

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 002**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2003 E 03770334 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 1572095**

54 Título: **β -L-2' desoxinucleósidos para el tratamiento de cepas de VHB resistentes**

30 Prioridad:

13.09.2002 US 410675 P

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

30.09.2015

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**STANDRING, DAVID;
SOMMADOSSI, JEAN-PIERRE;
PATTY, APRIL L. y
SEIFFER, MARIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 547 002 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

β -L-2' desoxinucleósidos para el tratamiento de cepas de VHB resistentes

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud Provisional No. 60/410.675, presentada el 13 de septiembre, 2002.

5 Campo de la invención

La presente invención incluye 2'-desoxi- β -L-nucleósidos para el tratamiento de cepas de hepatitis B que presentan resistencia a fármacos anti-VHB conocidos, así como terapias de combinación con 2'-desoxi- β -L-nucleósidos con inmunomoduladores.

Antecedentes de la invención

10 El virus de la hepatitis B ("VHB") sólo es segundo después del tabaco como una causa de cáncer humano. El mecanismo por el que VHB induce cáncer no se conoce, aunque se postula que puede desencadenar directamente el desarrollo de tumor, o desencadenar indirectamente el desarrollo de tumor a través de inflamación crónica, cirrosis y regeneración celular asociada con la infección.

15 El virus de la hepatitis B ha alcanzado niveles epidémicos en todo el mundo. Después de un periodo de incubación dos a seis meses en el que el huésped no es consciente de la infección, la infección por VHB puede dar lugar a hepatitis aguda y daño hepático, que causa dolor abdominal, ictericia, y niveles sanguíneos elevados de determinadas enzimas. VHB puede causar hepatitis fulminante, una forma rápidamente progresiva, frecuentemente mortal, de la enfermedad en la que se destruyen secciones masivas del hígado. Los pacientes se recuperan típicamente de la hepatitis viral aguda. En algunos pacientes, sin embargo, persisten altos niveles de antígeno viral en la sangre durante un periodo prolongado, o indefinido, causando una infección crónica. Las infecciones crónicas pueden dar lugar a hepatitis persistente crónica. Los pacientes infectados con VHB persistente crónico son más comunes en los países en desarrollo. La hepatitis persistente crónica puede causar fatiga, cirrosis del hígado y carcinoma hepatocelular, un cáncer hepático primario. En los países occidentales industrializados, los grupos de alto riesgo para infección por VHB incluyen aquellos en contacto con portadores de VHB o sus muestras sanguíneas. La epidemiología de VHB es de hecho muy similar a la del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, lo que explica por qué la infección por VHB es común entre pacientes con SIDA o infecciones asociadas con VIH. Sin embargo, VHB es más contagioso que VIH.

Hasta la fecha, la FDA sólo ha aprobado tres fármacos para el tratamiento de infección crónica por VHB: interferón alfa, 3TC (Epivir, lamivudina) y adefovir dipivoxil (Hepsera® Gilead Sciences).

30 Fármacos aprobados por la FDA para VHB:

Nombre del Fármaco	Clase de Fármaco	Empresa	Estado FDA
Intron A (interferón α -2b)	interferón	Schering-Plough	aprobado por la FDA
3TC (lamivudina; Epivir-VHB)	análogo de nucleósido	GlaxoSmithKline	aprobado por la FDA
Adefovir dipivoxil	análogo de nucleótido	Gilead Sciences	aprobado por la FDA

Interferón alfa

Una forma fabricada de interferón se usa para tratar la hepatitis B. Este tratamiento implica la administración de interferón por inyección durante aproximadamente cuatro meses.

35 No todos los pacientes responden a interferón, y algunas veces es necesario el retratamiento. En estudios clínicos, sólo el 45% de los pacientes que se trataron para hepatitis B con A (Interferón alfa-2b, recombinante, Schering Corporation) para inyección no tuvieron evidencia del virus de la hepatitis B en su sangre con el tiempo. Además, la mayor parte de los pacientes tienen dificultad para tolerar el tratamiento con interferón, que causa síntomas semejantes a la gripe graves, pérdida de peso, y ausencia de energía y vigor.

40 3TC

El enantiómero (-) de BCH-189 (2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina), también conocido como 3TC (Epivir, lamivudina), es un fármaco antiviral que es activo tanto frente a VIH como VHB. Pertenece a la clase de fármacos denominada inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósido (NRTI), que funcionan bloqueando la producción de la enzima transcriptasa inversa que VIH y VHB necesitan con el fin de replicarse. 3TC se desarrolló originalmente para el tratamiento de VIH, sin embargo, los investigadores han descubierto que 3TC también funciona frente al virus de

la hepatitis B. En diciembre de 1998, la U.S. Food and Drug Administration (FDA) aprobó Epivir VHB para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B.

Aunque 3TC inhibe eficazmente la replicación de VHB, las cinéticas lentas de la eliminación viral durante la terapia con 3TC (Nowak, M., S. Bonhoeffer, et al. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4398-4402) y la variabilidad espontánea del genoma viral dan lugar al surgimiento de mutantes resistentes al fármaco que portan mutaciones que afectan el dominio de la transcriptasa inversa (RT) (Mason, W. S., J. Cullen, et al. 1998. *Virology* 245:18-32. Nafa, S., S. Ahmed, et al. 2000. *Hepatology* 32:1078-1088; Melegari, M., P. P. Scaglioni, y J. R. Wands. 1998. *Hepatology* 27:628-633.; Seignerres, B., C. Pichoud, et al. 2000. *J. Infect. Dis.* 181:1221-1233). Aproximadamente el 50% de los pacientes tratados desarrollan resistencia viral después de 3 años de tratamiento con 3TC (Leung, N. W., C. L. Lai, et al. 2001. *Hepatology* 33:1527-1532). La resistencia a análogos de nucleósido está asociada con sustituciones en la secuencia de ácido nucleico del gen de la polimerasa causando cambios en la secuencia de aminoácidos de la RT de VHB, principalmente en el resto YMDD en el sitio catalítico. La variante de polimerasa más común es el cambio rtL180M-más-M204V (según la nomenclatura reciente independiente de genotipo para variantes de VHB resistentes a fármaco) (Stuyver, L. J., S. A. Locarnini, et al. 2001. *Hepatology* 33:751-757) que asocia una mutación en el sitio catalítico (rtM204V) con una mutación compensatoria en el dominio B de la RT (rtL180M) que proporciona una mayor capacidad de replicación a la variante del sitio catalítico (Allen, M. I., M. Deslauriers, et al. 1998. *Hepatology*, 27:1670-1677. Chayama, K., Y. Suzuki, et al. 1998. *Hepatology* 27:1711-1716. Melegari, M., P. P. Scaglioni, y J. R. Wands. 1998. *Hepatology* 27:628-633. Ono, S. K., N. Kato, et al. 2001. *J. Clin. Investig.* 107:449-455. Seignerres, B., S. Aguesse-Germon, et al. 2001. *J. Hepatol.* 34:114-122).

20 Adefovir dipivoxil (Hepsera)

El 20 de septiembre, 2002, la U.S. Food and Drug Administration aprobó adefovir dipivoxil para el tratamiento de hepatitis B crónica. HEPSERA™ es la marca registrada para adefovir dipivoxil, un profármaco diéster de adefovir. Adefovir es un análogo de nucleótido ácido de adenosina monofosfato que inhibe la ADN polimerasa del virus de la hepatitis B (VHB) compitiendo con el sustrato natural desoxiadenosina trifosfato y causando la terminación de la cadena del ADN después de su incorporación en ADN viral. El nombre químico de adefovir dipivoxil es 9-[2-[bis[(pivaloiloxi)metoxi]fosfinil]metoxi]-etil]adenina. Adefovir se fosforila al metabolito activo, adefovir difosfato, por quinasas celulares. Véanse, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 5.641.763 y 5.142.051, tituladas, N-phosphonylmethoxyalkyl derivatives of pyrimidine and purine bases and a therapeutical composition therefrom with antiviral activity.

30 Cepas de VHB resistentes

Lamivudina es un L-nucleósido para el tratamiento de VHB que resulta frecuentemente en la selección de cepas resistentes del virus que pueden discriminar entre el L-nucleósido no natural y el D-nucleósido, los sustratos naturales, y en particular los mutantes únicos, mutante YMDD (M552I o M552V) y L528M, y el doble mutante (L528M/M552V). Véanse las Patentes U.S. Nos. 6.242.187 y 6.265.181; y la Publicación Internacional No. WO 01/04358. Véase también: Ahmed et al. "Early Detection of Viral Resistance by Determination of Hepatitis B Virus Polymerase Mutations in Patients Treated by Lamivudine for Chronic Hepatitis B" *Hepatology*, 2000, 32 (5), 1078-1088; Ono et al. "The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance" *Journal of Clinical Investigation*, febrero 2001, 107 (4), 449-455; Allen "Identification and Characterization of Mutations in Hepatitis B Virus Resistant to Lamivudine" *Hepatology*, 1998, 7 (6), 1670-1677; Das et al. "Molecular Modeling and Biochemical Characterization Reveal the Mechanism of Hepatitis B virus Polymerase Resistance to Lamivudine (3TC) and Emtricitabine (FTC)" *Journal of Virology*, mayo 2001, 75 (10), 4771-4779; Delaney "Cross-Resistance Testing of Antihepadnaviral Compounds using Novel Recombinant Baculoviruses which Encode Drug-Resistant Strains of Hepatitis B Virus" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, junio 2001, 45 (6), 1705-1713; Fu "Role of Additional Mutations outside the YMDD Motif of Hepatitis B Virus Polymerase in L(-)-SddC (3TC) Resistance" *Biochemical Pharmacology*, 1998, 55 (10), 1567-1572; Fu "Sensitivity of L(-)-2',3'-Dideoxythiacytidine Resistant Hepatitis B Virus to Other Antiviral Nucleoside Analogues" *Biochemical Pharmacology*, 1999, 57 (12), 1351-1359; Gauthier "Quantitation of Hepatitis B Viremia and Emergence of YMDD Variants in Patients with Chronic Hepatitis B Treated with Lamivudine" *The Journal of Infection Diseases*, diciembre 1999, 180, 1757-1762; Kioko "YMDD Motif in Hepatitis B Virus DNA Polymerase Influences on Replication and Lamivudine Resistance: A Study by *In Vitro* Full-Length viral DNA Transfection" *Hepatology*, marzo 1999, 29 (3), 939-945; Kioko "Susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to other reverse transcriptase inhibitors" *The Journal of Clinical Investigation*, junio 1999, 3 (12), 1635-1640; Zoulim "Drug therapy for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and influence of hepatitis B virus polymerase mutations on the outcome of therapy" *Journal of Hepatology*, 1998, 29, 151-168; y Ying et al. *J. Viral Hepat.*, marzo 2000, 7 (2), 161-165.

En estudios clínicos controlados de lamivudina (100 mg cd) administrado a pacientes infectados con VHB, la prevalencia del mutante de VHB YMDD fue 14 a 32% después de un año de tratamiento y tanto como 58% después de dos a tres años de tratamiento. El virus mutante se asoció con evidencia de respuesta disminuida al tratamiento respecto a pacientes tratados con lamivudina sin mutaciones YMDD. Ono et al. *The Journal of Clinical Investigation*, 2001, 107 (4), 449-455.

El análisis genotípico de aislados virales obtenidos de pacientes con replicación renovada de VHB mientras recibían lamivudina sugiere que una reducción en la sensibilidad de VHB a lamivudina está asociada con mutaciones que resultan en una sustitución metionina a valina o isoleucina en el resto YMDD del dominio catalítico de la polimerasa de VHB (posición 552) y una sustitución leucina a metionina en la posición 515 ó 528 (dependiendo del genotipo/subtipo de VHB).

Actualmente, no hay un sistema de infección de VHB basado en células que pueda usarse para evaluar la actividad de agentes antivirales frente a células infectadas con aislados de VHB resistentes a lamivudina de pacientes. El modelo de VHB de pato (DVHB) *in vitro* no se ha demostrado útil para seleccionar mutaciones resistentes al fármaco porque los hepatocitos primarios de pato usados en este modelo no pueden mantenerse durante más de unas pocas semanas en cultivo celular. La relevancia de la selección de mutantes resistentes al fármaco en el modelo de marmota *in vivo* es dudosa porque el espectro de mutantes resistentes a lamivudina en la marmota no concuerda con el identificado en los pacientes infectados con VHB.

Interferones

El interferón es una proteína producida naturalmente por el cuerpo para modular el sistema inmune y para regular otras funciones celulares. Las principales clases de interferones son interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón omega e interferón tau. Los interferones pueden modificarse para incrementar la estabilidad *in vivo*, dichas modificaciones incluyen pegilación, u otros medios para aumentar la estabilidad de la molécula.

Los ejemplos de la clase de interferón alfa de interferones incluyen interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2b pegilado, ROFERON®-A (interferón alfa-2a, Roche), PEGASYS® (interferón alfa-2a pegilado, Roche), INTRON®A (interferón alfa-2b, Schering Corporation), PEG-INTRON® (interferón alfa-2b pegilado, Schering Corporation), interferón de consenso, INFERGEN (interferón alfacon-1) por InterMune, OMNIFERON (interferón natural) por Viragen, ALBUFERON por Human Genome Sciences, Interferón Alfa Oral por Amarillo Biosciences, y SuperFeron (IFN-alfa humano natural multi-subtipo, Genetrol, Inc.).

Otros tipos de interferón incluyen: interferón beta, interferón gamma, interferón tau, interferón omega, REBIF (interferón beta-1a) por Ares-Serono, Interferón Omega por BioMedicine, interferón gamma-1b por InterMune, y HuFeron (IFN-beta humano, Genetrol, Inc.).

Los tratamientos diarios con interferón α , una proteína producida por ingeniería genética, se han mostrado prometedores. También se ha desarrollado una vacuna derivada de suero humano para inmunizar pacientes frente a VHB. Las vacunas se han producido mediante ingeniería genética. Aunque se ha encontrado que la vacuna es efectiva, la producción de la vacuna es problemática porque el suministro de suero humano de portadores crónicos es limitado, y el procedimiento de purificación es largo y costoso. Además, cada lote de vacuna preparado a partir de diferente suero debe ensayarse en chimpancés para asegurar la seguridad. Además, la vacuna no ayuda a los pacientes ya infectados con el virus.

Una etapa esencial en el modo de acción de nucleósidos de purina y pirimidina frente a enfermedades virales, y en particular, VHB y VIH, es su activación metabólica por quinasas celulares y virales, para rendir derivados mono, di y trifosfato. Las especies biológicamente activas de muchos nucleósidos es la forma trifosfato, que inhibe la ADN polimerasa o transcriptasa inversa, o causa la terminación de la cadena.

Se han identificado varios nucleósidos sintéticos que presentan actividad frente a VHB. Como se ha indicado anteriormente, el enantiómero (-) de BCH-189 (2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina), conocido como 3TC, se ha aprobado para el tratamiento de la hepatitis B. Véase US 5.532.246 así como EPA 0 494 119 A1 presentada por BioChem Pharma, Inc.

Adefovir (9-{2-(fosfonometoxi)etil}adenina, también referido como PMEAs o (ácido {2-(6-amino-9H-purin-9-il)etoxi}metilfosfónico), también se ha aprobado en los Estados Unidos para el tratamiento de pacientes infectados con el virus de la hepatitis B. Véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5.641.763 y 5.142.051. Se ha observado resistencia al tratamiento con adefovir en pacientes con VHB.

β -2-Hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano ("FTC"), reivindicado en las Patentes U.S. Nos. 5.814.639 y 5.914.331 de Liotta et al., presenta actividad frente a VHB. Véase Furman et al., "The Anti-Hepatitis B Virus Activities, Cytotoxicities, and Anabolic Profiles of the (-) and (+) Enantiomers of cis-5-Fluoro-1-{2-(Hydroxymethyl)-1,3-oxathiolane-5-yl}-Cytosine" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, diciembre 1992, 2686-2692; y Cheng, et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267 (20), 13938-13942.

Las Patentes U.S. Nos. 5.565.438, 5.567.688 y 5.587.362 (Chu, et al.) describen el uso de 2'-fluoro-5-metil- β -L-arabinofuraniluridina (L-FMAU) para el tratamiento del virus de la hepatitis B y de Epstein Barr.

Penciclovir (PCV; 2-amino-1,9-dihidro-9-{4-hidroxi-3-(hidroximetil)butil}-6H-purin-6-ona) ha establecido actividad frente a la hepatitis B. Véanse, las Patentes U.S. Nos. 5.075.445 y 5.684.153.

La Yale University y The University of Georgia Research Foundation, Inc. describen el uso de L-FDDC (5-fluoro-3'-tia-2',3'-didesoxicitidina) para el tratamiento del virus de la hepatitis B en WO 92/18517.

Otros fármacos explorados para el tratamiento de VHB incluyen adenosina arabinósido, timosina, aciclovir, fosfonoformato, zidovudina, (+)-cianidanol, quinacrina, y 2'-fluoroarabinosil-5-yodouracilo.

- 5 Las Patentes U.S. Nos. 5.444.063 y 5.684.010 de Emory University describen el uso de nucleósidos de β -D-1,3-dioxolano purina enantioméricamente puros para tratar la hepatitis B.

WO 96/40164 presentada por Emory University, UAB Research Foundation, y el Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) describe varios β -L-2', 3'-didesoxinucleósidos para el tratamiento de la hepatitis B.

- 10 WO 95/07287 también presentada por Emory University, UAB Research Foundation, y el Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) describe 2'- ó 3'-desoxi y 2',3'-didesoxi- β -L-pentofuranosil nucleósidos para el tratamiento de infección por VIH.

WO96/13512 presentada por Genencor International, Inc., y Lipitek, Inc., describe la preparación de L-ribofuranosil nucleósidos como agentes antitumorales y viricidas.

WO95/32984 describe ésteres de lípido de nucleósidos monofosfatos como fármacos inmunosupresores.

- 15 DE 4224737 describe nucleósidos de citosina y sus usos farmacéuticos.

Tsai et al., en *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48(7), 1477-81, describe el efecto del agente anti-VIH análogos de 2'- β -D-F-2',3'-didesoxinucleósido en el contenido celular de ADN mitocondrial y producción de lactato.

Galvez, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1994**, 35(5), 1198-203, describe computación molecular de β -D-3'-azido-2',3'-didesoxi-5-fluorocitidina.

- 20 *Mahmoudian, Pharm. Research* **1991**, 8(1), 43-6, describe análisis de relación estructura-actividad cuantitativos de agentes VIH tales como β -D-3'-azido-2',3'-didesoxi-5-fluorocitidina.

La Patente U.S. No. 5.703.058 describe nucleósidos de pirimidina (5-carboximido ó 5-fluoro)-(2',3'-insaturados ó 3'modificados) para el tratamiento de VIH o VHB.

- 25 Lin et al., describe la síntesis y actividad antiviral de varios análogos 3'-azido de β -D-nucleósidos en *J Med. Chem.* **1988**, 31 (2), 336-340.

WO 00/3998 presentada por Idenix Pharmaceuticals, Ltd. describe métodos para preparar 6-bencil-4-oxopirimidinas sustituidas, y el uso de dichas pirimidinas para el tratamiento de VIH.

- 30 Idenix Pharmaceuticals, Ltd. describe 2'-desoxi- β -L-eritropentofurano-nucleósidos, y su uso en el tratamiento de VHB en las Patentes US Nos. 6.395.716; 6.444.652; 6.566.344 y 6.539.837. Véase también WO 00/09531. Se describe un método para el tratamiento de la infección por hepatitis B en seres humanos y otros animales huéspedes que incluye administrar una cantidad efectiva de un 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleósido biológicamente activo (referido alternativamente como β -L-dN o un β -L-2'-dN) o una sal, éster o profármaco de éste farmacéuticamente aceptable, incluyendo β -L-desoxiribotimidina (β -L-dT), β -L-desoxiribocitidina (β -L-dC), β -L-desoxiribouridina (β -L-dU), β -L-desoxiribo-guanosina (β -L-dG), β -L-desoxiribo-adenosina (β -L-dA) y β -L-desoxiribo-inosina (β -L-dI), administrado bien solo o en combinación, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se describieron derivados 5' y N⁶ (citidina) o N⁶ (adenosina) acilados o alquilados del compuesto activo, o los 5'-fosfolípido o 5'-éter lípidos.

- 40 von Janta-Lipinski et al. *J. Med. Chem.*, **1998**, 41 (12), 2040-2046 describen el uso de los enantiómeros L de β -2'-desoxiribonucleósido 5'-trifosfatos modificados 3'-fluoro para la inhibición de las polimerasas de la hepatitis B. Específicamente, se describieron los 5'-trifosfatos de 3'-desoxi-3'-fluoro- β -L-timidina (β -L-FFTP), 2',3'-didesoxi-3'-fluoro- β -L-citidina (β -L-FdCTP), y 2',3'-didesoxi-3'-fluoro- β -L-5-metilcitidina (β -L-FMethCTP) como inhibidores efectivos de las ADN polimerasas de VHB. Además, von Janta-Lipinski et al. describe la actividad biológica del trifosfato de β -L-timidina (pero no β -L-2'-dC) como un inhibidor nucleósido de ADN polimerasas endógenas de VHB y DVHB. Sin embargo, sólo se evaluó la β -L-timidina trifosforilada, no la forma no fosforilada reivindicada, y no hay ningún comentario en el artículo de si estos β -L-nucleósidos están fosforilados en las células o *in vivo* o, más importante, no hay ningún comentario sobre la eficacia de la fosforilación de β -L-timidina *in vivo*. Debido a esto, el artículo no enseña que la β -L-timidina tendría alguna actividad en la hepatitis B en una célula o *in vivo*. Véase también, WO 96/1204.

- 50 La Solicitud de Patente Europea No. 0 352 248 A1 de Johansson et al. describe el uso de compuestos L-ribofuranosil para el tratamiento de la hepatitis B.

Lin et al. "Synthesis of Several Pyrimidine L-Nucleoside Analogues as Potential Antiviral Agents" *Tetrahedron*, **1995**, 51 (4), 1055-1068, discute que β -L-5-yodo-2'-desoxiuridina (β -L-IuDR, compuesto 7) es activo frente a infección por

herpes y varios otros virus con ADN, que BVdU y β -L-BV-ara-U también son activos frente a herpes, β -L-BV-ara-U es activo frente al virus de la varicela-zoster; y que se encontró que 2',3'-didesoxi-L-azacitidina es activo frente a VHB.

5 La Publicación de Patente US No. 20030083306 de Idenix Pharmaceuticals, Ltd. describe profármacos 3' de 2'-desoxi- β -L-nucleósidos para el tratamiento de VHB. Véase también WO 01/96353.

La Patente U.S. No. 4.957.924 de Beauchamp describe varios ésteres terapéuticos de aciclovir.

En el encuentro de la European Association for the Study of the Liver el 17-21 de abril, 2002, en Madrid, España, Sühnel et al. de Gilead Sciences, Inc. presentaron un póster indicando que 10 combinaciones de adefovir con β -L-2'desoxitimidina producen efectos antivirales aditivos frente a VHB *in vitro*.

10 En el mismo encuentro, Delaney et al. de Gilead Sciences, Inc. presentaron una presentación oral indicando que cepas seleccionadas de VHB resistente a lamivudina, es decir, VHB con una única mutación en L528M (rtL180M) o M552I (rtM204I), o con una doble mutación en L528M (rtL528M) y M552V (rtM204V), son resistentes cruzados a L-dT y L-dC *in vitro*.

15 Los tratamientos para la infección por hepatitis B también se describen en Lok y McMahon, AASLD Practice Guidelines, p. 1225-1241 (2001) incluyendo el tratamiento con interferones. Se usaron marmotas orientales infectadas crónicamente con el virus de la hepatitis de marmota (WHV) como un modelo de infección con VHB para estudiar el efecto antiviral de 1-(2-fluoro-5-metil- β -L-arabinofuranosil)-uracilo (L-FMAU) y vacuna de antígeno de superficie WHV. La inmunidad humoral y celular asociada con la combinación de L-FMAU y vacuna se asemejó a la observada en infección por WHV auto-limitada. Menne et al, *J. Virology*, 76(11):5305-5314 (2002).

20 WO 98/23285 describe un método para el tratamiento o profilaxis de infecciones con el virus de la hepatitis B en un paciente humano o animal que comprende administrar al paciente cantidades efectivas o profilácticas de penciclovir (o un bioprecursor de éste tal como famciclovir) e interferón alfa.

Los ejemplos de agentes antivirales que se han identificado como activos frente al virus de la hepatitis B incluyen: Agentes actualmente en desarrollo clínico, incluyen:

Nombre del Fármaco	Clase de Fármaco	Empresa	Estado FDA
Intron A (interferón α -2b)	interferón	Schering-Plough	aprobado por la FDA
Epivir-HVB (lamivudina, 3TC)	análogo de nucleósido	GlaxoSmithKline	aprobado por la FDA
Adefovir dipivoxil	análogo de nucleótido	Gilead Sciences	Fase III* (NDA presentado marzo 2002)
Coviracil (emtricitabina; FTC)	análogo de nucleósido	Triangle Pharmaceuticals	Fase III
Entecavir	análogo de nucleósido	Bristol-Myers Squibb	Fase III
Clevudine (L-FMAU)	análogo de nucleósido	Triangle Pharmaceuticals	Fase II
ACH 126,443 (L-Fd4C)	análogo de nucleósido	Achillion Pharmaceuticals	Fase II
AM 365	análogo de nucleósido	Amrad	Fase II (Asia y Australia)
DAPD	análogo de nucleósido	Triangle Pharmaceuticals	Fase II
LdT (telbavudina)	análogo de nucleósido	Idenix	Fase II
XTL 001	anticuerpo monoclonal	XTL Biopharm	Fase II (Israel)
Theradigm	Inmunoestimulador	Epimmune	Fase II
Zadaxin** (timosina)	Inmunoestimulador	SciClone	Fase II con Epivir-HBV
EHT 899	proteína viral	Enzo Biochem	Fase II (Israel)
Vacuna de ADN de VHB	Inmunoestimulador	PowderJect (Reino Unido)	Fase I
MCC 478	análogo de nucleósido	Eli Lilly	Fase I (Alemania)

valLdC (valtorcitabina)	análogo de nucleósido	Idenix	Fase I
ICN 2001	análogo de nucleósido	ICN	Preclínico
Fluoro L y D nucleósidos	análogo de nucleósido	Pharmasset	Preclínico
Racivir	análogo de nucleósido	Pharmasset	Preclínico
Robustaflavona	análogo de nucleósido	Advanced Life Sciences	Preclínico

** Zadaxin: aprobación de fármaco huérfano en los EEUU

Terapias post-exposición y/o post trasplante de hígado

BayHepB	inmunoglobulina VHB	Bayer (EEUU)	aprobado por la FDA
anti-hepatitis B	inmunoglobulina VHB	Cangene (Canadá)	enviado a NDA 2001
Nabi-HB	inmunoglobulina VHB	Nabi	aprobado por la FDA

- 5 Mark Nelson, MD. Selected Highlights from Drug Development for Antiretroviral Therapies 2001 (Hep DART 2001) diciembre 16-20, 2001, Maui, Hawaii; Selected Highlights from American Association for the Study of Liver Diseases 52nd Annual Meeting (52nd AASLD). noviembre 9-13, 2001. Dallas, Tejas; Report on Hepatitis B from Digestive Disease Week 2001; mayo 20-23, 2001, Atlanta, Georgia.

La Solicitud U.S. No. 20020098199, publicada el 25 de julio, 2002, describe secuencias inmunoestimuladoras para el tratamiento de VHB y VHC.

- 10 La Patente U.S. No. 6.225.292, asignada a The Regents of the University of California y Dynavax Technologies Corp., describe oligonucleótidos que inhiben la actividad inmunoestimuladora de ISS-ODN (oligodesoxinucleótidos con secuencia inmunoestimuladora) así como métodos para su identificación y uso. Los oligonucleótidos descritos son útiles para controlar la actividad adyuvante de ISS-ODN pretendida terapéuticamente así como la actividad ISS-ODN no deseada ejercida por vectores de expresión recombinantes, tales como los usados para terapia génica e inmunización génica. Los oligonucleótidos también tienen actividad anti-inflamatoria útil para reducir la inflamación en respuesta a infección de un huésped con microbios que contienen ISS-ODN, para controlar la enfermedad autoinmune y para reforzar las respuestas inmunes del huésped de tipo Th2 a un antígeno. La patente también engloba conjugados farmacéuticamente útiles de los oligonucleótidos de la invención (incluyendo parejas de conjugado tales como antígenos y anticuerpos).

