM)	n	EC50 (nM)	CC50 (µM)	N
Compuesto 1	379 ± 83	>100	2	68,0 ± 0,4	>100	5
Diastereoisómero 2	244 ± 98	>100	2	56,8 ± 0,6	>100	4
Diastereoisómero 1	704 ± 372	>100	2	165 ± 23	>100	4

10

Ejemplo 14

Disposición metabólica *in vitro* del Compuesto 1 en fracciones microsómicas de hígado de rata, de mono y humano

Los compuestos de ensayo usados en este estudio fueron: Compuesto 1, pureza >95 %, Compuesto 4, pureza >95 %; Compuesto 3, pureza 90 % y Compuesto 2, pureza 80 %.

15 Condiciones de conservación - Los compuestos de ensayo se conservaron de 4 a 8 °C protegidos de la luz, las soluciones stocks de DMSO se conservaron a -20 °C.

Se utilizaron en el estudio las siguientes fracciones subcelulares de hígado.

Tabla 1. Fracción subcelular de hígado

Especie	Sexo	Fracción celular	Fuente
Rata	Macho	Microsomas, hígado	XenoTech, Lenexa, KS
Rata	Macho	Citosol, hígado	XenoTech, Lenexa, KS
Mono	Macho	Microsomas, hígado	XenoTech, Lenexa, KS
Mono	Macho	Citosol, hígado	XenoTech, Lenexa, KS
Humano	Macho	Microsomas, hígado	XenoTech, Lenexa, KS
Humano	Macho	Citosol, hígado	XenoTech, Lenexa, KS

20 Tabla 2, Supersomas CYP450

CYP450	Fuente
1A2	BD Gentest, Woburn, MA
2A6	BD Gentest, Woburn, MA
3A4	BD Gentest, Woburn, MA
2B6	BD Gentest, Woburn, MA
2D6	BD Gentest, Woburn, MA
2C8	BD Gentest, Woburn, MA
2C9	BD Gentest, Woburn, MA
2C19	BD Gentest, Woburn, MA
2E1	BD Gentest, Woburn, MA

Se utilizaron en el estudio los siguientes reactivos:

Sistema de regeneración de NADPH, Solución A: NADP⁺ + glucosa-6-fosfato y Solución B: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de BD Gentest, Woburn MA; ketoconazol de BD Gentest, Woburn MA; dimetilsulfóxido (DMSO), esterasa de hígado de cerdo y fosfatasa alcalina de Sigma-Aldrich, St Louis, MO; fosfato de potasio, monobásico

25

(K₂HPO₄) de Fisher Scientific, Pittsburg, PA; metanol y acetonitrilo de Burdick and Jackson; Muskegon, MI; tampón de fosfato de potasio 0,2 M, pH 7,4 preparado como sigue: para 100 mL de tampón, 19 mL de solución A (13,6 g de KH₂PO₄/0,5 L) mezclados con 81 mL de solución B (17,4 g de K₂HPO₄/0,5 L). No es necesario el ajuste de pH.

- 5 Se utilizó la desaparición del Compuesto 1 original para evaluar el metabolismo *in vitro* del mismo. Los niveles relativos de Compuesto 1 inmodificado se midieron por el método 1 de HPLC-UV. El Compuesto 1 residual se registra como la diferencia en tanto por ciento desde el tiempo cero o control. El sistema HPLC-UV fue como sigue:

Método 1

HPLC:	Agilent 1100
Columna:	Phenomenex Luna C18(2), 250 x 4,6 mm
Precolumna:	Cartucho Phenomenex SecurityGuard C 18, 4 x 2 mm
Fases móviles (MP):	(Fase móvil A) K ₂ HPO ₄ 10 mM pH 5; (Fase móvil B) ACN
Elución con gradiente:	5 a 60 % de Fase móvil B de 0 a 15 min
Tiempo de registro:	15 min
Tiempo de estabilización:	6 min
Caudal:	1 mL/min
Volumen de inyección:	20 µL
UV:	252 nm

- 10 Se realizó una identificación preliminar de metabolitos putativos comparando el tiempo de retención de los metabolitos observados con los tiempos de retención obtenidos con patrones sintetizados químicamente utilizando el siguiente método de HPLC-UV:

Método 2

Columna:	Phenomenex Luna C18(2), 250 x 4,6 mm	
Precolumna:	Cartucho Phenomenex SecurityGuard C 18, 4 x 2 mm	
Fases móviles (MP):	(Fase móvil A) K ₂ HPO ₄ 10 mM pH 5; (Fase móvil B) MeOH	
Elución con gradiente:	Tiempo (min)	% de Fase móvil B
	0	5
	15	30
	20	30
	30	45
Tiempo de registro:	60 min	
Tiempo de estabilización:	6 min	
Caudal:	1 mL/min	
Volumen de inyección:	20 µL	
UV:	252 nm	

En la Figura 2, se muestra un cromatograma de HPLC representativo del Compuesto 1 (diastereoisómeros 1 y 2) y de los metabolitos patrones obtenido por el método 2.

Estabilidad del Compuesto 1 en microsomas y citosol hepáticos

- 15 Se llevaron a cabo incubaciones con microsomas hepáticos o citosol hepático en un volumen final de 0,1 mL por punto de tiempo de incubación. Se incubó Compuesto 1 a 10 µM de una solución stock en DMSO (la concentración final de DMSO fue 0,1 %) a 37 °C durante 0 - 60 min con un conjunto de proteína microsómica (1,0 mg/ mL), suspendida en tampón de incubación (fosfato de potasio 0,1 M, pH 7, MgCl₂ 4, 5 mM, y EDTA 0,1 mM). Se inició la reacción microsómica por la adición de NADPH (concentración final 3 mM). Las incubaciones (a) sin proteína o (b) sin NADPH sirvieron como controles. Se terminaron las reacciones por la adición de 0,2 mL de solución de parada (acetoneitrilo). Se mezclaron las muestras en vórtice durante 30 segundos y después se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min. Se secó el sobrenadante utilizando un concentrador Labconco CentriVap y se reconstituyó el residuo seco en agua, se transfirió a un vial de vidrio de HPLC y se analizó por el método 1 de HPLC-UV (descrito antes).
- 20

Resultados: Se determinó el grado de metabolismo del Compuesto 1 en los microsomas hepáticos evaluando su depleción con el tiempo y se registró como tanto por ciento (%) de Compuesto 1 residual (Tabla 3). Se observó un metabolismo importante dependiente de NADPH; 100 % en los microsomas de mono en 30 min, y 64 y 66 % en los microsomas de rata y en los humanos en 60 min, respectivamente. Se observó también un metabolismo sustancial independiente de NADPH en los microsomas de mono, permaneciendo aproximadamente el 60 % de Compuesto 1 inmodificado después de 60 min.

Tabla 3. Compuesto 1 residual después de incubación con microsomas hepáticos

Especie	Tiempo (min)	% de Compuesto 1 residual	
		Sin cofactor	NADPH
Rata	0	100	100
	30	103	53
	60	103	36
Mono	0	100	100
	30	81	0
	60	64	0
Humano	0	100	100
	30	100	52
	60	94	34

Se llevaron a cabo incubaciones de microsomas (1 mg/ mL) como se describe en los procedimientos experimentales. La concentración del artículo de ensayo fue 10 µM. Los valores se expresan en tanto por ciento.

Inhibición de CYP3A4

Se llevaron a cabo incubaciones en un volumen final de 0,1 mL por punto de tiempo de incubación. El conjunto de microsomas hepáticos de rata (1 mg/ mL), mono (0,5 mg/ mL) o humanos (1,0 mg/ mL), suspendidos en tampón de incubación (fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,4) se incubó con Compuesto 1 a 10 µM en presencia de ketoconazol o ritonavir (0,1 y 1 µM). La concentración final de disolvente (DMSO o metanol) se mantuvo al 0,2 %. Se iniciaron las reacciones por la adición de un sistema de regeneración de NADPH (concentraciones finales, NADP⁺ 1,3 mM, glucosa-6-fosfato 3,3 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,4 U/ml, y MgCl₂ 3,3 mM). Las incubaciones sin inhibidor sirvieron como control. Se terminaron las reacciones a los 30 min (mono) o a los 60 min (rata y humanos) por la adición de 0,2 mL de solución de parada (acetoneitrilo). Se mezclaron las muestras en vórtice durante 30 segundos y después se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min. Se secó el sobrenadante utilizando un concentrador Labconco CentriVap y se reconstituyó el residuo seco en agua, se transfirió a un vial de vidrio de HPLC y se analizó por el método 1 de HPLC-UV (descrito antes).

Se llevaron a cabo incubaciones adicionales de control con microsomas hepáticos reunidos humanos (0,25 mg/ mL) suspendidos en tampón de incubación (fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, y EDTA 0,1 mM) y se incubaron con testosterona 50 µM (sustrato marcador de CYP3A4) en presencia de ketoconazol o ritonavir (0,1 y 1 µM). La concentración final de disolvente (DMSO o metanol) se mantuvo al 0,2 %. Se iniciaron las reacciones por la adición de NADPH (concentración final 3 mM). Las incubaciones sin inhibidor sirvieron como control. Se terminaron las reacciones después de 15 min por la adición de 0,2 mL de solución de parada (acetoneitrilo). Se mezclaron las muestras en vórtice durante 30 segundos y después se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un vial de vidrio de HPLC y se analizó por HPLC-UV.

Resultados: Se evaluó el papel potencial de CYP3A4 en el metabolismo dependiente de NADPH del Compuesto 1 utilizando ketoconazol y ritonavir, dos inhibidores de CYP3A4, y los resultados se resumen en la Tabla 4,

Tabla 4. Efecto de ritonavir y ketoconazol en la estabilidad metabólica del Compuesto 1 en microsomas

Especie	Ketoconazol (μM)	% de Compuesto 1 residual	Ritonavir (μM)	% de Compuesto 1 residual
Rata	Control ^a	100	Control	100
	0	86	0	86
	0,1	83	0,1	101
	1	120	1	123
Mono	Control	100	Control	100
	0	25	0	25
	0,1	68	0,1	41
	1	125	1	122
Humano	Control	100	Control	100
	0	65	0	65
	0,1	103	0,1	92
	1	117	1	117

^a Sin proteína

Las incubaciones de microsomas se realizaron en presencia o ausencia de inhibidores de CYP3A4 como se ha descrito antes. La concentración del compuesto de ensayo fue 10 μM . Los valores se expresan en tanto por ciento. La formación de 6- β -hidroxitestosterona en los microsomas hepáticos humanos fue inhibida en un 90 % a concentraciones 1 μM de ketoconazol y ritonavir.

5 Debido a que el Compuesto 1 se metaboliza rápidamente en los microsomas hepáticos de mono, se ajustaron las condiciones de incubación reduciendo el contenido en proteína a 0,5 mg/mL y el tiempo de incubación a 30 min. Las condiciones de incubación para los microsomas de rata y humanos no se cambiaron; la proteína fue 1 mg/mL y el tiempo de incubación fue de 60 min. Se observó la inhibición completa del Compuesto 1 con ketoconazol o ritonavir 1 μM en las tres especies, lo que sugiere que la CYP3A está asociada con el metabolismo dependiente de NADPH del Compuesto 1 en los microsomas hepáticos. Se inhibió la 6- β -hidroxilación de testosterona en los microsomas hepáticos humanos en un 90 % con ketoconazol o ritonavir 1 μM , demostrando condiciones adecuadas de reacción para los inhibidores.

10 Identificación de la isoenzima CYP asociada con el metabolismo del Compuesto 1

Supersomas. Se llevaron a cabo incubaciones en un volumen final de 0,1 mL de tampón de reacción (fosfato de potasio 50-100 mM, pH 7,4 o Tris-HCL100 mM, pH 7,4) según el protocolo suministrado con cada supersoma CYP450. Cada reacción contenía 4 pmoles de supersoma CYP450, NADP⁺ 1,3 mM, glucosa-6-fosfato 3,3 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,4 U/mL, MgCl₂ 3,3 mM y Compuesto 1 a 10 μM . Después de incubación durante 15 60 min a 37 °C, se añadieron 100 μL de solución de parada (acetonitrilo:metanol, 1:1) y se centrifugaron las muestras durante 10 min a 10.000 x g. Se secó entonces el sobrenadante y se reconstituyó en fosfato de potasio 10 mM, pH 5, se transfirió después a un vial de vidrio de HPLC y se analizó por HPLC-UV (descrito antes).

Resultados: Utilizando enzimas CYP recombinantes humanas, se demostró que la CYP3A4 era la única CYP que cataliza el metabolismo del Compuesto 1 (Tabla 5), confirmando además la implicación de CYP3A4.

20

Tabla 5 Tanto por ciento de Compuesto 1 residual después de incubación con enzimas CYP450 recombinantes humanas (supersomas)

CYP450	% de Compuesto 1 residual
1A2	104
2A6	105
2B6	108
2D6	102
2C8	105
2C9	109
2C19	111
2E1	100
3A4	62

Se realizaron incubaciones con supersomas como se describen en los procedimientos experimentales anteriores. Los valores se expresan en tanto por ciento y representan el promedio de dos experimentos independientes.

Perfil metabólico

5 Se realizaron incubaciones con microsomas hepáticos, citosol hepático o esterasa de hígado de cerdo en un volumen final de 0,1 mL por punto de tiempo de incubación. Las proteínas microsómicas reunidas (1,0 mg/ mL) suspendidas en tampón de incubación (fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,4) se incubaron durante 2 horas a 37 °C con Compuesto 1 50 µM procedente de una solución stock en DMSO (la concentración final de DMSO fue 0,1 %); la reacción microsómica se inició por la adición de un sistema de regeneración de NADPH (concentraciones finales, NADP⁺ 1,3 mM, glucosa-6-fosfato 3,3 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,4 U/ml, y MgCl₂ 3,3 mM). Las incubaciones sin NADPH o sin proteína sirvieron como controles. Se terminaron las reacciones por la adición de 0,1 mL de solución de parada (acetonitrilo). Se mezclaron las muestras en vórtice durante 30 segundos y después se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min. Se secó el sobrenadante utilizando un concentrador Labconco CentriVap y se reconstituyó el residuo seco en agua, se transfirió a un vial de vidrio de HPLC y se analizó por el método 2 de HPLC-UV (descrito antes).

15 Se incubó el citosol de hígado reunido (1,0 mg proteína/ mL) suspendido en tampón de incubación (fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,4) durante 2 horas a 37 °C con Compuesto 1 a 10 µM procedente de una solución stock en DMSO (la concentración final de DMSO fue 0,1 %); se inició la reacción con la adición del artículo de ensayo. Las incubaciones sin proteína sirvieron como control. Se terminaron las reacciones por la adición de 0,1 mL de solución de parada (acetonitrilo). Se mezclaron las muestras en vórtice durante 30 segundos y después se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min. Se secó el sobrenadante utilizando un concentrador Labconco CentriVap y se reconstituyó el residuo seco en agua, se transfirió a un vial de vidrio de HPLC y se analizó por el método 2 de HPLC-UV (descrito antes).

25 Se incubó esterasa de hígado de cerdo (14 U) suspendida en tampón de incubación (fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,4) durante 60 min a 37 °C con Compuesto 1 a 10 µM procedente de una solución stock en DMSO (la concentración final de DMSO fue 0,1 %); se inició la reacción con la adición del artículo de ensayo. Las incubaciones sin proteína sirvieron como controles. Se terminaron las reacciones por la adición de 0,1 mL de solución de parada (acetonitrilo). Se mezclaron las muestras en vórtice durante 30 segundos y después se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min. Se secó el sobrenadante utilizando un concentrador Labconco CentriVap y se reconstituyó el residuo seco en agua, se transfirió a un vial de vidrio de HPLC y se analizó por el método 2 de HPLC-UV (descrito antes).

30 La estabilidad metabólica de los metabolitos propuestos se determinó incubando los patrones sintetizados químicamente de Compuesto 2, Compuesto 4 y Compuesto 3 como se ha descrito antes para el Compuesto 1. Cuando fue posible, se verificó la formación de Compuesto 5 incubando las muestras con fosfatasa alcalina (10 U) durante 60 min a 37 °C.

35 Resultados: Se consiguió una identificación preliminar comparando la elución por LC de los metabolitos con la de los patrones sintéticos disponibles de los metabolitos putativos (Figura 2). Las asignaciones de metabolitos y la identificación preliminar se resumen en la Tabla 6. Los metabolitos U1, U2 y U3 se caracterizaron en base a los tiempos de retención.

Tabla 6: Perfil de metabolitos *in vitro* en microsomas después de incubación con el Compuesto 1

Asignación del metabolito ^a	Tiempo de retención (min)	Rata	Mono	Humano
Compuesto 5	5,430	ND	+	+
2'-C-metil-guanosina	9,058	+	+	+
Compuesto 2	22,861	ND	ND	ND
Compuesto 3 (diastereoisómero 1)	23,499	+	+	+
Compuesto 3 (diastereoisómero 2)	26,700	?	+	+
Compuesto U1 (estructura desconocida)	35,597	ND	+	ND
Compuesto U2 (estructura desconocida)	36,459	+	ND	ND
Compuesto U3 (estructura desconocida)	37,758	ND	+	ND
Compuesto 1	48,340 y 53,508	+	+	+

^a Asignación basada en la co-elución con patrones sintéticos.

^b Debido a interferencia de la matriz, no se pudo evaluar la formación de Compuesto 5 en presencia de NADPH. Se observó el metabolito en los microsomas humanos y de rata sin NADPH.

+: pico detectado
?: pico observado
ND: no detectado

Se observaron siete metabolitos potenciales, cuatro de los cuales habían sido identificados tentativamente en base a la co-elución con patrones sintéticos como el Compuesto 5, 2'-C-metil-guanina, y los diastereoisómeros 1 y 2 para el Compuesto 3. Se observaron tres metabolitos desconocidos, compuestos U1, U2 y U3. Se observaron los diastereoisómeros 1 y 2 para el Compuesto 3, y los compuestos U1, U2 y U3 en incubaciones llevadas a cabo con NADPH, lo que sugiere la implicación de la CYP450 en su formación. Se observaron los diastereoisómeros 1 y 2 para el Compuesto 3 en las tres especies. El compuesto U2 se observó solamente en la rata y los compuestos U1 y U3 se observaron solamente en el mono. Se observó la formación de Compuesto 5 en los microsomas de mono y humanos sin NADPH. Su identificación como el 5'-monofosfato de 2'-C-metil-guanosina, se confirmó tratando las muestras con fosfatasa que escinde el grupo fosfato, liberando el nucleósido 2'-C-metil-guanosina. No se pudo determinar la formación de Compuesto 5 en las muestras incubadas con NADPH debido a la interferencia de la matriz. Sin embargo, se debe observar que el Compuesto 5 se pudo degradar a 2'-C-metil-guanosina, que se detectó en las muestras de NADPH para las tres especies, lo que da a entender que el Compuesto 5 se formó realmente.

No se observó metabolismo del Compuesto 1 en el citosol hepático. En incubaciones de 60 min con esterasa de hígado de cerdo, el 25 % de Compuesto 1 se convirtió en el Compuesto 2 (Tabla 7), un metabolito que no fue observado en las incubaciones microsómicas.

El Compuesto 2 sufre un rápido metabolismo hasta Compuesto 5 en los microsomas (Tabla 8), en citosol (Tabla 9) y con esterasa de hígado de cerdo (Tabla 7). Se observó un metabolismo dependiente de NADPH del Compuesto 3 (diastereoisómero 1 y diastereoisómero 2) de menor (10 % en microsomas de rata) a moderado (20-30 % en microsomas humanos y de mono) (Tabla 10). Se observó también un metabolismo menor independiente de NADPH pero solamente en microsomas de mono (Tabla 8).

Tabla 7: Compuesto 1, Compuesto 4, Compuesto 3 y Compuesto 2 residuales después de incubación con esterasa de hígado de cerdo

	Compuesto 1	Compuesto 3	Compuesto 4	Compuesto 2
Control ^a	100	100	100	100
Esterasa	75	97	100	0

^aSin proteína

Las incubaciones con esterasa (14 U) se llevaron a cabo durante 60 min como se describe en las condiciones experimentales; la concentración del artículo de ensayo fue 10 µM. Los valores se expresan en tanto por ciento.

Los compuestos 2 y 3 han sido identificados como metabolitos *in vitro* del Compuesto 1. El Compuesto 4 no ha sido observado *in vitro*.

Tabla 8: Compuesto 2 residual después de incubación con microsomas hepáticos

Especie	% de Compuesto 2 residual	
	Sin cofactor	NADPH
Control ^a	100	100
Rata	0	0
Mono	0	19
Humano	0	0

^aSin proteína
Las incubaciones con microsomas (1 mg/ mL) se llevaron a cabo a 37 °C durante 15 min como se describe para el Compuesto 1 en las condiciones experimentales; la concentración del artículo de ensayo fue 10 µM. Los valores se expresan en tanto por ciento.
El Compuesto 2 ha sido identificado como un metabolito *in vitro* del Compuesto 1.

Tabla 9: Compuestos 1, 4, 3 y 2 residuales después de incubación con citosol hepático

Especie	Compuesto 1	Compuesto 3	Compuesto 4	Compuesto 2
Control ^a	100	100	100	100
Rata	100	96	101	0
Mono	100	99	103	0
Humano	100	100	100	0

^aSin proteína
Las incubaciones con citosol (1 mg/ mL) se llevaron a cabo durante 2 horas como se describe en las condiciones experimentales; la concentración del artículo de ensayo fue 10 µM. Los valores se expresan en tanto por ciento.
El Compuesto 3 y el Compuesto 2 han sido identificados como metabolitos *in vitro* del Compuesto 1.
El Compuesto 4 no ha sido observado como un metabolito *in vitro*.

Tabla 10: Compuesto 4 y Compuesto 3 residuales después de incubación con microsomas hepáticos

Especie	% de Compuesto 4 residual		% de Compuesto 3 residual	
	Sin cofactor	NADPH	Sin cofactor	NADPH
Control ^a	100	100	100	100
Rata	100	89	101	90
Mono	100	83	89	76
Humano	100	93	103	82

^aSin proteína
Las incubaciones con microsomas (1 mg/ mL) se llevaron a cabo durante 60 min esencialmente como se describe en las condiciones experimentales; la concentración del artículo de ensayo fue 50 µM. Los valores se expresan en tanto por ciento.
El Compuesto 3 ha sido identificado como un metabolito *in vitro* del Compuesto 1.
El Compuesto 4 no ha sido observado como un metabolito *in vitro*.

5 El Compuesto 4 no se observó en ninguna muestra después de la incubación con el Compuesto 1. Se evaluó la estabilidad metabólica de este compuesto para ver si se pudo convertir en el Compuesto 5 como se observó con el Compuesto 2. Solamente se observó un metabolismo menor (10-20 %) en base al Compuesto 4 residual en los microsomas en presencia de NADPH. No se pudo determinar la formación de Compuesto 5 en estas muestras debido a la interferencia de la matriz. No se observó metabolismo independiente de NADPH. No se observó

10 metabolismo del Compuesto 4 ni con citosol hepático (Tabla 9) ni con esterasa de hígado de cerdo (Tabla 7). Estas observaciones dan a entender que la falta de Compuesto 4 en las muestras incubadas con Compuesto 1 no es debida a un metabolismo posterior como es el caso del Compuesto 2, sugiriendo de este modo que el Compuesto 4 no es un metabolito *in vitro* del Compuesto 1.

15 Se observó un metabolismo dependiente de NADPH del Compuesto 3 de menor (10 % en rata) a moderado (20-30 % en microsomas humanos y de mono) (Tabla 10). Se observó también un metabolismo menor independiente de NADPH pero solamente en microsomas de mono (Tabla 10). El tratamiento de esta muestra con fosfatasa alcalina

dio como resultado la formación de 2'-C-metil-guanosina, dando a entender que se formó Compuesto 5 en los microsomas de mono después de la incubación con el Compuesto 3. No se observó metabolismo del Compuesto 3 con citosol hepático (Tabla 9) ni con esterasa de hígado de cerdo (Tabla 8).

Conclusión

- 5 El Compuesto 1 presentó un metabolismo significativo en los microsomas hepáticos de mono; el metabolismo en los microsomas humanos y en los de rata también fue sustancial. El metabolismo del Compuesto 1 parece que está mediado tanto por las rutas con CYP450 como por las rutas sin CYP450. Utilizando enzimas CYP recombinantes humanas, se identificó 3A4 como la única CYP implicada en el metabolismo dependiente de NADPH del Compuesto 1. Se observaron ocho metabolitos potenciales *in vitro*, cinco se identificaron como 2'-C-metil-guanosina, compuestos 2, 5 y dos diastereoisómeros del compuesto 3 (compuestos 3a y 3b). Los metabolitos U1, U2 y U3 son desconocidos y parece que son dependientes de la especie; el U2 se observó solamente en los microsomas de rata mientras que U1 y U2 se observaron solamente en los microsomas de mono. La formación del Compuesto 3 tuvo lugar en las tres especies. La formación del Compuesto 5 parece que está mediada tanto por las rutas con CYP450 como por las rutas sin CYP450 a través de la formación de Compuesto 2, aunque algo de formación del Compuesto 5 se asoció también con el metabolismo hasta los compuestos 3a y 3b. Aunque el Compuesto 5 no se pudo observar en incubaciones con NADPH debido a la interferencia de la matriz, la presencia de 2'-C-metil-guanosina en estas muestras da a entender que el Compuesto 5 se formó realmente, puesto que el monofosfato se puede descomponer a 2'-C-metil-guanosina. La formación del Compuesto 5 no mediada por CYP450 parece que es más importante en el mono que en la rata y en el ser humano, posiblemente teniendo en cuenta los niveles más altos de compuesto 5 y de 2'-C-metil-guanosina observados en los microsomas de mono.

Ejemplo 15

Disposición metabólica *in vitro* de Compuesto 1 y de 2'-C-metil-guanosina en hepatocitos primarios y en células Huh-7

Se utilizaron las siguientes líneas celulares en este estudio.

Especie	Sexo	Tipo de células	Fuente
Rata, Sprague Dawley	Macho	Hepatocitos primarios	CellzDirect, Pittsboro, NC
Mono, Cynomolgus	Macho	Hepatocitos primarios	CellzDirect, Pittsboro, NC
Humano	Varón/ mujer	Hepatocitos primarios	CellzDirect, Pittsboro, NC
Humano		Huh-7	Grupo VHC, Idenix Pharmaceuticals, Cambridge, MA

Reactivos: Se utilizaron en el estudio los siguientes reactivos:

- 25 Acetonitrilo, metanol y agua de grado HPLC de Burdick and Jackson, Muskegon, MI; fosfatasa alcalina, dimetilsulfóxido (DMSO), dexametasona, insulina y dihidrogenofosfato de tetrabutil-amonio (TBAP) de Sigma-Aldrich, St Louis, MO; DMEM con piruvato, L-glutamina, HEPES, aminoácidos no esenciales, penicilina-estreptomocina, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y tripsina-EDTA de Cellgro, Mediatech, Herndon, VA; centelleo de líquidos Eco Lite; suero fetal bovino (FBS), insulina-transferrina-selenio-A y medio de cultivo E de William de Gibco, Invitrogen Corporation; fosfato de potasio, monobásico (K_2HPO_4) de Fisher Scientific, Pittsburg, PA; y centelleo de líquidos Ultima Flow-AP de Perkin Elmer Life Sciences.