- 20 La Patente U.S. No. 6.589.940, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe composiciones de oligonucleótidos inmunoestimuladores. Estos oligonucleótidos comprenden una secuencia octanucleótido inmunoestimuladora. Estos oligonucleótidos pueden administrarse conjuntamente con un péptido o antígeno inmunoestimulador. También se describen métodos para modular una respuesta inmune después de la administración del oligonucleótido. Además, se proporciona un método de cribado in vitro para identificar oligonucleótidos con actividad inmunoestimuladora.

- 30 La Patente U.S. No. 6.562.798, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe composiciones de oligonucleótidos inmunoestimuladores, incluyendo secuencia hexanucleótido inmunoestimuladora que comprenden una citosina modificada. Estos oligonucleótidos pueden administrarse conjuntamente con un péptido o antígeno inmunomodulador. También se describen métodos para modular una respuesta inmune después de la administración del oligonucleótido que comprende una secuencia inmunoestimuladora modificada.

- 35 PCT WO 03/014316 A2, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe composiciones y métodos para la inmunomodulación de individuos. La inmunomodulación se consigue por la administración de complejos polinucleótido/microvehículo (IMO/MC) inmunomoduladores que comprenden oligonucleótidos inmunomoduladores 3-6mer. Los complejos IMP/MC pueden estar unidos covalentemente o no covalentemente. También se describen composiciones inmunomoduladoras que comprenden IMO3-6mer encapsulado en un MC.

PCT WO 03/000922 A2, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe compuestos inmunomoduladores y métodos para la inmunomodulación de individuos usando los compuestos inmunomoduladores.

PCT WO 02/052002 A2, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe polinucleótidos inmunomoduladores y métodos para la inmunomodulación de individuos usando los polinucleótidos inmunomoduladores.

- 40 PCT WO 01/68144A2 y PCT WO0168143A2 asignadas a Dynavax Technologies Corp., describen composiciones y métodos para la inmunomodulación de individuos. La inmunomodulación se consigue por la administración de complejos polinucleótido/microvehículo (IMP/MC) inmunomoduladores. Los complejos IMP/MC pueden estar unidos

covalentemente o no covalentemente y presentan un polinucleótido que comprende al menos una secuencia inmunoestimuladora unida a un microvehículo o nanovehículo biodegradable.

5 PCT WO 01/68117 A2, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe métodos para el tratamiento de infecciones por papillomavirus. Se administra un polinucleótido que comprende una secuencia inmunoestimuladora a un individuo que se ha expuesto a o está infectado con papillomavirus. El polinucleótido no se administra con antígeno de papillomavirus. La administración del polinucleótido resulta en la mejora de los síntomas de la infección por papillomavirus.

10 PCT WO 01/68078 A2, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe métodos para el tratamiento de infecciones por el virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la hepatitis C (VHC). Se administra un polinucleótido que comprende una secuencia inmunoestimuladora a un individuo que se ha expuesto a o está infectado con VHB y/o VHC. El polinucleótido no se administra con un antígeno de VHC o VHB. La administración del polinucleótido resulta en la mejora de los síntomas de la infección por VHB y/o VHC.

15 PCT WO 01/68077 A3, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe métodos de supresión, prevención, y/o tratamiento de infección por virus. Se administra un polinucleótido que comprende una secuencia inmunoestimuladora (un "ISS") a un individuo que presenta riesgo de estar expuesto a, ha estado expuesto a o está infectado con un virus. El polinucleótido que contiene ISS se administra con ningún antígeno del virus. La administración del polinucleótido que contiene ISS resulta en una incidencia y/o gravedad reducida de uno o más síntomas de la infección por virus.

20 PCT WO 01/12223 A2, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe métodos para modular una respuesta inmune frente a un segundo antígeno que conlleva la administración de un primer antígeno y un polinucleótido inmunoestimulador. La modulación de la respuesta inmune se manifiesta generalmente como estimulación de una respuesta Th1.

25 PCT WO 00/21556 A1, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe composiciones inmunomoduladoras antivirales que comprenden polinucleótidos inmunoestimuladores y antígenos de VIH, tales como gp120. También se describen métodos para modular una respuesta inmune después de la administración de composiciones de oligonucleótido y de antígeno.

30 PCT WO 00/16804 A1, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe métodos para tratar trastornos asociados con IgE y composiciones para uso de ellos. Los métodos son particularmente útiles en el tratamiento de alergias y trastornos relacionados con alergias. Los métodos comprenden generalmente administrar un inhibidor de IgE (tal como un anticuerpo anti-IgE) y un antígeno y/o una secuencia de polinucleótido inmunoestimuladora (ISS). Estos métodos de combinación ofrecen ventajas significativas, tales como permitir una terapia más agresiva a la vez que se reducen los efectos secundarios no deseados, tales como anafilaxis.

35 PCT WO 99/62923 A2, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe oligonucleótidos que comprenden una secuencia hexanucleótido inmunoestimuladora que comprende una citosina modificada. Estos oligonucleótidos pueden administrarse conjuntamente con un péptido o antígeno inmunomodulador. También se describen métodos para modular una respuesta inmune después de la administración del oligonucleótido que comprende una secuencia inmunoestimuladora modificada

40 PCT WO 98/55495 A2, asignada a Dynavax Technologies Corp., describe composición de oligonucleótido inmunoestimuladora incluyendo una secuencia octanucleótido inmunoestimuladora. Estos oligonucleótidos pueden administrarse conjuntamente con un péptido o antígeno inmunoestimulador. También se describen métodos para modular una respuesta inmune después de la administración del oligonucleótido. Además, también se describe un método de cribado in vitro para identificar oligonucleótidos con actividad inmunoestimuladora.

45 PCT WO 03/015711 A2, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe una clase de ácidos nucleicos inmunoestimuladores que tienen al menos dos dominios funcionalmente y estructuralmente definidos. Esta clase de resto de combinación ácidos nucleicos inmunoestimuladores activa una respuesta inmune y es útil para tratar una variedad de trastornos relacionados con inmunidad tales como cáncer, enfermedades infecciosas y trastornos alérgicos. Los ácidos nucleicos también estimulan la activación de células asesinas naturales y la producción de interferón de tipo 1.

50 La Patente U.S. No. 6.406.705, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe métodos y productos que utilizan una combinación sinérgica de oligonucleótidos inmunoestimuladores que tienen al menos un dinucleótido CpG no metilado (CpG ODN) y un adyuvante que no es ácido nucleico. Dichas combinaciones de adyuvantes pueden usarse con un antígeno o solas. También se describen métodos y productos que utilizan oligonucleótidos inmunoestimuladores que tienen al menos un dinucleótido CpG no metilado (CpG ODN) para la inducción de inmunidad celular en niños.

55 La Patente U.S. No. 6.339.068, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe vectores de vacuna de ADN que pueden mejorarse por la eliminación de restos CpG-N y la adición opcional de restos CpG-S. Además, para niveles de expresión altos y duraderos, el vector optimizado debería incluir un promotor/potenciador que no se

- regula a la baja por las citoquinas inducidas por los restos CpG inmunoestimuladores. En la presente memoria se proporcionan vectores y métodos de uso para la inmunoestimulación. La invención también proporciona vectores de terapia génica mejorados mediante la determinación de los restos CpG-N y CpG-S presentes en la construcción, eliminando restos estimuladores CpG (CpG-S) y /o insertando restos neutralizantes CpG (CpG-N), produciendo de esta manera una construcción de ácido nucleico que proporciona expresión aumentada del polipéptido terapéutico.
- 5 La Patente U.S. No. 6.239.116, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe secuencias de ácido nucleico que contienen dinucleótidos CpG no metilados que modulan una respuesta inmune incluyendo la estimulación de un patrón Th1 de activación inmune, se describen producción de citoquinas, actividad lítica de NK, y proliferación de células B. Las secuencias también son útiles como un adyuvante sintético.
- 10 La Patente U.S. No. 6.207.646, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe ácidos nucleicos que contienen dinucleótidos CpG no metilados y se describen utilidades terapéuticas basadas en su capacidad de estimular una respuesta inmune y para redirigir una respuesta Th2 a una respuesta Th1 en un sujeto.
- La Patente U.S. No. 6.194.388, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe oligonucleótidos que contienen dinucleótidos CpG no metilados y se describen utilidades terapéuticas basadas en su capacidad de estimular una respuesta inmune en un sujeto. También se describen terapias para tratar enfermedades asociadas con la activación del sistema inmune que se inician por dinucleótidos CpG no metilados en un sujeto que comprende administrar al sujeto oligonucleótidos que no contienen secuencias CpG no metiladas (es decir, secuencias CpG metiladas o ausencia de secuencia CpG) para superar a los ácidos nucleicos CpG no metilados para unión. Además, se describen dinucleótidos que contienen CpG metilado para uso en terapias antisentido o como sondas de hibridación in vivo, y oligonucleótidos inmunoinhibidores para uso como terapéuticos antivirales.
- 15 20 La Publicación U.S. no. 20030091599 A1, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe métodos y productos que utilizan una combinación sinérgica de oligonucleótidos inmunoestimuladores que tienen al menos un dinucleótido CpG no metilado (CpG ODN) y un adyuvante que no es ácido nucleico. Dichas combinaciones de adyuvantes pueden utilizarse con un antígeno o solas. La publicación también se refiere a métodos y productos que utilizan oligonucleótidos inmunoestimuladores que tienen al menos un dinucleótido CpG no metilado (CpG ODN) para la inducción de inmunidad celular en niños.
- 25 PCT WO 03/031573 A2, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe composiciones y se proporcionan métodos para identificar, caracterizar, y optimizar compuestos inmunoestimuladores, sus agonistas y antagonistas, funcionando a través de TLR3.
- 30 PCT WO 03/012061 A2, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe métodos y composiciones relacionadas con una base de datos de expresión de células dendríticas.
- PCT WO 02/069369 A2, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe composiciones inmunoestimuladoras descritas se proporcionan como ácidos nucleicos semejantes a CpG, incluyendo ácidos nucleicos que tienen características inmunoestimuladoras de ácido nucleico CpG, a pesar de determinadas sustituciones de C, G, o C y G del dinucleótido CpG. Las sustituciones pueden incluir, entre otras, intercambio de C metilada por C, inosina por G, y ZpY por CpG, donde Z es Citosina o dSpacer e Y es inosina, 2-aminopurina, nebularina, o dSpacer. También se describen métodos para inducir una respuesta inmune en un sujeto usando los ácidos nucleicos semejantes a CpG. Los métodos son útiles en el tratamiento de un sujeto que tiene o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa, alergia, asma, cáncer anemia, trombocitopenia, o neutropenia.
- 35 40 PCT WO 01/95935 A1, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe métodos y productos para inducir una respuesta inmune usando ácidos nucleicos inmunoestimuladores. En particular los ácidos nucleicos inmunoestimuladores inducen preferentemente una respuesta inmune Th2. La invención es útil para tratar y prevenir trastornos asociados con una respuesta inmune Th1 o para crear un entorno Th2 para tratar trastornos que son sensibles a respuestas inmunes Th2.
- 45 PCT WO 01/22990 A2, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe métodos y composiciones para prolongar la utilidad clínica de IFN-'alfa' en el tratamiento de una variedad de trastornos virales y proliferativos. También se describen métodos que incrementan la eficacia del tratamiento con IFN-'alfa' y reducen los efectos secundarios relacionados con el tratamiento con IFN-'alfa'. Además, se proporcionan métodos para soportar la supervivencia y para activar las células naturales productoras de interferón (IPC) *in vitro* sin IL-3 o GM-CSF exógeno.
- 50 55 PCT WO 01/22972 A2, asignada a Coley Pharmaceutical Group, Inc., describe composiciones de ácidos nucleicos inmunoestimuladores y métodos para usar las composiciones. Los ácidos nucleicos ricos en T contienen secuencias poli T y/o tienen más del 25% de residuos de nucleótido T. Los ácidos nucleicos TG tienen dinucleótidos TG. Los ácidos nucleicos ricos en C tienen al menos una región poli-C y/o más del 50% de nucleótidos C. Estos ácidos nucleicos inmunoestimuladores funcionan de una manera similar a los ácidos nucleicos que contienen restos CpG. La invención también engloba ácidos nucleicos CpG preferidos.

A la vista del hecho de que el virus de la hepatitis B ha alcanzado niveles epidémicos en todo el mundo, y que tiene efectos graves y frecuentemente trágicos en el paciente infectado, permanece una necesidad fuerte de proporcionar nuevos agentes farmacéuticos efectivos para tratar a seres humanos infectados con el virus resistente a fármaco, es decir, VHB resistente a lamivudina, que tengan baja toxicidad para el huésped.

- 5 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos, composiciones y su uso para el tratamiento y/o profilaxis de una infección por VHB resistente a lamivudina que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa en un huésped, tal como pacientes humanos.

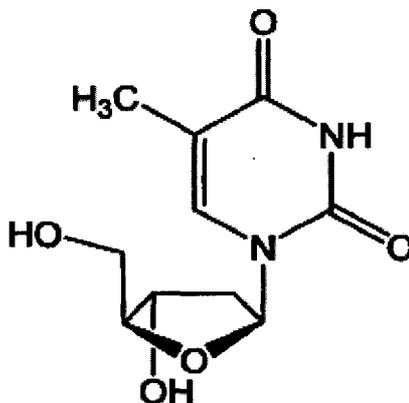
10 Es otro objeto de la presente invención proporcionar compuestos, composiciones y métodos para la prevención de una infección por mutante de VHB resistente, VHB YMDD (M552V), en un huésped sin estimular, tal como pacientes humanos.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar compuestos, composiciones y métodos para el tratamiento de pacientes infectados con una forma de VHB resistente a fármaco que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa.

- 15 Es otro objeto más de la presente invención proporcionar composiciones de terapias de combinación efectivas para el tratamiento de VHB resistente que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa y/o la supresión o prevención de la expresión de cepas de VHB resistentes que presentan una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa en un paciente.

Resumen de la invención

- 20 Un aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un huésped infectado con una forma del virus de la hepatitis B resistente a fármaco que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa, que comprende un compuesto β -L-2'-desoxinucleósido de la fórmula:



- 25 o una sal farmacéuticamente aceptable, ó 3' ó 5'-aminoácido éster, incluyendo el éster L-valinil de éste, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En realizaciones de la presente invención dicha forma del virus de la hepatitis B resistente a fármaco que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa es una forma del virus de la hepatitis B resistente a lamivudina que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa.

- 30 En realizaciones de la presente invención la composición farmacéutica comprende además una cantidad efectiva de uno o más agentes adicionales anti-virus de la hepatitis B (anti-VHB), en el que los agentes adicionales anti-VHB se seleccionan del grupo que consiste en 3TC (2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina), FTC (β -2-Hidroximetil-5-5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano), L-FMAU (2'-fluoro-5-metil- β -L-arabinofuranoliluridina), DAPD ((-)- β -D-2,6-diaminopurina dioxolano, DXG ((-)-beta-D-Dioxolano guanina), famciclovir, penciclovir, BMS-200475 (2-amino-1,9-dihidro-9-[(1S,3R,4S)-4-hidroxi-3-(hidroximetil)-2-metilenciclopentil]-6H-puirin-6-ona, monohidrato), bis pom PMEAs (adefovir, dipivoxil, o ácido {2-(6-amino-9H-purin-9-il)etoxi}metilfosfónico), lobucavir, ganciclovir, tenofovir, Lfd4C (β -L-5-fluoro-2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxicitidina), foscarnet (fosfonoformato trisodio), isoprinosina, levamizol, N-acetilcistina (NAC), interferón, interferón pegilado, ISS ("Secuencia inmunoestimuladora"), ribavirin, PC1323 (ácido batocuprofina disulfónico) y ácido poliadenicídico poliuridílico.

- 40 En una realización preferida al menos uno de los agentes anti-VHB es interferón. En una realización preferida más el interferón se selecciona del grupo que consiste en interferón alfa, interferón alfa pegilado, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2b pegilado, ROFERON®-A (interferón alfa-2a),

PEGASYS® (interferón alfa-2a pegilado), INTRON®A (interferón alfa-2b), PEG-INTRON® (interferón alfa-2b pegilado), interferón beta, interferón gamma, interferón tau, interferón omega, interferón de consenso, INFERGEN (interferón alfacon-1), OMNIFERON (interferón natural), REBIF (interferón beta-a), interferón omega, interferón alfa oral, interferón gamma-1b, SuperFeron (IFN-alfa multi-subtipo humano natural), y HuFeron (IFN-beta humano).

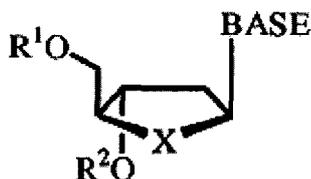
5 La presente invención proporciona el uso de cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un huésped infectado con una forma de VHB resistente a fármaco que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa.

10 La presente invención proporciona el uso de dicho medicamento para el tratamiento de un huésped infectado con una forma de VHB resistente a fármaco que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa y es una forma del virus de la hepatitis B resistente a lamivudina que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa.

En una realización de la invención, el huésped que necesita tratamiento es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

15 Se ha descubierto que los β -L-2'-desoxinucleósidos, y en particular β -L-2'-desoxicitidina y β -L-2'-desoxitimidina, son activos frente al virus de la hepatitis B resistente a fármaco con mutaciones en el codón 552 (M a V), es decir, el codón 204 (M a V) de la región de transcriptasa inversa del virus. Tomando como base este descubrimiento, se proporciona un método para tratar VHB resistente a lamivudina (M552V) en un huésped, tal como un mamífero, y en particular un ser humano, que incluye administrar un β -L-2'-desoxinucleósido o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable. Además, se proporciona un método para prevenir que ocurra la mutación de VHB
20 resistente a lamivudina (M552V) en un huésped sin estimular, tal como un mamífero, y en particular un ser humano, que incluye administrar un β -L-2'-desoxinucleósido o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable. También se proporciona un método para prevenir y/o suprimir el surgimiento del doble mutante de VHB (L528M/M552V) en un huésped, tal como un mamífero, y en particular un ser humano, que incluye administrar un β -L-2'-desoxinucleósido o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable.

25 En una realización, la descripción proporciona el uso de un β -L-2'-desoxinucleósido de la fórmula (I):



(I)

o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste en el que

30 R^1 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

R^2 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

X es O, S, SO_2 o CH_2 ; y

35 BASE es una base de purina o pirimidina que puede estar opcionalmente sustituida;

y todos los tautómeros y estereoisómeros de éste.

En una realización preferida, X es O.

En una realización, el residuo de aminoácido tiene la fórmula $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, en el que

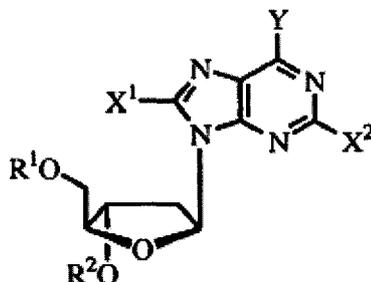
40 R^8 es la cadena lateral de un aminoácido y en el que, como en prolina, R^8 puede estar unido opcionalmente a R^{10} para formar una estructura de anillo; o alternativamente R^8 es un resto alquilo, arilo, heteroarilo o heterocíclico;

R^9 es hidrógeno, alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo; y

R^{10} y R^{11} son independientemente hidrógeno, acilo (incluyendo un derivado de acilo unido a R^8) o alquilo (incluyendo pero no limitado a metilo, etilo, propilo, y ciclopropilo);

y todos los tautómeros y estereoisómeros de éste.

En otra realización de la presente descripción, el β -L-2'-desoxinucleósido es una β -L-2'-desoxipurina de la fórmula:



o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

- 5 R^1 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-anloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

- 10 R^2 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-anloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

Y es OR^3 , NR^3R^4 o SR^3 ; y

X^1 y X^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, halógeno, OR^5 , NR^5R^6 o SR^5 ; y

- 15 R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son independientemente H, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquileo (en particular, dimetilaminometileno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-anloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

y todos los tautómeros y estereoisómeros de éste.

En una realización, el residuo de aminoácido tiene la fórmula $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, en el que

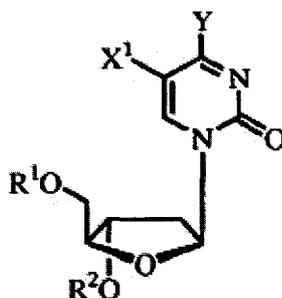
- 20 R^8 es la cadena lateral de un aminoácido y en el que, como en prolina, R^8 puede estar unido opcionalmente a R^{10} para formar una estructura de anillo; o alternativamente R^8 es un resto alquilo, arilo, heteroarilo o heterocíclico;

R^9 es hidrógeno, alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo; y

R^{10} y R^{11} son independientemente hidrógeno, acilo (incluyendo un derivado de acilo unido a R^8) o alquilo (incluyendo pero no limitado a metilo, etilo, propilo, y ciclopropilo);

- 25 y todos los tautómeros y estereoisómeros de éste.

En otra realización de la presente descripción, el β -L-2'-desoxinucleósido es una β -L-2'-desoxipirimidina de la fórmula:



o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

R¹ es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

5 R² es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

Y es OR³, NR³R⁴ o SR³;

X¹ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, halógeno, OR⁵, NR⁵R⁶ o SR⁵; y

10 R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son independientemente H, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquileo (en particular, dimetilaminometileno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

y todos los tautómeros y estereoisómeros de éste.

15 En una realización, el residuo de aminoácido tiene la fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), en el que

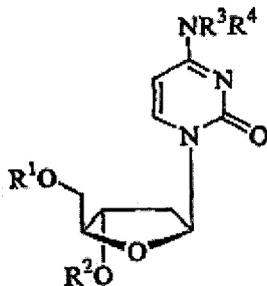
R⁸ es la cadena lateral de un aminoácido y en el que, como en prolina, R⁸ puede estar unido opcionalmente a R¹⁰ para formar una estructura de anillo; o alternativamente R⁸ es un resto alquilo, arilo, heteroarilo o heterocíclico;

R⁹ es hidrógeno, alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo; y

20 R¹⁰ y R¹¹ son independientemente hidrógeno, acilo (incluyendo un derivado de acilo unido a R⁸) o alquilo (incluyendo pero no limitado a metilo, etilo, propilo, y ciclopropilo);

y todos los tautómeros y estereoisómeros de éste.

En una realización particular, el β-L-2'-desoxinucleósido es una β-L-2'-desoxicitidina de la fórmula:



o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

25 R¹ es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

30 R² es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato; y

R³ y R⁴ son independientemente H, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquileo (en particular, dimetilaminometileno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato.

35 En una realización preferida, R¹ y/o R² es H.

En una realización, el residuo de aminoácido tiene la fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), en el que

R⁸ es la cadena lateral de un aminoácido y en el que, como en prolina, R⁸ puede estar unido opcionalmente a R¹⁰ para formar una estructura de anillo; o alternativamente R⁸ es un resto alquilo, arilo, heteroarilo o heterocíclico;

R⁹ es hidrógeno, alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo; y

R^{10} y R^{11} son independientemente hidrógeno, acilo (incluyendo un derivado de acilo unido a R^8) o alquilo (incluyendo pero no limitado a metilo, etilo, propilo, y ciclopropilo).

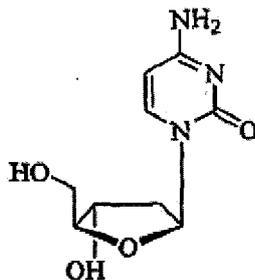
En otra realización preferida, R^1 y/o R^2 es un residuo de aminoácido, y en particular L-valinil.

En una realización, R^3 es hidrógeno, y R^4 es dimetilaminometileno.

5 En otra realización, R^3 es hidrógeno, y R^4 es acetilo.

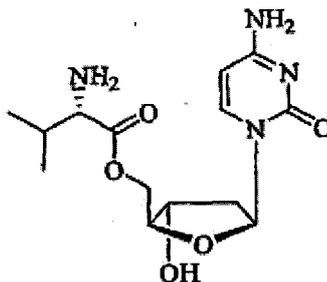
En otra realización, R^3 es hidrógeno, y R^4 es L-valinil.

En una realización particular, la β -L-2'-desoxicitidina tiene la fórmula:



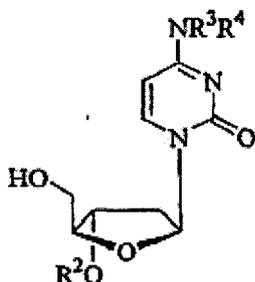
o una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste.

10 En otra realización particular, la β -L-2'-desoxicitidina tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

En otra realización particular, la β -L-2'-desoxicitidina tiene la fórmula:

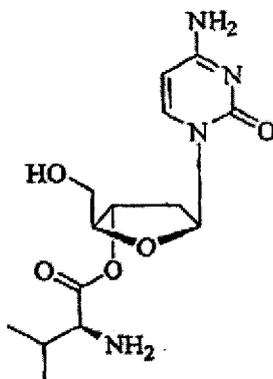


15 o una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

R^2 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxilalquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un profármaco fosfato; y

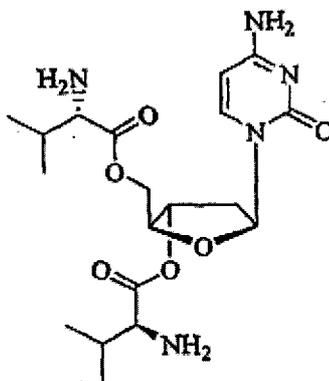
20 R^3 y R^4 son independientemente H, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, dialquilaminoalquilenilo, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxilalquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un profármaco fosfato.

En otra realización particular más, la β -L-2'-desoxicitidina tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

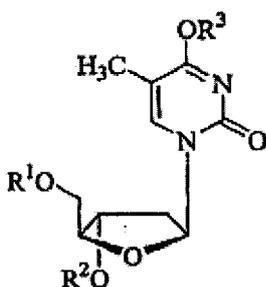
En otra realización particular más, la β -L-2'-desoxicitidina tiene la fórmula:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

En otra realización, el β -L-2'-desoxinucleósido es β -L-2'-desoxitimidina de la fórmula:



o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

10 R^1 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato; y

15 R^2 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato; y

R^3 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica (especialmente ciclopropilo), acilo, acetilo, butirilo, dialquilaminoalquilenos (en particular, dimetilaminometileno), CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo,

CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato; y todos los tautómeros y estereoisómeros de éste.

En una realización preferida, R^1 y/o R^2 es H.

En una realización, el residuo de aminoácido tiene la fórmula $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, en el que

- 5 R^8 es la cadena lateral de un aminoácido y en el que, como en prolina, R^8 puede estar unido opcionalmente a R^{10} para formar una estructura de anillo; o alternativamente R^8 es un resto alquilo, arilo, heteroarilo o heterocíclico;

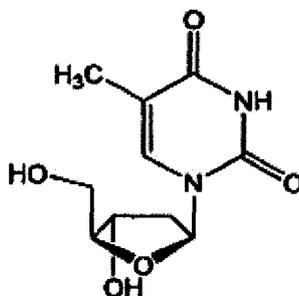
R^9 es hidrógeno, alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo; y

R^{10} y R^{11} son independientemente hidrógeno, acilo (incluyendo un derivado de acilo unido a R^8) o alquilo (incluyendo pero no limitado a metilo, etilo, propilo, y ciclopropilo);

- 10 y todos los tautómeros y estereoisómeros de éste.

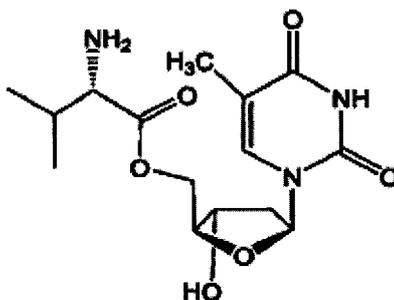
En otra realización preferida, R^1 y/o R^2 es un residuo de aminoácido, y en particular L-valinil.

En una realización particular, la β -L-2'-desoxitimidina tiene la fórmula:



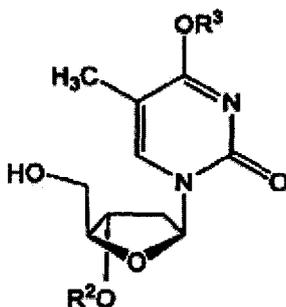
o una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste.