Preparación de cultivos celulares

- 35 Hepatocitos primarios: Se obtuvieron células aisladas recientemente de hígado de animales y de seres humanos en suspensión sobre hielo. Se sedimentaron las células por centrifugación a 70-75 x g (rata) o 95-90 x g (mono y humanos) y se resuspendieron a 0,8 millones de células por mL de medio para verter en placas (medio E de William suplementado con FBS al 5 %, penicilina-estreptomocina al 0,5 %, L-glutamina al 1 %, insulina a 4 μ g/mL y dexametasona 1 μ M). Se sembraron entonces placas de multipocillos recubiertas de colágeno I (colágeno de cola de rata I; 12 o 6 pocillos) mediante la adición de 1 mL (12 pocillos; 0,8 millones de células/pocillo) o 2 mL (6 pocillos; 1,6 millones de células/pocillo) de suspensión de células. Se agitaron suavemente las placas para distribuir uniformemente las células y se pusieron en un incubador a 37 °C durante aproximadamente 4 a 6 horas para dejar que se adhieran las células. Una vez que se hubieron adherido las células, se separó el medio de las placas y se reemplazó con medio de cultivo de hepatocitos (medio E de William suplementado con penicilina-estreptomocina, L-glutamina al 1 %, insulina-transferrina-selenio al 1 % y dexametasona 0,1 μ M). Se dejaron las células durante la noche en un incubador a 37 °C para que se aclimataran al cultivo y al medio.

- Células Huh-7: Se dispersaron monocapas confluentes de células Huh-7 utilizando tripsina-EDTA, se lavaron y se sedimentaron por centrifugación a 1.000 rpm (Beckman, Model Allegra 6R). Se resuspendieron las células a 0,2, 0,3 y 0,4 x 10⁶ células/mL de medio (DMEM suplementado con piruvato al 1 %, FBS al 10 %, penicilina-estreptomina al 0,5 %, L-glutamina al 1 %, aminoácidos no esenciales al 1 % y HEPES 22 mM). Se sembraron entonces placas de
- 5 multipocillos recubiertas con colágeno I (colágeno de cola de rata tipo I; 6 pocillos) mediante la adición de 2,0 mL de suspensión de células para alcanzar una densidad final de células de 0,4, 0,6 y 0,8 x 10⁶ células/pocillo y se pusieron en un incubador a 37 °C durante la noche para dejar que las células se adhieran y se aclimaten al cultivo y al medio. Se prepararon placas por duplicado con la misma densidad de células para la determinación del número de células en cada punto de tiempo.
- 10 Incubaciones con [¹⁴C]-Compuesto 1 y con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina
- Las incubaciones de hepatocitos con Compuesto 1 y 2'-C-metil-guanosina radiomarcados, marcados ambos en la posición C-8 del resto guanina, se llevaron a cabo en un volumen final de 2,0 mL de medio de cultivo de hepatocitos/pocillo (1,6 millones de células/mL). Se separó el medio de cultivo procedente de la incubación de células durante la noche y se reemplazó con medio fresco, pre-calentado a 37 °C, que contenía [¹⁴C]-Compuesto 1, (122 DPM/pmol) o [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina (127 DPM/pmol), 1 o 10 µM, a partir de una solución stock en DMSO (la concentración final de DMSO fue 0,1 %) o en etanol al 50 % (la concentración final de etanol fue 0,2 %). Después de 1, 4, 8 y 24 horas, se retiraron 0,5-1,0 mL de medio de incubación y se conservaron a -20 °C hasta el análisis (descrito más adelante). Se despreció el medio restante y se lavaron cuidadosamente las monocapas celulares dos veces con PBS enfriado en hielo. Después del último lavado, se retiró cuidadosamente todo el PBS y se añadió 1,0
- 15 20 mL de solución de extracción (metanol al 70 % enfriado en hielo). Se rascaron y separaron las células y se suspendieron en la solución de extracción, se transfirieron a tubos de microcentrifuga de polipropileno de 2 mL y se extrajeron los contenidos intracelulares durante la noche a -20 °C.
- Las incubaciones de Huh-7 se llevaron a cabo en un volumen final de 2,0 mL de medio de cultivo de Huh7/pocillo (0,4, 0,6 y 0,8 millones de células/mL). Se separó el medio de cultivo procedente de la incubación de células durante la noche y se reemplazó con medio de cultivo fresco, pre-calentado a 37 °C, que contenía [¹⁴C]-Compuesto 1 o [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina como se ha descrito antes para los hepatocitos primarios. Después de 24, 48 y 72 horas, se retiraron 0,5-1,0 mL de medio de incubación y se conservaron a -20 °C hasta el análisis (descrito más adelante). Se despreció el medio restante y las monocapas celulares se procesaron y se extrajeron como se ha descrito antes.
- 25 Determinación de la semi-vida (t_{1/2}) intracelular *in vitro* de 2'-C-metil-guanosina -5'-trifosfato en hepatocitos primarios
- 30 Se incubaron hepatocitos primarios con [¹⁴C]-Compuesto 1 (122 DPM/pmol) o [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina (127 DPM/pmol) a 10 µM durante 24 horas a cuyo tiempo se retiró el medio de incubación y se lavó cuidadosamente la monocapa celular dos veces con PBS templado (37 °C) y se volvió a cultivar con medio libre de fármaco. A tiempos seleccionados durante 24 horas, se retiró el medio y las monocapas celulares se lavaron cuidadosamente dos veces con PBS enfriado en hielo. Después del último lavado, se retiró cuidadosamente todo el PBS y las monocapas celulares se procesaron y se extrajeron como se ha descrito previamente.
- 35 Efecto de la ribavirina y el ritonavir sobre la formación de los compuestos 5, 6 y 7 en los hepatocitos primarios y en las células Huh7 después de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 y con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina
- Se realizaron incubaciones en hepatocitos primarios (1,6 millones de células/pocillo) y en células Huh7 (0,4 millones de células/pocillo) esencialmente como se ha descrito antes con las siguientes excepciones. Se incubaron las células con [¹⁴C]-Compuesto 1 (122 DPM/pmol) y con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina (127 DPM/pmol) a concentración 10 µM en presencia o ausencia de ritonavir (1 µM) o de ribavirina (5 µM) durante 24 horas (hepatocitos) o durante 72 horas (Huh7, ribavirina sólo). Se retiró el medio de incubación (0,5-1,0 mL) y se conservó a -20 °C para análisis (descrito más adelante). Se despreció el medio restante y las monocapas celulares se procesaron y se extrajeron como se ha descrito previamente.
- 40 Estabilidad de los nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina (compuestos 5, 6 y 7)
- Se evaluó la estabilidad de los nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina preparando una solución patrón 100 µM de Compuesto 7 (2'-C-metil-guanosina trifosfato) que contenía también Compuesto 5 (2'-C-metil-guanosina monofosfato) (10 %) y Compuesto 6 (2'-C-metil-guanosina difosfato) (30 %) en agua de grado HPLC y añadiendo 100 µL de esta solución patrón a (a) 900 µL de solución de extracción (metanol al 70 %) y (b) 900 µL de un blanco de extracto de células hepatocitos en metanol al 70 %. Las muestras después de la adición se mantuvieron a -20 °C hasta tres días y después de dicho tiempo se procesaron como se ha descrito para las muestras experimentales.
- 45 Identificación preliminar de metabolitos putativos
- La identificación preliminar de metabolitos putativos se llevó a cabo comparando el tiempo de retención de los metabolitos observados en el medio de incubación y en los extractos celulares con los tiempos de retención obtenidos con patrones sintetizados químicamente utilizando las condiciones de cromatografía descritas más adelante. Se realizó una identificación adicional de los nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina (mono-, di- y trifosfato)
- 55

incubando muestras del extracto celular con fosfatasa alcalina (10 unidades durante 60 min a 37 °C) y comparando los tiempos de retención en HPLC de los nucleósidos resultantes con el de la 2'-C-metil-guanosina auténtica.

Preparación y análisis de las muestras

Extractos celulares

- 5 Se prepararon extractos celulares por centrifugación a 16.000 RCF (fuerza centrífuga relativa) utilizando una microcentrífuga Eppendorf (Eppendorf, Modelo 5415D) durante 10 min para separar los desechos celulares. Se añadió una alícuota de 5-10 µL del sobrenadante a 5 mL de cóctel de centelleo líquido EcoLite™ (MP, Irvine, CA) y se midió la radiactividad mediante conteo por centelleo líquido (LSC) utilizando un contador de centelleo líquido multipropósito Beckman Coulter LS6500 (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Se secó después la muestra
- 10 restante utilizando un concentrador centrivap refrigerado Labconco (Labconco, Kansas City, MO). Los extractos secos se reconstituyeron en 120 µL de agua de grado HPLC y se centrifugaron a 16.000 RCF utilizando una microcentrífuga Eppendorf durante 10 min. Antes del análisis por HPLC (descrito más adelante), se midió la radiactividad de los extractos concentrados por conteo por centelleo líquido utilizando alícuotas de 5 µL. Se determinó entonces la recuperación por extracción comparando la radiactividad total en los extractos antes y después del secado. El extracto restante se analizó entonces por HPLC con detección de la radiactividad en línea utilizando un analizador de centelleo de flujo Radiomatic™ 515TR. Se cuantificó la radiactividad en los componentes separados mediante la integración de los picos utilizando el Software Flo-One™ (Perkin Elmer Life Sciences). Las muestras con escasa recuperación (<85 %) se volvieron a analizar cuando fue posible.

- 20 Se prepararon muestras para comprobar la estabilidad de los nucleótidos y se procesaron como se ha descrito antes para las muestras experimentales con la excepción de que no se necesitó ningún conteo por centelleo líquido ya que las muestras no eran radiactivas. Se reconstituyeron los extractos secos en 100 µL de agua de grado HPLC, se centrifugaron a 16.000 RCF utilizando una microcentrífuga Eppendorf durante 10 min y se analizaron por LC-UV (método 2; descrito más adelante). Las áreas de los picos UV para el Compuesto 5, Compuesto 6 y Compuesto 7 en estas muestras se compararon con las áreas de los picos obtenidas para la solución patrón.

25 Medio de incubación

- Se descongelaron muestras del medio de incubación a temperatura ambiente, se agitaron en vórtice y se centrifugaron a 16.000 RCF utilizando una microcentrífuga Eppendorf. Se añadió una alícuota de 10 µL a 5 mL de cóctel para centelleo líquido EcoLite™ (MP, Irvine, CA) y se midió la radiactividad por LSC utilizando un contador de centelleo líquido multipropósito Beckman Coulter LS6500 (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Se analizaron entonces las muestras (50-100 µL) por HPLC (descrito más adelante) con detección de la radiactividad en línea utilizando un analizador de centelleo de flujo Radiomatic™ 515TR. Se cuantificó la radiactividad en los componentes separados mediante la integración de los picos utilizando el Software Flo-One™ (Perkin Elmer Life Sciences). Las muestras con escasa recuperación (<85 %) se volvieron a analizar cuando fue posible..

Métodos analíticos

- 35 Todas las muestras se analizaron utilizando los siguientes métodos de HPLC:

Instrumentación:

- Agilent 1100 con ChemStation LC3D Versión A.10.02 (1757) (Agilent Technologies, Inc)
 Muestreador automático con termostato
 Detector de fotodiodos en serie
- 40 Compartimento de columna termoestabilizado
 Bomba cuaternaria
 Desgasificador a vacío

Condiciones cromatográficas:

Método 1 - Análisis del medio de incubación y extractos celulares con Compuesto 1:

- 45
- Columna: Phenomenex® Columbus 5 µ C18, 4,6 x 250 mm (Phenomenex USA, Torrance, CA)
 - Guarda columna: Security Guard Cartridge, 4 x 2 mm (Phenomenex USA, Torrance, CA)
 - Temperatura de la columna: ambiente
 - Detección UV: 252 nm
- 50
- Detección de radiactividad: cubeta de 500 µL de líquido, cóctel de centelleo de flujo (Ultima Flow-AP, Perkin Elmer Life Sciences, CT) a 3 mL/min.

Condiciones de gradiente de HPLC -Método 1			
Tiempo (min)	% de Fase móvil A	% de Fase móvil B	Caudal (mL/min)
0	95	5	1,0
15	70	30	1,0
20	70	30	1,0
30	50	50	1,0
50	50	50	1,0

Fase móvil A = fosfato de potasio 25 mM + TBAP 5 mM pH 6,3

Fase móvil B = Metanol

En la Figura 3, se proporciona un cromatograma de HPLC representativo del Compuesto 1 (diastereoisómeros 1 y 2) y de metabolitos patrones obtenido por el método 1

Método 2 - Análisis de extractos celulares con 2'-C-metil-guanosina:

- Columna: Phenomenex® Columbus 5 μ C18, 4,6 x 250 mm (Phenomenex USA, Torrance, CA)
- 5 • Guarda columna: Security Guard Cartridge, 4 x 2 mm (Phenomenex USA, Torrance, CA)
- Temperatura de la columna: ambiente
- Detección UV: 252 nm
- Detección de radiactividad: cubeta de 500 μ L de líquido, cóctel de centelleo de flujo (Ultima Flow-AP, Perkin Elmer Life Sciences, CT) a 3 mL/min.

Condiciones de gradiente de HPLC -Método 2			
Tiempo (min)	% de Fase móvil A	% de Fase móvil B	Caudal (mL/min)
0	95	5	1,0
15	70	30	1,0
20	70	30	1,0
30	50	50	1,0

Fase móvil A = fosfato de potasio 25 mM + TBAP 5 mM pH 6,3

Fase móvil B = Metanol

10 Método 3 - Análisis de muestras de medio de incubación con 2'-C-metil-guanosina:

- Columna: Phenomenex® Columbus 5 μ C18, 4,6 x 250 mm (Phenomenex USA, Torrance, CA)
- Guarda columna: Security Guard Cartridge, 4 x 2 mm (Phenomenex USA, Torrance, CA)
- Temperatura de la columna: ambiente
- 15 • Detección UV: 252 nm
- Detección de radiactividad: cubeta de 500 μ L de líquido, cóctel de centelleo de flujo (Ultima Flow-AP, Perkin Elmer Life Sciences, CT) a 3 mL/min.

Condiciones de gradiente de HPLC -Método 3			
Tiempo (min)	% de Fase móvil A	% de Fase móvil B	Caudal (mL/min)
0	95	5	1,0
15	70	30	1,0
20	70	30	1,0

Fase móvil A = fosfato de potasio 25 mM + TBAP 5 mM pH 6,3

Fase móvil B = Metanol

Método 4 - Análisis de muestras de medio de incubación con Compuesto 1

Este método se utilizó para la comparación de los perfiles de metabolitos en hepatocitos con los perfiles de metabolitos observados con incubaciones microsómicas, Ejemplo 14.

- Columna: Phenomenex® Columbus 5 μ C18, 4,6 x 250 mm (Phenomenex USA, Torrance, CA)
- 5 • Guarda columna: Security Guard Cartridge, 4 x 2 mm (Phenomenex USA, Torrance, CA)
- Temperatura de la columna: ambiente
- Detección UV: 252 nm
- Detección de radiactividad: cubeta de 500 μ L de líquido, cóctel de centelleo de flujo (Ultima Flow-AP, Perkin Elmer Life Sciences, CT) a 3 mL/min.

Condiciones de gradiente de HPLC -Método 4

Tiempo (min)	% de Fase móvil A	% de Fase móvil B	Caudal (mL/min)
0	95	5	1,0
15	70	30	1,0
20	70	30	1,0
30	55	45	1,0
50	55	45	1,0

Fase móvil A = fosfato de potasio 10 mM pH 5

Fase móvil B = Metanol

10 Cálculos

Los datos de concentración-tiempo para el Compuesto 1 y el Compuesto 7 (2'-C-metil-guanosina trifosfato) se analizaron utilizando Excel 2003 de Microsoft® Office para obtener los valores del área bajo la curva concentración-tiempo (AUC). AUC₀₋₂₄ fue el área bajo la curva concentración-tiempo calculada utilizando la regla del trapecio para funciones lineales y tiempos de muestreo de hasta 24 horas. El análisis de regresión lineal (Microsoft Excel) se utilizó para estimar el valor $t_{1/2}$ intracelular *in vitro* para el Compuesto 7 a partir de la función $t_{1/2} = 0,693/k$ donde k es la pendiente de la regresión lineal obtenida representando gráficamente el log natural de la concentración intracelular del Compuesto 7 en pmol/millón de células frente al tiempo de incubación.

15

Resultados

20 La disposición metabólica y la activación intracelular del Compuesto 1 se evaluó en hepatocitos primarios y en la línea de células del hepatoma humano Huh7 utilizando Compuesto 1 marcado con [¹⁴C]. Se evaluó también en paralelo la activación del nucleósido parental, 2'-C-metil-guanosina, utilizando la 2'-C-metil-guanosina marcada con [¹⁴C] para evaluar si la liberación de Compuesto 5 a través del Compuesto 1 lleva a niveles más altos del trifosfato activo, Compuesto 7.

25 La radiopureza de [¹⁴C]-Compuesto 1 y de [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina se evaluó utilizando HPLC. Se preparó una dilución 1:1000 del material stock en medio de hepatocitos y se analizó por HPLC. Ambos compuestos tenían > 98 % de pureza.

Perfil metabólico: medio de incubación

Hepatocitos primarios

Incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a concentración 10 micromolar

30 Se observó un extenso metabolismo del [¹⁴C]-Compuesto 1 en hepatocitos de rata, con una reducción aproximada del 50 % en los niveles de Compuesto 1 en el medio a las 4 horas y con el Compuesto 1 no detectable después de 24 horas (Tabla 11). El metabolismo en hepatocitos de mono fue moderado; los niveles en el medio disminuyeron aproximadamente un 40 % en 8 horas y 77 % después de 24 horas (Tabla 11). Por contraste con ambos hepatocitos, de rata y de mono, el metabolismo del Compuesto 1 en hepatocitos humanos (Tabla 11) parece que es
35 bajo con una reducción de sólo el 38 % en los niveles de Compuesto 1 en el medio, observada en 24 horas.

Tabla 11: Tanto por ciento de [¹⁴C]-Compuesto 1 residual en el medio de incubación de hepatocitos primarios y células Huh7 después de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1

Tiempo (horas)	% de [¹⁴ C]-Compuesto 1 residual (10 µM) en hepatocitos primarios					
	Humano (n=2)		Mono (n=2)		Rata (n=2)	
0	97	98	97	91	95	97
1	94	97	95	67	91	93
4 ^a	91	91	-	66	48	55
8	84	79	63	61	18	32
24	63	60	16	31	0	0

Tiempo (horas)	% de [¹⁴ C]-Compuesto 1 residual (1 µM) en hepatocitos primarios	
	Humano (n=1)	Rata (n=1)
0	97	99
1	100	89
8	78	21
24	51	0

Tiempo (horas)	% de [¹⁴ C]-Compuesto 1 residual (10 µM) en células Huh7 (n=2)	
	0	98
24	85	86
48	76	77
72	65	68

Se incubaron hepatocitos primarios y células Huh7 con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 1 o 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de [¹⁴C]-Compuesto 1 inmodificado en el medio de incubación y se expresan en tanto por ciento.

^a Debido a la disponibilidad limitada de células, no se realizó el muestreo a las 4 horas para el mono 1 (Cy230).

Se observó un total de diez metabolitos en el medio de incubación de hepatocitos de rata (Tabla 12); nueve en hepatocitos de mono (Tabla 13) y siete en hepatocitos humanos (Tabla 14).

Tabla 12: Metabolitos del Compuesto 1 observados en el medio de incubación de hepatocitos de rata después de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1

Lote nº Rs448	Metabolitos mayores observados en el medio después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)									
Tiempo (horas)	U8	2'-C- metil- guanosina	Compuesto 5	Compuesto 3	U5	U7	Compuesto 2 ^a	U4	U1	U3
0	1,3	BLD ^b	BLD	BLD	BLD	BLD	2,2	0,8	BLD	BLD
1	1,3	0,8	1,5	BLD	BLD	BLD	1,9	1,2	1,0	2,1
4	2,8	17,5	5,3	0,9	2,6	BLD	5,3	BLD	6,4	9,8
8	2,3	41,5	6,1	1,4	6,1	1,3	5,7	BLD	7,4	9,4
24	1,3	68,5	2,9	1,4	6,9	BLD	3,7	BLD	6,7	6,6

Lote nº Rs458	Metabolitos mayores observados en el medio después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)									
Tiempo (horas)	U8	2'-C- metil- guanosina	Compuesto 5	Compuesto 3	U5	U7	Compuesto 2 ^a	U4	U1	U3
0	1,2	BLD	BLD	BLD	BLD	BLD	1,5	0,4	BLD	BLD
1	1,4	0,5	BLD	BLD	BLD	BLD	1,5	BLD	1,4	2,6
4	2,2	10,1	3,6	0,9	2,6	0,4	5,1	BLD	7,1	11,9
8	2,3	23,4	3,3	2,1	4,7	BLD	6,8	BLD	10	14,8
24	2,6	65,3	2,6	1,7	6,2	BLD	4,6	BLD	7,2	10,0

Se incubaron hepatocitos de rata durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el medio de incubación y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^a Posible co-elución de un metabolito desconocido con el Compuesto 2.

^bBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

Tabla 13: Metabolitos del Compuesto 1 observados en el medio de incubación de hepatocitos de mono después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1

Lote n° Cy230 ^a	Metabolitos mayores observados en el medio después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)								
Tiempo (horas)	U8	2'-C- metil- guanosina	Compuesto 5	Compuesto 3	U5	Compuesto 2 ^b	U4	U1	U3
0	1,5	BLD ^c	BLD	BLD	BLD	1,0	BLD	BLD	BLD
1	1,0	BLD	0,9	BLD	BLD	1,9	0,6	0,7	0
8	1,3	10,4	5,7	0,5	BLD	8,5	0,6	6,8	2,8
24	BLD	48,8	8,4	3,1	BLD	7,0	1,0	10,6	4,9

Lote n° Cy234	Metabolitos mayores observados en el medio después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)								
Tiempo (horas)	U8	2'-C- metil- guanosina	Compuesto 5	Compuesto 3	U5	Compuesto 2 ^b	U4	U1	U3
0	1,1	BLD	BLD	BLD	BLD	6,2	2,1	BLD	BLD
1	0	2,1	28,5	BLD	BLD	0,6	1,8	BLD	BLD
4	1,4	6,8	19,0	BLD	BLD	1,1	2,8	1,8	0,5
8	0,9	14,8	16,6	BLD	BLD	1,8	1,6	3,1	0,8
24	BLD	35,6	7,5	0,9	2,2	8,2	1,7	8,6	4,3

Se incubaron hepatocitos de mono durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el medio de incubación y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^a Debido a la disponibilidad limitada de células, no se realizó el muestreo a las 4 horas para el mono 1 (Cy230).

^b Posible co-elución de un metabolito desconocido con el Compuesto 2.

^cBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

Tabla 14: Metabolitos del Compuesto 1 observados en el medio de incubación de hepatocitos humanos después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1

Lote n° Hu759	Metabolitos mayores observados en el medio después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)						
Tiempo (horas)	U8	2'-C- metil- guanosina	Compuesto 5	Compuesto 2 ^a	U4	U1	U3
0	0,8	BLD ^b	BLD	2,7	BLD	BLD	BLD
1	0,8	BLD	4,4	0	0,6	0	0
4	1,1	1,7	3,9	1,8	0,6	0	0,5
8	0,6	4,6	5,1	2,6	0,8	0,9	1,3
24	BLD	22,1	4,7	2,7	1,9	2,5	2,6

Lote n° Hu775	Metabolitos mayores observados en el medio después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)						
Tiempo (horas)	U8	2'-C- metil- guanosina	Compuesto 5	Compuesto 2 ^a	U4	U1	U3
0	1,0	BLD	BLD	1,1	0,5	BLD	BLD
1	1,3	BLD	0,5	BLD	BLD	BLD	BLD
4	1,0	1,6	4,5	0,8	0,8	BLD	BLD
8	1,2	7	7,2	0,6	0,9	0,5	0,9
24	0,8	29	7,1	0,7	1,2	0,6	0,7

Se incubaron hepatocitos humanos durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el medio de incubación y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^a Posible co-elución de un metabolito desconocido con el Compuesto 2.

^bBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

- 5 La identificación de los metabolitos se realizó mediante la comparación del tiempo de retención con los de patrones de referencia, cuando fue posible. Ambas muestras, hepatocitos y microsomas se analizaron utilizando los métodos 1 y 4 de HPLC para verificar adicionalmente y confirmar las identificaciones y asignaciones de los metabolitos en hepatocitos en relación con las descritas en el Ejemplo 14. La Tabla 15 resume las asignaciones de metabolitos para los metabolitos del Compuesto 1 observados en hepatocitos primarios y en células Huh7.

Tabla 15: Asignaciones metabólicas de los metabolitos del Compuesto 1 observados en hepatocitos primarios y en células Huh7

Asignación metabólica	Tiempo de retención (min) LC Método 1	Localización
Compuesto 5	15	Hepatocitos primarios (H,M,R) ^a Células Huh7
2'-C-metil-guanosina	9,4	Hepatocitos primarios (H,M,R) Células Huh7
Compuesto 2	32	Hepatocitos primarios (H,M,R) Células Huh7
Compuesto 3, diastereoisómero 1	24,7	Hepatocitos primarios (R,M)
Compuesto 3, diastereoisómero 2	27,5	Células Huh7
U1	38,4	Hepatocitos primarios (H,M,R)
U3	39,8	Hepatocitos primarios (H,M,R)
U4	36,8	Hepatocitos primarios (H,M,R)
U5	26,8	Hepatocitos primarios (R)
U6	33,8	Células Huh7
U7	30,9	Hepatocitos primarios (R)
Compuesto 6	22,3	Hepatocitos primarios (H,M,R) Células Huh7
Compuesto 7	25,9	Hepatocitos primarios (H,M,R) Células Huh7
U8	4,6	Hepatocitos primarios (H,M,R) Células Huh7
U9	28,1	Células Huh7

La 2'-C-metil-guanosina fue el metabolito predominante en todas las especies, representando el 26 % (humanos), 42 % (mono) y 67 % (rata) de la radiactividad total medida en el medio de incubación después de 24 horas.

Tabla 16: Niveles de 2'-C-metil-guanosina en el medio de incubación de hepatocitos primarios y células Huh7 después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1

Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina (% de la radiactividad total)					
	en hepatocitos primarios con [¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 µM)					
	Humano (n=2)		Mono (n=2)		Rata (n=2)	
1	BLD ^a	BLD	BLD	2,10	0,80	0,50
4 ^b	1,70	1,60	-	6,80	17,0	10,0
8	4,60	7,00	10,4	14,8	41,0	23,0
24	22,1	29,0	48,8	35,6	69,0	65,0

Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina (% de la radiactividad total)	
	en hepatocitos primarios con [¹⁴ C]-Compuesto 1 (1 µM)	
	Humano (n=1)	Rata (n=1)
1	BLD	BLD
8	9,20	29,4
24	38,7	58,3

Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina (% de la radiactividad total)	
	en células Huh7 (n=2) con [¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 µM)	
24	2,20	1,10
48	2,70	0,50
72	2,30	1,50

Se incubaron hepatocitos primarios y células Huh7 con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 1 o 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de 2'-C-metil-guanosina en el medio de incubación y se expresan en tanto por ciento.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

^bDebido a la disponibilidad limitada de células, no se realizó el muestreo a las 4 horas para el mono 1 (Cy230).

5 El Compuesto 5 y el Compuesto 2 fueron los más altos en los hepatocitos de mono, representando el 8 % de la radiactividad total después de 24 horas mientras que en los hepatocitos humanos y de rata, representaron 3 a 5 % después de 24 horas, respectivamente. La presencia de Compuesto 5 en el medio de incubación se confirmó mediante tratamiento con fosfatasa alcalina. Otro metabolito o metabolitos no identificados co-eluyen con el Compuesto 2 en las condiciones cromatográficas del método 1 de HPLC o co-eluyen con el Compuesto 3 en las condiciones cromatográficas del método 4 de HPLC. Los metabolitos desconocidos, U1 y U3 representaron el 7 a 8 % de la radiactividad total a las 24 horas en los hepatocitos de rata, 10 y 5 % en los de mono y aproximadamente 2 % en los hepatocitos humanos. Otro metabolito desconocido, U5, fue observado solamente en hepatocitos de rata y representó aproximadamente el 7 % de la radiactividad total después de 24 horas. El Compuesto 3 (mezcla de los compuestos 3a y 3b), identificado como un metabolito importante dependiente de NADPH en los microsomas hepáticos, pareció ser un metabolito menor en los hepatocitos, representando el 3 % o menos de la radiactividad total en los hepatocitos de mono y de rata y siendo indetectable en los hepatocitos humanos (Tablas 12-13).

No se observaron metabolitos en el medio de incubación de hepatocitos primarios después de la incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina.

Incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a concentración 1 micromolar

20 Se evaluó el metabolismo de [¹⁴C]-Compuesto 1 a 1 µM en los hepatocitos humanos y de rata y, como se había observado a la concentración 10 µM, el metabolismo en los hepatocitos de rata fue extenso con aproximadamente un 79 % de reducción en los niveles de Compuesto 1 en el medio a las 8 horas y con Compuesto 1 no detectable después de 24 horas (Tabla 11). El metabolismo en los hepatocitos humanos (Tabla 11), fue más bajo, permaneciendo el 51 % de Compuesto 1 en el medio a las 24 horas. Se observaron un total de ocho metabolitos en el medio de incubación de hepatocitos de rata (Tabla 17); solamente se detectaron 2'-C-metil-guanosina, Compuesto 5 y Compuesto 2 en el medio de hepatocitos humanos (Tabla 17).

Tabla 17: Metabolitos de Compuesto 1 observados en el medio de incubación de hepatocitos humanos y de rata después de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1

Hu775	Metabolitos mayores observados en el medio después de incubación con Compuesto 1 a 1 µM (% de la radiactividad total)		
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 2 ^b
0	BLD ^a	BLD	2,22
1	BLD	BLD	BLD
8	9,22	10,4	2,27
24	38,7	8,29	1,72

Rs458	Metabolitos mayores observados en el medio después de incubación con Compuesto 1 a 1 µM (% de la radiactividad total)							
Tiempo (horas)	2'-C- metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 3	M10	U7	Compuesto 2 ^b	U1	U3
0	BLD	BLD	BLD	BLD	BLD	1,05	BLD	BLD
1	BLD	BLD	BLD	BLD	BLD	3,02	2,85	1,76
8	29,4	6,41	BLD	5,04	BLD	9,52	12,7	16,4
24	58,3	BLD	1,71	3,04	1,98	7,43	11,2	14,7

Se incubaron hepatocitos humanos y de rata durante 1, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 1 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el medio de incubación y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

^bPosible co-elución de un metabolito desconocido con el Compuesto 2.

5 El principal metabolito a las 24 horas en los hepatocitos humanos y de rata fue la 2'-C-metil-guanosina, que representa el 39 y 58 %, respectivamente (Tabla 16). En los hepatocitos humanos el Compuesto 5 representó el 8 % y el Compuesto 2 representó el 1,7 % a las 24 horas. En los hepatocitos de rata no se detectó Compuesto 5 a las 24 horas y el Compuesto 2 representó el 7 % de la radiactividad total. Los metabolitos desconocidos en hepatocitos de rata representaron el 31 % de la radiactividad total. El Compuesto 3 (3a y 3b; 1,7 %) se detectó también en los hepatocitos de rata a las 24 horas (Tabla 17).

10 No se observaron metabolitos en el medio de incubación de hepatocitos primarios después de la incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina 1 µM.

Células Huh7

15 En contraste con los hepatocitos primarios, el metabolismo del Compuesto 1 en la línea de células del hepatoma humano, Huh7, fue bajo. Después de 24 horas, el Compuesto 1 representó el 86 % de la radiactividad medida en el medio de incubación y en 72 horas, representó el 67 %. Se observó un total de seis metabolitos (Tabla 18) en el medio de incubación de células Huh7.

Tabla 18: Metabolitos del Compuesto 1 observados en el medio de incubación de células Huh7 después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1

Huh7	Metabolitos mayores observados en el medio después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)					
Tiempo (horas)	U8	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 2	U6	U4
0	0,8	BLD ^a	BLD	2,9	BLD	0,4
24	1,0	1,2	2,0	8,2	BLD	1,5
48	0,5	0,5	0,8	18,3	0,5	2,4
72	1,0	1,5	0,7	25,3	0,7	3,5

Huh7	Metabolitos mayores observados en el medio después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)					
Tiempo (horas)	U8	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 2	U6	U4
0	1,0	BLD	BLD	1,7	BLD	BLD
24	0,7	2,2	3,2	8,0	BLD	1,3
48	0,6	2,7	1,5	17,2	0,3	2,4
72	1,2	2,3	1,0	27,2	0,4	3,2

Se incubaron las células con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el medio de incubación y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

- 5 Un metabolito menor (<1 %), U6 parece que es el único en Huh7. El Compuesto 2 parece que es el metabolito mayor en células Huh7, representando el 26 % de la radiactividad total a las 72 horas. La 2'-C-metil-guanosina y el Compuesto 5 representaron el 2 y 0,9 %, respectivamente, de la radiactividad total a las 72 horas. U4 representó el 3,4 % de la radiactividad a las 72 horas.

No se observaron metabolitos en el medio de incubación de células Huh7 después de la incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina.

- 10 Perfil metabólico: extractos celulares

Se evaluó la estabilidad de los nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina a lo largo del procedimiento de preparación y extracción de la muestra utilizando un patrón de referencia de Compuesto 7 que contenía también Compuesto 5 (10 %) y Compuesto 6 (30 %). No se observó ninguna desintegración de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina.

Hepatocitos primarios

- 15 [¹⁴C]-Compuesto 1 y [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a concentración 10 micromolar

La recuperación por extracción de la radiactividad intracelular se determinó por conteo por centelleo líquido como se describe en los procedimientos experimentales descritos anteriormente. En general, la recuperación por extracción varió de 66 % a 79 %. No se determinó la radiactividad que permanece en los sedimentos celulares. El perfil metabólico del [¹⁴C]-Compuesto 1 en hepatocitos primarios se resume de la Tabla 19 a la Tabla 22 y de la Tabla 26 a la Tabla 29 y el perfil metabólico de [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina en hepatocitos humanos, de mono y de rata se resume de la Tabla 23A a la Tabla 25 y en la Tabla 27.

- 20

Tabla 19: Metabolitos del Compuesto 1 observados en extractos de hepatocitos humanos después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1

Hu759 Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)									
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7	Compuesto 2 ^b	U4	U1	U3	Compuesto 1
1	3,69	6,44	4,93	34,2	6,50	7,06	6,05	BLD ^a	31,1
4	4,20	5,70	8,01	63,1	1,81	4,24	3,44	BLD	8,48
8	7,52	7,99	13,99	70,5	BLD	BLD	BLD	BLD	BLD
24	10,3	5,38	13,4	69,5	BLD	BLD	BLD	BLD	1,38

Hu775 Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)									
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7	Compuesto 2 ^b	U4	U1	U3	Compuesto 1
1	3,75	8,77	6,09	46,4	2,30	3,85	3,52	1,42	23,9
4	3,10	5,54	12,4	69,7	BLD	1,07	1,20	BLD	6,96
8	5,89	4,44	11,1	74,1	BLD	0,57	BLD	BLD	3,90
24	9,06	12,8	17,05	59,6	BLD	BLD	BLD	BLD	1,59

Se incubaron hepatocitos humanos durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el extracto celular y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

^bPosible co-elución de un metabolito desconocido con el Compuesto 2.

Tabla 20: Metabolitos del Compuesto 1 observados en extractos de hepatocitos de mono después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1

5 Cy230 ^a Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)								
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7	Compuesto 2 ^b	U1	U3	Compuesto 1
1	1,68	8,41	9,25	63,4	3,20	6,19	2,72	4,03
8	0,95	3,84	13,8	80,9	BLD ^c	0,55	BLD	BLD
24	2,31	6,96	18,5	72,2	BLD	BLD	BLD	BLD

Cy234 Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)								
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7	Compuesto 2 ^b	U1	U3	Compuesto 1
1	3,04	18,5	9,65	34,9	7,96	6,46	2,20	17,3
4	1,35	5,47	17,1	70,3	1,25	1,49	BLD	3,03
8	2,06	5,38	14,9	77,6	BLD	BLD	BLD	BLD
24	1,25	3,34	16,0	79,4	BLD	BLD	BLD	BLD

Se incubaron hepatocitos de mono durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el extracto celular y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^aDebido a la disponibilidad limitada de células, no se realizó el muestreo a las 4 horas para el mono 1 (Cy230).

^bPosible co-elución de un metabolito desconocido con el Compuesto 2.

^cBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

Tabla 21: Metabolitos del Compuesto 1 observados en extractos de hepatocitos de rata después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1

Rs448 Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)										
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Comp. 5	Comp. 6	Comp. 7	Comp. 3	Comp. 2 ^b	U4	U1	U3	Comp. 1
1	1,84	4,37	11,4	59,0	1,88	1,92	1,21	1,90	0,91	15,0
4	5,04	4,02	13,4	70,9	0,74	0,78	0,44	0,86	BLD ^a	3,86
8	8,77	3,23	12,7	73,0	BLD	BLD	0,26	0,89	BLD	1,20
24	14,7	2,72	15,2	66,2	BLD	BLD	BLD	1,22	BLD	BLD

Rs458 Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)										
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Comp. 5	Comp. 6	Comp. 7	Comp. 3	Comp. 2 ^b	U4	U1	U3	Comp. 1
1	1,75	2,65	12,3	50,8	BLD	3,48	1,44	5,55	BLD	19,7
4	3,78	4,53	16,7	69,1	BLD	BLD	0,32	1,54	BLD	4,02
8	4,95	3,84	16,8	72,5	BLD	BLD	BLD	0,92	BLD	0,95
24	16,9	12,8	14,6	54,5	BLD	BLD	BLD	1,2	BLD	BLD

Se incubaron hepatocitos de rata durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el extracto celular y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

^bPosible co-elución de un metabolito desconocido con el Compuesto 2.

5

Tabla 22: Metabolitos del Compuesto 1 observados en extractos de hepatocitos humanos y de rata después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1

Hu775 Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con Compuesto 1 a 1 µM (% de la radiactividad total)								
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7	Compuesto 2 ^b	U1	Compuesto 1	
1	BLD ^a	5,45	7,94	48,5	4,94	5,38	19,9	
8	4,34	3,60	13,0	75,0	BLD	BLD	4,07	
24	9,05	6,41	12,4	67,0	BLD	BLD	2,78	

Rs458 Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con Compuesto 1 a 1 µM (% de la radiactividad total)								
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7	Compuesto 2 ^b	U1	U3	Compuesto 1
1	1,01	3,74	13,0	50,5	5,83	1,93	8,43	12,3
8	5,58	3,51	13,27	77,6	BLD	BLD	BLD	BLD
24	13,1	6,68	18,1	62,1	BLD	BLD	BLD	BLD

Se incubaron hepatocitos humanos y de rata durante 1, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 1 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el extracto celular y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

^bPosible co-elución de un metabolito desconocido con el Compuesto 2.

Tabla 23A: Metabolitos de 2'-C-metil-guanosina observados en extractos de hepatocitos humanos después de la incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

Hu759		Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con 2'-C-metil-guanosina 10 µM (% de la radiactividad total)		
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7
1	97,1	BLD ^a	0,51	2,40
4	87,3	BLD	1,64	11,1
8	73,9	1,89	4,54	19,6
24	52,4	3,82	7,71	36,1

Hu775		Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con 2'-C-metil-guanosina 10 µM (% de la radiactividad total)		
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7
1	94,9	0,59	0,63	3,93
4	77,3	0,89	2,36	19,4
8	61,4	1,11	3,46	34,1
24	40,2	3,41	10,6	45,8

Se incubaron hepatocitos humanos y de rata durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el extracto celular y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

5 Tabla 23B: Metabolitos de 2'-C-metil-guanosina observados en extractos de hepatocitos de mono después de la incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

Cy230a		Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con 2'-C-metil-guanosina 10 µM (% de la radiactividad total)		
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7
1	96,4	BLD ^b	BLD	3,63
8	77,3	BLD	2,82	19,9
24	65,0	BLD	8,41	26,6

Cy234		Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con 2'-C-metil-guanosina 10 µM (% de la radiactividad total)		
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7
1	86,9	2,19	2,19	8,70
4	57,9	BLD	6,51	35,6
8	45,8	3,32	7,90	43,0
24	29,0	5,03	14,1	51,8

Se incubaron hepatocitos de mono durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el extracto celular y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^aDebido a la disponibilidad limitada de células, no se realizó el muestreo a las 4 horas para el mono 1 (Cy230).

^bBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

Tabla 24: Metabolitos de 2'-C-metil-guanosina observados en extractos de hepatocitos de rata después de la incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

Rs448 Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con 2'-C-metil-guanosina 10 µM (% de la radiactividad total)				
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7
1	93,6	BLD ^a	1,24	5,21
4	78,6	BLD	3,54	17,9
8	69,2	BLD	4,76	24,1
24	51,5	2,56	10,4	35,6

Rs458 Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con 2'-C-metil-guanosina 10 µM (% de la radiactividad total)				
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7
1	94,5	BLD ^a	1,08	4,42
4	79,8	BLD	4,01	16,2
8	67,2	BLD	5,42	27,0
24	47,1	9,39	9,65	33,9

Se incubaron hepatocitos de rata durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el extracto celular y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

5 Tabla 25: Metabolitos de 2'-C-metil-guanosina observados en extractos de hepatocitos humanos y de rata después de la incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

Hu775 Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con 2'-C-metil-guanosina 1 µM (% de la radiactividad total)				
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7
1	94,6	BLD ^a	BLD	5,36
8	65,8	BLD	6,83	27,3
24	41,3	3,39	9,04	46,3

Rs458 Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con 2'-C-metil-guanosina 1 µM (% de la radiactividad total)				
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7
1	93,4	BLD ^a	1,50	4,56
8	68,7	BLD	5,14	26,1
24	49,2	6,83	9,88	34,1

Se incubaron hepatocitos humanos y de rata durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 1 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el extracto celular y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

Tabla 26: Metabolitos de Compuesto 1 en extractos celulares Huh7 después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1

Huh7	Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)					
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7	U9	Compuesto 1
24	BLD ^a	BLD	BLD	59,7	BLD	40,3
48	BLD	6,57	6,14	71,5	BLD	15,8
72	BLD	6,93	6,86	72,1	BLD	14,1

Huh7	Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con Compuesto 1 a 10 µM (% de la radiactividad total)					
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7	U9	Compuesto 1
24	BLD ^a	4,81	7,55	71,8	5,40	10,4
48	2,65	5,82	6,42	59,3	4,61	21,2
72	BLD	5,74	8,44	69,6	BLD	16,2

Se incubaron las células con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el extracto celular y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

Tabla 27: Metabolitos de 2'-C-metil-guanosina observados en extractos celulares Huh7 después de la incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

Huh7	Metabolitos mayores observados en extractos celulares después de incubación con 2'-C-metil-guanosina 10 µM (% de la radiactividad total)			
Tiempo (horas)	2'-C-metil-guanosina	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7
24	89,5	BLD ^a	BLD	10,5
48	89,3	BLD	3,56	7,18
72	89,6	BLD	BLD	10,4

Se incubaron las células con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de metabolitos en el extracto celular y se expresan en tanto por ciento (%) de la radiactividad total medida en la muestra.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

Tabla 28: Niveles de 2'-C-metil-guanosina-5'-trifosfato en hepatocitos primarios después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

Niveles de Compuesto 7 (pmol/millón de células) en hepatocitos humanos				
Tiempo (horas)	[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (10 µM)		[¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 µM)	
	Humano 1 (Hu759)	Humano 2 (Hu775)	Humano 1 (Hu759)	Humano 2 (Hu775)
0	0	0	0	0
1	9,70	18,5	24,0	54
4	51,0	86	166	216
8	96,0	149	225	366
24	214	215	360	564
AUC ^a	2871	3548	5759	9036
Niveles de Compuesto 7 (pmol/millón de células) en hepatocitos de mono ^b				
Tiempo (horas)	[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (10 µM)		[¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 µM)	
	Mono 1 (Cy230) ^b	Mono 2 (Cy234)	Mono 1 (Cy230) ^b	Mono 2 (Cy234)
0	0	0	0	0
1	2,87	4,00	180	22,0
4	-	29,0	-	183
8	14,58	39,0	895	476
24	6,85	57,0	344	552
AUC	241	956	13765	9861
Niveles de Compuesto 7 (pmol/millón de células) en hepatocitos de rata (n=2)				
Tiempo (horas)	[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (10 µM)		[¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 µM)	
	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)
0	0	0	0	0
1	28,0	23,0	580	534
4	141	113	1429	1347
8	258	239	1791	1618
24	347	319	937	770
AUC	5906	5384	31568	28123

Se incubaron los hepatocitos primarios durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de Compuesto 7 en los extractos celulares de hepatocitos humanos (n=2), de mono (n=2) y de rata (n=2) y se expresan en pmol/millón de células.

^aAUC = área bajo la curva de concentración-tiempo expresada como pmol*h/ millón de células

^bDebido a la disponibilidad limitada de células, no se realizó el muestreo a las 4 horas para el mono 1 (Cy230).

Tabla 29: Niveles de 2'-C-metil-guanosina-5'-trifosfato en hepatocitos primarios después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

Niveles de Compuesto 7 (pmol/millón de células)				
Hepatocitos humanos				
Tiempo (horas)	[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (1 μM)		[¹⁴ C]-Compuesto 1 (1 μM)	
	Humano 2 (Hu775)	Rata 2 (Rs458)	Humano 2 (Hu775)	Rata 2 (Rs458)
0	0	0	0	0
1	1,90	2,60	8,80	80,0
8	11,0	20,1	44,2	238
24	21,0	27,0	60,4	103
AUC ^a	302	458	1027	3881

Se incubaron los hepatocitos primarios durante 1, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 1 μM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de compuesto 7 en los extractos celulares de hepatocitos humanos (n=1) y de rata (n=1) y se expresan en pmol/millón de células.

^aAUC = área bajo la curva de concentración-tiempo expresada como pmol*h/ millón de células.

La confirmación de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina se realizó por digestión con fosfatasa alcalina. Los niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina, después de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 y con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina, se resumen de la Tabla 28 a la Tabla 34.

Tabla 30: Nucleótidos totales de 2'-C-metil-guanosina en hepatocitos primarios después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

Tiempo (horas)	[¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 μM)					
	Nucleótidos intracelulares totales (pmol/millón de células)					
	Humano (n=2)		Mono ^a (n=2)		Rata (n=2)	
0	0	0	0	0	0	0
1	31,0	71,4	231	39,8	735	691
4	202	272	-	242	1779	1761
8	295	443	1091	600	2181	2079
24	457	846	466	686	1191	1158

Tiempo (horas)	[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (10 μM)					
	Nucleótidos intracelulares totales (pmol/millón de células)					
	Humano (n=2)		Mono (n=2)		Rata (n=2)	
0	0	0	0	0	0	0
1	11,8	24,2	2,87	5,90	35,0	29,0
4	58,9	101	-	34,3	169	141
8	127	169	16,7	49,0	305	287
24	283	281	9,01	77,5	473	498

Tiempo (horas)	Nucleótidos intracelulares totales (pmol/millón de células)			
	[¹⁴ C]-Compuesto 1 (1 μM)		[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (1 μM)	
	Humano (n=1)	Rata (n=1)	Humano (n=1)	Rata (n=1)
0	0	0	0	0
1	12,6	106	1,90	3,45
8	54,0	290	13,7	24,0
24	77,4	144	26,5	40,4

Se incubaron los hepatocitos primarios durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 1 o 10 μM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles totales de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina (suma de MP, DP y TP) en los extractos celulares de hepatocitos humanos, de mono y de rata y se expresan en pmol/millón de células.

^aDebido a la disponibilidad limitada de células, no se realizó el muestreo a las 4 horas para el mono 1 (Cy230).

Tabla 31: Niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina en hepatocitos humanos después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 y con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

[¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 μM)	Compuesto 5		Compuesto 6		Compuesto 7	
Tiempo (horas)	pmol/millón de células					
0	0	0	0	0	0	0
1	4,00	10,3	3,00	7,10	24,0	54,0
4	15,0	17,1	21,0	38,4	166	216
8	25,0	21,9	45,0	55	225	366
24	28,0	121	69,0	161	360	564

[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (10 μM)	Compuesto 5		Compuesto 6		Compuesto 7	
Tiempo (horas)	pmol/millón de células					
0	0	0	0	0	0	0
1	BLD ^a	2,80	2,10	2,90	9,70	18,5
4	BLD	4,00	7,50	10,5	51,0	86,0
8	9,00	4,90	22,1	15,0	96,0	149
24	23,0	16,0	46,0	50,0	214	215

Se incubaron los hepatocitos humanos durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 μM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de nucleótidos en los extractos celulares de dos donadores (Hu759 y Hu775) y se expresan en pmol/millón de células.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

Tabla 32: Niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina en hepatocitos de mono después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 y con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

[¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 μM)	Compuesto 5		Compuesto 6		Compuesto 7	
Tiempo (horas)	pmol/millón de células					
	Mono 1 ^a (Cy230)	Mono 2 (Cy234)	Mono 1 (Cy230)	Mono 2 (Cy234)	Mono 1 (Cy230)	Mono 2 (Cy234)
0	0	0	0	0	0	0
1	23,9	11,7	26,3	6,10	180	22,0
4	-	14,3	-	44,5	-	183
8	42,5	33,0	153	91,0	895	476
24	33,2	23,2	88,4	111	344	552

[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (10 μM)	Compuesto 5		Compuesto 6		Compuesto 7	
Tiempo (horas)	pmol/millón de células					
	Mono 1 ^a (Cy230)	Mono 2 (Cy234)	Mono 1 (Cy230)	Mono 2 (Cy234)	Mono 1 (Cy230)	Mono 2 (Cy234)
0	0	0	0	0	0	0
1	BLD ^b	0,95	BLD	0,95	2,87	4,00
4	-	BLD	-	5,30	-	29,0
8	BLD	3,00	2,07	7,00	14,6	39,0
24	BLD	5,50	2,16	15,0	6,85	57,0

Se incubaron los hepatocitos de mono durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 μM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de nucleótidos en los extractos celulares de dos donadores (Cy230 y Cy234) y se expresan en pmol/millón de células.

^aDebido a la disponibilidad limitada de células, no se realizó el muestreo a las 4 horas para el mono 1 (Cy230).

^bBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

Tabla 33: Niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina en hepatocitos de rata después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 y con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

[¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 μM) Tiempo (horas)	Compuesto 5		Compuesto 6		Compuesto 7	
	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)
0	0	0	0	0	0	0
1	43,0	28,0	112	129	580	534
4	81,0	88,0	269	326	1429	1347
8	79,0	86,0	311	375	1791	1618
24	39,0	181	215	207	937	770

[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (10 μM) Tiempo (horas)	Compuesto 5		Compuesto 6		Compuesto 7	
	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)
0	0	0	0	0	0	0
1	BLD ^b	BLD	7,00	5,60	28,0	23,0
4	BLD	BLD	28,0	28,0	141	113
8	BLD	BLD	47,0	48,0	287	239
24	25,0	88,0	101	91,0	347	319

Se incubaron los hepatocitos de rata durante 1, 4, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 μM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de nucleótidos en los extractos celulares de dos donadores (Rs448 y Rs458) y se expresan en pmol/millón de células.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

Tabla 34: Niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina en hepatocitos humanos y de rata después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 y con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

[¹⁴ C]-Compuesto 1 (1 μM) Tiempo (horas)	Compuesto 5		Compuesto 6		Compuesto 7	
	Humano 2 (Hu775)	Rata 2 (Rs458)	Humano 2 (Hu775)	Rata 2 (Rs458)	Humano 2 (Hu775)	Rata 2 (Rs458)
0	BLD ^a	BLD	BLD	BLD	BLD	BLD
1	2,40	6,00	1,40	20,0	8,80	80,0
8	2,10	11,0	7,70	41,2	44,2	238
24	5,80	11,0	11,2	30,0	60,4	103

[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (1 μM) Tiempo (horas)	Compuesto 5		Compuesto 6		Compuesto 7	
	Humano 2 (Hu775)	Rata 2 (Rs458)	Humano 2 (Hu775)	Rata 2 (Rs458)	Humano 2 (Hu775)	Rata 2 (Rs458)
0	BLD	BLD	BLD	BLD	BLD	BLD
1	BLD	BLD	BLD	0,85	1,90	2,60
8	BLD	BLD	2,70	4,00	11,0	20,1
24	1,50	5,40	4,00	8,00	21,0	27,0

Se incubaron los hepatocitos humanos y de rata durante 1, 8 y 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 1 μM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de nucleótidos en los extractos celulares de dos donadores (Rs448 y Rs458) y se expresan en pmol/millón de células.

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

5 Después de 24 horas de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 en hepatocitos humanos el metabolito principal fue el Compuesto 7 (65 %), seguido por el Compuesto 6 (15,3 %) y 2'-C-metil-guanosina y Compuesto 5 con 9-10 % de la radiactividad total. Se detectó también Compuesto 1 (1,5 %) a las 24 horas. Se observaron los niveles máximos de Compuesto 7 de 296 pmol/millón de células (media de dos donadores) a las 24 horas. Debido a que no se realizó muestreo después de las 24 horas, no queda claro si los niveles de Compuesto 7 habrían continuado aumentando. La media del AUC_{0-24h} de Compuesto 7 en hepatocitos humanos (n=2) fue de 7.398 pmol*h/millón de células.

10 El Compuesto 7 fue también el principal metabolito intracelular en hepatocitos de mono (>70 %) y de rata (70-55 %) de 4-24 horas. No se detectó el Compuesto 1 después de 24 horas en ambas especies. En los hepatocitos de mono, el Compuesto 6 representó el 17 % mientras que la 2'-C-metil-guanosina y el Compuesto 5 representaron un 2-5 % de la radiactividad intracelular total a las 24 horas. La 2'-C-metil-guanosina y los compuestos 5 y 6 representaron el 8-16 % de la radiactividad total en los hepatocitos de rata a las 24 horas. El Compuesto 7 alcanzó los niveles máximos de 1.705 pmol/millón de células a las 8 horas en los hepatocitos de rata mientras que en los hepatocitos de mono, los niveles pico de 895 y 552 pmol/millón de células se alcanzaron a las 8 horas en un donador y a las 24 horas en el segundo. Para el Compuesto 7, los valores de AUC_{0-24h} fueron 11.813 y 29.846 pmol*h/millón de células en hepatocitos de mono y de rata, respectivamente.

20 Se evaluó también el metabolismo de [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina en hepatocitos primarios. El perfil metabólico de la [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina en hepatocitos primarios se resume de la Tabla 21 a la Tabla 25 y de la Tabla 28 a la Tabla 34. Los porcentajes de monofosfato, difosfato y trifosfato en hepatocitos humanos, de mono y de rata fueron 7-12 %, 17-20 % y 69-76 %, respectivamente. Los niveles de Compuesto 7 después de incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina fueron de 2,3 a 19,7 veces más bajos que después de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1. Se observaron los niveles máximos de Compuesto 7 de 215, 32 y 249 pmol/millón de células a las 24 horas en hepatocitos humanos, de mono y de rata, respectivamente.