- 15 En otra realización particular, la β -L-2'-desoxitimidina tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

En otra realización particular, la β -L-2'-desoxitimidina tiene la fórmula:

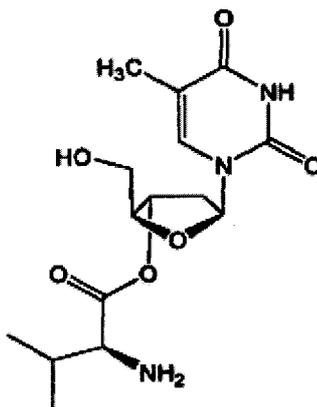


o una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

R² es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un profármaco fosfato; y

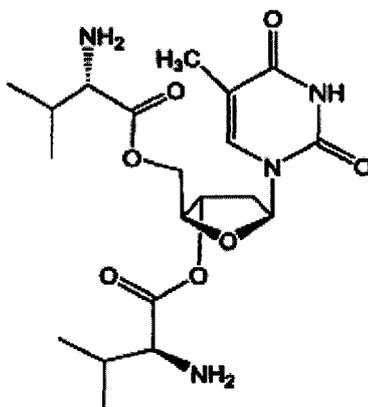
- 5 R³ es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, dialquilaminoalquileno, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un profármaco fosfato.

En otra realización particular más, la β-L-2'-desoxitimidina tiene la fórmula:



- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

En otra realización particular más, la β-L-2'-desoxitimidina tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

- 15 En una realización preferida, el β-L-2'-desoxinucleósido carece en al menos 90% de sus enantiómeros opuestos β-D.

En otra realización, la descripción incluye un método para el tratamiento de seres humanos infectados con VHB que incluye administrar una cantidad de tratamiento para VHB de una sal, éster o profármaco de los derivados 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósidos descritos. Un profármaco, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que se convierte en el nucleósido con la administración in vivo. Los ejemplos no limitativos incluyen sal farmacéuticamente aceptable (referida alternativamente como "sales fisiológicamente aceptables"), los derivados 5' y N⁴ (citidina) o N⁶ (adenosina) acilados (incluyendo con un residuo de aminoácido tal como L-valinil) o alquilados del compuesto activo, o los 5'-fosfolípido ó 5'-éter lípidos del compuesto activo.

En otra realización, el 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido se administra en alternación o en combinación con uno o más otros 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósidos o uno o más otros compuestos que presentan actividad frente al virus de la hepatitis B.

La actividad anti-virus de la hepatitis B de los β -L-2'-desoxinucleósidos proporcionados en la presente memoria, y en particular β -L-2'-dC o β -L-2'-dT, o las sales, ésteres, fosfatos o profármacos farmacéuticamente aceptables de estos compuestos, puede aumentarse por la administración de dos o más de estos nucleósidos en combinación o alternación. Alternativamente, por ejemplo, uno o más de los β -L-2'-desoxinucleósidos proporcionados en la presente memoria, y en particular β -L-2'-dC o β -L-2'-dT, pueden administrarse en combinación y/o alternación con uno o más otros compuestos que presentan actividad frente al virus de la hepatitis B. Los ejemplos no limitativos incluyen FTC, L-FMAU, DAPD, DXG, famciclovir, penciclovir, BMS-200475, bis pom PMEA (adefovir, dipivoxil), lobucavir, ganciclovir, tenofovir, Lfd4C, interferón, interferón pegilado, o ribavirin. En una realización, los β -L-2'-desoxinucleósidos proporcionados en la presente memoria, y en particular β -L-2'-dC o β -L-2'-dT, pueden administrarse en combinación y/o alternación con 3TC.

En una realización, el 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleósido se administra en alternación o en combinación con uno o más inmunomoduladores, tales como una citoquina TH1, y en particular un interferón, preferiblemente interferón gamma para el tratamiento de infección por VHB bien resistente o de tipo salvaje.

En una realización de la descripción, el inmunomodulador se administra en la forma de una proteína. En una realización alternativa, el inmunomodulador se administra en la forma de un gen o fragmento génico que expresa la proteína inmunomoduladora. En una realización particular de la presente descripción, el inmunomodulador se administra en la forma de un gen o fragmento génico de éste, y la administración está mediada por un adenovirus. En una realización particular de la descripción, el inmunomodulador es interferón (tal como interferón gamma) y su administración es en la forma de un gen o fragmento génico que está mediada por un adenovirus.

Un β -L-2'-desoxinucleósido administrado en combinación y/o alternación con un interferón, tal como interferón alfa o interferón gamma, proporciona una terapia superior en los seres humanos frente al virus de la hepatitis B. En una realización, el interferón se administra en la forma de una proteína, típicamente directamente en la vena o arteria. En una realización alternativa de la descripción, el interferón se administra en la forma de un ácido nucleico, gen o fragmento génico de éste que se expresa por el huésped. El ácido nucleico de interferón puede administrarse al huésped "desnudo", es decir, sin un vector, o alternativamente, puede administrarse mediante un vector, incluyendo pero no limitado a, un vector viral tal como un vector adenovirus.

En una realización, el interferón es interferón alfa, opcionalmente interferón alfa pegilado. En otra realización, el interferón alfa se selecciona del grupo, incluyendo, pero no limitado a: interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2b pegilado ROFERON®-A (interferón alfa-2a, Roche), PEGASYS® (interferón alfa-2a pegilado, Roche), INTRON®A (interferón alfa-2b, Schering Corporation), PEG-INTRON® (interferón alfa-2b pegilado, Schering Corporation), interferón de consenso, INFERGEN (interferón alfacon-1) por InterMune, OMNIFERON (interferón natural) por Viragen, ALBUFERON por Human Genome Sciences, Interferón Alfa Oral por Amarillo Biosciences, y SuperFeron (IFN-alfa multi-subtipo humano natural, Genetrol, Inc.). En una realización alternativa, el interferón es interferón gamma. En otra realización más, el interferón es interferón beta, interferón omega o interferón tau. En otra realización, el interferón se selecciona del grupo, incluyendo, pero no limitado a: REBIF (interferón beta-1a) por Ares-Serono, Interferón Omega por BioMedicine, interferón gamma-1b por InterMune, y HuFeron (IFN-beta humano, Genetrol, Inc.).

En general, durante la terapia de alternación, se administra seriadamente una dosificación efectiva de cada agente, mientras en la terapia de combinación, se administran conjuntamente dosificaciones efectivas de dos o más agentes. Las dosificaciones dependerán de la velocidad de absorción, inactivación, bio-distribución, metabolismo y excreción del fármaco así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Debe indicarse que los valores de dosificación también variarán con la gravedad de la afección que se va a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes y programas de dosificación específicos se ajustarán con el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Los ejemplos de intervalos de dosificación adecuados pueden encontrarse en la bibliografía científica y en el *Physicians Desk Reference*. Muchos ejemplos de intervalos de dosificación adecuados para otros compuestos descritos en la presente memoria también se encuentran en la bibliografía pública o pueden identificarse usando procedimientos conocidos. Estos intervalos de dosificación pueden modificarse según se desee para conseguir un resultado deseado.

50 Descripción breve de las figuras

La **Figura 1a** ilustra un proceso general para obtener β -L-eritropentafurano-nucleósidos (β -L-dN) usando L-ribosa o L-xilosa como un material de partida. La Figura 1b y 1c son ejemplos ilustrativos no limitativos según la presente descripción de la síntesis de ésteres 3'- y 5'-valinil de 2'-desoxi- β -L-citidina (β -L-dC) a partir de 2'-desoxi- β -L-citidina, respectivamente.

55 La **Figura 2** es un ejemplo ilustrativo no limitativo según la presente descripción de la síntesis de N⁴-acetil-2'-desoxi- β -L-citidina a partir de 2'-desoxi- β -L-citidina.

La **Figura 3** es un ejemplo ilustrativo no limitativo según la presente descripción de la síntesis de N⁴-[(dimetilamino)metileno]-2'-desoxi-β-L-citidina a partir de 2'-desoxi-β-L-citidina.

La **Figura 4** es un ejemplo ilustrativo no limitativo según la presente descripción de la síntesis de 3',5'-di-O-acetil-2'-desoxi-β-L-citidina a partir de 2'-desoxi-β-L-citidina.

5 La **Figura 5** es un ejemplo ilustrativo no limitativo según la presente descripción de la síntesis de éster 3',5'-di-O-valinil de 2'-desoxi-β-L-citidina a partir de 2'-desoxi-β-L-citidina.

La **Figura 6** es un ejemplo ilustrativo no limitativo según la presente descripción de la síntesis de éster N⁴-(Boc-valinil) de 2'-desoxi-β-L-citidina a partir de 2'-desoxi-β-L-citidina.

10 La **Figura 7** es un ejemplo ilustrativo no limitativo según la presente descripción de la síntesis de éster de 3',5',N⁴-tri-(L-valinil)-2'-desoxi-β-L-citidina a partir de 3',5',N⁴-tri-(Boc-L-valinil)-2'-desoxi-β-L-citidina.

La **Figura 8** es un gráfico de líneas que representa una técnica de calibración estándar útil para la determinación de la solubilidad de varios nucleósidos. La **Figura 8a** es la curva de calibración determinada para β-D-desoxiribocitosina natural. La **Figura 8b** es la curva de calibración determinada para el éster 3',5'-divalinil de β-L-desoxiribocitosina.

15 La **Figura 9a** es un ejemplo no limitativo de un perfil de HPLC usado para evaluar la estabilidad del éster 3',5'-divalinil de β-L-desoxiribocitosina a un pH de 7,42. El perfil de HPLC indica la presencia del éster 3',5'-divalinil de β-L-desoxiribocitosina junto con 3 metabolitos activos, el éster 3'-valinil de β-L-desoxiribocitosina, el éster 5'-valinil de β-L-desoxiribocitosina y L-dC. La **Figura 9b** es un gráfico de líneas que representa las concentraciones relativas del éster 3',5'-divalinil de β-L-desoxiribocitosina y sus metabolitos con el tiempo.

20 De manera similar, la **Figura 10a y 11a** son ejemplos no limitativos de los perfiles de HPLC usados para evaluar la estabilidad del éster 3',5'-divalinil de β-L-desoxiribocitosina a un pH de 7,20 y 4,51, respectivamente. A estos pH, el perfil de HPLC indica la presencia del éster 3',5'-divalinil de β-L-desoxiribocitosina junto con 3 metabolitos activos, el éster 3'-valinil de β-L-desoxiribocitosina, el éster 5'-valinil de β-L-desoxiribocitosina y L-dC. La **Figura 10b y 11b** son gráficos de líneas que representan las concentraciones relativas del éster 3',5'-divalinil de β-L-desoxiribocitosina y sus metabolitos con el tiempo.

25 La **Figura 12** es un ejemplo no limitativo de un perfil de HPLC usado para evaluar la estabilidad del éster 3',5'-divalinil de β-L-desoxiribocitosina a un pH de 1,23. A este pH, el perfil de HPLC sólo indica la presencia del éster 3',5'-divalinil de β-L-desoxiribocitosina sin ninguna descomposición en ninguno de sus 3 metabolitos activos.

La **Figura 13** es un gráfico de líneas que representa el metabolismo *in vitro* del éster 3',5'-divalinil de β-L-desoxiribocitosina en plasma humano.

30 La **Figura 14** es un gráfico de líneas que representa el metabolismo intracelular de β-L-desoxiribocitosina (L-dC) en células HepG2.

La **Figura 15** es un gráfico de líneas que representa la acumulación intracelular de L-dC en hepatocitos primarios humanos.

35 La **Figura 16** es un gráfico que ilustra el metabolismo de L-dA, L-dC, y L-dT en células Hep G2 humanas en términos de acumulación y descomposición. Las células se incubaron con 10 μM de compuesto.

Descripción detallada de la invención

Se ha descubierto que los β-L-2'-desoxinucleósidos, y en particular β-L-2'-desoxicitidina y β-L-2'-desoxitimidina, son activos frente al virus de la hepatitis B resistente a fármaco con mutación o mutaciones, y en particular la mutación está en el codón 552 (M a V), es decir, el codón 204 (M a V) de la región de transcriptasa inversa del virus. Tomando como base este descubrimiento, se proporciona un método para tratar VHB resistente a lamivudina (M552V) en un huésped, tal como un mamífero, y en particular un ser humano, que incluye administrar un β-L-2'-desoxinucleósido o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable. Además, se proporciona un método para prevenir que ocurra la mutación de VHB resistente a lamivudina (M552V) en un huésped sin estimular, tal como un mamífero, y en particular un ser humano, que incluye administrar un β-L-2'-desoxinucleósido o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable. También se proporciona un método para prevenir y/o suprimir el surgimiento del doble mutante de VHB (L528M/M552V) en un huésped, tal como un mamífero, y en particular un ser humano, que incluye administrar un β-L-2'-desoxinucleósido o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, el 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido se administra en alternación o combinación con uno o más 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósidos adicionales, o uno o más otros compuestos que presentan actividad frente al virus de la hepatitis B. En general, durante la terapia de alternación, se administra seriadamente una dosificación efectiva de cada agente, mientras en la terapia de combinación, se administran conjuntamente dosificaciones efectivas de dos o más agentes. Las dosificaciones dependerán de la velocidad de absorción, inactivación, y excreción del fármaco así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Debe indicarse que los valores de dosificación también variarán con la gravedad de la afección que se va a aliviar. Debe

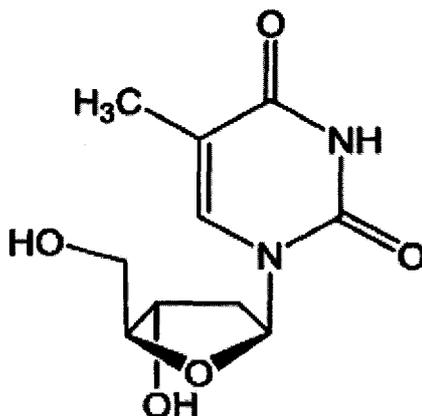
entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes y programas de dosificación específicos se ajustarán con el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

5 En otra realización, la descripción incluye un método para el tratamiento de seres humanos infectados con VHB que incluye administrar una cantidad de tratamiento de VHB de un profármaco de los derivados 2'-desoxi-β-L-eritropentofuranonucleósidos descritos. Un profármaco, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que se convierte en el nucleósido o un metabolito de éste con la administración in vivo. Los ejemplos no limitativos incluyen la sal farmacéuticamente aceptable (referida alternativamente como "sal fisiológicamente aceptable"), los derivados 5' y/o N⁴ (citidina) y/o N⁶ (adenosina) acilados (incluyendo con un residuo de aminoácido tal como L-valinil) o alquilados del compuesto activo, o los 5'-fosfolípido ó 5'-éter lípidos del compuesto activo.

10 Una realización preferida de la presente descripción es un método para el tratamiento de infecciones por VHB en seres humanos u otros animales huéspedes, que incluye administrar una cantidad efectiva de uno o más de un derivado 2'-desoxi-β-L-eritropentofuranonucleósido seleccionado del grupo que consiste en β-L-2'-desoxiadenosina, β-L-2'-desoxicitidina, β-L-2'-desoxiuridina, β-L-2'-guanosina, β-L-2'-desoxiinosina, y β-L-2'-desoxitimidina, o un profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, incluyen un fosfato, derivado 5' o N⁶ alquilado o acilado, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos de esta descripción bien poseen actividad anti-VHB, o son metabolizados a un compuesto o compuestos que presentan actividad anti-VHB. En una realización preferida, el 2'-desoxi-β-L-eritropentofuranonucleósido se administra sustancialmente en la forma de un único isómero, es decir, al menos aproximadamente 95% en la estereoconfiguración designada.

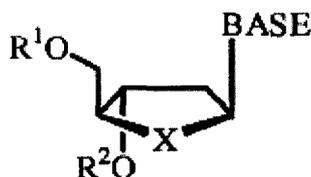
I. Compuestos definidos por la presente invención

La invención proporciona el uso de un compuesto β-L-2'-desoxinucleósido de la fórmula:



o su sal farmacéuticamente aceptable, o 3' ó 5'- éster aminoácido, incluyendo el éster L-valinil de éste.

25 En una realización, la descripción proporciona el uso de un β-L-2'-desoxinucleósido de la fórmula (I):



(I)

o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

30 R¹ es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

R² es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxilalquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

X es O, S, SO₂ o CH₂; y

- 5 BASE es una base de purina o pirimidina que puede estar opcionalmente sustituida;
y todas las formas tautómeras y estereoisómeras de éste.
En una realización preferida, X es O.
En una realización, el residuo de aminoácido tiene la fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), en el que
- 10 R⁸ es la cadena lateral de un aminoácido y en el que, como en prolina, R⁸ puede estar unido opcionalmente a R¹⁰ para formar una estructura de anillo; o alternativamente R⁸ es un resto alquilo, arilo, heteroarilo o heterocíclico;
R⁹ es hidrógeno, alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo; y
R¹⁰ y R¹¹ son independientemente hidrógeno, acilo (incluyendo un derivado de acilo unido a R⁸) o alquilo (incluyendo pero no limitado a metilo, etilo, propilo, y ciclopropilo);
y todas las formas tautómeras y estereoisómeras de éste.
- 15 En una primera subrealización, R¹ y/o R² es C(O)-alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo, y BASE es citosina, citosina protegida o timina.
En una segunda subrealización, R¹ y/o R² es C(O)-alquilo inferior y BASE es citosina, citosina protegida o timina.
En una tercera subrealización, R¹ y/o R² es C(O)-metilo y BASE es citosina, citosina protegida o timina.
En una cuarta subrealización, R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹) y BASE es citosina, citosina protegida o timina.
- 20 En una quinta subrealización, R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ es isopropilo, al menos uno de R¹⁰ y R¹¹ es hidrógeno, y BASE es citosina, citosina protegida o timina.
En una sexta subrealización, R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ es una cadena lateral de aminoácido, y BASE es citosina, citosina protegida o timina.
- 25 En una séptima subrealización, R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹); R⁸ es una cadena lateral de aminoácido no polar y BASE es citosina, citosina protegida o timina.
Los ejemplos no limitativos de subrealizaciones pueden definirse por la fórmula (I) en la que:
- (1) R¹ y/o R² es C(O)-metilo y BASE es citosina.
(2) R¹ y/o R² es C(O)-metilo y BASE es citosina protegida.
(3) R¹ y/o R² es C(O)-metilo y BASE es timina.
- 30 (4) R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NH₂), R⁸ es isopropilo y BASE es citosina.
(5) R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NH₂), R⁸ es isopropilo y BASE es citosina protegida.
(6) R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NH₂), R⁸ es isopropilo y BASE es timina.
- En una octava subrealización, X es O, R¹ y/o R² es C(O)-alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo, y BASE es citosina, citosina protegida o timina.
- 35 En una novena subrealización, X es O, R¹ y/o R² es C(O)-alquilo inferior y BASE es citosina, citosina protegida o timina.
En una décima subrealización, X es O, R¹ y/o R² es C(O)-metilo y BASE es citosina, citosina protegida o timina.
En una décimo primera subrealización, X es O, R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹) y BASE es citosina, citosina protegida o timina.
- 40 En una decimosegunda subrealización, X es O, R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ es isopropilo, al menos uno de R¹⁰ y R¹¹ es hidrógeno, y BASE es citosina, citosina protegida o timina.
En una decimotercera subrealización, X es O, R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ es una cadena lateral de aminoácido, y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

En una decimocuarta subrealización, X es O, R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹); R⁸ es una cadena lateral de aminoácido no polar; al menos uno de R⁵ y R⁶ es hidrógeno y B es citosina, citosina protegida o timina.

Los ejemplos no limitativos de subrealizaciones pueden definirse por la fórmula (I) en la que:

(1) X es O, R¹ y/o R² es C(O)-metilo y BASE es citosina.

5 (2) X es O, R¹ y/o R² es C(O)-metilo y BASE es citosina protegida.

(3) X es O, R¹ y/o R² es C(O)-metilo y BASE es timina.

(4) X es O, R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NH₂), R⁸ es isopropilo y BASE es citosina.

(5) X es O, R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NH₂), R⁸ es isopropilo y BASE es citosina protegida.

(6) X es O, R¹ y/o R² es C(O)C(R⁸)(H)(NH₂), R⁸ es isopropilo y BASE es timina.

10 En una decimoquinta subrealización, X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)-alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo, y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

En una decimosexta subrealización, X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)-alquilo inferior y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

15 En una decimoséptima subrealización, X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)-metilo y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

En una decimooctava subrealización, X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹) y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

En una decimonovena subrealización, X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ es isopropilo, al menos uno de R¹⁰ y R¹¹ es hidrógeno, y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

20 En una vigésima subrealización, X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ es una cadena lateral de aminoácido, y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

En una vigésimo primera subrealización, X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹); R⁸ es una cadena lateral de aminoácido no polar; al menos uno de R⁵ y R⁶ es hidrógeno y B es citosina, citosina protegida o timina.

Los ejemplos no limitativos de subrealizaciones pueden definirse por la fórmula (I) en la que:

25 (1) X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)-metilo y BASE es citosina.

(2) X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)-metilo y BASE es citosina protegida.

(3) X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)-metilo y BASE es timina.

(4) X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)C(R⁸)(H)(NH₂), R⁸ es isopropilo y BASE es citosina.

(5) X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)C(R⁸)(H)(NH₂), R⁸ es isopropilo y BASE es citosina protegida.

30 (6) X es O, R¹ es hidrógeno, R² es C(O)C(R⁸)(H)(NH₂), R⁸ es isopropilo y BASE es timina.

En una vigésimo segunda subrealización, X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)-alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo, y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

En una vigésimo tercera subrealización, X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)-alquilo inferior y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

35 En una vigésimo cuarta subrealización, X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)-metilo y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

En una vigésimo quinta subrealización, X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹) y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

40 En una vigésimo sexta subrealización, X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ es isopropilo, al menos uno de R¹⁰ y R¹¹ es hidrógeno, y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

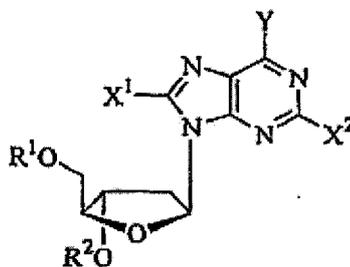
En una vigésimo séptima subrealización, X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ es una cadena lateral de aminoácido, y BASE es citosina, citosina protegida o timina.

En una vigésimo octava subrealización, X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹); R⁸ es una cadena lateral de aminoácido no polar; al menos uno de R⁵ y R⁶ es hidrógeno y B es citosina, citosina protegida o timina.

Los ejemplos no limitativos de subrealizaciones pueden definirse por la fórmula (I) en la que:

- 5 (1) X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)-metilo y BASE es citosina.
 (2) X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)-metilo y BASE es citosina protegida.
 (3) X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)-metilo y BASE es timina.
 (4) X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)C(R⁸)(H)(NH₂), R⁸ es isopropilo y BASE es citosina.
 (5) X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)C(R⁸)(H)(NH₂), R⁸ es isopropilo y BASE es citosina protegida.
 10 (6) X es O, R¹ y R² son independientemente C(O)C(R⁸)(H)(NH₂), R⁸ es isopropilo y BASE es timina.

En otra realización, la descripción proporciona el uso de una β-L-2'-desoxipurina de la fórmula:



o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

- 15 R¹ es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

R² es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

- 20 Y es OR³, NR³R⁴ o SR³; y

X¹ y X² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, halógeno, OR⁵, NR⁵R⁶ o SR⁵; y

- 25 R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son independientemente H, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquilo (en particular, dimetilaminometileno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

y todas las formas tautómeras y estereoisómeras de éste.

En una realización, el residuo de aminoácido tiene la fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), en el que

- 30 R⁸ es la cadena lateral de un aminoácido y en el que, como en prolina, R⁸ puede estar unido opcionalmente a R¹⁰ para formar una estructura de anillo; o alternativamente R⁸ es un resto alquilo, arilo, heteroarilo o heterocíclico;

R⁹ es hidrógeno, alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo; y

R¹⁰ y R¹¹ son independientemente hidrógeno, acilo (incluyendo un derivado de acilo unido a R⁸) o alquilo (incluyendo pero no limitado a metilo, etilo, propilo, y ciclopropilo);

y todas las formas tautómeras y estereoisómeras de éste.

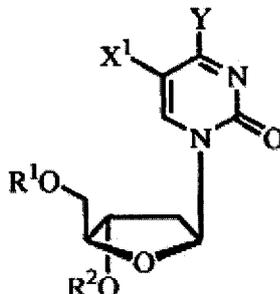
- 35 En otra realización preferida, R¹ y/o R² es un residuo de aminoácido, y en particular L-valinil.

En una realización, R³ es hidrógeno, y R⁴ es dimetilaminometileno.

En otra realización, R³ es hidrógeno, y R⁴ es acetilo.

En otra realización, R³ es hidrógeno, y R⁴ es L-valinil.

En otra realización, la descripción proporciona el uso de una β-L-2'-desoxipirimidina de la fórmula:



o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

5 R¹ es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

10 R² es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

Y es OR³, NR³R⁴ o SR³;

X¹ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, halógeno, OR⁵, NR⁵R⁶ o SR⁵; y

15 R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son independientemente H, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquilenos (en particular, dimetilaminometileno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

y todas las formas tautómeras y estereoisómeras de éste.

En una realización, el residuo de aminoácido tiene la fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), en el que

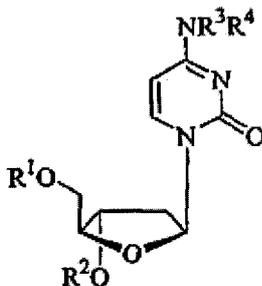
20 R⁸ es la cadena lateral de un aminoácido y en el que, como en prolina, R⁸ puede estar unido opcionalmente a R¹⁰ para formar una estructura de anillo; o alternativamente R⁸ es un resto alquilo, arilo, heteroarilo o heterocíclico;

R⁹ es hidrógeno, alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo; y

R¹⁰ y R¹¹ son independientemente hidrógeno, acilo (incluyendo un derivado de acilo unido a R⁸) o alquilo (incluyendo pero no limitado a metilo, etilo, propilo, y ciclopropilo);

25 y todas las formas tautómeras y estereoisómeras de éste.

En una realización particular, la β-L-2'-desoxipirimidina es β-L-2'-desoxicitidina de la fórmula:



o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

R¹ es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

5 R² es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato; y

10 R³ y R⁴ son independientemente H, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquilenos (en particular, dimetilaminometileno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

y todas las formas tautómeras y estereoisómeras de éste.

En una realización preferida, R¹ y/o R² es H.

En una realización, el residuo de aminoácido tiene la fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), en el que

15 R⁸ es la cadena lateral de un aminoácido y en el que, como en prolina, R⁸ puede estar unido opcionalmente a R¹⁰ para formar una estructura de anillo; o alternativamente R⁸ es un resto alquilo, arilo, heteroarilo o heterocíclico;

R⁹ es hidrógeno, alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo; y

R¹⁰ y R¹¹ son independientemente hidrógeno, acilo (incluyendo un derivado de acilo unido a R⁸) o alquilo (incluyendo pero no limitado a metilo, etilo, propilo, y ciclopropilo);

y todas las formas tautómeras y estereoisómeras de éste.

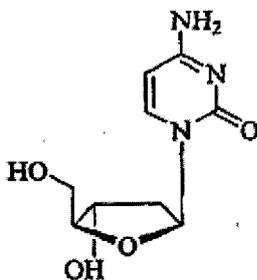
20 En otra realización preferida, R¹ y/o R² es un residuo de aminoácido, y en particular L-valinil.

En una realización, R³ es hidrógeno, y R⁴ es dimetilaminometileno.

En otra realización, R³ es hidrógeno, y R⁴ es acetilo.

En otra realización, R³ es hidrógeno, y R⁴ es L-valinil.

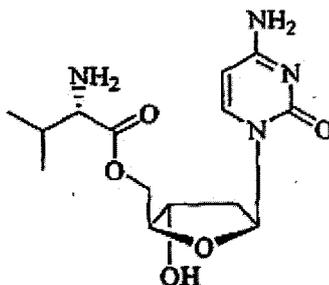
En una realización particular, la β-L-2'-desoxicitidina tiene la fórmula:



25

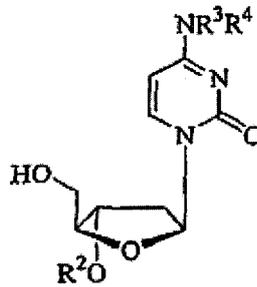
o una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste.