25 [¹⁴C]-Compuesto 1 y [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a concentración 1 micromolar

30 Se observó una tendencia y un perfil metabólico similares con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 1 μM en hepatocitos de rata y humanos (Tabla 21, Tabla 29, Tabla 30 y Tabla 34); el [¹⁴C]-Compuesto 1 a 1 μM no se evaluó en hepatocitos de mono. El Compuesto 7 fue el principal metabolito en ambas especies, representando el 70-78 % de la radiactividad total a las 24 horas con niveles máximos de 60,4 y 103 pmol/millón de células en los hepatocitos humanos y de rata, respectivamente. Las AUC_{0-24h} para el Compuesto 7 fueron 3.881 y 1.027 pmol*h/millón de células para los hepatocitos de rata (n=1) y humanos (n=1), respectivamente. Estos valores son aproximadamente 8,8 y 7,2 veces

5 más bajos que los valores observados para el [¹⁴C]-Compuesto 1 a concentración 10 µM en los hepatocitos humanos y de rata, respectivamente. La [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a concentración 1 µM presentó un perfil similar al observado a la concentración 10 µM. Las AUC_{0-24h} para el Compuesto 7 después de la incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina 1 µM fueron 302 y 458 pmol*h/millón de células para los hepatocitos humanos (n=1) y de rata (n=1), respectivamente, 11,7 más bajas que la AUC observada con la 2'-C-metil-guanosina 10 µM. Estas observaciones sugieren que la formación de Compuesto 7 es dependiente de la dosis tanto para el Compuesto 1 como para la 2'-C-metil-guanosina en este intervalo de concentración.

Período de semidesintegración del [¹⁴C]-Compuesto 7 en hepatocitos humanos y de rata

10 La Tabla 35 y la Tabla 36 resumen la desintegración del Compuesto 7 en los hepatocitos humanos y de rata. Los niveles de Compuesto 7 a tiempo cero fueron 692 y 932 pmol/millón de células en hepatocitos humanos y de rata, respectivamente. Después de 24 horas sin [¹⁴C]-Compuesto 1, los niveles de Compuesto 7 bajaron a 273 (61 % de reducción) y a 83 (91 % de reducción) pmol/millón de células en hepatocitos humanos y de rata, respectivamente. El periodo de semidesintegración *in vitro* para el Compuesto 7 en los hepatocitos humanos fue de 17,4 horas, mientras que en los hepatocitos de rata fue de 6,61 horas.

15 Tabla 35: Desintegración del compuesto 7 en hepatocitos humanos después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 y con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina.

Tiempo (horas)	Compuesto 7 (pmol/millón de células)	
	[¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 µM)	[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (10 µM)
0	692	266
1	702	259
4	597	217
8	497	190
24	273	58,0
t _{1/2} (horas)	17,4	10,8

Se midió la desintegración del compuesto 7 después de 24 horas de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de Compuesto 7 en los extractos celulares de un donador (Hu775) y se expresan en pmol/millón de células. Se utilizó el análisis de regresión lineal (Microsoft Excel) para estimar el valor t_{1/2} intracelular *in vitro* para el Compuesto 7.

Tabla 36: Desintegración del compuesto 7 en hepatocitos de rata después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1.

Tiempo (horas)	[¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 µM) Compuesto 7 (pmol/millón de células)
0	932
1	954
4	811
8	545
24	83,0
t _{1/2} (horas)	6,61

Se midió la desintegración del Compuesto 7 después de 24 horas de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de compuesto 7 en los extractos celulares de un donador (Rs458) y se expresan en pmol/millón de células. Se utilizó el análisis de regresión lineal (Microsoft Excel) para estimar el valor t_{1/2} intracelular *in vitro* para el Compuesto 7.

20 Se determinó también el período de semidesintegración del Compuesto 7 *in vitro* después de incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina en hepatocitos humanos. Los niveles de Compuesto 7 a tiempo cero después de la incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina durante 24 horas fueron de 266 pmol/millón de células. Después de 24 horas sin [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina, los niveles de Compuesto 7 disminuyeron hasta 58 pmol/millón de células (78 % de reducción). El periodo de semidesintegración del Compuesto 7 *in vitro* después de incubación con 2'-C-metil-guanosina en hepatocitos humanos fue de 10,8 horas, casi la mitad del observado después del Compuesto 1,

Células Huh7

El perfil metabólico de [¹⁴C]-Compuesto 1 en células Huh7 se resume en la Tabla 26, Tabla 37 y Tabla 38. Los niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina después de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 y con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina se resumen en la Tabla 37 y en la Tabla 38.

- 5 Tabla 37: Niveles de trifosfato de 2'-C-metil-guanosina en células Huh7 después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

Tiempo (horas)	Niveles de compuesto 7 (pmol/millón de células)		
	[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (10 µM) (n=1)	[¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 µM) (n=2)	
	0	0	0
24	3,10	21,3	8,60
48	1,40	15,2	16,1
72	1,60	13,3	11,1
AUC ^a	120	1,020	726

Se incubaron las células con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de Compuesto 7 en extractos celulares de células Huh7 y se expresan en pmol/millón de células.

^a AUC = área bajo la curva concentración-tiempo expresada como pmol*h/millón de células

- Tabla 38: Niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina en células Huh7 después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 y con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina

[¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 µM)	Compuesto 5		Compuesto 6		Compuesto 7	
Tiempo (horas)	pmol/millón de células (n=2)					
0	0	0	0	0	0	0
24	BLD ^a	1,40	2,20	0	8,60	21,3
48	1,50	1,50	1,60	1,40	16,1	15,2
72	1,10	1,10	1,60	1,10	11,1	13,3
[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (10 µM)	Compuesto 5		Compuesto 6		Compuesto 7	
Tiempo (horas)	pmol/millón de células (n=1)					
0	BLD ^a		0		0	
24	BLD		BLD		3,10	
48	BLD		BLD		1,40	
72	BLD		BLD		1,60	

Se incubaron las células durante 24, 48 y 72 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de nucleótidos en los extractos celulares y se expresan en pmol/millón de células

^aBLD = por debajo del límite de detección (30 DPM)

- 10 El Compuesto 7 fue el principal metabolito (83-93 % de la radiactividad total) en células Huh7 hasta las 72 horas después de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1. Los niveles de Compuesto 7 en las células Huh7 fueron el 88 % más bajos que en los hepatocitos humanos. Los niveles máximos de Compuesto 7 de 16 pmol/millón de células tuvieron lugar a las 48 horas y el AUC_{0-72h} fue de 873 pmol*h/millón de células (n=2). Después de 72 horas de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1, el Compuesto 1 inmodificado representó el 15 % de la radiactividad total. Se observó un metabolito desconocido (U9) a las 24 y 48 horas en las células Huh7 (n=1) y parece que es único para Huh7 ya que
- 15 no se observó en los hepatocitos primarios.

Los niveles de Compuesto 7 fueron significativamente más bajos después de la incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina (de la Tabla 18 a la Tabla 38). Se observó una concentración máxima de 3 pmol/millón de células a las 24

horas y el AUC_{0-72h} fue de 120 pmol*h/millón de células (n=1), 7,3 veces más baja que con el [¹⁴C]-Compuesto 1. El Compuesto 7 fue el único metabolito intracelular observado.

Efecto de ribavirina y ritonavir en los niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina en hepatocitos primarios

5 La ribavirina es un análogo nucleósido actualmente en uso para el tratamiento de VHC y se evaluaron sus efectos sobre los niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina en hepatocitos humanos (n=1) y de rata (n=2) después de 24 horas. La Tabla 39 y la Tabla 40 resumen los niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina alcanzados después de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 10 µM o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 µM en presencia de ribavirina 5 µM.

10 Tabla 39: Niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina en hepatocitos humanos después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina en presencia o ausencia de ribavirina o ritonavir.

Tratamiento	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7	Nucleótidos totales
pmol/millón de células				
[¹⁴ C]-Compuesto 1 (10 µM)	Hu775	Hu775	Hu775	Hu775
Control	57,0	139	600	796
Ribavirina 5 µM	36,0	148	548	732
Ritonavir 1 µM	57,0	141	409	607
	Compuesto 5	Compuesto 6	Compuesto 7	Nucleótidos totales
pmol/millón de células				
[¹⁴ C]-2'-C-metil-guanosina (10 µM)	Hu775	Hu775	Hu775	Hu775
Control	24,0	46,0	243	313
Ribavirina 5 µM	14,0	38,0	151	203
Ritonavir 1 µM	23,0	71,0	217	311

Se incubaron hepatocitos humanos durante 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 µM en presencia o ausencia de ribavirina 5 µM o ritonavir 1 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de nucleótidos en extractos celulares de un donador (Hu775) y se expresan en pmol/millón de células.

Tabla 40: Niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina en hepatocitos de rata después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina en presencia o ausencia de ribavirina o ritonavir.

Tratamiento	Compuesto 5		Compuesto 6		Compuesto 7		Nucleótidos totales	
	pmol/millón de células							
[¹⁴ C]- Compuesto 1 (10 µM)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)
Control	75,0	91,0	382	314	1134	893	1591	1298
Ribavirina 5 µM	76,0	83,0	335	300	1087	977	1498	1360
Ritonavir 1 µM	96,0	116	364	411	1179	1235	1639	1762

Tratamiento	Compuesto 5		Compuesto 6		Compuesto 7		Nucleótidos totales	
	pmol/millón de células							
¹⁴ C-2'-C-metil- guanosina (10 µM)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)	Rata 1 (Rs448)	Rata 2 (Rs458)
Control	24,0	33,0	164	105	419	299	607	437
Ribavirina 5 µM	23,0	20,0	125	83,0	324	272	472	375
Ritonavir 1 µM	37,0	27,0	136	106	378	279	551	412

Se incubaron hepatocitos de rata durante 24 horas con [¹⁴C]-Compuesto 1 o con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina a 10 µM en presencia o ausencia de ribavirina 5 µM o ritonavir 1 µM como se describe en los procedimientos experimentales. Los valores representan los niveles de nucleótidos en extractos celulares de dos donadores (Rs448 y Rs458) y se expresan en pmol/millón de células.

5 Para el Compuesto 1, no se observó una diferencia importante con los niveles de control en los niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina en presencia de ribavirina en los hepatocitos humanos o de rata. Para la 2'-C-metil-guanosina, se observó un ligero descenso (17 %) en los niveles de trifosfato en los hepatocitos de rata mientras que se observó un descenso del 38 % en los hepatocitos humanos (n=1). Sin embargo, se necesitará una evaluación posterior para determinar si este efecto está verdaderamente relacionado con la inhibición de la fosforilación de la 2'-C-metil-guanosina por la ribavirina o es debido a la variabilidad del ensayo ya que se evaluó un
10 único donador.

Los estudios en microsomas descritos antes sugieren que la CYP3A puede desempeñar un papel en el metabolismo del Compuesto 1. En tales estudios, el ritonavir, un inhibidor de CYP3A, bloqueó el metabolismo del Compuesto 1 dependiente de NADPH en los microsomas hepáticos. Se evaluó el efecto de ritonavir 1 µM sobre el metabolismo y la subsiguiente formación de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina en hepatocitos humanos y de rata después de la incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 a 10 µM después de 24 horas y se resume en la Tabla 39 y en la Tabla 40. En los
15 hepatocitos humanos, el ritonavir disminuyó los niveles de Compuesto 7 en un 30 % en comparación con el control no tratado. Sin embargo, se necesitará una evaluación posterior para determinar si este efecto está verdaderamente relacionado con la inhibición del metabolismo catalizado por CYP450 o es debido a la variabilidad del ensayo. No se observó ninguna reducción en los niveles de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina en los hepatocitos de rata (n=2).

20 Conclusión

Como se demuestra en este estudio, el [¹⁴C]-Compuesto 1, sufre un extenso metabolismo *in vitro* en los hepatocitos primarios (rata>mono>humano), incluyendo la formación de nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina (Compuestos 5, 6 y 7).

25 En el medio de incubación, la 2'-C-metil-guanosina fue el principal metabolito observado en las tres especies. Los estudios en microsomas hepáticos del Ejemplo 14 identificaron cinco metabolitos mayores dependientes de NADPH (CYP), concretamente Compuesto 3 (3a y 3b), U1, U2 y U3. En el presente estudio, se detectaron U1 y U3 en las tres especies. Por contraste, no se detectó U2 en ninguna especie y el Compuesto 3 (3a y 3b) pareció que era un metabolito menor detectable solamente en los hepatocitos de rata y de mono. Se observó el Compuesto 5 en el medio de incubación, lo que sugiere que algo del metabolismo/desintegración del Compuesto 1 tiene lugar antes de
30 la penetración celular y puede contribuir a los niveles de 2'-C-metil-guanosina en el medio.

En extractos de hepatocitos primarios, el Compuesto 7 fue el metabolito predominante, representando el 60-81 % de la radiactividad intracelular total en las tres especies a las 4-24 horas. A las 24 horas, aparte de una pequeña

cantidad (1 %) de metabolito U1 en los hepatocitos de rata y de una pequeña cantidad (1-2 %) de Compuesto 1 inmodificado en los hepatocitos humanos, la 2'-C-metil-guanosina y sus nucleótidos representaron el total de la radiactividad intracelular.

5 Los nucleótidos de 2'-C-metil-guanosina son sustancialmente más altos después de la incubación de hepatocitos con [¹⁴C]-Compuesto 1 en comparación con la incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina. Esto fue particularmente cierto en los hepatocitos de mono en los que la fosforilación de 2'-C-metil-guanosina fue limitada después de la incubación con 2'-C-metil-guanosina. En las tres especies, los niveles del trifosfato activo, Compuesto 7, fueron de 2,3 a 19,7 veces más altos a partir del Compuesto 1 que a partir de la 2'-C-metil-guanosina. La formación de trifosfato pareció que era dependiente de la dosis y presentó una semi-vida *in vitro* de 17,4 y 6,61 horas en hepatocitos humanos y de rata, respectivamente. Además, el Compuesto 5 fue detectable en los hepatocitos primarios después de incubación con Compuesto 1 y los niveles fueron significativamente más altos que los observados con 2'-C-metil-guanosina, especialmente en hepatocitos de mono y de rata en los que el monofosfato fue indetectable o estaba en el límite de detección después de la incubación con 2'-C-metil-guanosina.

15 En contraste con los hepatocitos primarios, el metabolismo del Compuesto 1 incluyendo la formación de Compuesto 7, fue significativamente más bajo en las células Huh7, lo que sugiere que la ruta o rutas enzimáticas que llevan a la liberación de Compuesto 5 con subsiguiente fosforilación hasta trifosfato pueden ser más activas en los hepatocitos primarios que en la línea celular derivada del hepatoma humano. Sin embargo, los niveles de Compuesto 7 en las células Huh7 después de incubación con [¹⁴C]-Compuesto 1 son sustancialmente más altos que después de incubación con [¹⁴C]-2'-C-metil-guanosina.

20 Ejemplo 16

Estudio de metabolismo en la rata con Compuesto 1 radiomarcado

25 Se realizó un estudio preliminar de metabolismo en la rata con Compuesto 1 radiomarcado. Se marcó el compuesto con [¹⁴C] en la posición C-8 del resto guanina. Los objetivos del estudio fueron determinar, 1) la farmacocinética plasmática de la radiactividad total, 2) la evolución de la radiactividad total con el tiempo y la cantidad de 2'-C-metil-guanosina-5'-TP en el hígado, 3) la principal vía de excreción, y 4) el perfil metabólico en excreciones, hígado, y plasma.

Diseño del estudio

30 El [¹⁴C]-Compuesto 1 isotópicamente diluido se administró intravenosamente a ratas machos Sprague-Dawley a 50 mg/kg o por sonda oral a 100 mg/kg. El diseño del estudio y la recogida de muestras se resumen en las siguientes tablas:

Grupo Número	N	Vía	Nivel dosis objetivo (mg/kg)	Volumen dosis objetivo (mL/kg)	Conc. dosis objetivo (mg/mL)	Nivel de radiactividad objetivo (μCi/kg)	Tiempo de terminación (Horas)
1A (JVC/FVC)	4	IV	50	1	50	340	2
1B (JVC/FVC)	4	IV	50	1	50	340	6
1C (JVC/FVC)	4	IV	50	1	50	340	24
2A (JVC)	4	PO	100	1	100	340	2
2B (JVC)	4	PO	100	1	100	340	6
2C (JVC)	4	PO	100	1	100	340	24

FVC: vena femoral canulada

JVC: vena yugular canulada

Resumen de recogida de muestras

Grupo	Orina	Heces	Sangre/plasma	Hígado
1A (IV)	Pre-dosis, 0-1, 1-2 h	Pre-dosis, 0-2 h	15 min., 1, 2 h	2 h
1B (IV)	Pre-dosis, 0-1, 1-2, 2-6 h	Pre-dosis, 0-6 h	Pre-dosis, 45 min., 4, 6 h	6 h
1C (IV)	Pre-dosis, 0-1, 1-2, 2-6, 6-24 h	Pre-dosis, 0-6, 6-24 h	5, 30 min., 10, 24 h	24 h
2A (PO)	Pre-dosis, 0-1, 1-2 h	Pre-dosis, 0-2 h	15 min., 1, 2 h	2 h
2B (PO)	Pre-dosis, 0-1, 1-2, 2-6 h	Pre-dosis, 0-6 h	Pre-dosis, 45 min., 4, 6 h	6 h
2C (PO)	Pre-dosis, 0-1, 1-2, 2-6, 6-24 h	Pre-dosis, 0-6, 6-24 h	5, 30 min., 10, 24 h	24 h

El Compuesto 1 [guanil-8-¹⁴C] se obtuvo de Moravek Biochemicals, Inc, Brea, CA y tenía las siguientes especificaciones:

Identidad	Compuesto 1 [guanil-8- ¹⁴ C]-
Pureza radioquímica	98,4 % (como isómeros)
Actividad específica	54,8 mCi/mmol
Número de lote	448-108-0548
Peso molecular	628,4 g/mol
Proveedor	Moravek Biochemicals, Inc, Brea, CA

5 El Compuesto 1 se preparó siguiendo los procedimientos descritos previamente o modificaciones rutinarias de los mismos y tenía las siguientes especificaciones:

Identidad	Compuesto 1
Pureza HPLC	98,9 % por el área del pico a 254 nm
Número de lote	JW-210-112-01
Peso molecular	626,619 g/mol
Proveedor	Idenix Pharmaceuticals

Los compuestos de referencia 2'-C-metil-guanosina, Compuesto 2, Compuesto 3, Compuesto 4, Compuesto 5 (2'-C-metil-guanosina-5'-MP), Compuesto 7 (2'-C-metil-guanosina-5'-TP), Compuesto 6 (2'-C-metil-guanosina-5'-DP, presente en el Compuesto 7) se prepararon siguiendo los procedimientos descritos en esta memoria o modificaciones rutinarias de los mismos.

10 Todos los compuestos químicos utilizados para el estudio eran de grado reactivo o superior. Los disolventes eran de grado HPLC y se obtuvieron de Burdick and Johnson.

Procedimientos analíticos

Conteo por centelleo líquido (LSC)

15 Se cuantificó la radiactividad en todas las muestras mediante conteo por centelleo líquido (LSC). Se utilizó un contador de centelleo líquido multipropósito Beckman Coulter LS6500 (Beckman Instruments, Fullerton, CA) para el LSC. Las muestras se igualaron en volumen y se analizaron por duplicado. Se añadió un cóctel de centelleo líquido EcoLite™ (MP, Irvine, CA) a cada muestra líquida.

Cromatografía de líquidos de alta resolución

20 Para análisis por HPLC, se detectó la radiactividad en el eluato utilizando un monitor de radiactividad que empleaba una cubeta de centelleo líquido como se indica más adelante. Los porcentajes de radiactividad en los componentes separados se cuantificaron integrando los picos utilizando el software ProFSA. Los análisis por HPLC se llevaron a cabo utilizando los sistemas y condiciones listados a continuación.

Sistema 1: Agilent 1100 Series

- Muestreador automático de placa de pocillos
- 25 • Termostato para el muestreador 1100
- Detector de fotodiodos en serie
- Compartimento de columna termoestabilizado
- Bomba cuaternaria
- Desgasificador a vacío
- 30 • Chemstation para LC3 D Versión A.10.02 (1757) (Agilent Technologies, Inc., DE)
- Analizador de centelleo de flujo Radiomatic™ 625TR
- Software ProFSA (Perkin Elmer Life Sciences, MA)

Este sistema se utilizó para el análisis de formulaciones de dosis y para el perfil de metabolitos en orina, heces y plasma.

Sistema 2: Agilent 1100 Series

- Muestreador automático de placa de pocillos
- Termostato para el muestreador 1100
- Detector de fotodiodos en serie
- 5 • Compartimento de columna termoestabilizado
- Bomba cuaternaria
- Desgasificador a vacío
- Chemstation para LC3 D Version B.01.01 (164) (Agilent Technologies, Inc., DE)
- Analizador de centelleo de flujo Radiomatic™ 625TR
- 10 • Software Flo-One™ (Perkin Elmer Life Sciences, MA)

Este sistema se utilizó para el análisis de extractos hepáticos.

Condiciones cromatográficas:

Método 1

- Columna: Phenomenex® Luna 5 µ C18 (2), 4,6 x 250 mm (Phenomenex USA, Torrance, CA)
- 15 • Guarda columna: Security Guard Cartridge, Polar RP 4 x 2 mm (Phenomenex USA, Torrance, CA)
- Temperatura de la columna: 35 °C
- Detección UV: 252 nm
- Detección de radiactividad: cubeta de 500 µL de líquido, cóctel de centelleo de flujo (Ultima Flow-AP, Perkin Elmer Life Sciences, CT) a 4,5 mL/min.

Condiciones de gradiente de HPLC - Método 1			
Tiempo (min)	% de A	% de B	Caudal (mL/min)
0	100	0	1,5
4	100	0	1,5
10	85	15	1,5
12	75	25	1,5
17	70	30	1,5
28	25	75	1,5
33	10	90	1,5
34	10	90	1,5
35	100	0	1,5

A = formiato de amonio 20 mM en agua

B = formiato de amonio 10 mM en metanol-agua (90:10)

- 20 Este método se utilizó para analizar alícuotas de la formulación predosis y postdosis, y para realizar el perfil por HPLC de muestras de orina, extractos de heces, y plasma.

Método 2

- Columna: Phenomenex® Columbus 5 µ C-18, 4,6 x 250 mm (Phenomenex USA, Torrance, CA)
- Guarda columna: Security Guard Cartridge, 4 x 2 mm (Phenomenex USA, Torrance, CA)
- 25 • Temperatura de la columna: ambiente
- Detección UV: 252 nm

- Detección de radiactividad: cubeta de 500 μL de líquido, cóctel de centelleo de flujo (Ultima Flow-AP, Perkin Elmer Life Sciences, CT) a 3 mL/min.

Tiempo (min)	Condiciones de gradiente de HPLC - Método 2		Caudal (mL/min)
	% de A	% de B	
0	95	5	1,0
15	70	30	1,0
20	70	30	1,0
30	50	50	1,0
50	50	50	1,0

A = fosfato de potasio 25 mM + dihidrogenofosfato de tetrabutilamonio 5 mM pH 6,3
B = Metanol

Este método se utilizó para analizar los extractos hepáticos.

- 5 La Figura 4 proporciona un cromatograma de HPLC representativo de una mezcla de patrones de referencia y Compuesto 1 (diastereoisómeros 1 y 2) obtenido por el método 2,

Preparación y análisis de las muestras

Las muestras de hígado y de plasma se conservaron en un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y todas las otras muestras se conservaron en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Formulaciones de dosis para pureza radioquímica

- 10 Se prepararon dos formulaciones de dosis (50 mg/mL para los Grupos 1A-C de dosis IV y 100 mg/mL para los Grupos 2A-C de dosis PO) en PEG 200 que contenía DMSO al 5 %. Se separaron submuestras de las formulaciones de dosis antes y después de la administración de la dosis. Se diluyó una alícuota (10 μL) de cada submuestra añadiendo metanol (490 μL) y formiato de amonio 20 mM en agua (1500 μL). Se analizaron las formulaciones de dosis diluidas para determinación de la pureza radioquímica por el método 1 de HPLC.

15 Orina

- Se prepararon muestras de orina reunidas para los Grupos 1C y 2C mezclando un porcentaje fijo del volumen total para los cuatro animales a partir de los puntos de tiempo seleccionados. Para el Grupo 1C, se reunieron muestras de los intervalos de recogida de 1, 2, 6, y 24 h. Para el Grupo 2C, se preparó un conjunto de muestras de los cuatro animales para los intervalos de recogida de 24 h solamente. Para los intervalos de recogida de 1, 2, y 6 h, se utilizó una muestra de orina de un único animal del Grupo 2A o 2B para el análisis. Todas las muestras se pusieron a temperatura ambiente y se mezclaron brevemente en vórtice. Se diluyeron las muestras cuando fue necesario (de 2 a 20 veces) con una fase móvil acuosa apropiada para el método de HPLC seleccionado. Las muestras reunidas y diluidas del intervalo de recogida de 24 h se centrifugaron a 2040 x g durante 10 minutos. Todas las otras muestras se analizaron sin centrifugación. Se utilizó el método 1 de HPLC para la determinación por HPLC. Se analizaron 25 muestras seleccionadas por el método 2 de HPLC para comparación con el perfil de metabolitos generado por las incubaciones microsómicas y de hepatocitos (Ejemplos 14 y 15) y con el perfil de metabolitos de los extractos hepáticos.

Heces

- 30 Se prepararon muestras reunidas para el intervalo de tiempo de 24 h de los Grupos 1C y 2C combinando un porcentaje fijo del peso total de cada homogenato de muestra de un animal individual para cada grupo. Se reunieron las alícuotas en un tubo de centrifuga de polipropileno de 15 mL. Al conjunto de muestras (aproximadamente 3 g de cada una), se añadieron 4,5 mL de MeOH-agua (70:30). Se agitó la muestra con vórtice durante un minuto, se sonicó durante 10 minutos, y después se centrifugó a 5700 x g durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo y se midió el volumen total del sobrenadante. Se repitió el procedimiento de extracción dos veces más. Se 35 determinó la radiactividad en cada extracto por conteo por centelleo líquido de alícuotas duplicadas (20 μL de cada una) para la recuperación por extracción. Se agrupó una porción (10 % del volumen total) de cada extracto para el análisis por LSC y HPLC. Los extractos reunidos se diluyeron (1:4) con fase móvil acuosa y se analizaron utilizando el método 1 de HPLC para obtener el perfil metabólico. Para comparar los datos de metabolismo *in vitro* con los datos *in vivo*, se analizaron estas mismas muestras fecales por el método 2 de HPLC.

40 Extracción plasmática para análisis de HPLC

Se prepararon conjuntos de muestras de plasma de rata terminales para el Grupo 1A, Grupo 1C, y Grupos 2A-C. Se prepararon los conjuntos combinando 1 mL de plasma de cada uno de los cuatro animales. Se transfirieron

submuestras (2 mL cada una) del conjunto de muestras a tubos de centrifuga cónicos de 15 mL para la extracción. Se añadieron a cada submuestra, 6 mL de metanol y se agito cada mezcla en vórtice vigorosamente y después se centrifugó a 5700 x g durante 15 minutos. Se transfirió el sobrenadante (extracto 1) a un tubo de 15 mL. Se extrajeron después los sedimentos con metanol (2 mL). Se agitó cada muestra en vórtice vigorosamente para asegurar la mezcla. Se centrifugaron las muestras como se ha descrito antes. Se separó el sobrenadante (extracto 2). Se registró el volumen total de cada extracto. Se reunieron submuestras proporcionales de los extractos 1 y 2 de cada conjunto de muestra de plasma, se concentraron en un SpeedVac a temperatura ambiente, y se reconstituyeron añadiendo metanol (50 µL) y la fase móvil acuosa del método 1 de HPLC hasta un volumen total de 500 µL para cada muestra. Se preparó el conjunto de plasma terminal del Grupo 1 B y se extrajo similarmente con la excepción del volumen del conjunto de muestras (3,8 mL) y de los volúmenes de extracción (11,4 mL y 4 mL para la primera y segunda extracción, respectivamente). Se analizaron todos los extractos y los extractos reconstituidos por LSC. Los extractos reconstituidos que contenían suficiente radiactividad se analizaron por HPLC.