En otra realización particular, la β-L-2'-desoxicitidina tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

En otra realización particular, la β -L-2'-desoxicitidina tiene la fórmula:

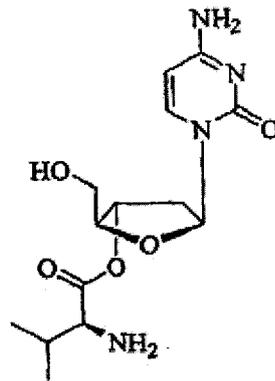


o una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

5 R^2 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un profármaco fosfato; y

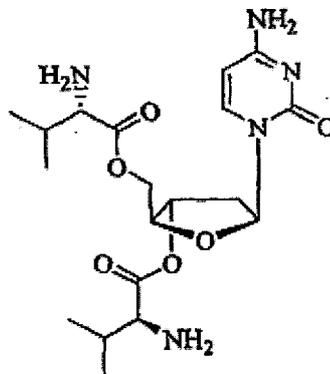
R^3 y R^4 son independientemente H, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, dialquilaminoalquileno, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un profármaco fosfato.

10 En otra realización particular más, la β -L-2'-desoxicitidina tiene la fórmula:



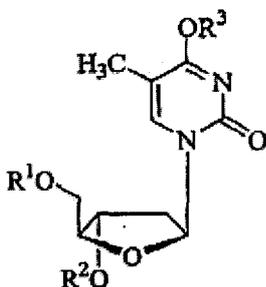
o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

En otra realización particular más, la β -L-2'-desoxicitidina tiene la fórmula:



15 o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

En otra realización, el β -L-2'-desoxinucleósido es β -L-2'-desoxitimidina de la fórmula:



o su sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

5 R^1 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato; y

R^2 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato; y

10 R^3 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquilenilo (en particular, dimetilaminometileno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un derivado fosfato;

y todas las formas tautómeras y estereoisómeras de éste.

15 En una realización preferida, R^1 y/o R^2 es H.

En una realización, el residuo de aminoácido tiene la fórmula $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, en el que

R^8 es la cadena lateral de un aminoácido y en el que, como en prolina, R^8 puede estar unido opcionalmente a R^{10} para formar una estructura de anillo; o alternativamente R^8 es un resto alquilo, arilo, heteroarilo o heterocíclico;

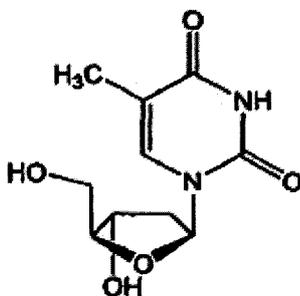
R^9 es hidrógeno, alquilo (incluyendo alquilo inferior) o arilo; y

20 R^{10} y R^{11} son independientemente hidrógeno, acilo (incluyendo un derivado de acilo unido a R^8) o alquilo (incluyendo pero no limitado a metilo, etilo, propilo, y ciclopropilo);

y todas las formas tautómeras y estereoisómeras de éste.

En otra realización preferida, R^1 y/o R^2 es un residuo de aminoácido, y en particular L-valinilo.

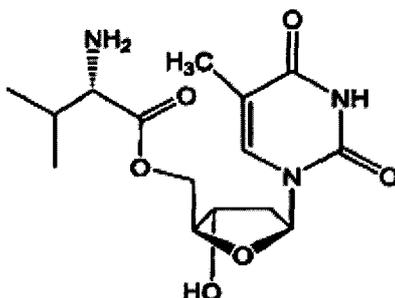
En una realización particular, la β -L-2'-desoxitimidina tiene la fórmula:



25

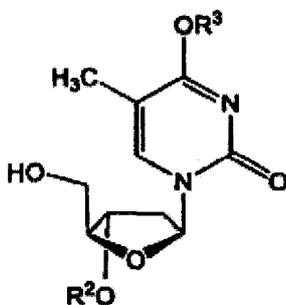
o una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste; y todas las formas tautómeras y estereoisómeras de éste.

En otra realización particular, la β -L-2'-desoxitimidina tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

En otra realización particular, la β -L-2'-desoxitimidina tiene la fórmula:



5

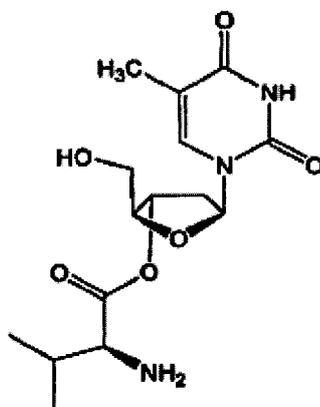
o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en el que

R^2 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un profármaco fosfato; y

10 R^3 es hidrógeno, alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, dialquilaminoalquilenos, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, o trifosfato, o un profármaco fosfato;

y todas las formas tautómeras y estereoisómeras de éste.

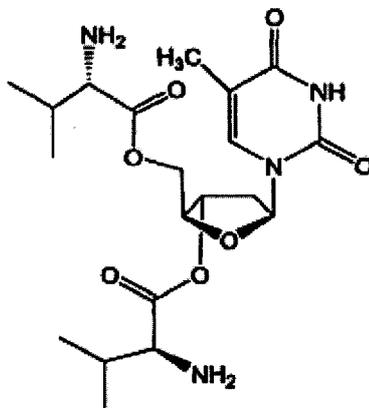
En otra realización particular más, la β -L-2'-desoxitimidina tiene la fórmula:



15

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

En otra realización particular más, la β -L-2'-desoxitimidina tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

II. Definiciones

- 5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "virus resistente" se refiere a un virus que presenta un incremento de tres, y más típicamente, cinco o más veces en CE_{50} comparado con el virus nativo en una línea celular constante, incluyendo, pero no limitado a células mononucleares de sangre periférica (PBM), células MT2 o MT4.
- 10 Tal y como se usa en la presente memoria, el término hepatitis B y afecciones relacionadas se refiere a hepatitis B y afecciones relacionadas tales como afecciones positivas para anticuerpo anti-VHB y positivas para VHB, inflamación hepática crónica causada por VHB, cirrosis, hepatitis aguda, hepatitis fulminante, hepatitis persistente crónica, y fatiga. La presente descripción incluye el uso de derivados de 2'-desoxi- β -L-eritro.pentofuranonucleósidos profilácticamente para prevenir o retardar la progresión de enfermedades clínicas en individuos que son positivos para anticuerpo anti-VHB o antígeno VHB o que han estado expuestos a VHB.
- 15 El término nucleósido biológicamente activo, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un nucleósido que presenta una CE_{50} de 15 micromolar o menos cuando se ensaya en células 2.2.15 transfectadas con el virión de la hepatitis.
- 20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "sustancialmente puro" o "sustancialmente en la forma de un isómero óptico" se refiere a una composición de nucleósido que incluye al menos 95% a 98%, o más, preferiblemente 99% a 100%, de un único enantiómero de ese nucleósido. En una realización preferida, el β -L-2'-desoxinucleósido se administra en forma sustancialmente pura para cualquiera de las indicaciones descritas.
- De manera similar, el término "aislado" se refiere a un compuesto que incluye al menos 85 ó 90% en peso, preferiblemente 95% a 98% en peso, e incluso más preferiblemente 99% a 100% en peso, del nucleósido, comprendiendo el resto otras especies químicas o enantiómeros.
- 25 El término "forma sustancialmente pura" se usa a lo largo de la especificación para describir un compuesto que incluye aproximadamente 90% o más, alternativamente al menos 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% o más de un único enantiómero de ese compuesto. Cuando se hace referencia a un nucleósido de una configuración particular (D o L) en esta especificación, se presume que el nucleósido se administra en forma sustancialmente pura.
- 30 El término "independientemente" se usa en la presente memoria para indicar que la variable que se aplica independientemente varía independientemente de aplicación a aplicación. Así, en un compuesto tal como R^1XYR^2 , donde R^1 es independientemente carbono o nitrógeno, "las dos R^1 " pueden ser carbono, las dos R^2 pueden ser nitrógeno, o una R^1 puede ser carbono y la otra R^2 nitrógeno.
- 35 El término "alquilo", tal y como se usa en la presente memoria, a no ser que se especifique otra cosa, se refiere a un hidrocarburo saturado lineal, ramificado, o cíclico, primario, secundario o terciario típicamente C_1 a C_{18} , tal como C_1 a C_{10} , preferiblemente C_1 a C_6 , y específicamente incluye metilo, trifluorometilo, CCl_3 , $CFCl_2$, CF_2Cl , etilo, CH_2CF_3 , CF_2CF_3 , propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *t*-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, *t*-pentilo, neopentilo, amilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, y 2,3-dimetilbutilo. El término incluye grupos alquilo tanto sustituidos como no sustituidos. Los restos con los que se puede sustituir el grupo alquilo se seleccionan del grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, bien
- 40

no protegido o protegido según sea necesario, como conocen los expertos en la técnica, por ejemplo, como se enseña en Greene, *et al*, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Segunda Edición, 1991,

5 El término "alquilo inferior", tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se especifique otra cosa, se refiere a un grupo alquilo C₁ a C₄ saturado lineal, ramificado, o si es apropiado, cíclico (por ejemplo, ciclopropilo), incluyendo formas tanto sustituidas como no sustituidas. A no ser que se indique específicamente otra cosa en esta solicitud, cuando alquilo es un resto adecuado, se prefiere alquilo inferior. De manera similar, cuando alquilo o alquilo inferior es un resto adecuado, se prefiere alquilo o alquilo inferior no sustituido.

10 El término "arilo", tal y como se usa en la presente memoria, a no ser que se especifique otra cosa, se refiere a un fenilo, bifenilo, o naftilo, y preferiblemente fenilo. El término incluye restos tanto sustituidos como no sustituidos. El grupo arilo puede sustituirse con uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, bien no protegido o protegido según sea necesario, como conocen los expertos en la técnica, por ejemplo, como se enseña en Greene, *et al*, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Segunda Edición, 1991,

15 El término "acilo" se refiere a un éster de ácido carboxílico de la fórmula -C(O)R' en la que el resto no carbonilo del grupo éster (es decir, R') se selecciona de alquilo o alquilo inferior lineal, ramificado, o cíclico, alcoxilalquilo incluyendo metoximetilo, alcarilo, aralquilo o arilalquilo (incluyendo bencilo o bencilo sustituido), ariloxialquilo tal como fenoximetilo, arilo incluyendo fenilo sustituido opcionalmente con halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I), alquilo C₁ a C₄ o alcoxi C₁ a C₄, residuo de aminoácido o heteroaromático. Los grupos arilo en los ésteres comprenden óptimamente un grupo fenilo. El término acilo incluye específicamente pero no está limitado a acetilo, propionilo, butirilo, pentanoilo, 3-metilbutirilo, hidrógeno succinilo, 3-clorobenzoilo, benzoilo, acetilo, pivaloilo, mesilato, propionilo, valerilo, caproico, caprílico, cáprico, laurico, mirístico, palmítico, esteárico, y oleico. Alternativamente, también están incluidos los ésteres sulfonato tales como alquilo o aralquilo sulfonilo incluyendo metanosulfonilo, el mono, di o trifosfato éster, tritilo o monometoxitritilo, tialquilsililo (por ejemplo, dimetil-t-butilsililo) o difenilmetilsililo. El término "acilo inferior" se refiere a un grupo acilo en el que el resto no carbonilo es alquilo inferior.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "base de purina" o "pirimidina", incluye, pero no está limitado a, 6-alquilpurina y N⁶-alquilpurinas, N⁶-acilpurinas, N⁶-bencilpurina, 6-halopurina, N⁶-vinilpurina, N⁶-purina acetilénica, N⁶-acil purina, N²-hidroxialquil purina, N²-tioalquil purina, N²-alquilpurinas, N²-alquilpirimidinas, N⁴-acilpirimidinas, 4-bencilpirimidina, N⁴-halopirimidinas, N⁴-pirimidinas acetilénicas, 4-acil y N⁴-acil pirimidinas, 4-hidroxialquil pirimidinas, 4-tioalquil pirimidinas, timina, citosina, 6-azapirimidina, incluyendo 6-azacitosina, 2- y/o 4-mercaptopirimidina, uracilo, C⁵-alquilpirimidinas, C⁵-bencilpirimidinas, C⁵-halopirimidinas, C⁵-vinilpirimidina, C⁵ pirimidina acetilénica, C⁵-acil pirimidina, C⁵-hidroxialquil purina, C⁵-amidopirimidina, C⁵-cianopirimidina, C⁵-nitropirimidina, C⁵-aminopirimidina, N²-alquilpurinas, N²-alquil-6-tiopurinas, 5-azacitosina, 5-azauracil, triazolopiridina, imidazolopiridina, pirrolopirimidina, y pirazolopirimidina. Pueden protegerse los grupos oxígeno y nitrógeno
30
35 funcionales en la base según sea necesario o se desee. Los grupos protectores adecuados son muy conocidos para los expertos en la técnica, e incluyen trimetilsililo, dimetilhexilsililo, *t*-butildimetilsililo, y *t*-butildifenilsililo, tritilo, grupos alquilo, grupos acilo tales como acetilo y propionilo, metanosulfonilo, y *p*-toluenosulfonilo.

40 Las bases preferidas incluyen citosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, 5- yodocitosina, uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 5-metiluracilo, timina, adenina, guanina, inosina, xantina, 2,6-diaminopurina, 6-aminopurina, 6- cloropurina y 2,6-dicloropurina, 6-bromopurina, 2,6-dibromopurina, 6-yodopurina, 2,6-di-yodopurina, 5-bromovinilcitosina, 5-bromoviniluracilo, 5-bromoetenilcitosina, 5-bromoeteniluracilo, 5-trifluorometilcitosina, 5-trifluorometiluracilo.

45 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "residuo de aminoácido" incluye pero no está limitado a los enantiómeros L o D o cualquier mezcla de éstos, incluyendo una mezcla racémica, todas las configuraciones tautómeras y estereoquímicas, de alanil, valinil, leucinil, isoleucinil, prolinil, fenilalaninil, triptofanil, metioninil, glicinil, serinil, treoninil, cisteinil, tirosinil, asparaginil, glutaminil, aspartoil, glutaoil, lisinil, argininil, e histidinil. Los aminoácidos preferidos están en la estereoconfiguración L y un resto de aminoácido preferido es L-valinil.

Las abreviaturas de los aminoácidos usadas en la presente memoria se describen en la Tabla 1.

Tabla 1

Aminoácidos			Codones			
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU		
Ácido Aspártico	Asp	D	GAC	GAU	GAC	GAU
Ácido Glutámico	Glu	E	GAA	GAG		

Aminoácidos			Codones						
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU					
Glicina	Gly	G	GGA	GCG	GGG	GGU			
Histidina	His	H	CAC	CAU					
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
Lisina	Lys	K	AAA	AAG					
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	GUU	
Metionina	Met	M	AUG						
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU					
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG					
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
Triptófano	Trp	W	UGG						
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU					

- 5 El término "inmunomodulador" o "modular una respuesta inmune", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una quimioquina o citoquina que regula bien directamente o indirectamente una respuesta inmune, que incluye efectos inmunoestimuladores así como inmunosupresores. La inmunomodulación es principalmente una alteración cualitativa de una respuesta inmune global, aunque también pueden ocurrir cambios cuantitativos conjuntamente con la inmunomodulación. La inmunomodulación puede implicar una respuesta inmune que se desplaza hacia una respuesta inmune de "tipo Th1", opuesto a una respuesta inmune de "tipo Th2". Las respuestas de tipo Th1 se consideran típicamente respuestas del sistema inmune celular (por ejemplo, linfocitos citotóxicos), mientras las respuestas de tipo Th2 son generalmente "humorales", o basadas en anticuerpos. Las respuestas inmunes de tipo Th1 se caracterizan normalmente por reacciones de "hipersensibilidad de tipo retardado" a un antígeno, y pueden detectarse al nivel bioquímico por niveles incrementados de citoquinas asociadas con Th1 tales como IFN-gamma, IL-2, IL-12, y TNF-beta, así como IFN-alfa e IL-6, aunque IL-6 también puede estar asociada asimismo con respuestas de tipo Th2. Las respuestas inmunes de tipo Th1 están asociadas generalmente con la producción de linfocitos citotóxicos (CTL) y bajos niveles o producción transitoria de anticuerpo. Las respuestas inmunes de tipo Th2 están asociadas generalmente con mayores niveles de producción de anticuerpos, incluyendo producción de IgE, una ausencia de o producción mínima de CTL, así como la expresión de citoquinas asociadas con Th2 tales como IL-4. De acuerdo con esto, la inmunomodulación en una realización puede reconocerse, por ejemplo, por un incremento en IFN-gamma y/o una disminución en la producción de IgE en un individuo tratado según la invención comparado con la ausencia de tratamiento.
- 10
- 15
- 20 Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no están limitados a, una molécula tal como una quimioquina o citoquina que afecta bien directamente o indirectamente una respuesta inmune. Los ejemplos no limitativos de inmunomoduladores incluyen citoquinas Th1, y en particular, interferón, interferón- α , interferón- α purificado, interferón- α 2a, interferón- α 2b, interferón- β , interferón- γ , interferón de consenso, interferón pegilado, interferón- α pegilado, factor estimulador de las colonias de granulocitos macrófagos, interleuquina, interleuquina-2, e interleuquina-12. En una realización, el inmunomodulador es interferón, por ejemplo, interferón- γ .
- 25

Las abreviaturas tal y como se usan en la presente memoria se pretende que se refieran a lo siguiente:

- Ad IFN Vector de adenovirus que expresa interferón gamma de marmota
- Ad RFP Vector de adenovirus sin el gen de interferón gamma de marmota
- ADN CCC Forma viral circular cerrada covalentemente de ADN
- 30 ADN Ácido desoxirribonucleico

	FTC	(-)-β-2',3'-didesoxi-5-fluoro-3'-tiacitidina
	GFP	Proteína verde fluorescente
	VHB	Virus de la hepatitis B
	IFN	interferón
5	L-FMAU	1-(2-fluoro-5-metil-β,L-arabinofuranosil)timina
	M1, M2	Mes 1 ó 2, respectivamente, después del inicio del tratamiento
	PCNA	Antígeno nuclear celular proliferativo
	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
	Pfu	Unidad formadora de placa
10	RFP	Proteína roja fluorescente
	RI	Intermedios de replicación
	RT	Transcripción inversa
	TUNEL terminal (TdT)	Ensayo de marcaje de extremos mellados con dUTP mediado por la desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT)
15	WHV	Virus de la hepatitis B de marmota

Tal y como se usa en la presente memoria, "tratamiento" es una estrategia para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, alivio o mejora de uno o más síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, prevención de la diseminación de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o mitigación del estado de la enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia comparada con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

El término huésped, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un organismo unicelular o multicelular en el que el virus puede replicarse, incluyendo líneas celulares y animales, y preferiblemente un ser humano. Alternativamente, el huésped puede portar una parte del genoma viral de la hepatitis B, cuya replicación o función puede alterarse por los compuestos de la presente invención. El término huésped se refiere específicamente a células infectadas, células transfectadas con todo o parte del genoma de VHB y animales, en particular, primates (incluyendo chimpancés) y seres humanos. En la mayor parte de las aplicaciones en animales de la presente invención, el huésped es un paciente humano. Las aplicaciones veterinarias en determinadas indicaciones, sin embargo, se anticipan claramente por la presente invención (tal como chimpancés).

III. Formulaciones de sal de nucleótido o profármaco

El término "sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable" se usa a lo largo de la especificación para describir cualquier forma farmacéuticamente aceptable (tal como un éster, éster fosfato, sal de un éster o un grupo relacionado) de un compuesto nucleósido que, después de la administración a un paciente, proporciona directamente o indirectamente, el β-L-2'-desoxinucleósido, o presentan actividad por sí mismos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Profármacos farmacéuticamente aceptables se refieren a un compuesto que se metaboliza, por ejemplo hidroliza u oxida, en el huésped para formar el compuesto de la presente invención. Los ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos protectores biológicamente lábiles en un resto funcional del compuesto activo. Los profármacos incluyen compuestos que pueden oxidarse, reducirse, aminarse, desaminarse, hidroxilarse, deshidroxilarse, hidrolizarse, deshidrolizarse, alquilarse, desalquilarse, acilarse, desacilarse, fosforilarse, desfosforilarse para producir el compuesto activo. Los compuestos de esta invención poseen actividad antiviral frente a VHB, y en particular VHB resistente a lamivudina (M552V), o se metabolizan a un compuesto que presenta dicha actividad.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "sal o complejo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal o complejo del β-L-2'-desoxinucleósido que retiene la actividad biológica deseada del compuesto parental y presenta efectos toxicológicos no deseados mínimos, o no los presenta. Los ejemplos no limitativos de dichas sales son (a) sales de adición a ácido formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido bicarbónico, ácido carbónico, y semejantes), y sales formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido maleico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmoico, ácido algínico, ácido poliglútamico, ácido tósico, ácido

metanosulfónico, ácido cítrico, ácido malónico, ácido α -cetoglutárico, ácido α -glicerofosfónico, ácido naftalensulfónico, ácidos naftalendisulfónicos, y ácido poligalacturónico; (b) sales de adición a base formadas con cationes tales como sodio, potasio, cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio, potasio, y semejantes, o con un catión orgánico formado con N,N-dibencil-etilendiamina, amoniaco, o etilendiamina; o (c) combinaciones de (a) y (b), por ejemplo, una sal de tanato de cinc o semejantes.

Cualquiera de los nucleósidos descritos en la presente memoria y/o los compuestos que se describen en la presente memoria para uso en terapia de combinación o alternación puede administrarse como un profármaco nucleótido para incrementar la actividad, biodisponibilidad, estabilidad o alterar de otra manera las propiedades del nucleósido. Se conocen varios ligandos profármacos de nucleótido. En general, la alquilación, acilación u otra modificación lipofílica del mono, di o trifosfato del nucleósido incrementará la estabilidad del nucleótido. Los ejemplos de grupos sustituyentes que pueden reemplazar uno o más hidrógenos en el resto fosfato son alquilo, arilo, esteroides, carbohidratos, incluyendo azúcares, 1,2-diacilglicerol y alcoholes. Muchos se describen en R. Jones y N. Bischofberger, *Antiviral Research*, **1995**, 27, 1-17. Cualquiera de éstos puede usarse en combinación con los nucleósidos descritos para conseguir un efecto deseado.

En una realización, las posiciones 5' y/o 3'-O y/o la posición N⁴ del β -L-2'-desoxinucleósido se acila, alquila o fosforila (incluyendo ésteres mono, di, y trifosfato así como fosfatos estabilizados y fosfolípidos). En una realización, el grupo acilo es un éster de ácido carboxílico en el que el resto no carbonilo del grupo éster se selecciona de alquilo lineal, ramificado o cíclico, alcoxilalquilo incluyendo metoximetilo, aralquilo incluyendo bencilo, ariloxialquilo incluyendo fenoximetilo, arilo incluyendo fenilo sustituido opcionalmente con halógeno, alquilo, alquilo o alcoxi, ésteres sulfonato tales como alquilo o aralquilo sulfonilo incluyendo metanosulfonilo, tritilo o monometoxitritilo, bencilo sustituido, trialquilsililo, o difenilmethylsililo. Los grupos arilo en los ésteres comprenden óptimamente un grupo fenilo. El grupo alquilo puede ser lineal, ramificado o cíclico y es preferiblemente C₁ a C₁₈.

El β -L-2'-desoxinucleósido puede convertirse en un éster farmacéuticamente aceptable por reacción con un agente esterificante apropiado, por ejemplo, un haluro o anhídrido de ácido. El nucleósido o su profármaco farmacéuticamente aceptable puede convertirse en una sal farmacéuticamente aceptable de éste de una manera convencional, por ejemplo, por tratamiento con una base o ácido apropiado. El éster o sal puede convertirse en el nucleósido parental, por ejemplo, por hidrólisis. Las modificaciones de los compuestos activos, específicamente en las posiciones 5' y/o 3'-O y/o la posición N⁴, pueden afectar la biodisponibilidad y velocidad de metabolismo de la especie activa, proporcionando así control sobre la administración de la especie activa. Una modificación preferida es un 3' y/o 5' éster de aminoácido, incluyendo el éster L-valinil.

El nucleósido activo puede proporcionarse como un 5'-fosfoéster lípido o un 5'-éter lípido, como se describe en las referencias siguientes: Kucera, L.S., N. Iyer, E. Leake, A. Raben, Modest E.K., D.L.W., y C. Piantadosi "Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation." *AIDS Res. Hum. Retro Viruses*, **1990**, 6, 491-501; Piantadosi, C, J. Marasco C.J., S.L. Morris-Natschke, K.L. Meyer, F. Gumus, J.R. Surles, K.S. Ishaq, L.S. Kucera, N. Iyer, CA. Wallen, S. Piantadosi, y E.J. Modest "Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV activity." *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1408.1414; Hosteller, K.Y., D.D. Richman, D.A. Carson, L.M. Stuhmiller, G.M. T. van Wjlc, y H. van den Bosch "Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3,-deoxythymidine." *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, 36, 2025.2029; Hosetler, K.Y., L.M. Stuhmiller, H.B. Lenting, H. van den Bosch, y D.D. Richman, "Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides." *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 61127.

Los ejemplos no limitativos de patentes U.S. que describen sustituyentes lipofílicos adecuados que pueden incorporarse covalentemente al nucleósido, preferiblemente en la posición 5'-OH del nucleósido o preparaciones lipofílicas, incluyen las Patentes U.S. Nos. 5.149.794 (sep. 22, 1992, Yatvin *et al*); 5.194.654 (mar. 16, 1993, Hostetter *et al*, 5.223.263 (junio 29, 1993, Hostetter *et al*); 5.256.641 (oct. 26, 1993, Yatvin *et al*); 5.411.947 (mayo 2, 1995, Hostetter *et al*); 5.463.092 (oct. 31, 1995, Hostetter *et al*); 5.543.389 (ago. 6, 1996, Yatvin *et al*); 5.543.390 (ago. 6, 1996, Yatvin *et al*); 5.543.391 (ago. 6, 1996, Yatvin *et al*); y 5.554.728 (sep. 10, 1996; Basava *et al*). Las solicitudes de patente extranjeras que describen sustituyentes lipofílicos que pueden unirse a los nucleósidos de la presente invención, o preparaciones lipofílicas, incluyen WO 89/02733, WO 90/00555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO 94/26273, WO 96/15132, EP 0 350 287, EP 93917054.4, y WO 91/19721.

Los ejemplos no limitativos de profármacos de nucleótido se describen en las referencias siguientes: Ho, D.H.W. "Distribution of Kinase and deaminase of 1β -D- arabinofuranosylcytosine in tissues of man and muse." *Cancer Res.* **1973**, 33, 2816-2820; Holy, A. "Isopolar phosphorous-modified nucleotide analogues," En: De Clercq (Ed.), JAI Press, *Advances in Antiviral Drug Design*, **1992**, Vol. I, 179-231; Hong, C.I., Nechaev, A., y West, C.R. "Synthesis and antitumor activity of 1β -D-arabino-furanosylcytosine conjugates of cortisol and cortisone." *Biochem. Biophys. Rs. Commun.* **1979a**, 88, 1223-1229; Hong, C.I., Nechaev, A., Kirisits, A.J. Buchleit, D.J. y West, C.R. "Nucleoside conjugates as potential antitumor agents. 3. Synthesis and antitumor activity of 1-(β -D-arabinofuranosyl) cytosine conjugates of corticosteroids and selected lipophilic alcohols." *J. Med. Chem.* **1980**, 28, 171-177; Hosteller, K.Y., Stuhmiller, L.M., Lenting, H.B.M. van den Bosch, H. y Richman *J. Biol. Chem.* 265, 6112-6117; Hosteller, K.Y., Carson, D.A. y Richman, D.D. "Phosphatidylazidothymidine: mechanism of antiretroviral action in CEM cells." *J. Biol*

- Chem.* **1991**, 266, 11714-11717; Hosteller, K.Y., Korba, B. Sridhar, C, Gardener, M. "Antiviral activity of phosphatidyl-dideoxycytidine in hepatitis B-infected cells and enhanced hepatic uptake in mice." *Antiviral Res.* **1994a**, 24, 59-67; Hosteller, K.Y., Richman, D.D., Sridhar, C.N. Feigner, P.L. Feigner, J., Ricci, J., Gardener, M.F. Selleseth, D.W. y Ellis, M.N. "Phosphatidylazidothymidine and phosphatidyl-ddC: Assessment of uptake in mouse lymphoid tissues and antiviral activities in human immunodeficiency virus-infected cells and in raucher leukemia virus-infected mice." *Antimicrobial Agents Chemother.* **1994b**, 38, 2792-2797; Hunston, R.N., Jones, A.A. McGuigan, C, Walker, R.T., Balzarini, J., y DeClercq, E. "Synthesis and biological properties of some cyclic phosphotriesters derived from 2'-deoxy-5-fluorouridine." *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 440-444; Ji, Y.H., Moog, C., Schmitt, G., Bischoff, P. y Luu, B. "Monophosphoric acid esters of 7- β - hydroxycholesterol and of pyrimidine nucleoside as potential antitumor agents: synthesis and preliminary evaluation of antitumor activity." *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 2264-2270; Jones, A.S., McGuigan, C, Walker, R.T., Balzarini, J. y DeClercq, E. "Synthesis, properties, and biological activity of some nucleoside cyclic phosphoramidates." *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1984**, 1471-1474; Juodka, B.A.y Smart, J. "Synthesis of diribonucleoside phosph (P \rightarrow N) amino acid derivatives." *Coll. Czech. Chem. Comm.* **1974**, 39, 363-968; Kataoka, S., Imai, J., Yamaji, N., Kato, M., Saito, M., Kawada, T. y Imai, S. "Alkylated cAMP derivatives; selective synthesis and biological activities." *Nucleic Acids Res. Sym. Ser.* **1989**, 21, 1-2; Kataoka, S., Uchida, "(cAMP) benzyl and methyl triesters." *Heterocycles* **32**, 1351-1356; Kinchington, D., Harvey, J.J., O'Connor, T.J., Jones, B.C.N.M., Devine, KG., Taylor-Robinson D., Jeffries, D.J. y McGuigan, C. "Comparison of antiviral effects of zidovudine phosphoramidate and phosphorodiamidate derivatives against HIV and ULV *in vitro*." *Antiviral Chem. Chemother.* **1992**, 3, 107-112; Kodama, K., Morozumi, M., Saithoh, K.I., Kuninaka, H., Yosino, H. y Saneyoshi, M. "Antitumor activity and pharmacology of 1- β -D- arabinofuranosylcytosine-5'-stearylphosphate; an orally active derivative of 1- β -D- arabinofuranosylcytosine." *Jpn. J. Cancer Res.* **1989**, 80, 679-685; Kory, M. y Engels, J. "The effects of adenosine- and guanosine 3',5' phosphoric acid benzyl esters on guinea-pig ventricular myocardium." *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1979**, 310, 103-111; Kumar, A., Goe, P.L., Jones, A.S. Walker, R.T. Balzarini, J. y DeClercq, E. "Synthesis and biological evaluation of some cyclic phosphoramidate nucleoside derivatives." *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 2368-2375; LeBec, C, y Huynh-Dinh, T. "Synthesis of lipophilic phosphate triester derivatives of 5-fluorouridine an arabinocytidine as anticancer prodrugs." *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6553-6556; Lichtenstein, J., Barner, H.D. y Cohen, S.S. "The metabolism of exogenously supplied nucleotides by *Escherichia coli* " *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 457- 465; Luchty, J., Von Daeniken, A., Friederich, J. Manthey, B., Zweifel, J., Schlatter, C. y Benn, M.H. "Synthesis and toxicological properties of three naturally occurring cyanoethioalkanes". *Mitt. Geg. Lebensmittelunters. Hyg.* **1981**, 72, 131-133 (*Chem. Abstr.* 95, 127093); McGigan, C. ToUerfield, S.M. y Riley, P.a. "Synthesis and biological evaluation of some phosphate triester derivatives of the anti-viral drug Ara." *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 6065-6075; McGuigan, C, Devine, KG., O'Connor, T.J., Galpin, S.A., Jeffries, D.J. y Kinchington, D. "Synthesis and evaluation of some novel phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) as anti-HIV compounds." *Antiviral Chem. Chemother.* **1990a**, 1, 107-113; McGuigan, C, O'Connor, T.J., Nicholls, S.R. Nickson, C. y Kinchington, D. "Synthesis and anti-HIV activity of some novel substituted dialkyl phosphate derivatives of AZT and ddCyd." *Antiviral Chem. Chemother.* **1990b**, 1, 355-360; McGuigan, C, Nicholls, S.R., O'Connor, T.J., y Kinchington, D. "Synthesis of some novel dialkyl phosphate derivative of 3'-modified nucleosides as potential anti-AIDS drugs." *Antiviral Chem. Chemother.* **1990c**, 1, 25-33; McGuigan, C, Devin, K.G., O'Connor, T.J., y Kinchington, D. "Synthesis and anti-HIV activity of some haloalkyl phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3' deoxythymidine (AZT); potent activity of the trichloroethyl methoxyalaninyl compound." *Antiviral Res.* **1991**, 15, 255-263; McGuigan, C, Pathirana, R.N., Mahmood, N., Devine, K.G. y Hay, A.J. Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV-1 in cell lines which are resistant to the action of AZT. *Antiviral Res.* **1992**, 17, 311-321; McGuigan, C, Pathirana, R.N., Choi, S.M., Kinchington, D. y O'Connor, T.J. Phosphoramidate derivatives of AZT as inhibitors of HIV; studies on the carboxyl terminus. *Antiviral Chem. Chemother.* **1993a**, 4, 97-101; McGuigan, C, Pathirana, R.N., Balzarini, J. y DeClercq, E. "Intracellular delivery of bioactive AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT." *J. Med. Chem.* **1993b**, 36, 1048- 1052.

Los derivados alquil hidrógeno fosfato del agente anti-VIH AZT pueden ser menos tóxicos que el análogo nucleósido parental. *Antiviral Chem. Chemother.* **5**, 271-277; Meyer, R. B., Jr., Shuman, D.A. y Robins, R.K. "Synthesis of purine nucleoside 3', 5'-cyclic phosphoramidates." *Tetrahedron Lett.* **1973**, 269-272; Nagyvary, J. Gohil, R.N., Kirchner, C.R. y Stevens, J.D. "Studies on neutral esters of cyclic AMP." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, 55, 1072-1077; Namane, A. Gouyette, C, Fillion, M.P., Fillion, G. y Huynh-Dinh, T. "Improved brain delivery of AZT using a glycosyl phosphotriester prodrug." *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3039-3044; Nargeot, J. Nerbonne, J.M. Engels, J. y Leser, H.A. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1983**, 80, 2395-2399; Nelson, K.A., Benrude, W.G. Stser, W.N. y Hutchinson, J.P. "The question of chair-twist equilibria for the phosphate rings of nucleoside cyclic 3', 5' monophosphates. ¹HNMR and x-ray crystallographic study of the diastereomers of thymidine phenyl cyclic 3', 5'- monophosphate." *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 4058-4064; Nerbonne, J.M., Richard, S., Nargeot, J. y Lester, H.A. "New photoactivatable cyclic nucleotides produce intracellular jumps in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations." *Nature* **1984**, 301, 74-76; Neumann, J.M., Herv, M., Debouzy, J.C., Guerra, F.I., Gouyette, C, Dupraz, B. y Huyny-Dinh, T. "Synthesis and transmembrane transport studies by NMR of a glucosyl phospholipid of thymidine." *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4270-4277; Ohno, R., Tatsumi, N., Hirano, M., Imai, K. Mizoguchi, H, Nakamura, T., Kosaka, M., Takatuski, K., Yamaya, T., Toyama K., Yoshida, T., Masaoka, T., Hashimoto, S., Ohshima, T., Kimura, I., Yamada, K. y Kimura, J. "Treatment of myelodysplastic syndromes with orally administered 1- β -D-arabinouranosylcytosine -5' stearylphosphate." *Oncology* **1991**, 48, 451-455. Palomino, E., Kessle, D. y Horwitz, J.P. "A dihydropyridine carrier system for sustained delivery of 2',3' dideoxynucleosides to the brain." *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 22-625; Perkins, R.M., Barney, S. Witrock, R., Clark, P.H., Levin, R. Lambert, D.M., Petteway, S.R., Serafinowska, H.T., Bailey, S.M.,

- Jackson, S., Harnden, M.R. Ashton, R., Sutton, D., Harvey, J.J. y Brown, A.G. "Activity of BRL47923 and its oral prodrug, SB203657A against a raucher murine leukemia virus infection in mice." *Antiviral Res.* **1993**, *20* (Supl. I), 84; Piantadosi, C., Marasco, C.J., Jr., Norris-Natschke, S.L., Meyer, K.L., Gumus, F., Surlis, J.R., Ishaq, K.S., Kucera, L.S. Iyer, N., Wallen, C.A., Piantadosi, S. y Modest, E.J. "Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV-1 activity." *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1408-1414; Pompon, A., Lefebvre, I., Imbach, J.L., Kahn, S. y Farquhar, D. "Decomposition pathways of the mono- and bis(pivaloyloxymethyl) esters of azidothymidine-5'-monophosphate in cell extract and in tissue culture medium; an application of the 'on-line ISRP-cleaning HPLC technique." *Antiviral Chem Chemother.* **1994**, *5*, 91-98; Postemark, T. "Cyclic AMP and cyclic GMP." *Annu. Rev. Pharmacol.* **1974**, *14*, 23-33; Prisbe, E.J., Martin, J.C.M., McGhee, D.P.C., Barker, M.F., Smees, D.F. Duke, A.E., Matthews, T.R. y Verheyden, J.P.J. "Synthesis and antiherpes virus activity of phosphate an phosphonate derivatives of 9-[(1, 3-dihydroxy-2-propoxy)methyl] guanine." *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 671-675; Pucchi, F., Gosselin, G., Lefebvre, L., Pompon, a., Aubertin, A.M. Dim, y Imbach, J.L. "Intracellular delivery of nucleoside monophosphate through a reductase-mediated activation process." *Antiviral Res.* **1993**, *22*, 155-174; Pugaeva, V.P., Klochkeva, S.I., Mashbits, F.D. y Eizengart, R.S. "Toxicological assessment and health standard ratings for ethylene sulfide in the industrial atmosphere." *Gig. Trf. Prof. Zabol.* **1969**, *14*, 47-48 (*Chem. Abstr.* *72*, 212); Robins, R.K. "The potential of nucleotide analogs as inhibitors of Retro viruses and tumors." *Pharm. Res.* **1984**, *11-18*; Rosowsky, A., Kim, S.H., Ross y J. Wick, M.M. "Lipophilic 5'-(alkylphosphate) esters of 1-β-D- arabinofuranosylcytosine and its N⁴-acyl and 2,2'-anhydro-3'-O-acyl derivatives as potential prodrugs." *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 171-178; Ross, W. "Increased sensitivity of the walker turnout towards aromatic nitrogen mustards carrying basic side chains following glucose pretreatment." *Biochem. Pharm.* **1961**, *8*, 235-240; Ryu, E.K., Ross, R.J. Matsushita, T., MacCoss, M., Hong, Cl. y West, C.R. "Phospholipid-nucleoside conjugates. 3. Synthesis and preliminary biological evaluation of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine 5' diphosphate [-], 2-diacylglycerols." *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 1322-1329; Saffhill, R. y Hume, W.J. "The degradation of 5-iododeoxyuridine and 5- bromoethoxyuridine by serum from different sources and its consequences for the use of these compounds for incorporation into DNA." *Chem. Biol. Interact.* **1986**, *57*, 347-355; Saneyoshi, M., Morozumi, M., Kodama, K., Machida, J., Kuninaka, A. y Yoshino, H. "Synthetic nucleosides and nucleotides. XVI. Synthesis and biological evaluations of a series of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine 5'-alkyl or arylphosphates." *Chem Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 2915-2923; Sastry, J.K., Nehete, P.N., Khan, S., Nowak, B.J., Plunkett, W., Arlinghaus, R.B. y Farquhar, D. "Membrane-permeable dideoxyuridine 5'-monophosphate analogue inhibits human immunodeficiency virus infection." *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 441-445; Shaw, J.P., Jones, R.J. Arimilli, M.N., Louie, M.S., Lee, W.A. y Cundy, K.C. "Oral bioavailability of PMEA from PMEA prodrugs in male Sprague-Dawley rats." *9th Annual AAPS Meeting.* **1994** San Diego, CA (Resumen). Shuto, S., Ueda, S., Imamura, S., Fukukawa, K. Matsuda, A. y Ueda, T. "A facile one- step synthesis of 5' phosphatidyl nucleosides by an enzymatic two-phase reaction." *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 199-202; Shuto, S. Itoh, H, Ueda, S., Imamura, S., Kukukawa, K., Tsujino, M., Matsuda, A. y Ueda, T. *Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 209-217. Un ejemplo de un profármaco fosfato útil es el grupo S-acil-2-tioetilo, también referido como "SATE."

IV. Terapia de combinación o alternación

- Se ha reconocido que las variantes de VHB resistentes a fármaco pueden surgir después de un tratamiento prolongado con un agente antiviral. La resistencia a fármaco ocurre lo más típicamente por mutación de un gen que codifica una enzima usada en el ciclo de vida viral, y lo más típicamente en el caso de VHB, ADN polimerasa. Recientemente, se ha demostrado que la eficacia de un fármaco frente a una infección por VHB puede prolongarse, aumentarse, o restaurarse por la administración del compuesto en combinación o alternación con un segundo, tercer, cuarto, etc., compuesto antiviral que induzca una mutación diferente de la causada por el fármaco principal. Alternativamente, las farmacocinéticas, biodistribución u otro parámetro del fármaco puede alterarse por dicha terapia de combinación o alternación. Las dosificaciones dependerán de factores tales como absorción, biodistribución, velocidades de metabolismo y excreción para cada fármaco así como otros factores conocidos para los expertos en la técnica. Debe indicarse que los valores de dosificación también variarán con la gravedad de la afección que se va a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes y programas de dosificación específicos se ajustarán con el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Los ejemplos de intervalos de dosificación adecuados para compuestos anti-VHB pueden encontrarse en la bibliografía científica y en el Physicians Desk Reference. Muchos ejemplos de intervalos de dosificación adecuados para otros compuestos descritos en la presente memoria también se encuentran en la bibliografía pública o pueden identificarse usando procedimientos conocidos. Estos intervalos de dosificación pueden modificarse según se desee para conseguir un resultado deseado.
- En general, durante la terapia de combinación, se administran conjuntamente dosificaciones efectivas de dos o más agentes, mientras en la terapia de alternación, se administra seriamente una dosificación efectiva de cada agente. En la terapia de alternación, por ejemplo, pueden administrarse uno o más primeros agentes en una cantidad efectiva durante un periodo de tiempo efectivo para tratar la infección viral, y después uno o más segundos agentes que sustituyen los primeros agentes en la rutina de la terapia y asimismo proporcionados en una cantidad efectiva durante un periodo de tiempo efectivo. En general, la terapia de combinación se prefiere típicamente sobre la terapia de alternación porque induce múltiples estreses simultáneos en el virus.

En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, si el β-L-2'-nucleósido de la presente invención se administra en combinación o alternación con un segundo inhibidor de transcriptasa inversa que es un nucleósido

o no nucleósido que está fosforilado a una forma activa, se prefiere que un segundo compuesto se fosforile por una enzima que sea diferente de la que fosforila el β -L-2'-nucleósido seleccionado de la presente invención *in vivo*. Los ejemplos de enzimas quinasas son timidina quinasa, citosina quinasa, guanosina quinasa, adenosina quinasa, desoxicitidina quinasa, 5'-nucleotidasa y desoxiguanosina quinasa.

- 5 La actividad anti-virus de la hepatitis B, frente a VHB bien de tipo salvaje o una cepa resistente, de los β -L-2'-desoxinucleósidos proporcionados en la presente memoria, y en particular β -L-2'-dC o β -L-2'-dT, o las sales, ésteres, fosfatos o profármacos farmacéuticamente aceptables de estos compuestos, puede aumentarse por la administración de dos o más de estos nucleósidos en combinación o alternación. Alternativamente, por ejemplo, uno o más de los β -L-2'-desoxinucleósidos proporcionados en la presente memoria, y en particular β -L-2'-dC o β -L-2'-dT, pueden administrarse en combinación y/o alternación con uno o más compuestos adicionales que presentan actividad frente al virus de la hepatitis B. Los ejemplos no limitativos incluyen FTC, L-FMAU, DAPD, DXG, famciclovir, penciclovir, BMS-200475, bis pom PMEA (adefovir, dipivoxil), lobucavir, ganciclovir, tenofovir, Lfd4C, foscarnet (fosfonoformato trisodio) isoprinosina, levamizol, N-acetilcistina (NAC), interferón, interferón pegilado, ribavirin, PC1323 o ácido poliadenílico poliuridílico. En una realización, los β -L-2' desoxinucleósidos proporcionados en la presente memoria, y en particular β -L-2'-dC o β -L-2'-dT, pueden administrarse en combinación y/o alternación con 3TC.

Los ejemplos de agentes que se han identificado como activos frente al virus de la hepatitis B, y pueden usarse así en combinación y/o alternación con la composición de la presente invención incluyen:

Nombre del Fármaco	Clase de Fármaco	Empresa	Estado FDA
Intron A (interferón α -2b)	interferón	Schering-Plough	aprobado por la FDA
Epivir-HBV (lamivudina, 3TC)	análogo de nucleósido	GlaxoSmithKline	aprobado por la FDA
Adefovir dipivoxil	análogo de nucleótido	Gilead Sciences	aprobado por la FDA
Coviracil (emtricitabina; FTC)	análogo de nucleósido	Gilead Sciences	Fase III
Entecavir	análogo de nucleósido	Bristol-Myers Squibb	Fase III
Clevudine (L-FMAU)	análogo de nucleósido	Gilead Sciences	Fase II
ACH 126,443 (L-Fd4C)	análogo de nucleósido	Achillion Pharmaceuticals	Fase II
AM 365	análogo de nucleósido	Amrad	Fase II (Asia y Australia)
DAPD	análogo de nucleósido	Gilead Sciences	Fase II
LdT (telbavudina)	análogo de nucleósido	Idenix	Fase III
XTL 001	anticuerpo monoclonal	XTL Biopharm	Fase II (Israel)
Theradigm	Inmunoestimulador	Epimmune	Fase II
Zadaxin** (timosina)	Inmunoestimulador	SciClone	Fase II con Epivir-HBV
EHT 899	proteína viral	Enzo Biochem	Fase II (Israel)
Vacuna de ADN de VHB	Inmunoestimulador	PowderJect (Reino Unido)	Fase I
MCC 478	análogo de nucleósido	Eli Lilly	Fase I (Alemania)
vallDc (valtorcitabina)	análogo de nucleósido	Idenix	Fase II
ICN 2001	análogo de nucleósido	ICN	Preclínico
Fluoro L y D nucleósidos	análogo de nucleósido	Pharmasset	Preclínico
Racivir	análogo de nucleósido	Pharmasset	Preclínico
Robustaflovona	análogo de nucleósido	Advanced Life Sciences	Preclínico

** Zadaxin: aprobación de fármaco huérfano en los EEUU

Terapias post-exposición y/o post trasplante de hígado

BayHepB	inmunoglobulina VHB	Bayer (EEUU)	aprobado por la FDA
anti-hepatitis B	inmunoglobulina VHB	Cangene (canadá)	enviado a NDA 2001
Nabi-HB	inmunoglobulina VHB	Nabi	aprobado por la FDA

Fuentes:

5 Hepatitis B Foundation Drug Watch. Compounds in Development for Hepatitis B. www.hepb.org, Pharmaceuticals Research and Manufacturers of America. Mark Nelson, MD. Selected Highlights from Drug Development for Antiretroviral Therapies 2001 (Hep DART 2001) diciembre 16-20, 2001, Maui, Hawaii; Selected Highlights from American Association for the Study of Liver Diseases 52nd Annual Meeting (52nd AASLD). noviembre 9-13, 2001. Dallas, Tejas; Report on Hepatitis B from Digestive Disease Week 2001; mayo 20-23, 2001, Atlanta, Georgia.

10 En una realización, el 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleósido se administra en alternación o combinación con uno o más tal como un agente inmunoestimulador y/o inmunomodulador, tal como una citoquina TH1, y en particular un interferón, preferiblemente interferón gamma para el tratamiento de VHB de tipo salvaje o una cepa resistente de VHB, y/o para la supresión o prevención de la expresión de una cepa resistente de VHB. Por ejemplo, pueden usarse secuencias inmunoestimuladoras, tales como las descritas anteriormente en la presente memoria, así como

15 en: Krieg *et al.* (1989) *J Immunol.* 143:2448-2451; Tokunaga *et al.* (1992) *Microbiol. Immunol.* 36:55-66; Kataoka *et al.* (1992) *Jpn. J Cancer Res.* 83:244-247; Yamamoto *et al.* (1992) *J Immunol.* 148:4072-4076; Mojcik *et al.* (1993) *Clin. Immunol. and Immunopathol.* 67:130-136; Branda, *et al.* (1993) *Biochem. Pharmacol.* 71 45:2037-2043; Pisetsky *et al.* (1994) *Life Sci.* 54(2): 101-107; Yamamoto *et al.* (1994a) *Antisense Research and Development* 4:119-122; Yamamoto *et al.* (1994b) *Jpn. J Cancer Res.* 85:775-779; Raz *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9519-9523; Kimura *et al.* (1994) *J Biochem.* (Tokio) 116:991-994; Krieg *et al.* (1995) *Nature* 374:546549; Pisetsky *et al.* (1995) *Ann. N Y Acad. Sci.* 772:152-163; Pisetsky (1996a) *J Immunol.* 156:421-423; Pisetsky (1996b) *Immunity* 5:303-310; Zhao *et al.* (1996) *Biochem. Pharmacol.* 51:173-182; Yi *et al.* (1996) *J. Immunol.* 156:558-564; Krieg (1996) *Trends Microbiol.* 4(2):73-76; Krieg *et al.* (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6:133-139; Klimnan *et al.* (1996) *Proc. Nad. Acad. Sci. USA.* 93:2879-2883; Raz *et al.* (1996); Sato *et al.* (1996) *Science* 273:3 52-3 54; Stacey *et al.* (1996) *J Immunol.* 157:2116-2122; Ballas *et al.* (1996) *J Immunol.* 157:1840-1845; Branda *et al.* (1996) *J Lab. Clin. Med* 128:329-338; Sonehara *et al.* (1996) *J Interferon and Cytokine Res.* 16:799-803; Klimnan *et al.* (1997) *J Immunol.* 158:3635-3639; Sparwasser *et al.* (1997) *Eur. J Immunol.* 27:1671-1679; Roman *et al.* (1997); Carson *et al.* (1997) *J Exp. Med* 186:1621-1622; Chace *et al.* (1997) *Clin. Immunol, and Immunopathol.* 84:185-193; Chu *et al.* (1997) *J Exp. Med* 186:1623-1631; Lipford *et al.* (1997a) *Eur. J Immunol.* 27:2340-2344; Lipford *et al.* (1997b) *Eur. J Immunol.* 27:3420-3426; Weiner *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10833-10837; Macfarlane *et al.* (1997) *Immunology* 91:586-593; Schwartz *et al.* (1997) *J Clin. Invest.* 100:68-73; Stein *et al.* (1997), *Antisense Technology*, Cap. 11 p. 241-264, C. Lichtenstein y W. Nellen, Eds., IRL Press; Wooldridge *et al.* (1997) *Blood* 89:2994-2998; Leclerc *et al.* (1997) *Cell. Immunol.* 179:97-106; Kline *et al.* (1997) *J Invest. Med* 45(3):282A; Yi *et al.* (1998a) *J Immunol* 160:1240-1245; Yi *et al.* (1998b) *J Immunol.* 160:4755-4761; Yi *et al.* (1998c) *J Immunol.* 160:5898-5906; Yi *et al.* (1998d) *J Immunol.* 161: 4493-4497; Krieg (1998) *Applied Antisense Oligonucleotide Technology* Cap. 24, p. 431-448, CA. Stein y A.M. Krieg, Eds., Wiley-Liss, Inc.; Krieg *et al.* (1998a) *Trends Microbiol.* 6:23-27; Krieg *et al.* (1998b) *J Immunol.* 161:2428-2434; Krieg *et al.* (1998c) *Proc. Nad. Acad. Sci. USA* 95:12631-12636; Spiegelberg *et al.* (1998) *Allergy* 53(45S):9397; Homer *et al.* (1998) *Cell Immunol.* 190:77-82; Jakob *et al.* (1998) *J Immunol.* 161:3042-3049; Redford *et al.* (1998) *J Immunol.* 161:3930-3935; Weeratiia *et al.* (1998) *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 8:351-356; McCluskie *et al.* (1998) *J Immunol.* 161(9):4463-4466; Gramzinski *et al.* (1998) *Mol. Med* 4:109-118; Liu *et al.* (1998) *Blood* 92:3730-72 3736; Moldoveanu *et al.* (1998) *Vaccine* 16: 1216-1224; Brazolot Milan *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15553-15558; Briode *et al.* (1998) *J Immunol.* 161:7054-7062; Briode *et al.* (1999) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118:453-456; Kovarik *et al.* (1999) *J Immunol.* 162:1611-1617; Spiegelberg *et al.* (1999) *Pediatr. Pulmonol. Suppl.* 18:118-121; Martin-Orozco *et al.* (1999) *Int. Immunol.* 11:1111-1118; EP 468.520; WO 96/02555; WO 97/28259; WO 98/16247; WO 98/18810; WO 98/37919; WO 01/68116

45 PCT/US01/07839; WO99/33488; WO 99/51259 y WO 99/62923. Véase también Zimmermann *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:3627-3630; Krieg (1999) *Trends Microbiol* 7:64-65; Patentes U.S. Nos. 5.663.153; 5.723.335; 5.849.719; y 6.174.872. Véase también WO 99/56755, WO 00/06588, WO 00/16804; WO 00/21556; WO 00/67023 y WO 01/12223.

50 Se mostró en el modelo de marmota y en ratones transgénicos, que la expresión intrahepática de citoquinas TH1 incluyendo IFN gamma, TNF alfa, e Interleuquina 12 puede inducir una inhibición de la replicación viral mediante una ruta no citolítica (Guidotti, L. G., P. Borrow, A. Brown, H. McClary, R. Koch, y F. V. Chisari "Noncytopathic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from the hepatocyte" *J Exp Med.* 1999, 189, 1555-1564; Guo, J. T., H. Zhou, C. Liu, C Aldrich, J. Saputelli, T. Whitaker, M. I. Barrasa, W. S. Mason, y C. Seeger "Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recover from transient hepadnavirus infections" *J Virol.* 2000, 74, 1495-1505.

En otra realización, los β -L-2'-desoxinucleósidos proporcionados en la presente memoria, y en particular β -L-2'-dC o β -L-2'-dT, pueden administrarse en combinación y/o alternación con un interferón, tal como interferón alfa o interferón gamma proporcionan una terapia superior en los seres humanos frente al virus de la hepatitis B, bien de tipo salvaje o una cepa resistente, y/o para la prevención o supresión de la expresión de VHB resistente. En una realización, el interferón se administra en la forma de una proteína, por ejemplo directamente en la vena o arteria. En una realización alternativa de la invención, el interferón se administra en la forma de un ácido nucleico, gen o fragmento génico de éste que se expresa por el huésped. El ácido nucleico de interferón puede administrarse al huésped "desnudo", es decir, sin un vector, o alternativamente, puede administrarse mediante un vector, incluyendo pero no limitado a un vector viral tal como un vector adenovirus. En una realización particular de la presente invención, el inmunomodulador se administra en la forma de un gen o fragmento génico de éste, y la administración está mediada por un adenovirus. En una realización particular de la invención, el inmunomodulador es interferón (tal como interferón gamma) y su administración es en la forma de un gen o fragmento génico que está mediada por un adenovirus.

En una realización, el interferón es interferón alfa, opcionalmente interferón alfa pegilado. En otra realización, el interferón se selecciona del grupo, incluyendo, pero no limitado a: interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2b pegilado ROFERON®-A (interferón alfa-2a, Roche), PEGASYS® (interferón alfa-2a pegilado, Roche), INTRON®A (interferón alfa-2b, Schering Corporation), PEG-INTRON® (interferón alfa-2b pegilado, Schering Corporation), interferón de consenso, INFERGEN (interferón alfacon-1) por InterMune, OMNIFERON (interferón natural) por Viragen, ALBUFERON por Human Genome Sciences, Interferón Alfa Oral por Amarillo Biosciences, y SuperFeron (IFN-alfa multi-subtipo humano natural, Genetrol, Inc.). En una realización alternativa, el interferón es interferón gamma. En otra realización más, el interferón es interferón beta, interferón omega o interferón tau. En otra realización, el interferón se selecciona del grupo, incluyendo, pero no limitado a: REBIF (interferón beta-1a) por Ares-Serono, Interferón Omega por BioMedicine, interferón gamma-1b por InterMune, y HuFeron (IFN-beta humano, Genetrol, Inc.).