Extracción de hígado para análisis de HPLC

Se prepararon homogenatos sobre hielo seco en 70 % de metanol-30 % de agua que contenía EDTA 20 mM y EGTA 20 mM (aproximadamente 1x (p/v) el peso del hígado) y se conservaron congelados. Se prepararon conjuntos de muestras de hígado para todos los grupos combinando un porcentaje fijo del peso total de cada homogenato de muestra de cada animal individual para cada grupo. Cada conjunto de homogenatos de hígado (3,77-5,02 g) se puso en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL y se añadieron 16,0 mL de metanol:agua (70:30). Se agitó la muestra en vórtice durante un minuto, y después se centrifugó a 11200 x g durante 20 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo y se midió el volumen total. Se repitió el procedimiento de extracción tres veces más. Se determinó la radiactividad de cada sobrenadante por LSC de alícuotas duplicadas (100 µL cada una) para recuperación por extracción. Se tomaron submuestras de los cuatro extractos de cada muestra para formar un conjunto proporcionado. Para el Grupo 1, se reunieron las submuestras antes de la concentración y, para el Grupo 2, se concentró cada submuestra por separado y después se juntaron debido a los grandes volúmenes implicados. Se secó cada extracto completamente o se redujo hasta aproximadamente 100 µL. Se realizó la reconstitución con metanol (20 µL) y suficiente volumen de la fase móvil acuosa del método 2 de HPLC de tal modo que el volumen total de cada muestra reconstituida fue de 500 µL. Se analizaron alícuotas duplicadas de las muestras reconstituidas por LSC. Se analizó cada muestra por el método 2 de HPLC.

Cálculos de los µg equivalentes/g y del tanto por ciento de la dosis administrada

Tanto por ciento de la dosis administrada (% de AD) para el fármaco parental y para cada metabolito en cada período de recogida = (% de la radiactividad total de la muestra atribuida al metabolito) * (radiactividad total expresada como % de la dosis administrada, recuperada durante el correspondiente período de recogida).

Para estos cálculos no se hizo ninguna corrección para la recuperación por extracción.

Microgramos equivalentes/g para el fármaco parental o el metabolito en cada período de recogida = (% de la radiactividad para cada metabolito) * (µg equivalentes totales/g durante el correspondiente período de recogida).

Cálculos de los parámetros farmacocinéticos

Se analizaron los datos de concentración-tiempo en plasma para la radiactividad total utilizando Excel 2003 de Microsoft® Office para obtener el área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC). Se calculó el AUC₀₋₂₄ (área bajo la curva concentración-tiempo de 0 a 24 h después de la administración) utilizando la regla del trapecio para funciones lineales y tiempos de muestreo nominales. Para el grupo de dosis IV, se extrapoló la concentración a tiempo cero de los datos de concentración para los dos primeros puntos de tiempo. Las concentraciones plasmáticas máximas (pico) (C_{max}) y el tiempo para las concentraciones pico (t_{max}) fueron los valores observados. La estadística descriptiva se preparó en Excel.

Cifras significativas y redondeo de los números

No se aplicó ninguna regla general para las cifras significativas. Debido a la metodología analítica general utilizada en el estudio, los valores presentados con más cifras significativas no implican que estos valores sean más precisos. Para la entrada en un programa de hoja de cálculo o calculadora, los valores obtenidos instrumentalmente se introdujeron tal como se obtuvieron con la excepción del conteo por centelleo líquido (LSC) en el que se utilizaron números enteros redondeados. Los datos de las tablas se muestran como números redondeados.

Análisis de dosis y administración de dosis

Análisis de formulaciones de dosis

Se prepararon dos formulaciones de dosis (50 mg/kg para los Grupos 1A-C de dosis IV, y 100 mg/kg para los Grupos 2A-C de dosis PO) por el siguiente procedimiento. Se prepararon ambas formulaciones en PEG 200 que contenía DMSO al 5 %. Se pesó la cantidad necesaria de material radioactivo y se pulverizó hasta un polvo fino con una espátula. El 30 % del volumen final de PEG 200 y el artículo de ensayo pesado se añadieron a un vial de

formulación mientras se agitaba con agitación magnética para obtener una formulación uniforme. El volumen final se completó con PEG 200. Se sonicó la formulación a temperatura ambiente durante 15 minutos o más tiempo para obtener una suspensión homogénea. Se continuaron los ciclos de sonicación/agitación hasta que la formulación fue homogénea. Se separaron alícuotas por triplicado para determinación de homogeneidad (CV). Se determinó la concentración de radiactividad de la formulación y se calculó la actividad específica.

5

Se analizaron las alícuotas de dosis por el método 1 de HPLC después de diluir 10 µL de cada formulación con 490 µL de metanol y 1,5 mL de la fase móvil acuosa.

La pureza radioquímica del artículo de ensayo en las formulaciones de dosis antes y después de la administración se muestra en la siguiente tabla:

10 Tabla 41. Pureza radioquímica del artículo de ensayo en las formulaciones de dosis

Grupo de dosis	Pureza radioquímica ¹	
	Predosis	Postdosis
1A-C	99,0 %	99,1 %
2A-C	98,6 %	98,9 %

¹Determinada como el total de dos isómeros.

Los datos indicaron que las formulaciones de dosis eran estables durante el tiempo de administración de la dosis.

Administración de la dosis

Los niveles de la dosis objetivo para los Grupos 1 y 2 fueron 50 mg/kg (IV) y 100 mg/kg (PO), respectivamente. El promedio de los datos de dosis se resume en la tabla:

15 Tabla 42. Promedio de los datos de administración de la dosis

Grupo	µCi/Kg	mg/kg
1A	270 (±4)	50,3 (±0,7)
1B	267 (±2)	49,7 (±0,4)
1C	269 (±3)	50,1 (±0,6)
2A	254 (±4)	100 (±2)
2B	254 (±3)	99,7 (±1,2)
2C	253 (±2)	99,5 (±0,6)

Farmacocinética

Farmacocinética de la radiactividad total

20 Se llevaron a cabo radioanálisis de muestras de plasma. Los datos de concentración plasmática para la radiactividad total expresada como µg equivalentes/mL se resumen a continuación:

ES 2 458 358 T3

Concentraciones de radiactividad total en plasma después de la administración IV de [¹⁴C]-Compuesto 1 a las ratas del grupo 1 con una dosis objetivo de 50 mg/kg

Grupo 1A	Tiempo	µg equivalentes/mL					
	horas	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media	SD
	0,25	10,883	9,006	7,913	8,978	9,195	1,235
	1	1,371	1,358	1,600	1,267	1,399	0,142
	2	2,202	1,861	2,545	2,092	2,175	0,285

Grupo 1B	Tiempo	µg equivalentes/mL					
	horas	Rata 5	Rata 6	Rata 7	Rata 8	Media	SD
	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,75	1,576	1,600	1,710	2,454	1,835	0,417
	4	0,755	0,713	0,938	0,790	0,799	0,098
	6	2,376	2,233	2,160	3,837	2,652	0,795

Grupo 1C	Tiempo	µg equivalentes/mL					
	horas	Rata 9	Rata 10	Rata 11	Rata 12	Media	SD
	0,083	50,653	45,178	35,246	37,600	43,692	7,067
	0,5	4,824	4,036	4,072	3,857	4,311	0,428
	10	0,566	0,675	0,573	0,562	0,605	0,054
	24	0,515	0,759	0,553	0,453	0,570	0,133

5 Concentraciones de radiactividad total en plasma después de la administración PO de [¹⁴C]-Compuesto 1 a las ratas del grupo 2 con una dosis objetivo de 100 mg/kg

Grupo 2A	Tiempo	µg equivalentes/mL					
	horas	Rata 13	Rata 14	Rata 15	Rata 16	Media	SD
	0,25	0,216	0,433	0,474	0,260	0,346	0,127
	1	0,305	0,439	0,470	0,401	0,404	0,072
	2	0,634	0,877	1,086	0,879	0,869	0,185

Grupo 2B	Tiempo	µg equivalentes/mL					
	horas	Rata 17	Rata 18	Rata 19	Rata 20	Media	SD
	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,75	0,346	0,327	0,331	0,256	0,315	0,040
	4	0,578	0,618	0,675	0,630	0,625	0,040
	6	1,157	1,163	1,522	1,480	1,331	0,198

Grupo 2C	Tiempo	µg equivalentes/mL					
	horas	Rata 21	Rata 22	Rata 23	Rata 24	Media	SD
	0,083	0,228	0,394	0,228	0,596	0,283	0,175
	0,5	0,236	0,335	0,378	0,408	0,316	0,075
	10	0,806	0,555	0,506	0,511	0,622	0,143
	24	0,450	0,303	0,458	0,384	0,399	0,072

Media (SD) de las concentraciones de radiactividad total en plasma después de la administración IV de [¹⁴C]-Compuesto 1 a las ratas del grupo 1 con una dosis objetivo de 50 mg/kg y después de la administración PO a las ratas del grupo 2 con una dosis objetivo de 100 mg/kg

Concentración plasmática (μg equivalentes/ mL)				
Tiempo horas	IV		PO	
	Media	SD	Media	SD
0	0,000	0,000	0,000	0,000
0,0833	43,692	7,067	0,283	0,175
0,25	9,195	1,235	0,346	0,127
0,5	4,311	0,428	0,316	0,075
0,75	1,835	0,417	0,315	0,040
1	1,399	0,142	0,404	0,072
2	2,175	0,285	0,869	0,185
4	0,799	0,098	0,625	0,040
6	2,652	0,795	1,331	0,198
10	0,605	0,054	0,622	0,143
24	0,570	0,133	0,399	0,072
AUC₀₋₂₄ (μg equivalentes-h/ mL)				
	36,000		15,445	

5 Para el grupo de dosis IV, la concentración de la radiactividad total disminuyó rápidamente en 1 h y después aumentó de nuevo a las 2 h. Después de disminuir a las 4 h, se observó un aumento secundario en la concentración a las 6 h. Similarmente, se observaron concentraciones elevadas a las 2 y 6 h para los grupos de dosis PO. Este modelo es indicativo de recirculación enterohepática y reabsorción de radiactividad.

Se calcularon los valores de AUC a partir del promedio de los datos de concentración para cada grupo de dosis. Se calculó la concentración a tiempo cero (C_0) a partir de las concentraciones en los puntos de tiempo de 0,08 h y 0,25 h por extrapolación. Los valores de AUC₀₋₂₄ fueron 36,0 y 15,4 h· μg equivalentes/mL para los grupos de dosis IV y PO, respectivamente. La absorción de radiactividad total normalizada a la dosis fue aproximadamente 22 %.

10 Las concentraciones plasmáticas de Compuesto 1 y 2'-C-metil-guanosina se determinan por LC-MS.

Radiactividad total en el hígado

15 Se recogieron muestras de hígado a las 2, 6 y 24 h postdosis de los animales de ambos grupos, de dosis IV y de dosis PO. Se congelaron las muestras rápidamente después de la extirpación y se mantuvieron en hielo seco durante la homogenización. Se realizó la homogenización sobre hielo seco en 70 % de metanol-30 % de agua que contenía EDTA 20 mM y EGTA 20 mM (aproximadamente 1x (w/v) de peso del hígado). Se sometieron a combustión alícuotas pesadas por triplicado (aproximadamente 500 mg) en el Packard Sample Oxidizer y se siguieron por análisis de LSC para determinar la radiactividad 9100 μL Spec-Chec®). El promedio de los datos de los niveles de radiactividad total en hígado se resumen a continuación.

Tabla 43

Grupo	Radiactividad total como % de AD ¹	Concentración de radiactividad total como μg equivalentes/gramo
1A	15,5 \pm 0,7	206 \pm 24
1B	10,1 \pm 1,0	137 \pm 12
1C	1,76 \pm 0,11	23,2 \pm 3,1
2A	0,20 \pm 0,04	5,09 \pm 0,78
2B	0,37 \pm 0,05	10,3 \pm 1,2
2C	0,17 \pm 0,03	4,08 \pm 1,10

¹AD = Dosis administrada

20 Los datos para el grupo de dosis IV sugieren que la extracción hepática del fármaco tuvo lugar muy pronto (antes de las 2 h de dosis) y fue muy eficiente.

Excreción de la dosis administrada

Se analizaron la orina y las heces de cada animal para el contenido radiomarcado. Los datos como suma de la excreción urinaria y fecal se resumen a continuación:

Tabla 44

Nivel de dosis (mg/kg)	Tiempo de terminación (h)	Excreción urinaria + fecal (%.AD) [†]
1A	2	26,0 ± 2,3
1B	6	27,8 ± 4,9
1C	24	86,0 ± 4,8
2A	2	0,05 ± 0,06
2B	6	0,36 ± 0,18
2C	24	94,1±8,9

[†] Promedio de los datos de cuatro animales y suma de todos los puntos de tiempo de recogida

- 5 Los datos de excreción urinaria para todos los grupos de dosis se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 45

Nivel de dosis (mg/kg)	Tiempo de terminación (h)	Excreción urinaria (%.AD) [†]
1A	2	25,9 ± 2,4
1B	6	27,7 ± 4,9
1C	24	46,9 ± 4,1
2A	2	0,05 ± 0,06
2B	6	0,36 ± 0,18
2C	24	2,84 ± 0,82

[†] Promedio de los datos de cuatro animales y suma de todos los puntos de tiempo de recogida

- 10 La baja excreción urinaria de radiactividad en el grupo de dosis oral indicó una baja absorción y esta observación es concordante con los datos farmacocinéticos.

Los datos de excreción fecal se resumen a continuación:

Tabla 46

Nivel de dosis (mg/kg)	Tiempo de terminación (h)	Excreción fecal (%.AD) [†]
1A	2	0,05 ± 0,08
1B	6	0,13 ± 0,12
1C	24	39,0 ± 4,0
2A	2	0,001 ± 0,001
2B	6	0,006 ± 0,005
2C	24	91,3 ± 8,7

[†] Promedio de los datos de cuatro animales y suma de todos los puntos de tiempo de recogida

- 15 Los datos para el Grupo 1C sugieren una extensa secreción biliar, ya que el 39 % de la dosis IV fue recuperado en las heces. Para el grupo de dosis oral, la excreción fecal fue la principal vía de eliminación. Aproximadamente 91 % de la radiactividad total administrada se eliminó por las heces. La cantidad de la dosis administrada oralmente recuperada en la orina y en las heces no se puede usar para estimar la extensión de la absorción ya que la secreción biliar representa una vía de eliminación importante.

- 20 Cuantificación y distribución de metabolitos

Se prepararon extractos de orina, heces, plasma e hígado para análisis por HPLC con detección radioquímica como se ha descrito antes. Las recuperaciones por extracción con disolvente para los extractos de heces, hígado y plasma se presentan en la Tabla 47. Los tiempos de retención de patrones de referencia analizados por el método 1 y el método 2 de HPLC se dan en la Tabla 48.

Tabla 47

Muestra	Recuperación por extracción
Heces (Grupo 1 C, 24 h)	109,3 %
Heces (Grupo 2C, 24 h)	96,7 %
Hígado (Grupo 1A, 2 h)	96,5 %
Hígado (Grupo 1B, 6 h)	103,7 %
Hígado (Grupo 1C, 24 h)	82,1 %
Hígado (Grupo 2A, 2 h)	83,3 %
Hígado (Grupo 2B, 6 h)	93,1 %
Hígado (Grupo 2C, 24 h)	71,4 %
Plasma terminal (Grupo 1A, 2 h)	86,6 %
Plasma terminal (Grupo 1B, 6 h)	77,8 %
Plasma terminal (Grupo 1C, 24 h)	87,5 %
Plasma terminal (Grupo 2A, 2 h)	52,5 %
Plasma terminal (Grupo 2B, 6 h)	59,1 %
Plasma terminal (Grupo 2C, 24 h)	34,9 %

Tabla 48: Tiempos de retención (minutos) de HPLC típicos de los patrones de referencia

Patrones de referencia	HPLC Método 1	HPLC Método 2
Compuesto 1	28,6 y 28,3	45,2 y 42,3
Compuesto 3 (diastereoisómero 1 y diastereoisómero 2)	22,7 y 21,6	24,3 y 27,2
Compuesto 2	20,4	31,6
Compuesto 4	19,5	30,1
2'-C-metil-guanosina	11,3	9,4
Compuesto 7	na ¹	25,9
Compuesto 6	na	22,6
Compuesto 5	na	16,2

¹na = no aplicable

Metabolitos urinarios

Los análisis por HPLC de las muestras de orina reunidas de todos los puntos de tiempo se llevaron a cabo para el Grupo 1C. Los datos, expresados como porcentaje de distribución del área de picos de HPLC y como porcentaje de la dosis administrada, se resumen en la Tabla 49. Los metabolitos R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8 se caracterizaron en base al tiempo de retención.

Tabla 49: Perfil metabólico: orina del grupo 1C (Dosis IV)

Tiempo de recogida		1 h ¹	2 h ¹	6 h ¹	24 h ¹	Total					
Porcentaje de AD (Media)		22,9	5,11	2,33	16,6	46,9					
Compuesto	Tiempo de retención (Minutos)	% HPLC ²	% AD	% HPLC	% AD	% HPLC	% AD	% HPLC	% AD	% HPLC	% de excreción urinaria total
Comp. 1	28,6 y										
	28,3	93,5	21,39	48,9	2,50	30,5	0,71	9,09	1,51	26,1	55,6
U3 ³	26,5	nd ⁴	nd	0,24	0,01	nd	nd	nd	nd	0,01	0,03
U1 ³	25,2	nd	nd	0,18	0,01	nd	nd	nd	nd	0,01	0,02
Comp. 3 diastereo-isómero 1	22,7	0,24	0,05	1,01	0,05	0,37	0,01	nd	nd	0,12	0,25
Comp. 3 diastereo-isómero 2	21,6	1,00	0,23	2,69	0,14	1,19	0,03	nd	nd	0,39	0,84
Comp. 2	20,4	2,29	0,52	2,57	0,13	1,40	0,03	0,45	0,07	0,76	1,62
R8	17,1	nd	nd	0,95	0,05	0,52	0,01	nd	nd	0,06	0,13
R7	13,1	nd	nd	0,59	0,03	0,68	0,02	0,63	0,10	0,15	0,32
R6	12,4	nd	nd	1,01	0,05	0,90	0,02	nd	nd	0,07	0,15
2'-C-metil-guanosina	11,3	2,12	0,48	35,1	1,79	57,7	1,35	86,7	14,4	18,0	38,4
R5	10,9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R4	9,4	nd	nd	1,03	0,05	0,91	0,02	nd	nd	0,07	0,16
R3	8,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R2	6,2	nd	nd	0,58	0,03	0,94	0,02	nd	nd	0,05	0,11
R1	2,1	0,83	0,19	5,12	0,26	4,90	0,11	3,09	0,51	1,08	2,30
Total		100	22,9	100	5,11	100	2,33	100	16,6	46,9	100

¹El conjunto de orina de todos los animales del Grupo1C se preparó por mezcla proporcional en volumen.

²Tanto por ciento HPLC = Abundancia de cada metabolito expresada como tanto por ciento del área de picos de HPLC en el extracto de la muestra.

³ Metabolito observado *in vitro* en el Ejemplo 15

⁴nd = no detectado

5 Todas las muestras de orina se analizaron también por el método 2 de HPLC. Se utilizó este método para los experimentos de metabolismo *in vitro* descritos antes y para el análisis de extractos de hígado. Este método proporcionó también datos adicionales para la identificación de metabolitos mediante la comparación del tiempo de retención con patrones de referencia.

10 Para el grupo de dosis PO, se analizó un conjunto de muestras de orina del tiempo de recogida de 24 h. Para los tiempos de recogida de 1, 2, y 6 h, la mayoría de las muestras habían sido usadas para radioanálisis. Las muestras restantes fueron insuficientes para que fueran reunidas proporcionalmente. Por lo tanto, se utilizaron muestras de animales individuales de los grupos 1A o 1B para el análisis de HPLC. Los datos, como porcentaje de distribución de HPLC y como porcentaje de la dosis administrada, se resumen en la Tabla 50. Los metabolitos R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8 se caracterizaron en base al tiempo de retención.

Tabla 50: Perfil metabólico: orina del grupo 2C (Dosis PO)

Tiempo de recogida		1 h ¹	2 h ¹	6 h ¹	24 h ¹				
Porcentaje AD		0,08	0,10	0,28	2,32				
Compuesto	Tiempo de retención típico (Min.)	% HPLC ³	% AD	% HPLC	% AD	% HPLC	% AD	% HPLC	% AD
Compuesto 1	28,6 y 28,3	74,8	0,06	6,57	0,01	nd	nd	0,30	0,01
U3 ⁴	26,5	nd ⁵	nd	4,31	0,004	nd	nd	nd	nd
U1 ⁴	25,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Compuesto 3 diastereo-isómero 1	22,7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Compuesto 3 diastereo-isómero 2	21,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Compuesto 2	20,4	nd	nd	1,81	0,002	nd	nd	nd	nd
R8	17,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R7	13,1	nd	nd	8,39	0,01	1,33	0,004	0,85	0,02
R6	12,4	4,39	0,004	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2'-C-metil-guanosina	11,3	5,33	0,004	56,2	0,06	86,18	0,24	92,1	2,14
R5	10,9	nd	nd	nd	nd	3,01	0,001	2,85	0,07
R4	9,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R3	8,0	nd	nd	2,95	0,003	1,51	0,004	0,46	0,01
R2	6,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R1	2,1	15,5	0,01	19,7	0,02	7,97	0,02	3,41	0,08
Total		100	0,08	100	0,10	100	0,28	100	2,32

¹Muestra de un único animal (n° 15, Grupo 2A, para 1 h y n° 20, Grupo 2B para 2 h y 6 h).

²El conjunto de orina de todos los animales del Grupo2C se preparó por mezcla proporcional en volumen.

³ % HPLC = Abundancia de cada metabolito expresada como % del área de picos de HPLC en el extracto de la muestra.

⁴ Metabolito observado *in vitro* en el Ejemplo 15

⁵nd = no detectado

5 La Tabla 50 contiene datos de muestras de animales individuales y de conjuntos de muestras. Para estimar la distribución global de los metabolitos urinarios, se asumió que el perfil de un animal individual es reflejo del promedio global del perfil de metabolitos. Por lo tanto, los datos de distribución por HPLC de los animales individuales se utilizaron para calcular el porcentaje de la dosis administrada excretada como diferentes metabolitos durante los intervalos de recogida de 1, 2, y 6 h. Los datos estimados se resumen en la Tabla 51. Los metabolitos R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8 se caracterizaron en base al tiempo de retención.

Tabla 51: Perfil metabólico estimado: orina del grupo 2C (Dosis PO)

Tiempo de recogida	1 h	2 h	6 h	24 h	Total						
% AD (Media)	0,02	0,04	0,46	2,32	2,84						
Código del metabolito	Tiempo retención típico (Minutos)	% HPLC ¹	% AD	% HPLC	% AD	% HPLC	% AD	% HPLC	% AD	% HPLC	% de excreción urinaria total
Comp. 1	28,6 y 28,3	74,8	0,01	6,57	0,003	nd	nd	0,30	0,01	0,02	0,73
U3 ³	26,5	nd ³	nd	4,31	0,002	nd	nd	nd	nd	0,002	0,06
U1 ³	25,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Comp. 3 diastereo-isómero 1	22,7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Comp. 3 diastereo-isómero 2	21,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Comp. 2	20,4	nd	nd	1,81	0,001	nd	nd	nd	nd	0,001	0,03
R8	17,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R7	13,1	nd	nd	8,39	0,003	1,33	0,01	0,85	0,02	0,02	0,81
R6	12,4	4,39	0,001	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,001	0,02
2'-C-metil-guanosina	11,3	5,33	0,001	56,2	0,02	86,18	0,40	92,1	2,14	2,56	90,4
R5	10,9	nd	nd	nd	nd	3,01	0,01	285	0,07	0,08	2,83
R4	9,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R3	8,0	nd	nd	2,95	0,001	1,51	0,01	0,46	0,01	0,02	0,67
R2	6,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R1	2,1	15,5	0,002	19,7	0,01	7,97	0,04	3,41	0,08	0,13	4,46
Total		100	0,02	100	0,04	100	0,460	100	2,32	2,84	100

¹% HPLC = Abundancia de cada metabolito expresada como % del área de picos de HPLC en el extracto de la muestra. El promedio de los datos del perfil de metabolitos para 1 h, 2 h, y 6 h se estimó utilizando la distribución de % HPLC de un único animal de la Tabla 9-4. En la estimación se asume que el perfil del único animal refleja el promedio del perfil de metabolitos.

³ Metabolito observado *in vitro* en el Ejemplo 15

⁴nd = no detectado

5 Se analizaron por el método 2 de HPLC dos muestras de orina (muestra a las 6 h del animal número 19 y conjunto de orina de la recogida de las 24 h).

10 Se utilizaron los datos del análisis por el método 1 de HPLC para calcular la distribución de metabolitos. El Compuesto 1, fue el componente principal en la orina del grupo de dosis IV. Este componente representó el 26,1 % de la dosis administrada y el 55,6 % de la excreción urinaria total. La 2'-C-metil-guanosina fue el metabolito principal (18,0 % de la dosis administrada, 38,4 % de la excreción urinaria total). Un metabolito polar (denominado R1) representó el 1,0 % de la dosis administrada y el 2,3 % de la excreción urinaria total. Todos los demás metabolitos estuvieron presentes en menos de un 0,2 % de la dosis administrada.

15 Para el grupo de dosis PO, la 2'-C-metil-guanosina fue el componente urinario principal presente en un nivel estimado de 2,6 % de la dosis administrada y representó el 90,4 % de la excreción urinaria total (Tabla 51). El metabolito polar, R1, se detectó a 0,1 % de la dosis administrada y representó el 4,5 % de la excreción urinaria total. El Compuesto 1 representó solamente el 0,02 % de la dosis administrada. Él fue el componente más abundante

solamente en el punto de tiempo de 1 h, representando el 74,8 % de la radiactividad total eliminada por la orina antes de una hora. A las 6 h, representó solamente el 6,6 % de la excreción urinaria total.

El Compuesto 2 y el Compuesto 3 estuvieron presentes a niveles muy bajos y se identificaron en base a los tiempos de retención comparables con los de patrones de referencia apropiados utilizando ambos métodos, 1 y 2, de HPLC.

5 Metabolitos fecales

Se extrajeron los conjuntos de muestras fecales y se prepararon para análisis por HPLC como se ha descrito antes. Solamente se analizaron muestras fecales de las recogidas de 24 h. Debido a la baja radiactividad total y al tamaño de la muestra, no se analizaron las recogidas de las 6 h.

10 Se analizaron las muestras por HPLC con detección radioquímica. La distribución de metabolitos como % de la dosis administrada se derivó de estos análisis. Los datos para el análisis por HPLC de los conjuntos de extractos fecales de ambos grupos de dosis, IV y PO, se dan en la Tabla 52. Ambos conjuntos de extractos fecales se analizaron también por el método 2 de HPLC. Los metabolitos R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8 se caracterizaron en base al tiempo de retención.

15 Tabla 52: Perfil metabólico: extractos fecales de los grupos 1C (IV) y 2C (Dosis PO)

Grupo de dosis	1C (IV)	2C (PO)			
Tiempo recogida	24 h ¹	24 h ¹			
% AD (media)	39,0	91,2			
Código de metabolito	Tiempo de retención típico (Min.)	% HPLC ²	% AD	% HPLC	% AD
Compuesto 1	28,6 y 28,3	50,6	19,7	71,9	65,6
U3 ³	26,5	4,97	1,90	nd ⁴	nd
U1 ³	25,2	3,37	1,31	nd	nd
Compuesto 3 diastereoisómero 1	22,7	nd	nd	nd	nd
Compuesto 3 diastereoisómero 2	21,6	nd	nd	nd	nd
Compuesto 2	20,4	nd	nd	nd	nd
R8	17,1	nd	nd	nd	nd
R7	13,1	nd	nd	nd	nd
R6	12,4	nd	nd	nd	nd
2'-C-metil-guanosina	11,3	41,0	16,0	28,1	25,6
R5	10,9	nd	nd	nd	nd
R4	9,4	nd	nd	nd	nd
R3	8,0	nd	nd	nd	nd
R2	6,2	nd	nd	nd	nd
R1	2,1	nd	nd	nd	nd
Total		100	39,0	100	91,2

¹El conjunto de heces de todos los animales se preparó por mezcla proporcional en peso.

²% HPLC = Abundancia de cada metabolito expresada como % del área de picos de HPLC en el extracto de la muestra.

³ Metabolitos observados *in vitro* en el Ejemplo 14

⁴nd = no detectado

20 Los datos de análisis por HPLC utilizando el método 1 se usaron para calcular la distribución de metabolitos. El Compuesto 1 fue el componente más abundante de las heces para ambos grupos de dosis. Representó el 19,7 % y 65,6 % de la dosis administrada (50,6 % y 71,9 % de la excreción fecal total) para los grupos de dosis IV y PO, respectivamente (Tabla 52). La 2'-C-metil-guanosina fue el metabolito principal para el grupo de dosis IV, representando el 16,0 % de la dosis administrada (41,0 % de de la excreción fecal total). Para el grupo de dosis PO,

la 2'-C-metil-guanosina fue el único metabolito (25,6 % de la dosis administrada, 28,1 % de la excreción fecal total). Para el grupo de dosis IV, se detectaron dos metabolitos menores, denominados R11 y R10, representando el 1,9 y 1,3 % de la dosis administrada (5,0 % y 3,4 % de la excreción fecal total), respectivamente. Los metabolitos R11 y R12 fueron cromatográficamente idénticos a los metabolitos U3 y U1, generados respectivamente por las incubaciones en microsomas y en hepatocitos de los Ejemplos 14 y 15.

Excreción total de Compuesto 1 y su metabolito principal 2'-C-metil-guanosina

La excreción total de Compuesto 1 y su metabolito principal 2'-C-metil-guanosina se calculó como la suma de la excreción urinaria total y la excreción fecal total de cada componente. Para el Grupo C, los datos estimados se usaron para calcular la recuperación urinaria. Los datos se presentan en la Tabla 53. La excreción global del Compuesto 1 fue el 45,9 % y el 65,6 % de la dosis administrada para los grupos de dosis IV y PO, respectivamente. La excreción de 2'-C-metil-guanosina representó el 34,0 % y el 28,2 % de las dosis respectivas.

Tabla 53: Excreción total (% de de la dosis administrada) de Compuesto 1 y 2'-C-metil-guanosina

Grupo de dosis	Compuesto	Orina	Heces	Total
IV (1C)	Compuesto 1	26,1	19,7	45,9
	2'-C-metil-guanosina	18,0	16,0	34,0
PO (2C)	Compuesto 1	0,02	65,6	65,6
	2'-C-metil-guanosina	2,56	25,6	28,2

El dato de concentración en orina para el Grupo 2C es estimado

15 Metabolitos plasmáticos

Las muestras terminales de plasma se reunieron, se extrajeron y se prepararon para el análisis por HPLC como se ha descrito antes. Para el Grupo 1, las muestras terminales de plasma (2, 6, y 24 h) se reunieron y se analizaron por HPLC como se ha descrito antes. Para el Grupo 2, solamente la muestra de las 6 h tuvo suficiente radiactividad para el análisis. El único metabolito detectable observado en todas las muestras de plasma fue la 2'-C-metil-guanosina. El plasma a las 2 h mostró un pico polar que eluye a los 2,1 minutos que podría ser la 2'-C-metil-guanosina. Se observó que la 2'-C-metil-guanosina interactuaba con los componentes de la matriz lo que produjo la elución parcial del metabolito en el frente del disolvente (aproximadamente 2 minutos). Cuando se volvió a analizar la muestra después de dilución con la fase móvil acuosa este componente había desaparecido.

Perfil metabólico en hígado

25 Se reunieron los homogenatos de hígado en cada punto de tiempo para ambos grupos de dosis mediante una mezcla proporcional según el peso de las muestras de los animales individuales. Se extrajeron las muestras reunidas y se prepararon para análisis por HPLC como se ha descrito antes. Se determinó la abundancia de metabolitos como un % de la dosis administrada y como µg equivalentes/g. Los datos se presentan en la Tabla 54, Tabla 55, Tabla 56 y Tabla 57, respectivamente. Los metabolitos R1, R8 y R9 se caracterizaron en base al tiempo de retención.

Tabla 54: Perfil metabólico (expresado como % de de la dosis administrada): hígado del grupo 1 (Dosis IV)

Tiempo de recogida	2 h	6 h	24 h				
% AD (media)	15,5	10,1	1,76				
Código del metabolito	Tiempo de retención típico (Minutos)	% HPLC ¹	% AD	% HPLC	% AD	% HPLC	% AD
R1	4,1	0,65	0,10	nd ²	nd	nd	nd
2'-C-metil-guanosina	9,6	13,8	2,14	14,6	1,48	23,9	0,42
Compuesto 5	15,0	62,6	9,73	63,1	6,39	59,9	1,05
R9	16,4	0,70	0,11	0,89	0,09	nd	nd
R8	17,2	0,40	0,06	0,92	0,09	nd	nd
Compuesto 6	22,5	21,6	3,35	20,1	2,04	16,2	0,29
Compuesto 7	26,0	0,29	0,05	0,35	0,04	nd	nd
Total		100	15,5	100	10,1	100	1,76

¹ % HPLC = Abundancia de cada metabolito expresada como % del área de picos de HPLC en el extracto de la muestra.

²nd = no detectado

Tabla 55: Perfil metabólico (expresado como % de de la dosis administrada): hígado del grupo 2 (Dosis PO)

Tiempo de recogida	2 h	6 h	24 h				
% AD (media)	0,20	0,37	0,17				
Código del metabolito	Tiempo de retención típico (Minutos)	% HPLC ¹	% AD	% HPLC	% AD	% HPLC	% AD
R1	4,1	nd ²	nd	nd	nd	nd	nd
2'-C-metil-guanosina	9,6	77,5	0,15	85,0	0,32	53,9	0,09
Compuesto 5	15,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R9	16,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R8	17,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Compuesto 6	22,5	22,6	0,04	15,0	0,06	46,1	0,08
Compuesto 7	26,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total		100	0,20	100	0,37	100	0,17

¹ % HPLC = Abundancia de cada metabolito expresada como % del área de picos de HPLC en el extracto de la muestra.

²nd = no detectado

Tabla 56: Perfil metabólico: hígado del grupo 1 (Dosis IV)

Tiempo de recogida		2 h	6 h	24 h			
Concentración media (µg equivalentes/g)		206	137	23,2			
Código del metabolito	Tiempo de retención (Minutos)	% HPLC ¹	como µg equivalentes/g	% HPLC	como µg equivalentes/g	% HPLC	como µg equivalentes/g
R1	4,1	0,65	1,34	nd ²	nd	nd	nd
2'-C-metil-guanosina	9,6	13,8	28,4	14,6	20,0	23,9	5,56
Compuesto 5	15,0	62,6	129	63,1	86,2	59,9	13,9
R9	16,4	0,70	1,44	0,89	1,22	nd	nd
R8	17,2	0,40	0,82	0,92	1,26	nd	nd
Compuesto 6	22,5	21,6	44,4	20,1	27,5	16,2	3,77
Compuesto 7	26,0	0,29	0,60	0,35	0,48	nd	nd
Total		100	206	100	137	100	23,2

¹ % HPLC = Abundancia de cada metabolito expresada como % del área de picos de HPLC en el extracto de la muestra.

²nd = no detectado

Tabla 57: Perfil metabólico: hígado del grupo 2 (Dosis PO)

Tiempo de recogida		2 h	6 h	24 h			
Concentración media (µg equivalentes/g)		5,09	10,3	4,08			
Código del metabolito	Tiempo de retención (Minutos)	% HPLC ¹	como µg equivalentes/g	% HPLC	como µg equivalentes/g	% HPLC	como µg equivalentes/g
R1	4,1	nd ²	nd	nd	nd	nd	nd
2'-C-metil-guanosina	9,6	77,5	3,94	85,0	8,76	53,9	2,20
Compuesto 5	15,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R9	16,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R8	17,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Compuesto 6	22,5	22,6	1,15	15,0	1,55	46,1	1,88
Compuesto 7	26,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total		100	5,09	100	10,3	100	4,08

¹ % HPLC = Abundancia de cada metabolito expresada como % del área de picos de HPLC en el extracto de la muestra.

²nd = no detectado

5 Por el método de detección radioquímica de HPLC, se observó la 2'-C-metil-guanosina-5'-TP a niveles bajos solamente en dos extractos de hígado de los grupos de dosis IV (muestra de las 2 h del Grupo 1 A y muestra de las 6 h del Grupo 1B). Ella representó el 0,05 % de la dosis administrada en el hígado del Grupo 1A y el 0,04 % en el hígado del Grupo 1B (Tabla 54). La concentración de Compuesto 7 fue de 0,60 µg equivalentes de Compuesto 1/g de hígado para el Grupo 1A y de 0,48 µg equivalentes de Compuesto 1/g de hígado para el Grupo 1B (Tabla 56).

10 El metabolito principal en los extractos de hígado del grupo de dosis IV fue el Compuesto 5 que representó el 9,7 %, el 6,4 %, y el 1,1 % de la dosis a las 2, 6, y 24 h. Estos valores representaron el 60-63 % de la radiactividad total en las muestras (Tabla 54). El Compuesto 5 no se detectó por el método de HPLC en ningún hígado del grupo de dosis

oral. El Compuesto 6 estuvo presente a 3,4 %, 2,0 %, y 0,29 % de la dosis en las muestras del grupo IV. Estos niveles representaron aproximadamente el 16-22 % de la radiactividad total en hígado (Tabla 54). Para las muestras del grupo de dosis oral, el Compuesto 6 se observó a 0,04 %, 0,06 %, y 0,08 % de la dosis administrada a las 2, 6, y 24 h, respectivamente, representando el 15-46 % de la radiactividad total en hígado (Tabla 55).

- 5 La 2'-C-metil-guanosina representó aproximadamente el 14-24 % de la radiactividad total en el hígado para el grupo de dosis IV y aproximadamente el 54-85 % de la radiactividad total en el hígado para el grupo de dosis PO. Se detectaron tres metabolitos menores no identificados en las muestras de hígado del grupo de dosis IV.

- 10 La investigación preliminar de los extractos reveló la presencia de los tres compuestos fosforilados en las muestras del grupo de dosis oral. Debido a sus bajas concentraciones y a la baja actividad específica del [¹⁴C]Compuesto 1 administrado, no se detectaron ni el monofosfato ni el trifosfato en estas muestras por análisis de radioHPLC.

En la Tabla 58 se muestra un perfil comparativo de metabolitos para orina, heces e hígado después de un período de exposición de 24 h. Los metabolitos R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R9 se caracterizaron en base al tiempo de retención.

- 15 Tabla 58: Comparación de los perfiles metabólicos en orina, heces e hígado de rata a las 24 h después de la administración de [¹⁴C]Compuesto 1

Código del compuesto	Tanto por ciento de dosis							
	Orina 0-24 h		Heces 0-24 h		Hígado 24 h		Total	
	Oral	IV	Oral	IV	Oral	IV	Oral	IV
Compuesto 1	0,02	26,1	65,6	19,7	nd ²	nd	65,6	45,9
U3 ¹	0,002	0,01	nd	1,94	nd	nd	0,002	1,95
U1 ¹	nd	0,01	nd	1,31	nd	nd	nd	1,32
Compuesto 3 (diastereoisómero 1)	nd	0,12	nd	nd	nd	nd	nd	0,12
Compuesto 3 (diastereoisómero 2)	nd	0,39	nd	nd	nd	nd	nd	0,39
Compuesto 2	0,001	0,76	nd	nd	nd	nd	0,001	0,76
U8 ¹	nd	0,06	nd	nd	nd	nd	nd	0,06
R9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R7	0,02	0,15	nd	nd	nd	nd	0,02	0,15
R6	0,001	0,07	nd	nd	nd	nd	0,001	0,07
2'-C-metil-guanosina	2,56	18,0	25,6	16,0	0,09	0,42	28,3	34,5
Compuesto 5	nd	nd	nd	nd	nd	1,05	nd	1,05
Compuesto 6	nd	nd	nd	nd	0,08	0,29	0,08	0,29
Compuesto 7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R5	0,08	nd	nd	nd	nd	nd	0,08	nd
R4	nd	0,07	nd	nd	nd	nd	nd	0,07
R3	0,02	nd	nd	nd	nd	nd	0,02	nd
R2	nd	0,05	nd	nd	nd	nd	nd	0,05
R1	0,13	1,08	nd	nd	nd	nd	0,13	1,08
Total	2,84	46,9	91,2	nd	0,17	1,76	94,2	87,7

¹Metabolitos observados *in vitro* en el ejemplo 14

²nd = no detectado

Conclusión

5 En las ratas que recibieron dosis únicas de [¹⁴C]Compuesto 1, la recuperación global urinaria y fecal de la radiactividad representó el 86 % de la dosis IV y el 94 % de la dosis PO antes de 24 h. La principal vía de eliminación para el grupo de administración oral fue la excreción fecal (91 % de la dosis). Para el grupo IV, se recuperaron cantidades casi iguales de radiactividad en la orina (47 % de la dosis) y en las heces (39 % de la dosis).

10 Después de administración IV, el Compuesto 1 inmodificado fue el principal componente radiactivo (26 % de la dosis) y la 2'-C-metil-guanosina fue el principal metabolito (18 % de la dosis) observado en la orina. Un segundo metabolito más polar representó el 1,1 % de la dosis IV. Todos los otros metabolitos estuvieron presentes a menos del 0,2 % de la dosis administrada. Más del 91 % de la radiactividad excretada en las heces se recuperó como Compuesto 1 inmodificado y 2'-C-metil-guanosina. La recuperación fecal de estos dos compuestos representó el 20 y 16 % de la dosis IV y el 66 y 26 % de la dosis PO.

15 Después de administración oral, la 2'-C-metil-guanosina fue el principal componente relacionado con la dosis en la orina (2,6 % de la dosis). Un metabolito polar, R1, representó el 0,1 % y el Compuesto 1 inmodificado representó solamente el 0,02 % de la dosis oral. Se detectaron los metabolitos putativos, Compuesto 2 y Compuesto 3, a niveles muy bajos.

20 El Compuesto 1 fue el componente más abundante de las heces para ambos grupos de dosis (20 % de la dosis IV y 66 % de la dosis oral). La 2'-C-metil-guanosina fue el principal metabolito observado en las heces del grupo IV (16,0 % de la dosis) y el único metabolito detectado en las heces del grupo de dosis PO (26 % de la dosis). Para el grupo de dosis IV, se detectaron dos metabolitos menores, denominados R11 y R10, a 1,9 % y 1,3 % de la dosis administrada, respectivamente.

25 En la rata, los valores de AUC₀₋₂₄ normalizados a la dosis sugieren que la biodisponibilidad oral de la dosis radiactiva fue el 22 %. Estos datos reflejan una biodisponibilidad combinada del Compuesto 1, su principal metabolito 2'-C-metil-guanosina y otros diversos metabolitos menores. El grado de absorción de la dosis oral es probablemente superior al 22 %, sin embargo, puesto que una cantidad importante de la dosis IV (39 %) se excreta en las heces, una indicación de la extensa secreción biliar.

Después de administración IV de [¹⁴C]Compuesto 1, los niveles de radiactividad total en el hígado representaron el 16 % de la dosis administrada a las 2 h y el 10 % a las 6 h. La radiactividad total en el hígado se redujo al 1,8 % de la dosis en 24 h. Estos niveles de radiactividad corresponden a 206, 137 y 23 µg equivalentes de Compuesto 1/g de hígado.

30 Los niveles en hígado fueron significativamente más bajos después de la administración oral, representando el 0,2 %, 0,4 % y 0,2 % de la dosis a las 2, 6 y 24 h, respectivamente. Sin embargo, estos niveles corresponden a 5, 10 y 4 µg equivalentes de Compuesto 1/g de hígado.

35 El principal metabolito en los extractos de hígado del grupo de dosis IV fue el monofosfato de 2'-C-metil-guanosina, que representó el 9,7 %, 6,4 %, y 1,1 % de la dosis administrada a las 2, 6, y 24 h, respectivamente. Estos valores representaron el 60-63 % de la radiactividad total en el hígado. Los niveles de difosfato representaron el 16-22 % de la radiactividad en hígado y representaron 3,4, 2,0, y 0,3 % de la dosis IV en los tres puntos de tiempo respectivos. La 2'-C-metil-guanosina-5'-TP radiomarcada se detectó a bajos niveles por análisis de HPLC en dos extractos de hígado reunidos en los puntos de muestreo de las 2 h y 6 h del grupo de dosis IV y representaron 0,04-0,05 % de la dosis administrada. La 2'-C-metil-guanosina representó aproximadamente el 14-24 % de la radiactividad total en hígado del grupo de dosis IV.

40 Después de administración oral de [¹⁴C]Compuesto 1, no se detectaron ni el Compuesto 5 ni el Compuesto 7 por el método de radioHPLC en ninguna de las muestras de hígado. El difosfato representó el 0,04, 0,06 y 0,08 % de la dosis radioactiva a los puntos de tiempo de las 2, 6 y 24 h, respectivamente. Estos niveles corresponden al 15-46 % de la radiactividad total en el hígado a estos tiempos de muestreo y se equiparan a los 1,1, 1,6 y 1,9 µg equivalentes de Compuesto 1/g de hígado, respectivamente. La 2'-C-metil-guanosina representó el 54-85 % de la radiactividad en hígado del grupo PO.

50 Este estudio demuestra que el Compuesto 5 es el componente predominante relacionado con la dosis encontrado en el hígado de rata cuando se administra una cantidad relativamente alta de Compuesto 1 por administración IV. Después de administración oral, se encuentran niveles significativamente más bajos de material relacionado con la dosis en el hígado, siendo el Compuesto 6 la forma molecular predominante.

Ejemplo 17

Estudio de combinación *in vitro* de Compuesto 1 y ribavirina (RBV) en un replicón de VHC

Se midió la actividad antiviral del Compuesto 1 en combinación con ribavirina (RBV) sobre un replicón de VHC en células GS4.1 (Zhu et al., 2003, J Virol., 77:9204-9210) como se describe más adelante.

La línea de células GS4.1 contiene un replicón de VHC genotipo 1b (Lohmann 1999, Science 285 (5424):110-3). Se diluyeron Compuesto 1 y RBV en medio de ensayo para preparar stocks 4X. Se hicieron cuatro diluciones adicionales de 1,25 veces en serie a partir de los stocks 4X iniciales en medio de ensayo para una titulación de 5 puntos. Se añadieron diluciones del fármaco Compuesto 1 horizontalmente y diluciones de RBV verticalmente a placas de 96 pocillos en un diseño de tablero de ajedrez de 5x5. Esta adición se realizó por duplicado en cada placa. Las concentraciones finales de fármaco variaron de 1,5X a 0,6X de los valores de EC₅₀ de Compuesto 1 y RBV que se determinaron empíricamente en experimentos de titulación de los fármacos individuales; la EC₅₀ del Compuesto 1 fue 0,4 ± 0,09 µM y la EC₅₀ de la RBV fue 21,8 ± 3,6 µM. Después de tres días de tratamiento con el fármaco, se midió la inhibición de la replicación de VHC mediante cuantificación de la proteína vírica NS4A utilizando un ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). El desarrollo y validación del método ELISA para el replicón de VHC han sido descritos en detalle en un informe de estudio [IDIX-08-106].

Puesto que la citotoxicidad del compuesto de ensayo podría sesgar el análisis de interacción fármaco-fármaco en estos ensayos, se realizaron ensayos de citotoxicidad en paralelo empleando los procedimientos descritos más adelante (Mosmann 1983 J. Immunol. Meth, 65, 55-63). El resultado del ensayo se midió por la biorreducción del compuesto de tetrazolio MTS amarillo hasta un producto de formazan púrpura. Esta conversión está mediada por NADPH o NADH en células metabólicamente activas y es por tanto directamente proporcional al número de células vivas en un cultivo. Las placas se prepararon como se ha descrito antes.

El análisis de los datos de combinación *in vitro* se realizó utilizando el programa MacSynergy™ II (modelo de independencia de Bliss), y el software CombiTool (modelo de aditividad de Loewe). En adición, se usó el programa CalcuSyn para calcular el CI (índice de combinación) en la EC₅₀ calculada.

Controles

1. Control sin fármaco: células con replicón de VHC (GS4.1) en medio de ensayo.
2. Control con un único fármaco: células con replicón de VHC (GS4.1) tratadas con Compuesto 1 solo.
3. Control con un único fármaco: células con replicón de VHC (GS4.1) tratadas con RBV sola.
4. Control positivo de ELISA para NS4A: células con replicón de VHC (GS4.1) en medio de ensayo.
5. Control negativo de ELISA para NS4A: células Huh-7 en medio de ensayo.
6. Control positivo de citotoxicidad: medio de ensayo.
7. Control negativo de citotoxicidad: células con replicón de VHC (GS4.1) en medio de ensayo.

Líneas celulares

Se analizó cada línea de células y se encontró que era negativa para micoplasma como se detectó por procedimientos de tinción de ADN y PCR de cultivo directo en los Servicios de análisis de micoplasma de la ATCC.

La línea de células Huh-7 se derivó de células de hepatoma humano (Nakabayashi, 1982, Cancer Res. 42:3858-3863). Las células Huh-7 se mantuvieron en frascos Corning de 75 cm² en medio de crecimiento de Huh-7 a 37 °C con 5 % de CO₂, y corte con tripsina-EDTA a aproximadamente el 80 % de confluencia.

La línea de células GS4.1 se derivó de la línea de células de hígado humano Huh-7 y posee de manera estable un replicón bicistrónico de VH. Se mantuvieron las células en frascos Corning de 75 cm² en medio de crecimiento de GS4.1 a 3 °C con 5 % de CO₂, y corte con tripsina-EDTA a aproximadamente el 80 % de confluencia.

Reactivos

Los reactivos usados en este estudio se compraron de las siguientes fuentes:

- Tripsina-EDTA, Fuente: Cellgro; Metanol, Fuente: Burdick & Jackson; Acetona, Fuente: J.T. Baker; Anticuerpo monoclonal de ratón anti NS4A de la hepatitis C (mAb), Fuente: Virogen; Solución concentrada de lavado (20X), Fuente: KPL; Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (HRP) de cabra (H+L), Fuente: Zymed; Orto-fenilendiamina (comprimido OPD), Fuente: Zymed; Peróxido de hidrógeno solución al 30 % (H₂O₂), Fuente: EMD; Ácido sulfúrico (H₂SO₄), Fuente: Mallinckrodt Chemicals; Solución para ensayo de proliferación de células (basado en MTS) CellTiter 96® AQueous One, Fuente: Promega; Ácido cítrico, sal trisódica, dihidrato, Fuente: Sigma-Aldrich; Fosfato de sodio, dibásico (Na₂HPO₄), Fuente: Fisher Chemical; Trizma® solución de hidrocloreuro (Tris-HCl), Fuente: Sigma-Aldrich; Cloruro de sodio (NaCl) solución 5,0 M, Fuente: Applied Biosystem. Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) solución 0,5 M, Fuente: Sigma-Aldrich; Dimetilsulfóxido (DMSO), Fuente: Sigma-Aldrich; Geneticin® (G418), 100X, Fuente: Cellgro; Medio de Eagle con modificación de Dulbecco (DMEM), Fuente: Cellgro; Suero fetal bovino (FBS), inactivado por calor, Fuente: Cellgro; Solución de penicilina/estreptomina (10.000 UI por mL/10.000 µg por mL), Fuente: Cellgro; GlutaMAX, dipéptido de L-glutamina (200 mM), Fuente: Gibco; y MEM (medio mínimo esencial) con aminoácidos no esenciales, Fuente: Cellgro.

Medios y tampones

1. Medio de cultivo completo para células Huh-7: DMEM 1X (que contiene glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio), suplementado con suero fetal bovino al 10 %, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, GlutaMAX 2 mM, y MEM al 1 % con aminoácidos no esenciales.
- 5 2. Medio de cultivo/selección completo para células GS4.1: DMEM 1X (que contiene glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio), suplementado con suero fetal bovino al 10 %, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, GlutaMAX 2 mM, MEM al 1 % con aminoácidos no esenciales, y 0,5 mg/mL de geneticina (G418)
3. Medio de ensayo: medio de cultivo completo de Huh-7 con DMSO al 1 %
4. Solución de lavado para ELISA: solución de lavado KPL diluida a 1X en dH₂O
- 10 5. FBS-TNE al 10 %: Tris-HCl 50 mM (pH 7,5; Sigma), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM con FBS al 10 %
6. Tampón de citrato/fosfato: ácido cítrico 16 mM, Na₂HPO₄ 27 mM
7. Solución de OPD (orto-fenilendiamina): 1 comprimido de OPD + 12 mL de tampón de citrato/fosfato + 5 mL de H₂O₂ al 30 % por placa.

Tratamiento con el fármaco

- 15 Se sembraron placas de 96 pocillos con células GS4.1 (filas A-G) y células Huh-7 (fila H), a una densidad de $7,5 \times 10^3$ células por pocillo en 50 µL de medio de cultivo completo, respectivamente.
Se diluyeron el Compuesto 1 y la RBV en medio de ensayo como stocks 4X. Se prepararon cuatro diluciones adicionales de 1,25 veces en serie de cada compuesto a partir de los stocks 4X en medio de ensayo.
- 20 Se incubaron las células a 37 °C/5 % de CO₂ durante al menos cuatro horas, y después se inició el tratamiento con el fármaco añadiendo 25 µL de las diluciones seriadas del fármaco Compuesto 1 horizontalmente y 25 µL de las diluciones seriadas de RBV verticalmente en un diseño de tablero de ajedrez de 5x5. Esta adición se realizó por duplicado en cada placa de 96 pocillos. Las concentraciones finales de ambos fármacos variaron de 1,5X a 0,6X de sus respectivos valores de EC₅₀.
Se incubaron las células con inhibidores durante tres días a 37 °C/5 % de CO₂.
- 25 ELISA del replicón de VHC
Después de tres días de tratamiento con fármaco, se separó el medio de las placas con un golpeteo suave y se fijaron las células a las placas con 100 µL/pocillo de acetona:metanol 1:1.
Después de un minuto de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las placas tres veces con 100 µL/pocillo de solución de lavado de ELISA y se bloquearon después con 150 µL/pocillo de FBS-TNE al 10 %.
- 30 Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las placas tres veces con 100 µL/pocillo de solución de lavado de ELISA, y después se añadieron 100 µL/pocillo de mAb de ratón anti-NS4A de hepatitis C (1 mg/mL de stock diluido 1:4,000 en FBS-TNE al 10 %).
Después de 2 horas de incubación a 37 °C, se lavaron las placas tres veces con 100 µL/pocillo de solución de lavado de ELISA, y después se añadieron 100 µL/pocillo de anticuerpo anti-ratón con peroxidasa (HRP) de cabra (diluido 1:3,500 en FBS-TNE al 10 %).
- 35 Después de un período de incubación de una hora a 37 °C, se lavó cada placa tres veces con 100 µL/pocillo de solución de lavado de ELISA. Se inició entonces el desarrollo del color con 100 µL/pocillo de solución OPD.
Después de un período de incubación de 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, se pararon las reacciones añadiendo 100 µL de H₂SO₄ 2 N a cada pocillo.
- 40 Se midió la absorbancia a 490 nm en un contador multietiqueta Victor3 V 1420 (Perkin Elmer). Se calculó para cada fármaco y combinación de fármacos el tanto por ciento de inhibición de la replicación del replicón de VHC utilizando la media de los pocillos duplicados. Se calculó el valor de concentración eficaz al 50 % (EC₅₀) para el Compuesto 1 solo y para la RBV sola a partir de las ecuaciones que definen la recta de mejor ajuste determinadas por el software XLfit 4.1. El análisis de los datos de combinación *in vitro* se llevó a cabo utilizando el modelo de independencia de Bliss (MacSynergy™ II) y el modelo de aditividad de Loewe (CombiTool). En adición, se usó el programa CalcuSyn para calcular el CI medio en la EC₅₀ calculada.
- 45

Determinación de la citotoxicidad del Compuesto 1 y de la RBV en células GS4.1 utilizando el ensayo MTS

Se pusieron las células en placas y se trataron con inhibidores utilizando la matriz de fármaco descrita anteriormente.