25 **Secuencias inmunoestimuladoras**

El término "ISS" o "secuencia inmunoestimuladora" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a secuencias de polinucleótido, solas y/o formando complejos con MC, que producen una respuesta inmune mensurable según se mide *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo*. Los ejemplos de respuestas inmunes mensurables incluyen, pero no están limitadas a, producción de anticuerpo específico de antígeno, secreción de citoquinas, activación o expansión de poblaciones de linfocitos tales como células NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B, y semejantes. Preferiblemente, las secuencias ISS activan preferentemente una respuesta de tipo Th1. Un polinucleótido para uso en la invención contiene al menos una ISS. Tal y como se usa en la presente memoria, "ISS" es una abreviatura de un polinucleótido que contiene ISS.

Un polinucleótido que comprende una ISS (o una composición que comprende dicho polinucleótido) puede usarse en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. El polinucleótido inmunomodulador puede contener al menos una ISS o múltiples ISS. Las ISS pueden estar adyacentes en el polinucleótido, o pueden estar separadas por bases de nucleótido adicionales en el polinucleótido. Alternativamente, pueden administrarse múltiples ISS como polinucleótidos individuales.

Las ISS se han descrito en la técnica y pueden identificarse fácilmente usando ensayos estándar que indican varios aspectos de la respuesta inmune, tal como secreción de citoquinas, producción de anticuerpo, activación de células NK y proliferación de células T. Véase, por ejemplo, WO 97/28259; WO 98/16247; WO 99/11275; Krieg *et al.* (1995); Yamamoto *et al.* (1992); Ballas *et al.* (1996); Klinman *et al.* (1997); Sato *et al.* (1996); Pisetsky (1996a); Shimada *et al.* (1986); *Jpn. Cancer Res.* 77:808-816; Cowdery *et al.* (1996) *J Immunol.* 156:4570-4575; Roman *et al.* (1997); y Liptford *et al.* (1997a).

La ISS puede tener cualquier longitud mayor de 6 bases o pares de bases y generalmente comprende la secuencia 5'-citosina, guanina-3', preferiblemente mayor de 15 bases o pares de bases, más preferiblemente mayor de 20 bases o pares de bases de longitud. Como es muy conocido en la técnica, la citosina de la secuencia 5'-citosina, guanina-3' no está metilada. Una ISS también puede comprender la secuencia 5'-purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina, C, G-3'. Una ISS también puede comprender la secuencia 5'-purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina, C, C3'. Como se indica en las secuencias de polinucleótido siguientes, una ISS puede comprender (es decir, contener una o más de) la secuencia 5'-T, C, G-3'. En algunas realizaciones, una ISS puede comprender la secuencia 5'-C, G, pirimidina, pirimidina, C, G-3' (tal como 5'-CGTTCG-3'). En algunas realizaciones, una ISS puede comprender la secuencia 5'-C, G, pirimidina, pirimidina, C, G, purina, purina-3'. En algunas realizaciones, una ISS comprende la secuencia 5'-purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina-3' (tal como 5'-AACGTT-3').

En algunas realizaciones, una ISS puede comprender la secuencia 5'-purina, T, C, G, pirimidina, pirimidina-3'.

En algunas realizaciones, un polinucleótido que contiene ISS es menor de aproximadamente cualquiera de las longitudes siguientes (en bases o pares de bases): 10.000; 5.000; 2.500; 2.000; 1.500; 1.250; 1.000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 50; 25; 10. En algunas realizaciones, un polinucleótido que contiene ISS es mayor de aproximadamente cualquiera de las longitudes siguientes (en bases o pares de bases): 8; 10; 15; 20; 25; 30; 40;

50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1.000; 2.000; 5.000; 7.500; 10.000; 20.000; 50.000. Alternativamente, la ISS puede tener cualquiera de un intervalo de tamaños que tiene un límite superior de 10.000; 5.000; 2.500; 2.000; 1.500; 1.250; 1.000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 50; 25; ó 10 y un límite inferior seleccionado independientemente de 8; 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1.000; 2.000; 5.000; 7.500, en el que el límite inferior es menor que el límite superior.

En algunas realizaciones, la ISS incluye cualquiera de las secuencias siguientes:

GACGCTCC; GACGTCCC; GACGTTCC; GACGCCCC; AGCGTTCC; AGCGCTCC AGCGTCCC; AGCGCCCC; AACGTCCC; AACGCCCC; AACGTTCC; AACGCTCC GCGGTTCC; GGCGCTCC; GGCGTCCC; GGCGCCCC; GACGCTCG; GACGTCCG; GACGCCCCG; GACGTTCCG; AGCGCTCG; AGCGTTCCG; AGCGTCCG; GCGCCCC; AACGTCCG; AACGCCCCG; AACGTTCCG; AACGCTCG; GCGGTTCCG; GGCGCTCG; GGCGTCCG; GGCGCCCCG. En algunas realizaciones, el polinucleótido inmunomodulador incluye la secuencia

5'-TGACTGTGAACGTTCCGAGATGA-Y (SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, la ISS incluye cualquiera de las secuencias siguientes:

GACGCU; GACGUC; GACGUU; GACGUT; GACGTU; AGCGUU; AGCGCU; AGCGUC; AGCGUT; AGCGTU; AACGUC; AACGUU; AACGCU; AACGUT; AACGTU; GGCGUU; GGCGCU; GGCGUC; GGCGUT; GGCGTU.

En algunas realizaciones, la ISS incluye cualquiera de las secuencias siguientes:

GABGCTCC; GABGTCCC; GABGTTCC; GABGCCCC; AGBGTTCC; AGBGCTCC; AGBGTCCC; AGBGCCCC; AABGTCCC; AABGCCCC; AABGTTCC; AABGCTCC; GGBGTTCC; GGBGCTCC; GGBGTCCC; GGBGCCCC; GABGCTCG; GABGTCCG; GABGCCCCG; GABGTTCCG; AGBGCTCG; AGBGTTCCG; AGBGTCCG; GBGCCCC; AABGTCCG; AABGCCCCG; AABGTTCCG; AABGCTCG; GGBGTTCCG; GBGCTCG; GGBGTCCG; GGBGCCCCG; GABGCTBG; GABGTCCG; GABGCCCCG; GABGTTBG; AGBGCTBG; AGBGTTBG; AGBGTCCG; AGBGCCCCG; AABGTCCG; AABGCCCCG; AABGTTBG; AABGCTBG; GGBGTTBG; GGBGCTBG; GGBGTCCG; GGBGCCCCG, donde B es 5-bromocitosina.

En algunas realizaciones, la ISS incluye cualquiera de las secuencias siguientes:

GABGCUCC; GABGUCCC; GABGUTCC; GABGTUCC; GABGUUCC; GBGUUCC; AGBGTUCC; AGBGUTCC; AGBGCUCC; AGBGUCCC; AABGUCCC; ABGUUCC; AABGUTCC; AABGTUCC; AABGCUCC; GGBGUUCC; GGBGUTCC; GBGTUCC; GGBGCUCC; GGBGUCCC; GABGCUCC; GABGUCCG; GABGUUCC; ABGUTCC; GABGTUCC; AGBGCUCC; AGBGUUCC; AGBGUTCC; AGBGTUCC; AGBGUCCC; AABGUCCC; AABGUUCC; AABGUTCC; AABGTUCC; AABGCUCC; GGBGUUCC; GGBGUTCC; GGBGCUCC; GGBGUCCC; GABGCUCC; GABGUUCC; GABGUTCC; GABGTUCC; AGBGCUCC; AGBGUUCC; AGBGUTCC; GABGUTBG; GABGTUCC; AABGUCBG; AABGUUCC; AABGUTBG; AABGTUCC; AABGCUCC; GGBGUUCC; GGBGUTBG; GGBGTUCC; GGBGCUCC; GGBGUCCC, donde B es 5-bromocitosina.

En otras realizaciones, la ISS comprende cualquiera de las secuencias:

5'-TGACCGTGAACGTTCCGAGATGA-3';

5'-TCATCTCGAACGTTCCACAGTCA-3';

5'-TGACTGTGAACGTTCCAGATGA-3';

5'-TCCATAACGTTCCGCTAACGTTCCGTC-3';

5'-TGACTGTGAABGTTCCAGATGA-3', donde B es 5-bromocitosina;

5'-TGACTGTGAABGTTCCGAGATGA-3', donde B es 5-bromocitosina, y

5'-TGACTGTGAABGTTBGAGATGA-3', donde B es 5-bromocitosina .

Una ISS y/o polinucleótido que contiene ISS puede contener modificaciones. Las modificaciones de ISS incluyen cualquiera conocida en la técnica, pero no están limitadas a, modificaciones del grupo 3'-OH ó 5'-OH, modificaciones de la base de nucleótido, modificaciones del componente de azúcar, y modificaciones del grupo fosfato. Los ejemplos de dichas modificaciones se describen a continuación.

Una ISS puede ser ADN monocatenario o bicatenario, así como ARN monocatenario o bicatenario u otros polinucleótidos modificados. Una ISS puede o no incluir una o más regiones palindrómicas, que pueden estar presentes en los restos descritos anteriormente o pueden extenderse más allá del resto. Una ISS puede comprender secuencias de mayor rango adicionales, algunas de las cuales se describen en la presente memoria. Una ISS puede contener bases naturales o no naturales modificadas, y puede contener azúcar, fosfato y/o extremos modificados. Por ejemplo, las modificaciones de fosfato pueden incluir, pero no están limitadas a, fosfonato de metilo, fosforotioato, fosforamidato (con puente o sin puente), fosfotriéster y fosforoditioato y pueden usarse en cualquier

combinación. También pueden usarse otras uniones no fosfato. Los oligonucleótidos pueden comprender núcleos de fosforotioato. Las modificaciones de azúcar conocidas en el campo, tales como análogos de ARN 2'-alcoxi, análogos de ARN 2'-amino y quimeras ARN/ADN 2'-alcoxi o amino y otras descritas en la presente memoria, también pueden prepararse y combinarse con cualquier modificación de fosfato. Los ejemplos de modificaciones de base incluyen, pero no están limitadas a, adición de un resto aceptor de electrones en C-5 y/o C-6 de una citosina de la ISS (por ejemplo, 5-bromocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-yodocitosina).

La ISS puede sintetizarse usando técnicas y equipo de síntesis de ácido nucleico que son muy conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, métodos enzimáticos, métodos químicos, y la degradación de secuencias de oligonucleótido más largas. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (1997); y Sambrook *et al.* (1989). Cuando se ensamblan enzimáticamente, las unidades individuales pueden ligarse, por ejemplo, con una ligasa tal como T4 ADN o ARN ligasa. Patente U.S. No. 5.124.246. La degradación de oligonucleótidos puede conseguirse mediante la exposición de un oligonucleótido a una nucleasa, como se ejemplifica en la Patente U.S. No. 4.650.675.

La ISS también puede aislarse usando procedimientos de aislamiento de polinucleótidos convencionales. Dichos procedimientos incluyen, pero no están limitados a, hibridación de sondas a bibliotecas genómicas o de ADNc para detectar secuencias de nucleótidos compartidas, cribado de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar características estructurales compartidas y síntesis de secuencias nativas particulares por la reacción en cadena de la polimerasa.

La ISS circular puede aislarse, sintetizarse mediante métodos recombinantes, o sintetizarse químicamente. Cuando la ISS circular se obtiene mediante el aislamiento o mediante métodos recombinantes, la ISS será preferiblemente un plásmido. La síntesis química de oligonucleótidos circulares pequeños puede realizarse usando cualquier método descrito en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Gao *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:2025-2029; y Wang *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:2326-2333.

Las técnicas para preparar oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados se conocen en la técnica. El ADN o ARN natural, que contienen uniones fosfodiéster, se sintetiza generalmente acoplado secuencialmente el nucleósido fosforamídita apropiado con el grupo 5'-hidroxi del oligonucleótido en crecimiento unido a un soporte sólido en el extremo 3', seguido de la oxidación del triéster fosfito intermedio a triéster fosfato. Una vez se ha sintetizado la secuencia de oligonucleótido deseada, el oligonucleótido se retira del soporte, los grupos triéster fosfato se desprotegen a diéster fosfato y las bases de nucleósido se desprotegen usando amoniaco acuoso u otras bases. Véase, por ejemplo, Beaucage (1993) "Oligodeoxyribonucleotide Synthesis" en *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, ed.) Humana Press, Totowa, NJ; Warner *et al.* (1 984) *DNA* 3:401 y Patente U.S. No. 4.458.066.

La ISS también puede contener oligonucleótidos con fosfato modificado. La síntesis de polinucleótidos que contienen uniones fosfato modificadas o uniones no fosfato también es conocida en la técnica. Para una revisión, véase Matteucci (1997) "Oligonucleotide Analogs: an Overview" en *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*, (D.J. Chadwick y G. Cardew, ed.) John Wiley and Sons, Nueva York, NY. El derivado fosforoso (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o análogo de azúcar en los oligonucleótidos de la presente invención puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato o semejantes. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, *per se*, también es conocida y no es necesario describirla aquí con detalle. Peyrottes *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* 24: 1841-1848; Chaturvedi *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:2318-2323; y Schultz *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:2966-2973. Por ejemplo, la síntesis de oligonucleótidos fosforotioato es similar a la descrita anteriormente para oligonucleótidos naturales excepto que la etapa de oxidación se reemplaza por una etapa de sulfurización (Zon (1993) "Oligonucleoside Phosphorothioates" en *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, ed.) Humana Press, p. 165-190). De manera similar, también se ha descrito la síntesis de otros análogos de fosfato, tal como fosfotriéster (Miller *et al.* (1971) *JACS* 93:6657-6665), fosforamídatos sin puente (Jager *et al.* (1988) *Biochem.* 27:7247-7246), N3' a P5' fosforamídatos (Nelson *et al.* (1997) *JOC* 62:7278-7287) y fosforoditioatos (Patente U.S. No. 5.453.496). También pueden usarse otros oligonucleótidos modificados no basados en fósforo (Stirchak *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:6129-6141). Los oligonucleótidos con núcleos fosforotioato pueden ser más inmunogénicos que los que tienen núcleos fosfodiéster, y parece que son más resistentes a la degradación después de la inyección en el huésped. Braun *et al.* (1988) *J Immunol.* 141:2084-2089; y Latimer *et al.* (1995) *Mol. Immunol.* 32:1057-1064.

Los polinucleótidos que contienen ISS usados en la invención pueden comprender ribonucleótidos (que contienen ribosa como el componente de azúcar único o principal), desoxiribonucleótidos (que contienen desoxirribosa como el componente de azúcar principal), o, como se conoce en la técnica azúcares modificados o análogos de azúcar pueden incorporarse en la ISS. Así, además de ribosa y desoxirribosa, el resto de azúcar puede ser pentosa, desoxipentosa, hexosa, desoxihexosa, glucosa, arabinosa, xilosa, lixosa, y un grupo ciclopentilo "análogo" de azúcar. El azúcar puede estar en forma piranosil, o furanosil. En la ISS, el resto de azúcar es preferiblemente el furanosido de ribosa, desoxirribosa, arabinosa ó 2'-O-alquilribosa, y el azúcar puede unirse a las bases heterocíclicas respectivas en la configuración anomérica α o β . Las modificaciones de azúcar incluyen, pero no están limitadas a, análogos de ARN 2'-alcoxi, análogos de ARN 2'-amino y quimeras ARN/ADN 2'-alcoxi o amino. La preparación de estos azúcares o análogos de azúcar y los "nucleósidos" respectivos en los que los azúcares o análogos están

unidos a una base heterocíclica (base de ácido nucleico) se conoce *per se*, y no es necesario describirla aquí, excepto en el grado en el que dicha preparación pueda concernir a cualquier ejemplos específico. Las modificaciones de azúcar también pueden hacerse y combinarse con cualquier modificación de fosfato en la preparación de una ISS.

- 5 Las bases heterocíclicas, o bases de ácido nucleico, que se incorporan en la ISS pueden ser las bases de purina y pirimidina principales naturales (concretamente uracilo o timina, citosina, adenina y guanina, como se ha mencionado anteriormente), así como modificaciones naturales y sintéticas de dichas bases principales.

10 Los expertos en la técnica reconocerán que un gran número de nucleósidos no naturales "sintéticos" que comprenden varias bases heterocíclicas y varios restos de azúcar (y análogos de azúcar) están disponibles en la técnica, y que siempre que se satisfagan otros criterios de la presente invención, la ISS puede incluir una o varias bases heterocíclicas distintas de los componentes de cinco bases principales de los ácidos nucleicos naturales. Preferiblemente, sin embargo, la base heterocíclica en la ISS incluye, pero no está limitada a, grupos uracil-5-ilo, citosina-5-ilo, adenina-7-ilo, adenina-8-ilo, guanina-7-ilo, guanina-8-ilo, 4-aminopirrollo [2.3-d] pirimidin-5-ilo, 2-amino-4-oxopirrollo [2.3-d] pirimidin-5-ilo, 2-amino-4-oxopirrollo [2.3-d] pirimidin-3-ilo, donde las purinas están unidas al resto de azúcar de la ISS a través de la posición 9, las pirimidinas a través de la posición 1, las pirrolopirimidinas a través de la posición 7 y las pirazolopirimidinas a través de la posición 1.

15 La ISS y/o IMP puede comprender al menos una base modificada como se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional de propiedad común WO 99/62923. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "base modificada" es sinónimo de "análogo de base", por ejemplo, "citosina modificada" es sinónimo de "análogo de citosina". De manera similar, nucleósidos o nucleótidos "modificados" se definen en la presente memoria como sinónimos de "análogos" de nucleósidos o nucleótidos. Los ejemplos de modificaciones de base incluyen, pero no están limitados a, adición de un resto aceptor de electrones en C-5 y/o C-6 de una citosina de la ISS. Preferiblemente, el resto aceptor de electrones es un halógeno. Las citosinas modificadas pueden incluir, pero no están limitadas a, azacitosina, 5-bromocitosina, 5-clorocitosina, citosina clorada, ciclocitosina, citosina arabinósido, 25 5-fluorocitosina, fluoropirimidina, 5,6-dihidrocitosina, 5-yodocitosina, 5-nitrocitosina, 5-hidroxicitosina, y otro análogo de pirimidina o pirimidina modificada. Los uracilos modificados preferidos están modificados en C-5 y/o C-6, preferiblemente con un halógeno, e incluyen, pero no están limitados a, bromouracilo tal como 5-bromouracilo, clorouracilo tal como 5-clorouracilo, fluorouracilo tal como 5-fluorouracilo, yodouracilo tal como 5-yodouracilo e hidroxouracilo. Véase también, Kandimalla *et al*, 2001, *Bioorg. Med. Chem.* 9:807-813. Véase, por ejemplo, la 30 Solicitud de Patente Internacional No. WO 99/62923. Otros ejemplos de modificaciones de base incluyen la adición de uno o más grupos tiol a la base, incluyendo, pero no limitado a, 6-tio-guanina, 4-tio-timina y 4-tiouracilo. Además, algunos IMP pueden comprender bases modificadas tales como 7-deazaguanosina en lugar de cualquier residuo de guanosina, o una citosina modificada seleccionada de N4-etilcitosina o N4-metilcitosina en lugar de cualquier residuo de citosina, incluyendo la citosina del 5'-CG-3'.

35 La preparación de nucleósidos con base modificada, y la síntesis de los oligonucleótidos modificados usando dichos nucleósidos con base modificada como precursores, se ha descrito, por ejemplo, en las Pat. U.S. Nos. 4.910.300, 4.948.882 y 5.093.232. Estos nucleósidos con base modificada se han diseñado de manera que puedan incorporarse por síntesis química en posiciones bien terminales o internas de un oligonucleótido. Dichos nucleósidos con base modificada, presentes en posiciones bien terminales o internas de un oligonucleótido, pueden servir como 40 sitios de unión de un péptido u otro antígeno. Los nucleósidos modificados en su resto de azúcar también se han descrito (incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, Pat. U.S. Nos. 4.849.513; 5.015.733; 5.118.800; 5.118.802) y pueden usarse de manera similar.

45 La ISS usada en la invención puede producirse como complejos ISS-microvehículo. Los complejos ISS-microvehículo comprenden un polinucleótido que contiene ISS unido a un microvehículo (MC). Los complejos ISS-MC comprenden una ISS unida a la superficie de un microvehículo (es decir, la ISS no está encapsulada en el MC), adsorbida en un microvehículo (por ejemplo, adsorbida a lechos de PLGA), o encapsulada en un MC (por ejemplo, incorporada en liposomas).

50 Se ha mostrado previamente que los oligonucleótidos que contienen ISS unidos a micropartículas (lechos de SEPHAROSE®) tienen actividad inmunoestimuladora *in vitro* (Liang *et al.*, (1996), *J Clin. Invest.* 98:1119-1129). Sin embargo, resultados recientes muestran que los oligonucleótidos que contienen ISS unidos a oro, látex o partículas magnéticas no son activos en la estimulación de la proliferación de células 7TD1, que proliferan en respuesta a oligonucleótidos que contienen ISS (Manzel *et al*, (1999). *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 9:459-464).

55 Los microvehículos no son solubles en agua pura, y tienen un tamaño menor de aproximadamente 50-60 μm , preferiblemente un tamaño menor de aproximadamente 10 μm , más preferiblemente un tamaño de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 10 μm , 25 nm a aproximadamente 5 μm , 50 nm a aproximadamente 4,5 μm ó 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm . Los microvehículos pueden tener cualquier forma, tal como esférica, elipsoidal, de varilla, y semejantes, aunque se prefieren normalmente los microvehículos esféricos. Los microvehículos preferidos tienen tamaños de o aproximadamente 50 nm, 200 nm, 1 μm , 1,2 μm , 1,4 μm , 1,5 μm , 1,6 μm , 1,8 μm , 2,0 μm , 2,5 μm ó 4,5 μm . El "tamaño" de un microvehículo es generalmente el "tamaño de diseño" o 60 tamaño pretendido de las partículas indicado por el fabricante. El tamaño puede ser una dimensión medida

directamente, tal como diámetro medio o máximo, o puede determinarse por un ensayo indirecto tal como un ensayo de cribado por filtración. La medida directa del tamaño del microvehículo se realiza típicamente por microscopía, generalmente microscopía óptica o microscopía de barrido de electrones (SEM), en comparación con partículas de tamaño conocido o por referencia a un micrómetro. Como surgen variaciones menores en el tamaño durante el proceso de fabricación, se considera que los microvehículos tienen un tamaño indicado si las medidas muestran que los microvehículos tienen $\pm 5-10\%$ la medida indicada. Las características de tamaño también pueden determinarse por dispersión de la luz dinámica. Alternativamente, el tamaño del microvehículo puede determinarse por ensayos de cribado por filtración. Un microvehículo es menor que un tamaño indicado si al menos el 97% de las partículas pasan a través de un filtro "de tipo tamiz" (es decir, un filtro en el que las partículas retenidas están en la superficie del filtro, tal como filtros de policarbonato o poliétersulfona, a diferencia de un "filtro de profundidad" en el que las partículas retenidas se retienen en el interior del filtro) del tamaño indicado. Un microvehículo es mayor que un tamaño indicado si al menos aproximadamente el 97% de las partículas del microvehículo se retienen por un filtro de tipo tamiz del tamaño indicado. Así, al menos aproximadamente el 97% de los microvehículos de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 10 μm de tamaño pasan a través de un filtro tamiz de poro 10 μm y son retenidos por un filtro tamiz de 10 nm.

Como indica la discusión anterior, la referencia a un tamaño o intervalo de tamaño para un microvehículo incluye implícitamente variaciones aproximadas y aproximaciones del tamaño y/o intervalo de tamaño indicado. Esto se refleja por el uso del término "aproximadamente" cuando se hace referencia a un tamaño y/o intervalo de tamaño, y la referencia a un tamaño o intervalo de tamaño sin referencia a "aproximadamente" no significa que el tamaño y/o intervalo de tamaño 10 sea exacto.

Los microvehículos pueden ser de fase sólida (por ejemplo, lechos de poliestireno) o de fase líquida (por ejemplo, liposomas, micelas, o gotitas de aceite en una emulsión aceite en agua). Los microvehículos de fase líquida incluyen liposomas, micelas, gotitas de aceite y otras partículas basadas en lípido o aceite. Un microvehículo de fase líquida preferido es gotitas de aceite en una emulsión aceite-en-agua. Preferiblemente, las emulsiones aceite-en-agua usadas como microvehículos comprenden sustituyentes biocompatibles tales como escualeno. Los microvehículos de fase líquida se consideran normalmente no biodegradables, pero quizá pueden producirse microvehículos de fase líquida biodegradables por incorporación de uno o más polímeros biodegradables en la formulación del microvehículo de fase líquida. En una realización preferida, el microvehículo es gotitas de aceite en una emulsión aceite-en-agua preparada por emulsión de escualeno, trioleato de sorbitán, TWEEN 80® en un tampón de pH acuoso.

Los microvehículos de fase sólida para uso en complejos ISS-microvehículo pueden prepararse a partir de materiales biodegradables o materiales no biodegradables, y pueden incluir o excluir microvehículos de agarosa o agarosa modificada. Los microvehículos de fase sólida biodegradables útiles incluyen, pero no están limitados a: poliésteres biodegradables, tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), y copolímeros (incluyendo copolímeros en bloque) de éstos, así como copolímeros en bloque de poli(ácido láctico) y poli(etilén glicol); poliortoésteres tales como polímeros basados en 3,9-dietiliden-2,4,8,10-tetiaoxaespíro[5.5]undecano (DETOSU); polianhídridos tales como polímeros poli(anhídrido) basados en ácido sebácico, *p*-(carboxifenoxi)propano, o *p*-(carboxifenoxi)hexano; polianhídrido imidas, tales como polímeros polianhídrido basados en monómeros derivados de ácido sebácico que incorporan aminoácidos (es decir, unidos a ácido sebácico mediante uniones imida a través del nitrógeno amino-terminal) tal como glicina o alanina; ésteres polianhídrido; polifosfazenos, especialmente poli(fosfazenos) que contienen grupos éster sensibles a hidrólisis que pueden catalizar la degradación del núcleo del polímero mediante la generación de grupos ácido carboxílico (Schacht et al. (1996) *Biotechnol Bioeng.* 1996:102); y poliamidas tales como poli(ácido láctico-co-lisina). También se conoce una amplia variedad de materiales no biodegradables adecuados para fabricar microvehículos, incluyendo, pero no limitado a, poliestireno, polietileno, látex, oro, y materiales ferromagnéticos o paramagnéticos. Los microvehículos de fase sólida pueden modificarse covalentemente para incorporar uno o más restos para uso en la unión de la ISS, por ejemplo por la adición de grupos amina para la unión covalente usando entrecruzadores reactivos a amina.

Los complejos ISS-microvehículo pueden unirse covalentemente o no covalentemente. Los complejos ISS-MC unidos covalentemente pueden unirse directamente o pueden unirse por un resto entrecruzador de uno o más átomos (típicamente el residuo de un agente entrecruzador). La ISS puede modificarse para permitir o aumentar la unión al MC (por ejemplo, por la incorporación de un sulfidilo libre para el entrecruzamiento covalente o la adición de un resto hidrofóbico tal como lípidos, esteroides, esteroides tales como colesterol, y terpenos, para unión hidrofóbica), aunque pueden usarse ISS no modificadas para la formación de complejos ISS-MC no covalentes por interacción electrostática o por emparejamiento de bases (por ejemplo, por emparejamiento de bases de al menos una parte de la ISS con un oligonucleótido complementario unido al microvehículo). Los polinucleótidos que contienen ISS pueden unirse a microvehículos de fase sólida u otros restos químicos para facilitar la formación del complejo ISS-MC usando tecnología convencional conocida en la técnica tal como el uso de entrecruzadores heterobifuncionales disponibles (por ejemplo, 4-(N-maleidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo o sus derivados sulfo para la unión covalente de un microvehículo derivatizado con amina y una ISS modificada para contener un sulfidilo libre) o por la adición de compuestos tales como colesterol (por ejemplo, por el método de Godard et al. (1995) *Eur. J. Biochem.* 232: 404-410) para facilitar la unión a microvehículos hidrofóbicos tales como gotitas de aceite en emulsiones aceite-en-agua. Alternativamente, pueden incorporarse nucleósidos o nucleótidos modificados, tales como se conocen en la técnica, en un extremo, o en posiciones internas en la ISS. Éstos pueden

contener grupos funcionales bloqueados que, cuando se desbloquean, son reactivos con una variedad de grupos funcionales que están presentes en, o unidos a, el microvehículo o un resto que facilitaría la unión a un microvehículo. Determinadas realizaciones de complejos ISS-MC unidos no covalentemente utilizan una pareja de unión (por ejemplo, un anticuerpo y su antígeno cognado o biotina y estreptavidina o avidina), donde un miembro de la pareja de unión se une a la ISS y el microvehículo se derivatiza con el otro miembro de la pareja de unión (por ejemplo, una ISS biotinilada y un microvehículo derivatizado con estreptavidina pueden combinarse para formar un complejo ISS-MC unido no covalentemente).