5 Después de tres días de tratamiento con fármaco, se añadieron 20 µL de MTS a cada pocillo, y después se incubaron las placas a 37 °C/5 % de CO₂.

Después de 3 horas de incubación, se midió la absorbancia a 490 nm en un contador multietiqueta Victor3 V 1420 (Perkin Elmer). El valor de la concentración citotóxica al 50 % (CC₅₀) para cada fármaco y combinación de fármacos se determinó a partir de las ecuaciones que definen la recta de mejor ajuste determinadas por el software XLfit 4.1.

10 En las condiciones experimentales usadas en este estudio, no se observaron signos de citotoxicidad *in vitro* en las células tratadas con Compuesto 1 ni con RBV solos o en combinación.

Análisis de los datos de combinación de fármacos

15 Se utilizó el programa MacSynergy™ II, versión 1.0 (Prichard, Asetline, Shipman; University of Michigan, Michigan, USA) para evaluar los datos de potencia antiviral según el modelo de independencia de Bliss. El programa MacSynergy™ II calcula una superficie dosis-respuesta aditiva, teórica, basada en las curvas dosis-respuesta para cada fármaco titulado individualmente. La superficie de interacción aditiva calculada se resta entonces de la superficie de interacción derivada experimentalmente, que revela áreas de interacción no aditiva. Los picos por encima del plano del 0 % de inhibición indican áreas de interacción superior a la aditiva, o sinergismo. A la inversa, los picos por debajo del plano del 0 de % inhibición indican áreas de interacción inferior a la aditiva, o antagonismo. Los conjuntos de datos se evalúan estadísticamente con intervalos de confianza alrededor de la superficie dosis-respuesta experimental. Se calculan los volúmenes de los picos cuantificando el grado de sinergismo o antagonismo que cae fuera del intervalo de confianza; se registran los volúmenes y log de volúmenes de sinergismo y antagonismo (corrigiendo para las diluciones de fármaco). En este estudio, los conjuntos de datos se evaluaron en el nivel de confianza del 99,9 %; los volúmenes <25 µM² % (log de volúmenes <2) se consideraron aditivos, aquellos >25 pero <50 µM² % (log de volúmenes >2 y <5) se percibieron como sinergismo o antagonismo débil, los valores >50 pero <100 µM² % (log de volúmenes >5 y <9) se consideraron como sinergismo o antagonismo moderado, y los valores >100 µM² % (log de volúmenes >9) se consideraron como sinergismo o antagonismo fuerte. (Prichard, et al. 2004, Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 37(3): 540-545).

20 Se utilizó el programa CombiTool, versión 2.001 (Dressler, Muller, and Suhnel; Institute of Molecular Biotechnology, Jena, DE) para calcular las diferencias entre los efectos pronosticados (según el modelo de aditividad de Loewe) y los efectos observados (datos experimentales). Cuando se representan las diferencias con los efectos pronosticados, se obtiene una representación visual de la interacción del compuesto. La línea en cero representa el plano de interacción aditiva cero. Los puntos que caen por debajo o por encima del plano de interacción cero representan áreas de sinergismo o antagonismo respectivamente. Las desviaciones mayores que 0,25 de los efectos pronosticados se consideraron significativas (Dressler et al. 1999, Computers and Biomedical Research; 32: 145-160).

25 Se utilizó el programa CalcuSyn, versión 2.1 (BIOSOFT, Cambridge, UK) para determinar la naturaleza de la interacción fármaco-fármaco basada en la ecuación del índice de combinación (CI) propuesta por Chou and Talalay (1984) Adv. Enz. Regul. 22: 27-55. Se registra el índice de combinación en la EC₅₀ calculada para la combinación de fármacos; la descripción del grado de interacción del fármaco basado en el valor CI es como se recomienda en el manual del software CalcuSyn para Windows (Tabla 59).

Tabla 59: Descripción del grado de interacción analizado por el método del índice de combinación (CI)

Intervalo de CI	Descripción
<0,1	sinergismo muy fuerte
0,1-0,3	sinergismo fuerte
0,3-0,7	sinergismo
0,7-0,85	sinergismo moderado
0,85-0,90	sinergismo ligero
0,90-1,10	aditivo
1,10-1,20	antagonismo ligero
1,20-1,45	antagonismo moderado
1,45-3,3	antagonismo
3,3-10	antagonismo fuerte
>10	antagonismo muy fuerte

Análisis con MacSynergy™ II (independencia de Bliss)

Se analizaron cinco conjuntos de datos experimentales individuales utilizando el software MacSynergy™ II con un intervalo de confianza del 99,9 %.

- 5 El resultado de este análisis se presenta en la Figura 5. Una interacción sinérgica se localiza en el área de la concentración más baja de RBV ($0,6 \times EC_{50}$) y de las concentraciones de Compuesto 1 en su EC_{50} o por encima de su EC_{50} ($1x$ a $1,5x$ de EC_{50}), indicadas por el pequeño pico a estas concentraciones en la Figura 5. Todos los otros puntos de datos en la Figura 5 se agrupan cerca del plano de interacción aditiva cero lo que sugiere que los dos fármacos inhiben el replicón de VHC *in vitro* de una forma aditiva a estas concentraciones.
- 10 El volumen de interacción calculado de $56,7 \mu M^2$ % sugiere un sinergismo moderado. Cuando se corrige para diluciones de fármaco, se produce un log de volumen de interacción de $0,53 \mu M^2$ %, sugiriendo de nuevo una interacción aditiva de Compuesto 1 y RBV.

15 Globalmente, en una realización, el efecto combinado de Compuesto 1 y RBV es débilmente sinérgico cuando una concentración $\geq 0,4 \mu M$ de Compuesto 1 se combina con concentraciones bajas ($0,6 \times EC_{50}$) de RBV. En otra realización, una combinación de Compuesto 1 y RBV es aditiva.

Análisis por CombiTool (aditividad de Loewe)

20 Las diferencias entre el efecto aditivo calculado y los datos experimentales se cuantificaron y se representaron gráficamente para cada combinación de fármacos. La Figura 6 representa las diferencias entre el efecto aditivo calculado y los efectos anti-VHC observados para todas las combinaciones de fármacos de 5 experimentos independientes, obtenidos con el software CombiTool utilizando el modelo de aditividad de Loewe. En la Figura 6, LA-EXP = diferencias entre los efectos observados de 5 experimentos y los efectos pronosticados como se determina por el modelo de aditividad de Loewe mediante el software CombiTool. La línea en cero representa el plano de interacción aditiva cero. Los puntos que caen por debajo o por encima del plano de interacción cero representan áreas de sinergismo o antagonismo respectivamente. Las desviaciones superiores a 0,25 de los efectos pronosticados se consideraron significativas.

25 De modo similar al análisis por MacSynergy™ II, el CombiTool muestra que las combinaciones de fármacos que incluyen altas concentraciones de Compuesto 1 y bajas concentraciones de RBV son débilmente sinérgicas, como se ve por los puntos de datos agrupados alrededor del plano $-0,25$ en el gráfico CombiTool. Los demás puntos de datos de combinación de fármacos caen por encima del plano $-0,25$, lo que sugiere que los dos fármacos inhiben el replicón de VHC en una forma aditiva a estas concentraciones de fármaco. Según el modelo de aditividad de Loewe examinado con el programa CombiTool, en una realización, la interacción de Compuesto 1 y RBV parece que es débilmente sinérgica cuando se combinan altas concentraciones de Compuesto 1 con bajas concentraciones de RBV; dando todas las demás combinaciones interacciones aditivas.

Análisis por CalcuSyn (índice de combinación)

35 El programa CalcuSyn determinó que la media del CI en la EC_{50} calculada era $0,37 \pm 0,12$, concordante con una interpretación de sinergismo en este nivel de efecto.

No se observaron signos de citotoxicidad *in vitro* en las células tratadas con Compuesto 1 y RBV solos o en combinación, lo que sugiere que la relación de actividad combinada es debida a la inhibición de la replicación de VHC más que a la citotoxicidad celular.

40 En ciertas realizaciones, la combinación de ribavirina y Compuesto 1 ha mejorado la eficacia antivírica en comparación con cualquiera de los agentes analizados solos. En ciertas realizaciones, la combinación es de carácter sinérgico. Esto es contrario a los informes de la bibliografía de que existe antagonismo entre los nucleósidos de 2'-C-metilo y la ribavirina, véase, Coelmont et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50, 3444-3446,

45 Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que las células expuestas a la ribavirina generan una cantidad sustancial de ribavirina trifosfato que causa la depleción de los niveles de GTP celular – el sustrato natural para la síntesis de ARN de VHC – mediante un mecanismo de retroalimentación de la síntesis de nucleótidos. El resultado es que el 2'-C-metil-guanosina-5'-trifosfato tiene menos sustrato GTP natural para competir y por lo tanto es un inhibidor más eficaz.

50 Se observa también que el efecto de retroalimentación de la ribavirina se debería esperar en la primera etapa de fosforilación que convierte la guanosina en guanosina monofosfato. Puesto que el Compuesto 1 evita esta etapa mediante la liberación de 2'-C-metil-guanosina-5'-monofosfato, se podría esperar que la ribavirina no tenga impacto negativo sobre la conversión de Compuesto 1 a 2'-C-metil-guanosina-5'-trifosfato.

Ejemplo 18

Susceptibilidad *in vitro* de VHC sustituido con S282T a la ribavirina y el Compuesto 1

En este experimento, se evaluó la susceptibilidad *in vitro* del virus de hepatitis C (VHC) sustituido con S282T frente a la ribavirina (RBV) y al Compuesto 1 en dos sistemas de ensayo: un ensayo bioquímico estándar y un sistema de ensayo de replicón de genotipo 1b. La potencia antivírica de ribavirina 5'-trifosfato y de Compuesto 7 se determinó en primer lugar utilizando un ensayo enzimático estándar *in vitro* que mide la incorporación mediada por NS5B de guanosina 5'-monofosfato (GMP) radiomarcada en un modelo de ácido ribonucleico (ARN) oligomérico en presencia o ausencia de fármaco. Se ensayaron enzimas de tipo natural y enzimas mutantes S282T dirigidas al sitio en presencia de ribavirina trifosfato (RBV-TP) o de Compuesto 7, que es el metabolito activo del Compuesto 1 en las células.

Controles

1. Control sin fármaco (positivo) para el ensayo bioquímico de VHC: polimerasa en tampón de reacción sin fármaco.
2. Control de fondo (negativo) para ensayos bioquímicos de VHC: igual que el control positivo más EDTA 100 mM
3. Control sin fármaco (positivo) para el ensayo de replicón de VHC: células de replicón de VHC (GS4.1) en medio de ensayo.
4. Control positivo de ELISA para NS5A: células de replicón de VHC sin tratar (GS4.1) en medio de ensayo.
5. Control negativo de ELISA para NS5A: células Huh-7 en medio de ensayo.
6. Control positivo de citotoxicidad: medio de ensayo.
7. Control negativo de citotoxicidad: células de replicón de VHC sin tratar (GS4.1) en medio de ensayo.

Polimerasas de VHC

Las enzimas polimerasas empleadas en este estudio se expresaron y purificaron como sigue. La construcción de tipo natural codifica la proteína NS5B de VHC de 65 kDa de genotipo 1b (cepa Con-1) en un sistema de expresión bacteriano estándar utilizado para generar la enzima polimerasa recombinante. Se generó un plásmido de polimerasa mutante de VHC que lleva una única sustitución de serina a treonina en el residuo 282 del gen NS5B mediante mutagénesis dirigida al sitio de la construcción de tipo natural utilizando un kit comercial de mutagénesis según recomendaciones del fabricante. Los constructos de expresión utilizados en este estudio fueron:

1. Polimerasa natural de VHC genotipo 1b (con una delección de los 21 aminoácidos del carboxi terminal) clonada en los sitios de restricción NheI/XhoI del vector de expresión pET21a (Ampr). Número de clones 9-15.
2. Polimerasa S282T de VHC 1b que contiene una única sustitución de serina-a-treonina en el residuo 282 dentro del dominio B del gen NS5B en el mismo vector de expresión.

Líneas celulares de replicón de VHC

Se analizó cada línea de células y se encontró que era negativa para micoplasma como se detectó por procedimientos de tinción de ADN y PCR de cultivo directo en los Servicios de análisis de micoplasma de la ATCC.

1. La línea de células Huh-7 se derivó de células de hepatoma humano (Nakabayashi H., Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium, Cancer Res.; 1982, 42:3858-3863). Las células Huh-7 se mantuvieron en frascos Corning de 75 cm² en medio de cultivo de Huh-7 a 37 °C con 5 % de CO₂, y se cortaron con tripsina-EDTA a aproximadamente el 80 % de confluencia.

Fuente: Dr. Christoph Seeger, Fox Chase Cancer; Philadelphia, PA

2. La línea de células GS4.1 (Zhu et al. Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells, J. Virol.; 2003, 77:9204-9210) se derivó de la línea de células de hígado humano Huh-7 y posee de manera estable un replicón bicistrónico de VHC. Se mantuvieron las células en frascos Corning de 75 cm² en medio de cultivo de GS4.1 a 37 °C con 5 % de CO₂, y se cortaron con tripsina-EDTA a aproximadamente el 80 % de confluencia.

Fuente: Dr. Christoph Seeger, Fox Chase Cancer; Philadelphia, PA

3. La línea de células 184R-A se derivó cultivando las células de replicón natural en presencia de Compuesto 1 a una concentración de 1 a 5 µM durante > 100 días. La secuenciación de la población indicó que la variante S282T había sobrepasado al tipo natural el día 103.

4. La línea de células 184R-D2 se derivó también cultivando las células de replicón natural en presencia de concentraciones crecientes de Compuesto 1, empezando con 0,9 μM y terminando con 3,6 μM . La mutación S282T apareció en el replicón después de 69 días de selección, y sobrepasó a la variante S282 natural después de 80 días de selección. Se observaron dos mutaciones adicionales, S189P y Y586C en la línea de células del replicón 184R-D.

5. Estas mutaciones no fueron seleccionadas en ningún otro de los replicones resistentes al Compuesto 1 y no han sido implicadas en la resistencia a los análogos de nucleósidos o nucleótidos de VHC.

Reactivos para el ensayo bioquímico

Agua libre de RNasa, Fuente: Applied Biosystems (Nº de catálogo: AM9932); Cloruro de magnesio, Fuente: Sigma-Aldrich (Nº de catálogo: M1028); Cloruro de manganeso, Fuente: Sigma-Aldrich (Nº de catálogo: M1787); Ditiotreitól (DTT), Fuente: Sigma-Aldrich (Nº de catálogo: 43815); α -[^{32}P]GTP, Fuente: Perkin Elmer Life Sciences (Nº de catálogo: NEG 606H); tapa flexible de 96 pocillos, Fuente: BD Falcon (Nº de catálogo: 353913); Placas de fondo en U, flexibles de 96 pocillos, Fuente: BD Falcon (Nº de catálogo: 353911); Fluido de centelleo Microscint-O, Fuente: Perkin Elmer Life Sciences (Nº de catálogo: 6013611); seroalbúmina bovina (BSA) UltraPure a 50 mg/mL, Fuente: Applied Biosystems (Nº de catálogo: AM2616); Placas GF/B Unifilter-96, Fuente: Perkin Elmer Life Sciences (Nº de catálogo: 6005177); Etanol (EtOH) puro, Fuente: Sigma-Aldrich (Nº de catálogo: E7023-4L); Pirofosfato de sodio decahidrato, Fuente: EMD Chemicals (Nº de catálogo: SX0740-1); Triton X-100, Fuente: Sigma-Aldrich (Nº de catálogo: T8787); inhibidor de RNasa SUPERase-In, Fuente: Applied Biosystems (Nº de catálogo: AM2696); Ácido glutámico sal monosódica monohidrato, Fuente: Sigma-Aldrich (Nº de catálogo: G2834); Ácido tricloroacético (TCA), Fuente: EMD Chemicals (Nº de catálogo: TX1045-1), Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5 M, pH 8,0, Fuente: Applied Biosystems (Nº de catálogo: AM9260G); Adenosina trifosfato (ATP), Fuente: GE Healthcare Life Sciences (Nº de catálogo: 27-2056-01); Citidina trifosfato (CTP), Fuente: GE Healthcare Life Sciences (Nº de catálogo: 27-2066-01); Guanosina trifosfato (GTP), Fuente: GE Healthcare Life Sciences (Nº de catálogo: 27-2076-01); Uridina trifosfato (UTP), Fuente: GE Healthcare Life Sciences (Nº de catálogo: 27-2086-01); y oligonucleótidos sintéticos de ARN, Fuente: Dharmacon (Nº de catálogo: síntesis de encargo).

25 Reactivos para el ensayo de replicón y ELISA

Frascos de 75 cm^2 , Fuente: Corning Costar (Nº de catálogo: 430641); Placas de 96 pocillos, Fuente: Corning Costar (Nº de catálogo: 3595); Tripsina-EDTA, Fuente: Cellgro (Nº de catálogo: 25-053-CI); Metanol, Fuente: Burdick & Jackson (Nº de catálogo: AH230-4); Acetona, Fuente: J.T. Baker (Nº de catálogo: 9006-03); Anticuerpo monoclonal de ratón anti NS4A de la hepatitis C (mAb), Fuente: Virogen (Nº de catálogo: 256-A); Solución concentrada de lavado (20X), Fuente: KPL (Nº de catálogo: 50-63-00); Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (HRP) de cabra (H+L), (Nº de catálogo: 81-6520); Orto-fenilendiamina (comprimido OPD), Fuente: Zymed (Nº de catálogo: 00-2003); Peróxido de hidrógeno solución al 30 % (H_2O_2), Fuente: EMD (Nº de catálogo: HXO635-1); Ácido sulfúrico Fuente: Mallinckrodt Chemicals (Nº de catálogo: 2876-05); Solución para ensayo de proliferación de células (basado en MTS) CellTiter 96® Aqueous One, Fuente: Promega (Nº de catálogo: G3582); Ácido cítrico, sal trisódica, dihidrato, Fuente: Sigma-Aldrich (Nº de catálogo: C-8532); Fosfato de sodio, dibásico Fuente: Fisher Chemical (Nº de catálogo: S373-3); Solución de Trizma® hidrocloreuro (Tris-HCl), Fuente: Sigma-Aldrich (Nº de catálogo: T2663-1L); Cloruro de sodio, solución 5,0 M, Fuente: Applied Biosystem (Nº de catálogo: AM9759); Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) solución 0,5 M, Fuente: Sigma-Aldrich (Nº de catálogo: E7889-100 mL); Dimetilsulfóxido, Fuente: Sigma-Aldrich (Nº de catálogo: D2650); Geneticin® (G418), 100X, Fuente: Cellgro (Nº de catálogo: 30-324-CI); Medio de Eagle con modificación de Dulbecco (DMEM), Fuente: Cellgro (Nº de catálogo: 10-013-CV); Suero fetal bovino (FBS), inactivado por calor, Fuente: Cellgro (Nº de catálogo: 35-016-CV); Solución de penicilina/estreptomina (10.000 UI por mL/10.000 μg por mL), Fuente: Cellgro (Nº de catálogo: 30-001-CI); GlutaMAX, dipéptido de L-glutamina (200 mM), Fuente: Gibco (Nº de catálogo: 35050-061); y MEM con aminoácidos no esenciales, Fuente: Cellgro (Nº de catálogo: 25-025-CI).

45 Medios y tampones

En este experimento, se utilizaron los siguientes medios y tampones.

1. Medio de cultivo completo para células Huh-7: DMEM 1X (que contiene glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio), suplementado con suero fetal bovino al 10 %, 100 UI/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina, GlutaMAX 2 mM, y MEM al 1 % con aminoácidos no esenciales.
- 50 2. Medio de cultivo/selección completo para células naturales y células de replicón 184R: DMEM 1X (que contiene glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio), suplementado con suero fetal bovino al 10 %, 100 UI/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina, GlutaMAX 2 mM, MEM al 1 % con aminoácidos no esenciales, y 0,5 mg/mL de geneticina (G418).
3. Medio de ensayo: medio de cultivo completo de Huh-7 con DMSO al 1 %
- 55 4. Solución de lavado para ELISA: solución de lavado KPL diluida 1X en dH_2O
5. FBS-TNE al 10 %: Tris-HCl 50 mM (pH 7,5; Sigma), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM con FBS al 10 %

6. Tampón de citrato/fosfato: ácido cítrico 16 mM, Na₂HPO₄ 27 mM

7. Solución de OPD: 1 comprimido de OPD + 12 mL de tampón de citrato/fosfato + 5 mL de H₂O₂ al 30 % por placa.

I: Ensayos de polimerasa de VHC *in vitro*

5 En este experimento, se realizó la evaluación de la inhibición de la actividad de polimerasa *in vitro*, de las polimerasas de VHC, natural y mutante S282T, por la RBV-TP y el Compuesto 7.

Generación de las polimerasas naturales y mutantes S282T de VHC 1b

Se expresaron enzimas polimerasas de VHC de tipo natural con cola de hexa-histidina en el carboxi terminal y de S282T, y se purificaron hasta 85-90 % de pureza a partir de células BL21 de E. coli (DE3) utilizando un procedimiento de cromatografía de afinidad a níquel de una sola etapa.

10 Preparación de soluciones de compuestos

Se prepararon stocks de Compuesto 7 y de ribavirina-TP como soluciones 10 mM en agua libre de nucleasa y se conservaron en pequeñas alícuotas a -20 °C.

15 Se prepararon ocho diluciones seriadas de RBV-TP y de Compuesto 7 recientes en una solución acuosa de ATP 5 μM dando unas concentraciones finales de fármaco de ensayo de 1000 - 0,46 μM (RBV-TP) y 100 - 0,05 μM (Compuesto 7).

Ensayo bioquímico de la polimerasa de VHC para determinaciones de IC₅₀

20 Se realizó este ensayo para medir el efecto inhibitor del fármaco sobre la incorporación de α-[³³P]GMP a un material precipitable con ácido tricloroacético (TCA). Se recogió el producto radiomarcado por filtración sobre placas filtrantes de 96 pocillos y se cuantificó por conteo por centelleo líquido. Se utilizó un oligonucleótido sintético de ARN como modelo para la síntesis de una cadena complementaria de ARN.

- Se prepararon placas flexibles de 96 pocillos que contenían los artículos de ensayo como sigue: se transfirieron 10 μL de RBV-TP o compuesto 7 diluidos seriadamente en ATP 5 μM a pocillos triplicados en columnas adyacentes. Se mantuvieron las placas sobre hielo antes de la adición de la enzima.
- Se añadieron 10 μL de EDTA 500 mM a la columna 1 de la placa de ensayo para determinar la radiactividad de fondo.
- Se añadieron 10 μL de ATP 5 μM a las columnas 2 y 3 de la placa de ensayo para el control sin fármaco.
- Se preparó el cóctel de reacción a granel sobre hielo; para empezar las reacciones se añadieron 40 μL de cóctel de reacción a cada pocillo del ensayo. De este modo, el volumen final de la reacción fue de 50 μL. Las concentraciones finales de todos los reactivos en las reacciones se dan a continuación en la Tabla 60:

30 Tabla 60

Reactivo	Concentración
Glutamato de sodio	20 mM
Cloruro de magnesio	4 mM
Cloruro de manganeso	1 mM
Ditiotreitol	10 mM
Triton X-100	0,1 %
Inhibidor de RNasa	5 unidades/reacción
Seroalbúmina bovina	50 μg/mL
ATP	1 μM
CTP	1 μM
UTP	1 μM
GTP	50 nM
α-[³³ P]GTP	0,1 μCi/reacción
Modelo ARN	30 nM
VHC 1b polimerasa	60 nM
Compuesto 7 o RBV-TP	variable, como se describe
Agua libre de nucleasa	c.s. hasta un volumen final de 50 μL

- Se incubaron las reacciones a 30 °C durante 2 h.
- Se terminaron las reacciones por la adición de 50 µL de solución de precipitación (TCA al 22,5 %, pirofosfato de sodio 25 mM, enfriada en hielo), seguido por incubación sobre hielo durante al menos 20 minutos.
- 5 • Se hizo la recolección de las placas en un Packard Unifilter Harvester (Perkin Elmer Life Sciences) utilizando placas filtrantes GF/B (Perkin Elmer Life Sciences) prelavadas con pirofosfato de sodio 0,1 M. Se lavaron concienzudamente las placas con agua desionizada seguida por un lavado con etanol para ayudar a secar.
- Se dejaron secar al aire las placas, seguido por la adición de MicroScint-O (35 µL por pocillo; Perkin Elmer Life Sciences). Se contaron las placas en un contador de centelleo líquido Packard TopCount (Perkin Elmer Life Sciences).
- 10 • Se calcularon los valores de IC₅₀ a partir de las curvas dosis-respuesta de un único sitio mediante las ecuaciones que definen la recta de mejor ajuste determinadas con el software XLfit 4.1.

La inhibición *in vitro* de la NS5B de VHC natural (genotipo 1b) por la Ribavirina-TP y el Compuesto 7 se detalla en la Tabla 61 que sigue (los valores de IC₅₀ en µM)

Tabla 61

Identidad del compuesto	N	Tipo natural	S282T
Ribavirina-TP (Moravek M1593)	3	883,4 ± 378	45,9 ± 16,2
Compuesto 7	3	0,27 ± 0,06	2,61 ± 0,72

- 15 Como se ve en la Tabla 61, el RBV-TP presentó una inhibición marginal de la NS5B natural de genotipo 1b y fue >3.000 veces menos activo que el Compuesto 7 *in vitro*. La enzima mutante S282T fue 9,73 ± 1,79 veces menos susceptible a la inhibición por el Compuesto 7 como se ve por el valor medio de IC₅₀ de 2,61 ± 0,72 µM. Por
- 20 contraste, el RBV-TP presentó mejor actividad *in vitro* frente a la polimerasa mutante S282T como se ve por la IC₅₀ 19,2 veces más baja, de 45,9 ± 16,2 µM.

Estos datos indican un perfil diferente de resistencia cruzada de RBV-TP y Compuesto 7 frente a la enzima mutante S282T *in vitro* e implican que la ribavirina puede contrarrestar la aparición de la mutación de resistencia S282T cuando se usa en combinación con el Compuesto 1.

- 25 En ciertas realizaciones, el interferón puede contrarrestar la aparición de la mutación de resistencia S282T cuando se usa en combinación con el Compuesto 1.

La Tabla 62 proporciona los números de cambios desde tipo natural a mutante S282T.

Tabla 62

Identidad del compuesto	N	Tipo natural	S282T
Ribavirina-TP (Moravek M1593)	3	1	0,06 ± 0,02
Compuesto 7	3	1	9,73 ± 1,79

- 30 La enzima mutante S282T fue 9,73 ± 1,79 veces menos susceptible a la inhibición por el Compuesto 7 como se ve por el valor medio de IC₅₀ de 2,61 ± 0,72 µM (Tabla 61, Tabla 62). Por contraste, el RBV-TP presentó mejor actividad *in vitro* frente a la polimerasa mutante S282T como se ve por la IC₅₀ 19,2 veces más baja, de 45,9 ± 16,2 µM (Tabla 61).