Los complejos ISS-MC no covalentes unidos por unión electrostática explotan típicamente la carga altamente negativa del núcleo de polinucleótido. De acuerdo con esto, los microvehículos para uso en complejos ISS-MC unidos no covalentemente generalmente están cargados positivamente a pH fisiológico (por ejemplo, aproximadamente pH 6,8-7,4). El microvehículo puede poseer intrínsecamente una carga positiva, pero los microvehículos preparados a partir de compuestos que normalmente no poseen una carga positiva pueden derivatizarse o modificarse de otra manera para volverse cargados positivamente. Por ejemplo, el polímero usado para preparar el microvehículo puede derivatizarse para añadir grupos cargados positivamente, tales como aminas primarias. Alternativamente, los compuestos cargados positivamente pueden incorporarse en la formulación del microvehículo durante la fabricación (por ejemplo, pueden usarse tensioactivos cargados positivamente durante la fabricación de copolímeros poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico) para conferir una carga positiva a las partículas de microvehículo resultantes.

Las microesferas de fase sólida se preparan usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse por la técnica de emulsión-extracción de disolvente/evaporación. Generalmente, en esta técnica, se disuelven polímeros biodegradables tales como polianhidratos, poli(alquil- α -cianoacrilatos) y poli(α -hidroxi ésteres), por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(D,L-ácido láctico-co-glicólico) y poli(caprolactona), en un disolvente orgánico adecuado, tal como cloruro de metileno, para constituir la fase dispersa (DP) de la emulsión. DP se emulsiona con homogeneización a alta velocidad en volumen en exceso de fase continua acuosa (CP) que contiene un tensioactivo disuelto, por ejemplo, polivinilalcohol (PVA) o polivinilpirrolidona (PVP). El tensioactivo en CP es para asegurar la formación de gotita de emulsión discreta y con un tamaño adecuado. El disolvente orgánico se extrae en la CP y se evapora posteriormente elevando la temperatura del sistema. Las micropartículas sólidas se separan por centrifugación o filtración, y se secan, por ejemplo, por liofilización o aplicación de vacío, antes de almacenarlas a 4°C.

Generalmente, para preparar microesferas catiónicas, se añaden lípidos o polímeros catiónicos, por ejemplo, 1,2-dioleoil-1,2,3-trimetilamoniopropano (DOTAP), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o polilisina, bien a DP o CP, según su solubilidad en estas fases.

Pueden determinarse las características físico-químicas tales como tamaño medio, distribución de tamaño y carga superficial de las microesferas secas. Las características de tamaño se determinan, por ejemplo, por la técnica de dispersión de la luz dinámica y la carga superficial se determinó midiendo el potencial zeta.

Generalmente, los polinucleótidos que contienen ISS pueden adsorberse en las microesferas catiónicas por incubación acuosa de toda la noche de ISS y las partículas a 4°C. Las microesferas se caracterizan para tamaño y carga superficial antes y después de la asociación con ISS. Los lotes seleccionados pueden evaluarse para actividad como se describe en la presente memoria.

Un polinucleótido que contiene ISS puede administrarse antes, durante y/o después de la exposición a un virus. Un polinucleótido ISS también puede administrarse antes, durante y/o después de la infección por un virus. Un polinucleótido ISS también puede administrarse antes o después del inicio de los síntomas de la infección del virus. De acuerdo con esto, la administración del polinucleótido que contiene ISS puede ser a diferentes tiempos respecto a la exposición a, infección por y/o inicio de los síntomas de la infección del virus. Además, puede haber una o más administraciones. Si el polinucleótido que contiene ISS se administra en múltiples ocasiones, la ISS puede administrarse en cualquier esquema seleccionado por el médico, tal como diariamente, en días alternos, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, semanalmente, bisemanalmente, mensualmente o incluso en intervalos mayores (que pueden permanecer o no igual durante el curso del tratamiento). Cuando se proporcionan múltiples administraciones, el polinucleótido que contiene ISS puede proporcionarse en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más administraciones separadas. Generalmente, pero no necesariamente, es necesario un intervalo de al menos aproximadamente tres días para permitir el efecto de los polinucleótidos que contienen ISS.

Cuando el polinucleótido que contiene ISS se administra a un individuo que presenta riesgo de exposición a virus (es decir, antes de la infección), el polinucleótido que contiene ISS se administra preferiblemente menos de aproximadamente 14 días antes de la exposición al virus, preferiblemente menos de aproximadamente 10 días antes de la exposición al virus, más preferiblemente menos de aproximadamente 7 días antes de la exposición al virus, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 5 días antes de la exposición al virus. En algunas realizaciones, el polinucleótido que contiene ISS se administra aproximadamente 3 días antes de la exposición al virus.

En una realización adicional, el polinucleótido que contiene ISS se administra después de la exposición al virus, pero antes de la aparición de síntomas. Preferiblemente, el polinucleótido que contiene ISS se administra menos de aproximadamente tres días después de la exposición, más preferiblemente menos de aproximadamente un día, 12 horas, seis horas o dos horas después de la exposición, si se conoce o sospecha el momento de la exposición.

- 5 En otra realización, el polinucleótido que contiene ISS se administra después de la aparición de al menos un síntoma de la infección del virus. Por ejemplo, el polinucleótido que contiene ISS se administra en los aproximadamente 28, 21, 14, 7, 5 ó 3 días después de la aparición de un síntoma de la infección del virus. Sin embargo, aproximadamente 10 individuos infectados que presentan síntomas habrán sido sometidos ya a uno o más cursos de tratamiento con otra terapia. En dichos individuos, o en individuos que no aprecian la presencia de sus síntomas, el polinucleótido que contiene ISS puede administrarse en cualquier momento después de la infección.

Además, los tratamientos que emplean un polinucleótido que contiene ISS también pueden emplearse conjuntamente con otros tratamientos o como tratamientos de "segunda línea" empleados después del fracaso de un tratamiento de "primera línea".

- 15 Los polinucleótidos ISS pueden formularse en cualquier forma conocida en la técnica, tal como formulaciones en polvo seco, semi-sólidas o líquidas. Para la administración parenteral los polinucleótidos ISS se administran preferiblemente en una formulación líquida, aunque también pueden ser aceptables formulaciones sólidas o semisólidas, particularmente cuando el polinucleótido ISS se formula en una forma depot de liberación lenta. Los polinucleótidos ISS se formulan generalmente en forma líquida o de polvo seco para administración tópica, aunque las formulaciones semi-sólidas pueden ser ocasionalmente útiles.

- 20 Las formulaciones de polinucleótidos ISS pueden contener componentes adicionales tales como sales, tampones, agentes de volumen, osmolitos, antioxidantes, detergentes, tensioactivos y otros excipientes farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica. Generalmente, las formulaciones líquidas de polinucleótidos ISS preparadas en agua USP para inyección y son estériles, isotónicas y con pH tamponado a un pH fisiológicamente aceptable, tal como aproximadamente pH 6,8 a 7,5.

- 25 Los polinucleótidos que contienen ISS pueden formularse en vehículos de administración tales como liposomas, emulsión aceite/agua o formulaciones depot de liberación lenta. Los métodos para formular polinucleótidos en dichas formas son muy conocidos en la técnica.

- 30 Las formulaciones de polinucleótidos que contienen ISS también pueden incluir o excluir agentes inmunomoduladores tales como adyuvantes y citoquinas inmunoestimuladoras, que son muy conocidos en la técnica.

- Un intervalo de dosificación o cantidad efectiva adecuado es uno que proporciona la reducción deseada de síntomas y/o supresión de la infección viral y depende de varios factores, incluyendo el virus respiratorio particular, la secuencia ISS del polinucleótido, el peso molecular del polinucleótido y la ruta de administración. Las dosificaciones se seleccionan generalmente por el médico u otro profesional sanitario según una variedad de parámetros conocidos en la técnica, tal como gravedad de los síntomas, historial del paciente y semejantes. Generalmente, para un polinucleótido que contiene ISS de aproximadamente 20 bases, un intervalo de dosificación puede seleccionarse de, por ejemplo, un límite inferior seleccionado independientemente tal como aproximadamente 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 200, 300, 400 ó 500 $\mu\text{m}/\text{kg}$ hasta un límite superior seleccionado independientemente, mayor que el límite inferior, de aproximadamente 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000 ó 10.000 $\mu\text{m}/\text{kg}$. Por ejemplo, una dosis puede ser aproximadamente cualquiera de las siguientes: 0,1 a 100 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 0,1 a 50 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 0,1 a 25 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 0,1 a 10 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 1 a 500 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 100 a 400 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 200 a 300 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 1 a 100 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 100 a 200 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 300 a 400 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 400 a 500 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 500 a 1.000 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 500 a 5.000 $\mu\text{m}/\text{kg}$, ó 500 a 10.000 $\mu\text{m}/\text{kg}$. Generalmente, las rutas de administración parenterales pueden requerir dosis mayores de ISS comparado con una aplicación más directa en el tejido infectado, al igual que los polinucleótidos que contienen ISS de mayor longitud.

Los polinucleótidos que comprenden una ISS pueden administrarse por administración sistémica (por ejemplo, parenteral) o local (por ejemplo, tópica).

- 50 En una realización, el o los polinucleótidos que contienen ISS se administran tópicamente, tal como mucosa respiratoria (tal como conductos nasales o pulmón). Las rutas de administración nasofaríngea y pulmonar incluyen pero no están limitadas a, rutas intranasal, inhalación, transbronquial y transalveolar. El polinucleótido que contiene ISS puede administrarse así por inhalación de aerosoles, líquidos atomizados o polvos. Los dispositivos adecuados para administración por inhalación de composiciones que contienen ISS incluyen, pero no están limitados a, nebulizadores, atomizadores, vaporizadores, e inhaladores de dosis medida. Los nebulizadores, atomizadores, vaporizadores, e inhaladores de dosis medida rellenos con o que emplean reservorios que contienen las formulaciones que comprenden el o los polinucleótidos que contienen ISS están entre una variedad de dispositivos adecuados para uso en la administración por inhalación del o de los polinucleótidos que contienen ISS. Otros métodos de administración a la mucosa respiratoria incluyen la administración de formulaciones líquidas, tal como gotas nasales.

En otras realizaciones, el polinucleótido que contiene ISS se administra parenteralmente. Las rutas de administración parenteral incluyen, pero no están limitadas a, transdérmica, transmucosal e inyección directa. La administración parenteral por inyección puede ser cualquier ruta de inyección parenteral, incluyendo, pero no limitada a, rutas intravenosa (IV), intraperitoneal (IP), intramuscular (IM), subcutánea (SC) e intradérmica (ID).

- 5 La administración transdérmica y transmucosal puede conseguirse, por ejemplo, por la inclusión de un vehículo (por ejemplo, dimetilsulfóxido, DMSO), por aplicación de impulsos eléctricos (por ejemplo, iontoforesis) o una combinación de éstos. Una variedad de dispositivos está disponible para la administración transdérmica que pueden usarse según la invención. Como los virus respiratorios infectan células del tracto respiratorio, las rutas que administran los polinucleótidos ISS al tracto respiratorio, tales como administración por inhalación e intranasal (discutidas anteriormente), se consideran rutas de administración locales de administración en lugar de rutas sistémicas de administración, aunque la administración a través de dichas rutas se considera normalmente rutas de administración parenteral, sistémica.

- 10 La administración IV, IP, IM e ID pueden ser por administración en bolo o infusión. Para la administración SC, la administración puede ser por bolo, infusión o por dispositivo implantable, tal como una minibomba implantable (por ejemplo, minibomba osmótica o mecánica) o implante de liberación lenta. El o los polinucleótidos ISS también pueden administrarse en una formulación de liberación lenta adaptada para administración IV, IP, IM ID o SC. La administración por inhalación se consigue preferiblemente en dosis discretas (por ejemplo, mediante un inhalador de dosis medida), aunque puede conseguirse una administración similar a una infusión mediante el uso de un nebulizador. La administración mediante rutas transdérmicas y transmucosales puede ser continua o en pulsos.

20 Otros agentes

- Otros agentes terapéuticos que pueden usarse en el método y composiciones descritos en la presente memoria incluyen Ribavirin (Ribapharm, Inc.), globulina inmune de la hepatitis B (Nabi-HB intravenoso, Nabi Pharmaceuticals), ZADAXIN™ (timosina alfa 1, SCV-07 (SciClone Pharmaceuticals), Theradigm (Epimmune), producto hiperinmune anti-hepatitis B (Cangene Corp), RC-529 (Corixa/Rhein Biochem), HYB2055 (Hybridon), ViroKine (proteínas antivirales humanas, Genetrol, Inc.), Levovirin (Ribapharm, Inc.), interleuquina-2 (IL-2), factor de necrosis tumoral alfa, interleuquina 1-beta, interleuquina-12 (IL-12), Factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), ácido poliadenílico-poliuridílico, timosina alfa, Ampligen® (Hemispherx BioPharma), Polyadenur™ (ARN Poli A: Poli U, Hemispherx BioPharms), Oragen™ (Hemispherx BioPharms), Linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos del virus de la hepatitis B (VHB) (CellExSys, Inc.), vacuna terapéutica de la hepatitis b (Epimmune), vacuna profiláctica de ADN PJ Hep B (Powderject Pharmaceuticals), interleuquina 4, interleuquina 6, interleuquina 7, Factor estimulador de colonias de granulocitos.

- También pueden usarse vacunas del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en los métodos y composiciones descritas en la presente memoria. En una realización, se administra FTC y una vacuna de antígeno del virus de la hepatitis B, tal como una vacuna de antígeno de superficie, en combinación o en alternación a un huésped en una cantidad efectiva para el tratamiento o profilaxis de una infección por virus de hepatitis B, opcionalmente en combinación con otro agente terapéutico, tal como interferón.

- Otras vacunas que pueden administrarse incluyen Engerix-B® (GlaxoSmithKline), Recombivax HB® (Merck), Vacuna de la Hepatitis B (Recombinante), Vacuna de ADN terapéutica PJ Hep B (Powderject Pharmaceuticals), Hepavax-Gene® (vacuna de ADN recombinante de la hepatitis B, grupo Berna Biotech), Gen H-B Vax™ (Chiron Corporation), Hepatavax-B® (Merck & Co.), Hevac B® (Pasteur), KGC® (Korea Green Cross), TGP 943™ (Takeda Chem, Japón), Gen Hevac B® (Pasteur, Francia), Bio-Hep-B™/Sci-B- Vac™ (Bio-Technology General, Israel), AG-3™, Hepagene™, Hepacare™, (Medeva, Reino Unido, Evans Reino Unido).

V. Terapia génica

- Otro aspecto de la presente invención es usar métodos de terapia génica *in vivo* para administrar inmunomoduladores en combinación y/o alternación con el β -L-2'-desoxinucleósido de la presente invención, con diferentes métodos de acción y/o efectos sinérgicos, para tratar VHB. Los métodos de terapia génica se refieren a la introducción de secuencias de ácido nucleico (ADN, ARN, y ADN o ARN antisentido) en un huésped, tal como un animal, y en particular un ser humano, para incrementar la expresión del inmunomodulador que puede estar unido de manera operativa a un promotor y/o cualquiera de otros elementos genéticos necesarios para su expresión por el tejido diana. Dichas técnicas y métodos de terapia génica y administración son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, WO 90/11092, WO 98/11779; Pat. U.S. No. 5.693.622, 5.705.151, 5.580.859; Tabata H. et al. (1997) *Cardiovasc. Res.* 35(3):470-479, Chao J et al. (1997) *Pharmacol. Res.* 35(6):517-522, Wolff J. A. (1997) *Neuromuscul. Disord.* 7(5):314-318, Schwartz B. et al. (1996) *Gene Ther.* 3(5):405-411, Tsurumi Y. et al. (1996) *Circulation* 94(12):3281-3290.

- 55 Las construcciones de vector de polipéptido usadas en el método de terapia génica son preferiblemente construcciones que no se integrarán en el genoma del huésped ni contendrán secuencias que permitan la replicación. Cualquier promotor fuerte conocido por los expertos en la técnica puede usarse para dirigir la expresión del ADN.

Las construcciones de polipéptido pueden administrarse por cualquier método que administra materiales inyectables a las células de un animal, tal como, inyección en el espacio intersticial de los tejidos (corazón, músculo, piel, pulmón, hígado, intestino y semejantes). Las construcciones de polipéptido pueden administrarse en un vehículo líquido o acuoso farmacéuticamente aceptable.

- 5 La construcción de polipéptido pueden administrarse en el espacio intersticial de los tejidos en un animal, incluyendo el músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículos, ovario, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándula, y tejido conectivo. El espacio intersticial de los tejidos comprende el fluido intercelular, matriz de mucopolisacárido entre las fibras reticulares de tejidos orgánicos, fibras elásticas en las paredes de los vasos o cámaras, fibras de colágeno de tejidos fibrosos, o esta misma matriz en células musculares de la glía del tejido conectivo o en la lacunae del hueso. Es asimismo el espacio ocupado por el plasma de la circulación y el fluido linfático de los canales linfáticos. Puede administrarse convenientemente por inyección en los tejidos que comprenden estas células. Pueden administrarse preferiblemente en y expresarse en células persistentes, no en división que están diferenciadas, aunque la administración y expresión puede conseguirse en células no diferenciadas o menos completamente diferenciadas, tal como, por ejemplo, células madre de la sangre o fibroblastos de la piel.

- En una realización adicional de la invención, las células que están modificadas por ingeniería genética para expresar el inmunomodulador se administran a un paciente *in vivo*. Dichas células pueden obtenerse del paciente o un donante MHC compatible y pueden incluir, pero no está limitado a, fibroblastos, células de la médula ósea, células sanguíneas (por ejemplo, linfocitos), adipocitos, células musculares, células endoteliales, etc. Las células se modifican por ingeniería genética *in vitro* usando técnicas de ADN recombinante para introducir la secuencia codificadora de polipéptidos del inmunomodulador, o alternativamente, por procedimientos de transducción (usando vectores virales, y preferiblemente vectores que integran el transgén en el genoma celular) o transfección, incluyendo, pero no limitado a, el uso de plásmidos, cósmidos, YAC, ADN desnudo, electroporación, liposomas, etc. La secuencia codificadora del inmunomodulador puede ponerse bajo el control de un promotor constitutivo o inducible fuerte o promotor/potenciador para conseguir la expresión del inmunomodulador, y preferiblemente la secreción. Las células modificadas por ingeniería que expresan y preferiblemente secretan el inmunomodulador pueden introducirse en el paciente sistémicamente, por ejemplo, en la circulación, o intraperitonealmente.

- Alternativamente, las células pueden incorporarse en una matriz e implantarse en el cuerpo, por ejemplo, células endoteliales modificadas por ingeniería genética pueden implantarse como parte de un injerto linfático o vascular. (Véase, por ejemplo, Anderson et al. Pat. U.S. No. 5.399.349; y Mulligan y Wilson, Pat. U.S. No. 5.460.959).

- Cuando las células que se van a administrar son células no autólogas o no MHC compatibles, pueden administrarse usando técnicas muy conocidas que previenen el desarrollo de una respuesta inmune del huésped frente a las células introducidas. Por ejemplo, las células pueden introducirse en una forma encapsulada que, a la vez que permite un intercambio de componentes en el entorno extracelular inmediato, no permite que las células introducidas sean reconocidas por el sistema inmune del huésped.

- Las células eucariotas que pueden transducirse con las partículas virales infecciosas que contienen un ácido nucleico, gen o fragmento génico de éste para la expresión de un inmunomodulador incluyen, pero no están limitadas a, células primarias, tales como células sanguíneas nucleadas primarias, tales como leucocitos, granulocitos, monocitos, macrófagos, linfocitos (incluyendo linfocitos T y linfocitos B), células madre totipotentes, y linfocitos infiltrantes de tumor (células TIL); células de la médula ósea; células endoteliales; células epiteliales; queratinocitos; células madre; hepatocitos, incluyendo células precursoras de hepatocitos; hepatocitos, incluyendo células precursoras de hepatocitos; fibroblastos; células mesenquimales; células mesoteliales; y células parenquimales.

- En una realización, las células pueden dirigirse a un sitio específico, mediante lo cual las células funcionan como un terapéutico en dicho sitio. Alternativamente, las células pueden ser células que no están dirigidas a un sitio específico, y dichas células funcionan como un terapéutico sistémico.

- Pueden usarse células transducidas, por ejemplo, en el tratamiento de VHB introduciendo en células huésped, tales como células sanguíneas que se han extraído de un paciente y expandido en cultivo, partículas virales infecciosas según la presente invención que contienen genes que codifican un inmunomodulador. Las células pueden expandirse en número antes de o después de la transducción con las partículas virales infecciosas que contienen los genes deseados. Así, el procedimiento se realiza de una manera tal que después de la inyección en el paciente, las células transformadas producirán un inmunomodulador en el cuerpo del paciente.

- El gen o ácido nucleico portado por las células transducidas comprende específicamente la secuencia de un inmunomodulador, pero también puede comprender cualquier secuencia que aumente directamente o indirectamente los efectos terapéuticos de las células. El gen portado por las células transducidas también puede incluir secuencias que permitan a las células transducidas ejercer un efecto terapéutico que no tendrían habitualmente, tal como un gen que codifica un factor de coagulación útil en el tratamiento de la hemofilia. El gen puede codificar uno o más productos que tienen efectos terapéuticos. Los ejemplos de genes o ácidos nucleicos adecuados incluyen aquellos que codifican citoquinas tales como TNF, interleuquinas (interleuquinas 1-14),

interferones (interferones alfa, beta, gamma), proteínas receptoras de células T y receptores Fc para dominios de unión a antígeno de anticuerpos, tales como inmunoglobulinas. Los ejemplos adicionales de genes adecuados incluyen genes que modifican las células para "dirigirlas" a un sitio en el cuerpo al que las células no estarían normalmente "dirigidas", haciendo posible de esta manera el uso de las propiedades terapéuticas de las células en eses sitio. Por ejemplo, las células sanguíneas tales como células TIL pueden modificarse, por ejemplo, introduciendo una parte Fab de un anticuerpo monoclonal en las células, permitiendo de esta manera que las células reconozcan un antígeno elegido.

Es típico, pero no se requiere, administrar el ácido nucleico a la célula usando un vehículo conocido como un "vector". Los tipos más comunes de vectores usados en terapia génica son virus. Los científicos usan virus porque tienen una capacidad única de entrar en el ADN de una célula. Los virus usados como vectores en terapia génica están genéticamente deshabilitados; son incapaces de reproducirse. La mayor parte de los ensayos clínicos de terapia génica se basan en retrovirus de ratón para administrar el gen deseado. Otros virus usados como vectores incluyen adenovirus, virus adeno-asociados, poxvirus y el virus del herpes.

Por ejemplo, se extraen células del paciente y se crecen en el laboratorio. Las células se exponen al virus que porta el gen deseado. El virus entra en las células, y el gen deseado se vuelve parte del ADN de las células. Las células crecen en el laboratorio y se devuelven al paciente. Este tipo de terapia génica se denomina *ex vivo*, que significa "fuera del cuerpo". El gen se transfiere a las células del paciente mientras las células están fuera del cuerpo del paciente. En otros estudios, se usan vectores o liposomas (partículas grasas) para administrar el gen deseado a las células en el cuerpo del paciente. Esta forma de terapia génica se denomina *in vivo*, porque el gen se transfiere a las células dentro del cuerpo del paciente.

Cuando se usan vectores virales para transportar genes en el cuerpo, podrían alterar más allá que las células pretendidas. Otro peligro es que el nuevo gen pueda insertarse en la localización errónea en el ADN, causando posiblemente cáncer u otro daño. Además, cuando el ADN se inyecta directamente, o cuando se usa un sistema de administración de liposoma, existe la posibilidad de que el ADN pueda introducirse en células reproductoras, produciendo cambios hereditarios.

Otras preocupaciones incluyen la posibilidad de que los genes transferidos puedan "sobrexpresarse", produciendo tanto de la proteína ausente que sea perjudicial; que el vector viral pueda causar inflamación o una reacción inmune; y que el virus pueda transmitirse del paciente a otros individuos o al medioambiente.

Existen muchos vectores conocidos en la técnica. Puede usarse cualquier vector conocido en la presente invención. En una realización preferida de la presente invención, el vector puede tener como diana un tipo celular específico para una administración génica específica.

Vectores adenovirales

Puede usarse cualquiera de los vectores adenovirales para transfectar células y/o líneas celulares para expresar y/o secretar un inmunomodulador. Los adenovirus son virus sin cubierta que contienen un genoma de ADN bicatenario lineal. Aunque hay más de 40 cepas de serotipos de adenovirus, la mayor parte de las cuales causan infecciones benignas del tracto respiratorio en los seres humanos, los serotipos 2 ó 5 del subgrupo C se usan predominantemente como vectores. El ciclo vital no implica normalmente la integración en el genoma del huésped, en lugar de esto se replican como elementos episomales en el núcleo de la célula huésped y consecuentemente no hay riesgo de mutagénesis insercional. El genoma del adenovirus de tipo salvaje tiene aproximadamente 35 kb de las que hasta 30 kb pueden reemplazarse con ADN extraño (Smith, 1995, Verma y Somia, 1997). Hay cuatro unidades transcripcionales tempranas (E1, E2, E3 y E4) que tienen funciones reguladoras, y un transcrito tardío, que codifica proteínas estructurales. Los vectores progenitores tienen bien el gen E1 o E3 inactivado, suministrándose el gen perdido en trans bien por un virus auxiliar, plásmido o integrado en el genoma de una célula auxiliar (células de riñón fetal humano, línea 293, Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. L. y Nairn, R. (1997). *General Virology* 36: 59-72.). Los vectores de segunda generación usan además un mutante sensible a la temperatura E2a (Engelhardt, J. F., Litsky, L., y Wilson, J. M. (1994). *Human Gene Therapy* 5: 1217-1229.) o una delección E4 (Armentano, D., Zabner, J., et al. (1997). *Journal of Virology* 71: 2408-2416.). Los vectores "gutless" más recientes contienen sólo las repeticiones terminales invertidas (ITR) y una secuencia de empaquetamiento alrededor del transgén, proporcionándose todos los genes virales necesarios in trans por un virus auxiliar (Chen, H., Mack, L. M., Kelly, R., et al. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94: 1645-1650).

Los vectores adenovirales son muy eficientes en la transducción de células diana *in vitro* e *in vivo*, y pueden producirse a altas titulaciones ($>10^{11}$ /mL). Con la excepción de Geddes, B. J., Harding, T. C., Lightman, S. L. y Uney, J. B. (1997). *Nature Medicine* 3: 1402-1404., que mostraron expresión prolongada del transgén en cerebros de rata usando un vector de delección E1, la expresión del transgén *in vivo* a partir de vectores progenitores tiende a ser transitoria (Verma, I. M. y Somia, N. (1997). *Gene therapy - promises, problems and prospects.* *Nature* 389: 239-242.). Después de la inyección intravenosa, el 90% del vector administrado se degrada en el hígado por un mecanismo no mediado por inmunidad (Worgall, S., Wolff, G., Falck-Pedersen, E. y Crystal R. G. (1997). *Human Gene Therapy* 8: 37-44.). Posteriormente a esto, se produce una respuesta inmune restringida a la Clase I de MHC, usando CTL CD8+ para eliminar las células infectadas con el virus y células CD4+ para secretar IFN-alfa que resulta

en anticuerpo anti-adenoviral (Yang, Y. y Wilson, J. M. (1995). *Journal of Immunology* 155: 2564-2569.). La alteración del vector adenoviral puede eliminar algunos epitopos CTL, sin embargo, los epitopos reconocidos difieren con el haplotipo de MHC del huésped (Sparer, T. E., Wynn, S. G., Clark et al. (1997). *Journal of Virology* 71: 2277-2284. Jooss, K, Ertl, H. C. J. y Wilson, J. M. (1998). *Journal of Virology* 72: 2945-2954.). Los vectores remanentes, en aquellas células que no se destruyen, tienen su promotor inactivado (Armentano, D., Zabner, J., et al. (1997). *Journal of Virology* 71: 2408-2416.) y el anticuerpo persistente previene la administración posterior del vector.