II: A. Actividad antivírica de la ribavirina sobre líneas celulares estables que llevan replicones de VHC, naturales o con S282T

En este estudio se determinó la actividad *in vitro* anti-VHC de ribavirina y Compuesto 1 en líneas celulares estables que llevan replicones de genotipo 1b naturales o con S282T resistentes al Compuesto 1.

Ensayo del replicón de VHC con RBV y Compuesto 1

Tratamiento con fármaco

5 Se utilizó el siguiente protocolo:

1. Se sembraron las columnas 2-12 de placas de 96 pocillos con células de replicones naturales (GS4.1) o de replicones con S282T (184R-A y 184R-D2) a una densidad de $7,5 \times 10^3$ células por pocillo en 50 μ L de medio de cultivo completo. Se sembraron células Huh-7 en la columna 1 de cada placa a una densidad similar.

10 2. Se diluyeron el Compuesto 1 y la RBV en medio de ensayo como stocks 2X. Se prepararon ocho diluciones adicionales de 3 veces en serie de cada compuesto a partir de los stocks 2X en medio de ensayo. Las concentraciones finales de fármaco variaron de 100 a 0,015 μ M.

3. Se incubaron las células a 37 °C/5 % de CO₂ durante al menos cuatro horas, y después se inició el tratamiento con el fármaco añadiendo 50 μ L de las diluciones seriadas de fármaco RBV y Compuesto 1. Esta adición se realizó por duplicado en cada placa de 96 pocillos.

15 4. Se incubaron las células con inhibidores durante tres días a 37 °C/5 % de CO₂.

ELISA del replicón de VHC

Se utilizó el siguiente protocolo para el ensayo del replicón de VHC:

1. Después de tres días de tratamiento con fármaco, se separó el medio de las placas con un golpeteo suave y se fijaron las células a las placas con 100 μ L/pocillo de acetona:metanol 1:1.

20 2. Después de un minuto de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las placas tres veces con 100 μ L/pocillo de solución de lavado de ELISA y se bloquearon después con 150 μ L/pocillo de FBS-TNE al 10 %.

3. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las placas tres veces con 100 μ L/pocillo de solución de lavado de ELISA, y después se añadieron 100 μ L/pocillo de mAb de ratón anti NS4A de la hepatitis C (1 mg/mL de stock diluido 1:1.500 en FBS-TNE al 10 %).

25 4. Después de 2 horas de incubación a 37 °C, se lavaron las placas tres veces con 100 μ L/pocillo de solución de lavado de ELISA, y después se añadieron 100 μ L/pocillo de anticuerpo anti-ratón HRP de cabra (diluido 1:4.000 en FBS-TNE al 10 %).

4. Después de un período de incubación de una hora a 37 °C, se lavó cada placa tres veces con 100 μ L/pocillo de solución de lavado de ELISA. Se inició entonces el desarrollo del color con 100 μ L/pocillo de solución OPD.

30 5. Después de un período de incubación de 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, se pararon las reacciones añadiendo 100 μ L de H₂SO₄ 2 N a cada pocillo.

6. Se midió la absorbancia a 490 nm en un contador multietiqueta Victor3 V 1420 (Perkin Elmer). Se calculó para cada fármaco el tanto por ciento de inhibición de la replicación del replicón de VHC utilizando la media de los pocillos duplicados. Se calculó el valor de la concentración eficaz al 50 % (EC₅₀) para el Compuesto 1 y para la RBV a partir de las ecuaciones que definen la recta de mejor ajuste determinadas por el software XLfit 4.1.

35

Determinación de la citotoxicidad de RBV y de Compuesto 1 en células GS4.1 utilizando el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna (MTS)

Se pusieron las células en placas y se trataron con inhibidores como se ha descrito anteriormente.

40 Después de tres días de tratamiento con fármaco, se añadieron 20 μ L de MTS a cada pocillo, y después se incubaron las placas a 37 °C/5 % de CO₂ durante 3 horas.

Se midió la absorbancia a 490 nm en un contador multietiqueta Victor3 V 1420 (Perkin Elmer). El valor de la concentración citotóxica al 50 % (CC50) para cada fármaco y combinación de fármacos se determinó a partir de las ecuaciones que definen la recta de mejor ajuste determinadas por el software XLfit 4.1.

45 En las condiciones experimentales usadas en este estudio, no se observaron signos de citotoxicidad *in vitro* en las células de replicón natural o con S282T tratadas con concentraciones de hasta 100 μ M de Compuesto 1 o de RBV, véase, la Tabla 63. El Compuesto 1 presentó la actividad antivírica esperada en las células GS4.1 que llevan el replicón natural de VHC y en las células que llevan el replicón con el mutante S282T. Las medias de los valores de EC₅₀ determinadas a partir de 3 conjuntos independientes de datos experimentales se dan en la Tabla 63. La Tabla 64 proporciona los números de cambios desde el tipo natural a mutante S282T.

Tabla 63: Actividad antivírica y citotoxicidad de ribavirina y Compuesto 1 en líneas celulares con replicón de VHC de tipo natural y con S282T

Compuesto	N ^a	GS4.1 ^d (tipo natural)		184R-A ^e (S282T)		184R-D2 ^e (S282T)	
		EC ₅₀ ^b (μM)	CC ₅₀ ^c (μM)	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
Ribavirina	3	38 ± 2,8	>100	12,3 ± 1,9	>100	17 ± 3,5	>100
Compuesto 1	3	0,3 ± 0,06	>100	9 ± 0,9	>100	39 ± 10	>100

^aN= número de experimentos independientes

^bEC₅₀ = 50 % de concentración eficaz ± desviación típica

^cCC₅₀ = concentración citotóxica que reduce la viabilidad de las células en un 50 % en cultivo celular como se determina por el ensayo MTS.

^dGS4.1 = línea celular del hepatoma humano que lleva el replicón con1 de VHC tipo natural

^e184R-A & 184R-D2 = Compuesto 1 seleccionado de líneas celulares de replicón que contienen la señal de mutación S282T

Tabla 64. Número de cambios desde el tipo natural

Compuesto	GS4.1 (tipo natural).	184R-A (S282T)	184R-D2 (S282T)
Ribavirina	1	0,32	0,45
Compuesto 1	1	30	130

Se determinó el número de cambios dividiendo la EC₅₀ obtenida en las líneas celulares resistentes al Compuesto 1 por la EC₅₀ obtenida en las células de tipo natural.

5 La ribavirina tiene una actividad anti-VHC medible con una media de EC₅₀ de 38 ± 2,8 μM en células de replicón GS4.1 natural y, por tanto fue aproximadamente 126 veces menos activa que el Compuesto 1. Sin embargo, cuando se analizó en las dos líneas celulares de replicones resistentes al Compuesto 1, 184R-A y 184R-D2, la ribavirina demostró un aumento en la actividad de 2 a 3 veces como se indica por los valores más bajos de la media de EC₅₀ de 12,3 ± 1,9 μM (184R-A) y 17 ± 3,5 μM (184R-D2) (Tabla 63).

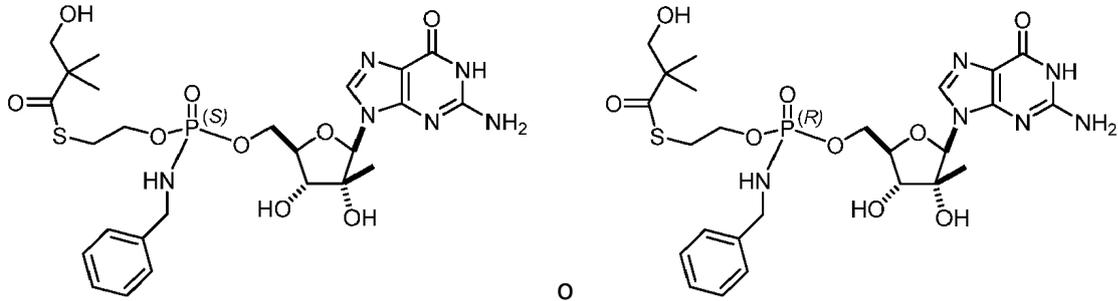
10 Estos datos del replicón de VHC parecen confirmar el hecho de que la RBV es realmente más activa frente al replicón de VHC con mutante S282T que frente al replicón natural en donde la actividad de RBV es muy difícil de medir porque se solapa con la citotoxicidad del compuesto.

15 La mejor actividad de RBV frente a la polimerasa mutante S282T parece que es concordante con que la RBV es un agente antiviral directo frente a la cepa mutante de VHC, aunque no se han descartado otros mecanismos de acción de la RBV. En resumen, la ribavirina y su metabolito activo RBV-TP parecen demostrar una mejor actividad antivírica *in vitro* frente a la variante S282T y no presentan signos de resistencia cruzada y/o de antagonismo al Compuesto 1 y Compuesto 7 con respecto al replicón de VHC que lleva la señal de la mutación S282T de VHC de resistencia al

20 Compuesto 1 (2'-C-metil- nucleósido)

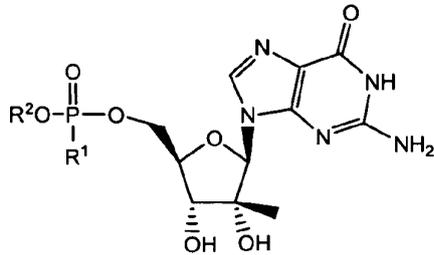
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto diastereoisoméricamente puro que tiene la fórmula



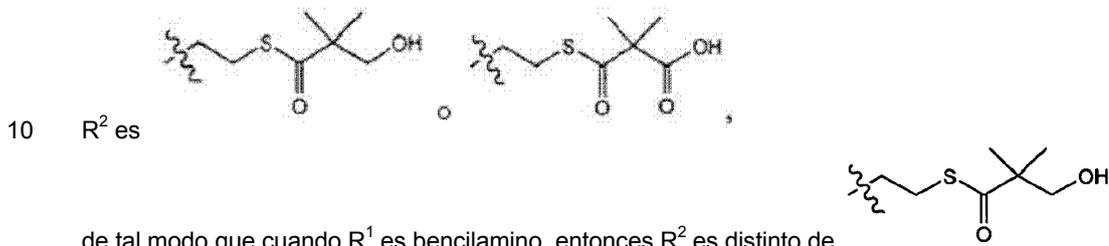
o una de sus sales, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables.

5 2. Un compuesto purificado que tiene la fórmula

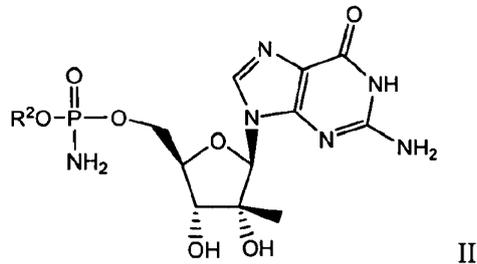


o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en donde

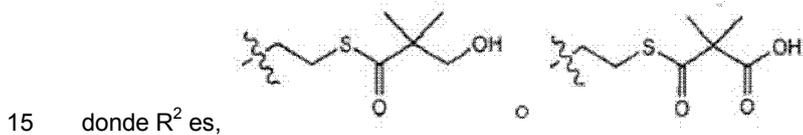
R¹ es hidroxilo, amino o bencilamino; y



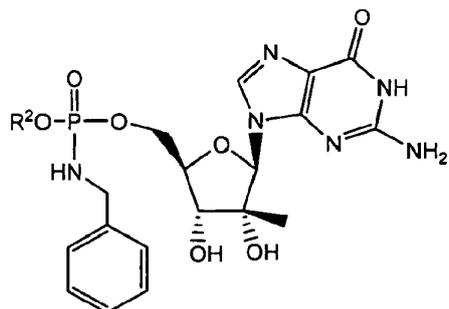
3. El compuesto purificado de la reivindicación 2, en donde el compuesto tiene la fórmula II:



o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en

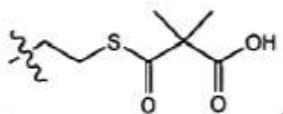


4. El compuesto purificado de la reivindicación 2, en donde el compuesto tiene la fórmula III:



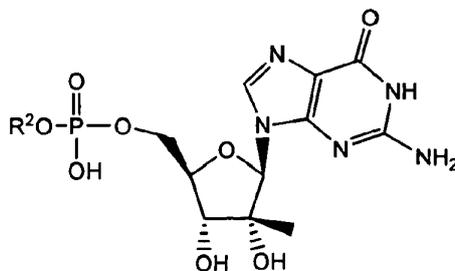
III

o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en



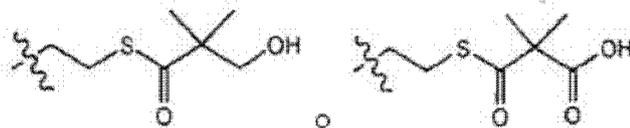
donde R² es,

5. El compuesto purificado de la reivindicación 2, en donde el compuesto tiene la fórmula IV:



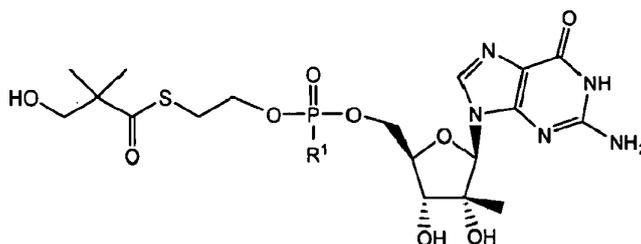
IV

o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en



donde R² es

6. El compuesto purificado de la reivindicación 2, en donde el compuesto tiene la fórmula V:

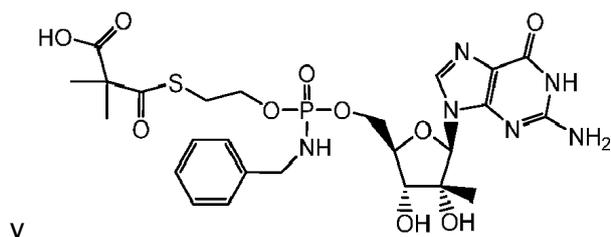
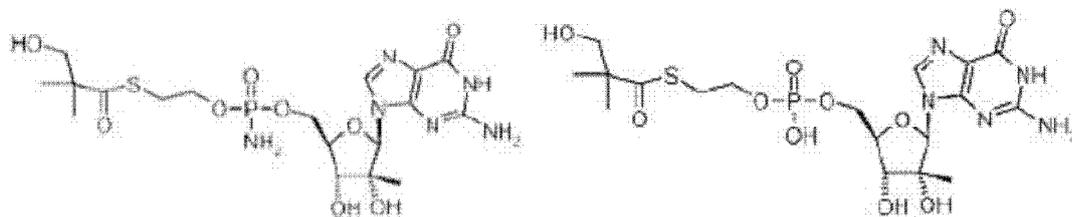


V

10

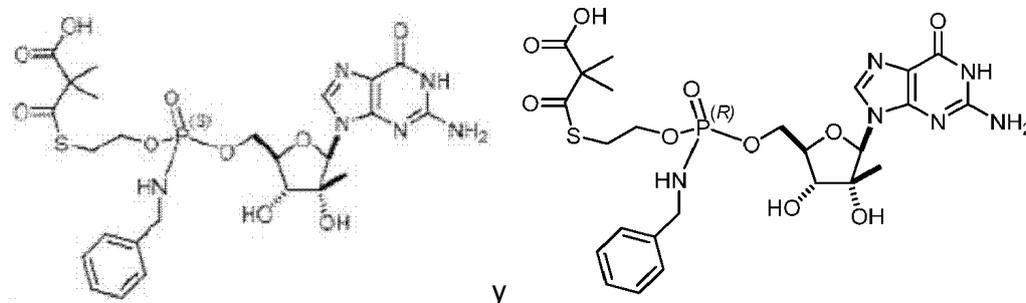
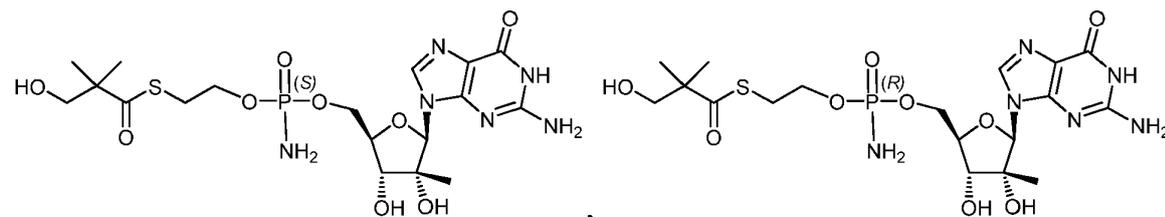
o una de sus sales, solvatos, hidratos, formas estereoisómeras o tautómeras farmacéuticamente aceptables, en donde R¹ es hidroxilo o amino.

7. El compuesto purificado de la reivindicación 2, en donde el compuesto se selecciona de:



y

5 8. El compuesto purificado de la reivindicación 2, en donde el compuesto se selecciona de:



y

9. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en donde la composición es una formulación oral.

11. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso en un método para el tratamiento de un hospedante infectado con un virus de la familia *Flaviviridae*.

12. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso en el método de la reivindicación 11, en donde el virus es el virus de la hepatitis C, y/o en donde el hospedante es un ser humano.

15 13. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso en el método de la reivindicación 11, en donde el método comprende además administrar un segundo agente antiviral seleccionado del grupo que consiste en un interferón, una ribavirina, una interleucina, un inhibidor de la proteasa NS3, un inhibidor de la cisteína proteasa, una fenantrenoquinona, un derivado de tiazolidina, una tiazolidina, una benzanilida, un inhibidor de helicasa, un inhibidor de polimerasa, un análogo de nucleótido, una gliotoxina, una cerulenina, un oligodesoxinucleótido antisentido con fosforotioato, un inhibidor de la traducción dependiente del IRES, y una ribozima;

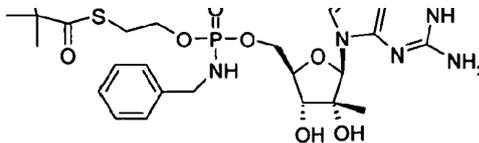
20

en donde el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en interferón alfa 2a pegilado, interferón alfacon-1, interferón natural, albuferón, interferón beta-1a, interferón omega, interferón alfa, interferón gamma, interferón tau, interferón delta e interferón γ -1b; o

en donde el segundo agente es opcionalmente ribavirina.

14. Un método para preparar el compuesto purificado de cualquiera de las reivindicaciones 2-8, que comprende:

(a) poner en contacto un compuesto I precursor que tiene la fórmula:



Compound 1

1

5 con composiciones de hepatocitos o microsomas hepáticos para dar una mezcla; y

(b) aislar el compuesto de la mezcla;

en donde el aislamiento comprende opcionalmente eluir el compuesto de una columna de fase inversa que contiene un medio.

FIG. 1

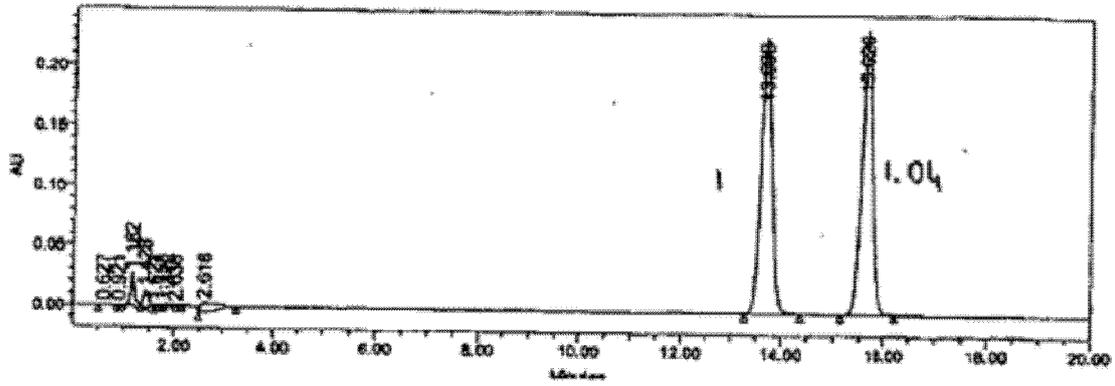


FIG. 2

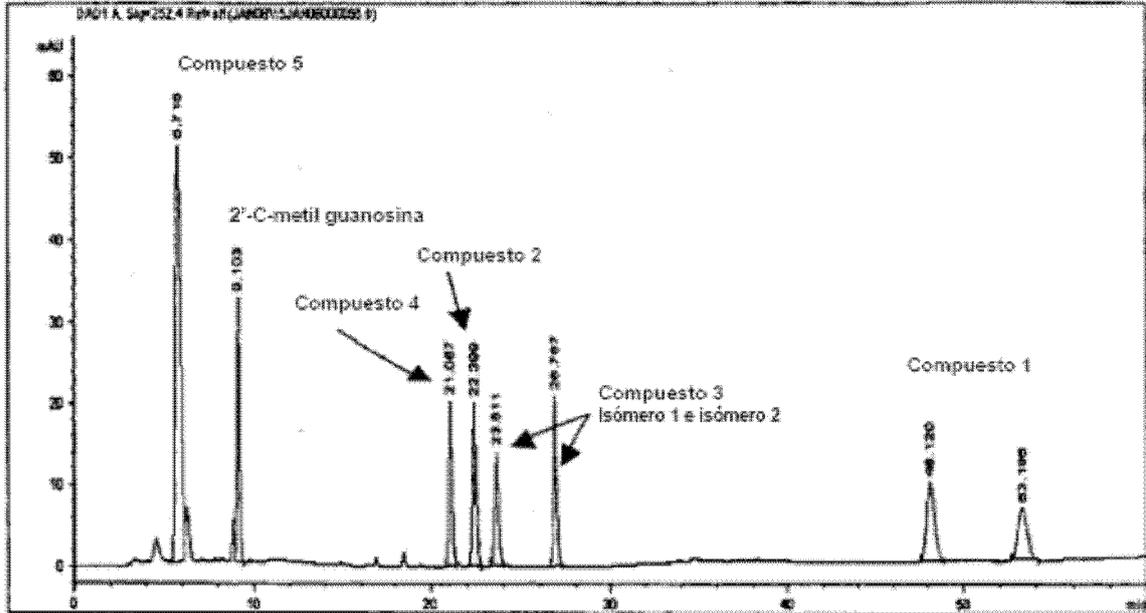


FIG. 3

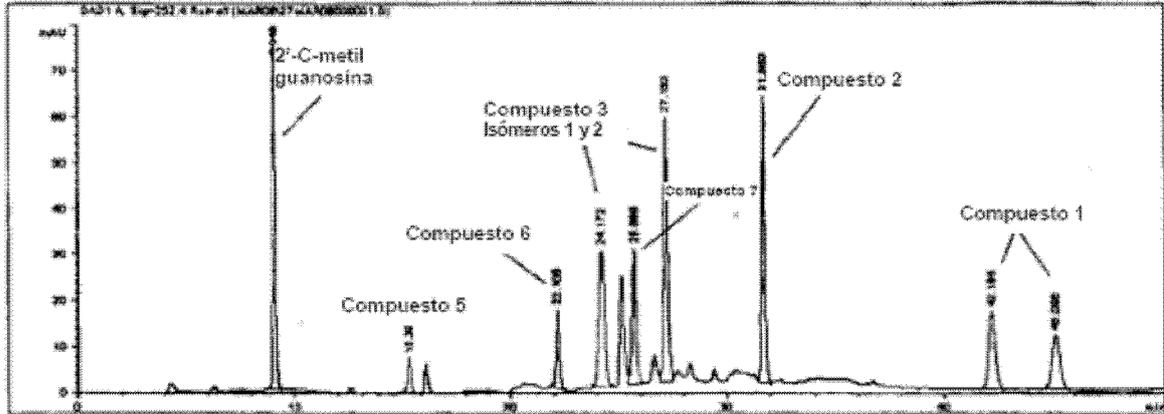


FIG. 4

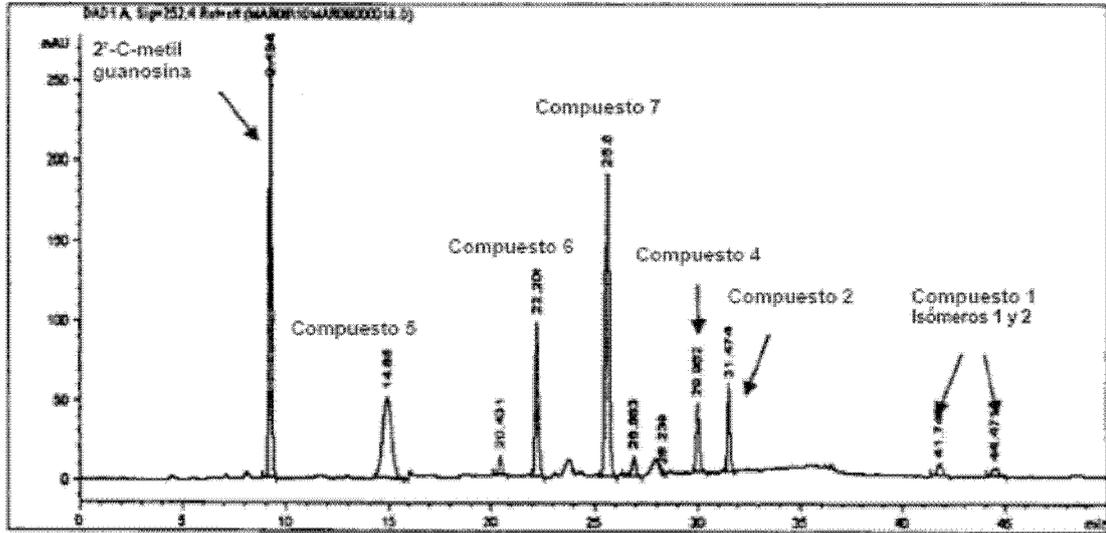


FIG. 5

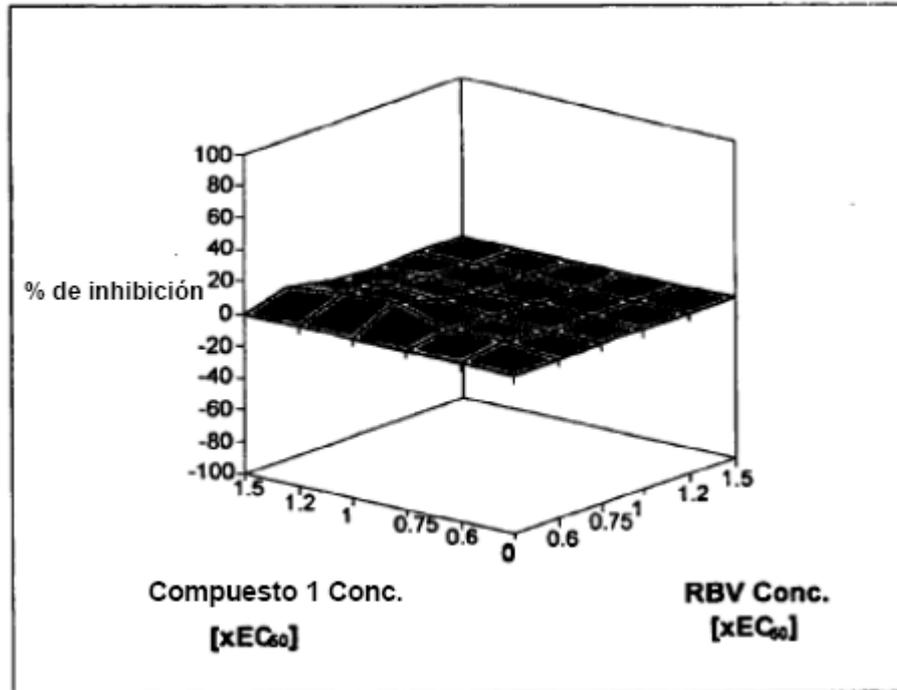


FIG. 6