Las estrategias para evitar la respuesta inmune que implican terapias inmunosupresoras transitorias han tenido éxito en prolongar la expresión del transgén y conseguir la transferencia secundaria del gen (Jooss, K., Yang, Y. y Wilson, J. M. (1996). *Human Gene Therapy* 7: 1555-1566. Kay, M. A., Meuse, L., et al. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94: 4686-4691). Un método menos intervencionista ha sido inducir tolerancia oral por alimentación del huésped con vector inactivado con UV (Kagami, H., Atkinson, J. C., et al. (1998) *Human Gene Therapy* 9: 305-313.). Sin embargo, es deseable manipular el vector en lugar del huésped. Aunque sólo se usan vectores con replicación deficiente, las proteínas virales se expresan a un nivel muy bajo que se presentan al sistema inmune. El desarrollo de vectores que contienen menos genes, culminando en los vectores "gutless" que no contienen secuencias codificadoras virales, ha resultado en la expresión prolongada del transgén in vivo en tejido hepático (Schiedner, G., Morral, N., et al. (1998). *Nature Genetics* 18: 180-183.). La administración inicial de grandes cantidades de ADN empaquetado en proteínas de adenovirus, la mayoría de las cuales se degradarán y presentarán al sistema inmune todavía causará problemas para los ensayos clínicos. Además, la población humana es heterogénea respecto al haplotipo MHC y una proporción de la población se habrá expuesto ya a la cepa adenoviral (Gahry-Sdard, H., Molinier-Frenkel, V., et al. (1997). *Journal of Clinical Investigation* 100: 2218-2226.).

Hasta hace poco, no se entendía bien el mecanismo por el que el adenovirus tomaba como diana la célula huésped. La expresión específica de tejido sólo era posible por lo tanto usando promotor/potenciadores celulares, por ejemplo, el promotor de la cadena 1 ligera de miosina (Shi, Q., Wang, Y. y Worton, R. (1997). *Human Gene Therapy* 8: 403-410.) y el promotor de la célula de músculo liso SM22a (Kim, S., Lin, H., et al. (1997). *Journal of Clinical Investigation* 100: 1006-1014.), o por administración directa a un área local (Rome, J. J., Shayani, V., et al. (1994). *Human Gene Therapy* 5: 1249-1258.). Se ha mostrado que la captación de la partícula de adenovirus es un proceso de dos etapas que implica una interacción inicial de una proteína de cubierta de fibra en el adenovirus con un receptor o receptores celulares, que incluye la molécula de MHC clase I (Hong, S. S., Karayan, L., et al. (1997). *EMBO Journal* 16: 2294-2306.) y el receptor de coxsackievirus-adenovirus (Bergelson, J. M., Cunningham J. A., et al. (1997). *Science* 275: 1320-1323.). La proteína de base pentona de la partícula de adenovirus se une a la familia de integrinas de heterodímeros de la superficie celular (Wickham, T. J., Mathias, P., et al. (1993). *Cell* 73: 309-319.) permitiendo la internalización a través de la endocitosis mediada por receptor. La mayor parte de las células expresan receptores primarios para la proteína de cubierta de fibra de adenovirus, sin embargo, la internalización es más selectiva (Harris, J. D. y Lemoine, N. R. (1996). *Trends in Genetics* 12: 400-404.). Los métodos para incrementar la captación viral incluyen estimular las células diana para expresar una integrina apropiada (Davison, E., Diaz, R. M., et al. (1997). *Journal of Virology* 71: 6204-6207.) y conjugar un anticuerpo con especificidad para el tipo de célula diana al adenovirus (Wickham, T. J., Lee, G. M., et al. (1997b). *Journal of Virology* 71: 7663-7669. Goldman, C K, Rogers, B. E., et al. (1997). *Cancer Research* 57: 1447-1451.). El uso de anticuerpos incrementa sin embargo las dificultades de la producción del vector y el riesgo potencial de activar el sistema del complemento. Mediante la incorporación de restos de unión a receptor en la proteína de cubierta de fibra, Wickham et al. (Wickham, T. J., Tzeng, E., et al. (1997a). *Journal of Virology* 71: 8221-8229.), fueron capaces de redirigir al virus a unirse a la integrina expresada por células endoteliales o de músculo liso dañadas, o receptores de heparin sulfato que es expresado por numerosos tipos celulares.

Cualquiera de los vectores virales adeno-asociados puede usarse para transfectar células y/o líneas celulares para expresar y/o secretar un inmunomodulador. Los virus adeno-asociados (AAV) son parvovirus humanos no patógenos, que dependen de un virus auxiliar, habitualmente adenovirus, para proliferar. Son capaces de infectar células tanto en división como no en división, y en ausencia de un virus auxiliar integrarse en un punto específico del genoma del huésped (19q 13-qter) a una alta frecuencia (Kotin, R. M., Siniscalco, M., et al. (1990). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 87: 2211-2215.). El genoma de tipo salvaje es una molécula de ADN monocatenaria, que consiste en dos genes; rep, que codifica proteínas que controlan la replicación viral, expresión de genes estructurales e integración en el genoma del huésped, y cap, que codifica proteínas estructurales de la cápside. A ambos extremos del genoma está una repetición terminal (TR) de 145 bp, que contiene un promotor.

Cuando se usa como un vector, los genes rep y cap se reemplazan por el transgén y sus secuencias reguladoras asociadas. La longitud total del inserto no puede exceder mucho de 4,7 kb, la longitud del genoma de tipo salvaje (Smith, A. E. (1995). *Annual Review of Microbiology* 49: 807-838.). La producción del vector recombinante requiere que rep y cap se proporcionen in trans, junto con los productos génicos del virus auxiliar (ARN de E1a, E1b, E2a, E4 y VA del genoma del adenovirus). El método convencional es cotransfectar dos plásmidos, uno para el vector y otro para rep y cap, en células 293 infectadas con adenovirus (Samulski, R. J., Chang, L., y Shenk, T. (1989). *Journal of Virology* 63: 3822-3828.). Este método, sin embargo, es problemático, con bajo rendimiento (<10⁴ partículas/ml) y tendente a contaminación con adenovirus y AAV de tipo salvaje. Una de las razones para el bajo rendimiento es el efecto inhibitorio del producto del gen rep en la replicación del adenovirus (Vincent, K. A., Piraino, S. T. y Wadsworth, S. C (1997). *Journal of Virology* 71: 1897-1905.). Los protocolos más recientes eliminan todos los

genes estructurales adenovirales y usan plásmidos resistentes rep (Xiao, X., Li, J. y Samulski, R. J. (1998) *Journal of Virology* 72: 2224-2232.) o conjugan un plásmido de expresión de rep con el virus maduro antes de la infección (Fisher, K. J., Kelley, W. M., Burda, J. F. y Wilson, J. M. (1996) *Human Gene Therapy* 7: 2079-2087.).

En ausencia de rep, el vector AAV sólo se integrará aleatoriamente, como un único provirus o concatámeros de cabeza a cola, una vez se han degradado ligeramente las repeticiones terminales (Rutledge, E. A. y Russell, D. W. (1997). *Journal of Virology* 71: 8429- 8436.). El interés en los vectores AAV se ha debido a su integración en el genoma del huésped permitiendo una expresión prolongada del transgén. Se ha reportado la transferencia génica en células epiteliales vasculares (Maeda, Y., Ikeda, U., et al. (1997). *Cardiovascular Research* 35: 514-521.), músculo estriado (Fisher, K. J., Jooss, K., et al. (1997). *Nature Medicine* 3: 306-316. Herzog, R. W., et al. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94: 5804-5809.) y células hepáticas (Snyder, R. O., Miao, C H., et al. (1997). *Nature Genetics* 16: 270-275.), con expresión prolongada cuando el transgén no deriva de una especie diferente. El anticuerpo neutralizante frente a la cápside de AAV puede ser detectable, pero no previene la readministración del vector o actividad de inhibición del promotor. Es posible que debido a la simplicidad de la cápside viral, la respuesta inmune esté así silenciada. Como los anticuerpos AAV estarán presentes en la población humana esto requerirá investigación adicional. No ha habido ningún intento de tomar como diana ningún tipo celular particular distinto de por administración del vector localizada.

En particular, pueden usarse los vectores adeno-asociados descritos en la Patente U.S. No. 5.693.531, incluyendo AAVp5neo; pSV- β -Galactosidasa; TRF169; LZ11; pSP72; pSP72nLacZ; pAdRSV4; pAdRSVnLacZ; AAVrnLac; SV40; pBluescriptSK; pSV40 ori AAV1; y pKMT11.

20 Vectores retrovirales

Cualquiera de los vectores retrovirales puede usarse para transfectar células y/o líneas celulares para expresar y/o secretar un inmunomodulador. Los retrovirus son una clase de virus recubiertos que contienen una molécula de ARN monocatenaria como el genoma. Después de la infección, el genoma viral se transcribe de forma inversa a ADN bicatenario, que se integra en el genoma del huésped y se expresa como proteínas. El genoma viral es de aproximadamente 10 kb, que contiene al menos tres genes: gag (que codifica proteínas del núcleo), pol (que codifica transcriptasa inversa) y env (que codifica la proteína de la cubierta viral). En cada extremo del genoma hay repeticiones terminales largas (LTR) que incluyen regiones de promotor/potenciador y secuencias implicadas con la integración. Además, hay secuencias requeridas para el empaquetamiento del ADN viral (ψ) y sitios de corte y empalme del ARN en el gen env. Algunos retrovirus contienen protooncogenes, que cuando mutan pueden causar cánceres, sin embargo, en la producción de vectores éstos se eliminan. Los retrovirus también pueden transformar células integrándose cerca de un protooncogén celular y dirigiendo la expresión inapropiada desde la LTR, o disrumpiendo un gen supresor de tumor. Este evento, denominado mutagénesis insercional, aunque extremadamente raro podría todavía ocurrir cuando los retrovirus se usan como vectores.

Los vectores retrovirales se basan lo más frecuentemente en el virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), que es un virus anfitrión, capaz de infectar tanto células de ratón, permitiendo el desarrollo del vector en modelos de ratón, como células humanas, permitiendo el tratamiento humano. Los genes virales (gag, pol, y env) se reemplazan con el transgén de interés y se expresa en plásmidos en la línea celular de empaquetamiento. Como los genes no esenciales carecen de la secuencia de empaquetamiento (ψ) no se incluyen en la partícula de virión. Para prevenir la recombinación que resulta en retrovirus competentes para la replicación, todas las regiones de homología con el núcleo del vector deben eliminarse y los genes no esenciales deben expresarse por al menos dos unidades transcripcionales (Markowitz, D., Goff, S. y Bank, A. (1988). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *Journal of Virology* 62: 1120-1124.). Aún así, se producen con una baja frecuencia retrovirus competentes para la replicación.

Las regiones esenciales incluyen las LTR 5' y 3', y la secuencia de empaquetamiento que está secuencia abajo de la LTR 5'. La expresión del transgén puede estar dirigida bien por la región promotora/potenciadora en la LTR 5', o por promotores alternativos virales (por ejemplo, citomegalovirus, virus del sarcoma de Rous) o celulares (por ejemplo, beta actina, tirosina). Los análisis mutacionales han mostrado que hasta la secuencia codificadora gag completa y la región en 5' inmediata pueden eliminarse sin afectar el empaquetamiento viral o la expresión del transgén (Kim, S. H., Yu, S. S., et al. (1998). *Journal of Virology* 72: 994-1004.). Sin embargo, el posicionamiento exacto del codón de inicio del transgén y pequeñas alteraciones de la LTR 5' influyen en la expresión del transgén (Rivire, I., Brose, K. y Mulligan, R. C. (1995). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 92: 6733-6737.). Para ayudar en la identificación de de células transformadas, pueden incluirse marcadores seleccionables, tales neomicina y beta galactosidasa, y la expresión del transgén puede mejorarse con la adición de sitios de ribosoma internos (Saleh, M. (1997). *Human Gene Therapy* 8: 979-983.). La capacidad vehicular disponible para vectores retrovirales es aproximadamente 7,5 kb (Verma, I. M. y Somia, N. (1997). *Nature* 389: 239-242.), que es demasiado pequeña para algunos genes incluso si se usa el ADNc.

La cubierta retroviral interacciona con una proteína celular específica para determinar el rango de células diana. Se ha demostrado que la alteración del gen env o su producto es un medio exitoso para manipular el rango de células. Las estrategias han incluido modificaciones directas del sitio de unión entre la proteína de cubierta y el receptor celular, sin embargo estas estrategias tienden a interferir con la internalización posterior de la partícula viral (Harris,

J. D. y Lemoine, N. R. (1996). *Trends in Genetics* 12: 400-404.). Mediante el reemplazo de una parte del gen env con 150 codones de la proteína eritropoyetina (EPO), Kasahara et al. (Kasahara, N., Dozy, A. M. y Kan, Y. W. (1994). *Science* 266: 1374-1376.) fueron capaces de tomar como diana células que portaban el receptor de EPO con alta afinidad. El acoplamiento de un anticuerpo a la partícula viral con afinidad para un segundo anticuerpo específico de célula mediante un puente de estreptovadina, mejora la captación viral, pero la internalización tiende a dar lugar a la degradación viral (Roux, P., Jeanteur, P., y Piechaczyk, M. (1989). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 9079-9083.). Neda et al (Neda, H., Wu, C H, y Wu. G. Y. (1991) *The Journal of Biological Chemistry* 266: 14143-14146.) trataron partículas virales con lactosa lo que resultó en la captación por las células, principalmente hepatocitos, expresando receptores de asiaglicoproteína. Posteriormente, hubo una expresión del transgén viral eficiente, debido posiblemente a la acidificación del endosoma permitiendo la fusión de la cubierta viral con la membrana del endosoma.

Los virus se diferencian respecto a sus tropismos, por lo tanto mediante el reemplazo del gen env con el de otro virus, el rango de huésped puede extenderse, en una técnica conocida como pseudotipado. La proteína G del virus de la estomatitis vesicular se ha incluido en vectores derivados de Mo-MLV (Burns, J. C, Matsubara, T., et al. (1994). *Developmental Biology* 165: 285-289.), que son también más estables cuando se purifican por ultracentrifugación. Recientemente, Qing (Qing, K., Bachelot, T., Mukherjee, P., et al. (1997). *Journal of Virology* 71: 5663-5667.) mejoraron la transducción en numerosas líneas celulares tratando en primer lugar las células receptoras con un virus adeno-asociado (discutido más adelante) que expresa el receptor celular para la proteína de la cubierta retroviral.

Un requerimiento para la integración retroviral y la expresión de genes virales es que las células diana deben estar en división. Esto limita la terapia génica a células en proliferación in vivo o ex vivo, mediante la cual las células se extraen del cuerpo, se tratan para estimular la replicación y se transducen con el vector retroviral, antes de volver al paciente. Las células ex vivo pueden transducirse más eficientemente, debido a la exposición a mayores titulaciones de virus y factores de crecimiento (Glimm, H, Kiem, H. P., et al. (1997). *Human Gene Therapy* 8: 2079-2086.). Además, las células tumorales tratadas ex vivo se asociarán con la masa tumoral y pueden dirigir los efectos tumoricidas (Oldfield, E. H. y Ram, Z. (1995). *Human Gene Therapy* 6: 55-85.; Abdel-Wahab, Z., Weltz, C, et al. (1997). *Cancer* 80: 401-412.).

Los lentivirus son una subclase de retrovirus que son capaces de infectar tanto células en proliferación como no en proliferación. Son considerablemente más complicados que los retrovirus simples, y contienen seis proteínas adicionales, tat, rev, vpr, vpu, nef y vif. Las líneas celulares de empaquetamiento actuales tienen plásmidos separados para un gen pseudotipo env, una construcción de transgén, y una construcción de empaquetamiento que suministra los genes estructurales y reguladores en trans (Naldini, L., Blmer, U., et al. (1996). *Science* 272: 263-267.). Los resultados iniciales usando genes marcadores han sido prometedores, mostrando una expresión prolongada in vivo en el tejido muscular, hepático y neuronal (Blmer, U., Naldini, L., et al. (1997). *Journal of Virology* 71: 6641-6649; Miyoshi, H, Takahashi, M., Gage, F. H. y Verma, I. M. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94: 10319-10323; Kafri, T., Blmer, U., et al. (1997). *Nature Genetics* 17: 314-317). De forma interesante, los transgenes están dirigidos por un promotor de citomegalovirus preparado por ingeniería internamente, que a diferencia de en vectores MoMLV, no está inactivado. Esto puede deberse a la respuesta inflamatoria limitada a la inyección del vector, que fue igual en magnitud que el control de salino (Blmer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. M. y Gage, F. H. (1997). *Journal of Virology* 71: 6641-6649).

Los vectores lentivirales usados derivan del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y están siendo evaluados para seguridad, con la intención de algunos de los genes reguladores no esenciales. Los mutantes de vpr y vif son capaces de infectar neuronas con eficiencia reducida, pero no células musculares o hepáticas (Blmer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. M. y Gage, F. H. (1997). *Journal of Virology* 71: 6641-6649; Kafri, T., Blmer, U., et al. (1997). *Nature Genetics* 17: 314-317.).

En una realización particular, se usan los vectores retrovirales pLXIN, pSIR, pLXSH, pLNCX, pLAPSN, pFB y pFB-Neo.

Vectores virales del herpes simple

Cualquiera de los vectores virales del herpes simple pueden usarse para transfectar células y/o líneas celulares para expresar y/o secretar un inmunomodulador. El virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) es un virus neurotrópico humano, consecuentemente el interés se ha centrado principalmente en usar HSV-1 como un vector para la transferencia génica al sistema nervioso. El virus HSV-1 de tipo salvaje es capaz de infectar neuronas y bien proseguir en un ciclo de vida lítico o persistir como un episoma intracelular en un estado latente. Las neuronas infectadas de forma latente funcionan normalmente y no son rechazadas por el sistema inmune. Aunque el virus latente es transcripcionalmente casi silencioso, posee promotores específicos de neuronas que son capaces de funcionar durante la latencia. Los anticuerpos frente a HSV-1 son comunes en la población humana, sin embargo son muy raras las complicaciones debidas a infección por herpes, tal como encefalitis.

El genoma viral es una molécula de ADN bicatenaria lineal de 152 kb. Hay dos regiones únicas, larga y corta (denominadas UL y US) que están unidas en cualquier orientación por secuencias de repetición internas (IRL e IRS). En el extremo no de conector de las regiones únicas hay repeticiones terminales (TRL y TRS). Hay hasta 81 genes

(Marconi, P., Krisky, D., et al. (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 11319-11320.), de los que aproximadamente la mitad no son esenciales para el crecimiento en cultivo celular. Una vez se han deletado estos genes no esenciales, pueden acomodarse 40-50 kb de ADN extraño en el virus (Glorioso, J. C., DeLuca, N. A. y Fink, D. J (1995). *Annual Review of Microbiology* 49: 675-710.). Se han identificado tres clases principales de genes de HSV-1, concretamente los genes inmediatos-tempranos (IE o alfa), los genes tempranos (E o beta) y los genes tardíos (L o gamma).

Después de la infección en células susceptibles, la replicación lítica está regulada por una secuencia coordinada temporalmente de transcripción génica. Vmw65 (una proteína estructural del tegumento) activa los genes inmediatos tempranos (IP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP477) que son factores transactivadores que permiten la producción de genes tempranos. Los genes tempranos codifican genes para el metabolismo de nucleótidos y la replicación de ADN. Los genes tardíos se activan por los genes tempranos y codifican proteínas estructurales. El ciclo completo dura menos de 10h y resulta invariablemente en la muerte celular.

Los eventos moleculares que dan lugar al establecimiento de la latencia no se han determinado completamente. La expresión génica durante la latencia está dirigida por los transcritos asociados a latencia (LAT) localizados en la región IRL del genoma. Dos LAT (2,0 y 1,5 kb) se transcriben en la dirección opuesta al gen IE ICP0. Los LAT tienen un papel en la reactivación de HSV-1 de la latencia (Steiner, I., Spivack, J. G., et al. (1989). *EMBO Journal* 8: 505-511.) y el establecimiento de la latencia (Sawtell, N. M. y Thompson, R. L. (1992). *Journal of Virology* 66: 2157-2169.). Se han identificado dos promotores activos en latencia que dirigen la expresión de los LAT (Marconi, P., Krisky, D., et al. (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 11319-11320.) y pueden demostrarse útiles para la expresión de transgén de vector.

Se han usado dos estrategias básicas para la producción de vectores HSV-1, concretamente amplicones y virus HSV-1 recombinantes. Los amplicones son plásmidos producidos bacterianamente que contienen col E1 ori (un origen de replicación de *Escherichia coli*), OriS (el origen de replicación de HSV-1), secuencia de empaquetamiento de HSV-1, el transgén bajo el control de un promotor inmediato-temprano y un marcador seleccionable (Federoff, H. J., Geschwind, M. D., Geller, A. I. y Kessler, J. A. (1992). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 1636-1640.). El amplicón se transfecta en una línea celular que contiene un virus auxiliar (un mutante sensible a la temperatura) que proporciona todos los genes estructurales y reguladores ausentes en trans. Tanto las partículas virales auxiliares como las que contienen el amplicón se administran al receptor. Los amplicones más recientes incluyen una secuencia derivada del virus de Epstein-Barr para el mantenimiento episomal del plásmido (Wang, S. y Vos, J. (1996). *Journal of Virology* 70: 8422-8430.).

Los virus recombinantes se hacen deficientes para la replicación por la delección de uno de los genes inmediato-temprano, por ejemplo, ICP4, que se proporciona en trans. Aunque son menos patógenos y pueden dirigir la expresión del transgén en el tejido cerebral, son tóxicos para las neuronas en cultivo (Marconi, P., Krisky, D., et al. (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 11319-11320.). La delección de varios genes inmediatos-tempranos reduce sustancialmente la citotoxicidad y también permite la expresión a partir de promotores que estarían silenciados en el virus latente de tipo salvaje. Estos promotores pueden usarse en la dirección de la expresión génica a largo plazo.

Los mutantes condicionales para la replicación sólo son capaces de replicarse en determinadas líneas celulares. Las líneas celulares permisivas son todas proliferativas y suministran una enzima celular para complementar una deficiencia viral. Los mutantes incluyen timidina quinasa (During, M. J., Naeyegele, J. R., OMalley, K. L. y Geller, A. I. (1994). *Science* 266: 1399-1403.), ribonucleasa reductasa (Kramm, C. M., Chase, M., et al. (1997). *Human Gene Therapy* 8: 2057- 2068.), UTPasa, o el factor de neurovirulencia g34.5 (Kesan, S., Randazzo, B. P., et al. (1995). *Laboratory Investigation* 73: 636-648.).

Vectores no virales

Los vectores virales inducen toda una respuesta inmunológica en algún grado y pueden tener riesgos de seguridad (tales como problemas de mutagénesis insercional y toxicidad). Además su capacidad es limitada y la producción a gran escala puede ser difícil de conseguir. Por lo tanto, en una realización de la invención, se usan métodos no virales de transferencia génica, que pueden requerir sólo un pequeño número de proteínas, tienen una capacidad virtualmente infinita, no tienen capacidad infecciosa o mutagénica y la producción a gran escala es posible usando técnicas farmacéuticas. Hay tres métodos de transferencia de ADN no viral, concretamente: ADN desnudo, liposomas y conjugados moleculares.

Ácidos nucleicos desnudos

El ADN o ácidos nucleicos desnudos pueden usarse para administrar el inmunomodulador al huésped. Pueden administrarse, por ejemplo, en la forma de un plásmido que puede inyectarse directamente en células musculares (Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. y Feigner P. L. (1990). *Science* 247: 1465-1468.) o unidos a partículas de oro que se bombardean en el tejido (Cheng, L., Ziegelhoffer, P. R. y Yang, N. S. (1993). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 90: 4455-4459.). Los términos ácido nucleico, ADN, ARN "desnudo" se refieren a secuencias que carecen de cualquier vehículo de administración que actúa para asistir, estimular, o facilitar la entrada en la célula, incluyendo secuencias virales, partículas virales,

formulaciones de liposoma, lipofectina o agentes de precipitación y semejantes. Aunque no es muy eficiente, esto puede resultar en un nivel bajo de expresión prolongado in vivo. A diferencia de otras terapias génicas, una ventaja principal de introducir secuencias de ácido nucleico desnudo en células diana es la naturaleza transitoria de la síntesis de inmunomodulador en las células. Los estudios han mostrado que las secuencias de ADN que no se replican pueden introducirse en células para proporcionar la producción del inmunomodulador deseado durante periodos de hasta seis meses. La simplicidad de este método, y expresión sostenida han dado lugar al desarrollo de vacunas de ADN. Comparadas con vacunas atenuadas y basadas en proteína convencionales, no se ven afectadas por la inmunidad pre-existente, por ejemplo, debida a anticuerpos maternos, es relativamente barato, y puede administrar varios antígenos de patógeno en un único plásmido (Manickan, E., Karem, K. L., y Rouse, B. T. (1997). *Critical Reviews in Immunology* 17: 139-154.). Las vacunas de ADN están siendo desarrolladas para aquellos patógenos para los que no existe una vacuna, por ejemplo, VIH (Lekutis, C, Shiver, J. W., Liu, M. A., y Letvin, L. N. (1997). *The Journal of Immunology* 158: 4471-4477.) o la vacuna actual no es totalmente efectiva, por ejemplo, gripe (Macklin, M. D., McCabe, D., et al. (1998). *Journal of Virology* 72: 1491-1496.). Mediante el uso de un gen altamente conservado Ulmer et al. (Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., et al. (1993). *Science* 254: 1745-1749.) fueron capaces de inmunizar ratones frente a dos cepas del virus influenza serológicamente distintas. En la mayor parte de los casos, sin embargo, las vacunas de ADN no se han mostrado mejores que las vacunas existentes (Macklin, M. D., McCabe, D., et al. (1998). *Journal of Virology* 72: 1491-1496.). El tipo real de respuesta inmune puede controlarse por cotransformación de un gen que codifica la citoquina apropiada (Xiang, Z. y Ertl, H. C. (1995). *Immunity* 2: 129-135.) y este método puede mostrarse útil para redirigir las respuestas inmunes inapropiadas (Manickan, E., Karem, K. L., y Rouse, B. T. (1997). *Critical Reviews in Immunology* 17: 139-154.). Otros usos para el ADN desnudo incluyen inmunopotenciación en cáncer (discutido más adelante, Corr. M., Tighe, H., Lee, D., Dudler, J., et al. (1997). *The Journal of Laboratory Investigation* 159: 4999-5004.), reparación de la función de insulina pancreática (Goldfme. I. D., German, M. S., Tseng, H., et al. (1997). *Nature Biotechnology* 15: 1378-1382.), y estimulación del desarrollo de los vasos sanguíneos colateral (Takeshita, S., Tsurumi, Y., et al. (1996). *Laboratory Investigation* 75: 487-501.). La expresión del producto génico en tejido muscular puede mejorarse por la coadministración de colagenasa, papaverina y condiciones isquémicas (Budker, V., Zhang, G., Danlco, I., Williams, P. y Wolff, J. (1998). *Gene Therapy* 5: 272-276.). El uso de un promotor específico de músculo (Skarli, M., Kiri, A., et al. (1998). *Gene Therapy* 5: 514-520.) y otras secuencias reguladoras intragénicas, tal como la secuencia poli A y de terminación de la transcripción (Hartikka, J., Sawdey, M., et al. (1996). *Human Gene Therapy* 7: 1205-1217.) también mejorará la expresión del transgén.

Para la inyección del polipéptido desnudo, una cantidad de dosificación efectiva del ADN o ARN estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 g/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Preferiblemente la dosificación será de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg y más preferiblemente de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. Por supuesto, como apreciará el experto en la técnica, esta dosificación variará según el sitio de tejido de la inyección. La dosificación apropiada y efectiva de la secuencia de ácido nucleico puede ser determinada fácilmente por los expertos en la técnica y puede depender de la afección que se está tratando y la ruta de administración. La ruta de administración es por la ruta parenteral de inyección en el espacio intersticial de tejidos, o también pueden usarse otras rutas parenterales, tales como, inhalación de una formulación de aerosol particularmente para la administración a los pulmones o tejidos bronquiales, garganta o membranas mucosas de la nariz. Además, las construcciones de polipéptido desnudo pueden administrarse a arterias durante angioplastia por el catéter usado en el procedimiento.

El inmunomodulador también puede administrarse en formulaciones de liposoma (tales como las enseñadas en Felgner P. L. et al. (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 772: 126-139 y Abdallah B. et al. (1995) *Biol. Cell* 85(1):1-7) que pueden prepararse por métodos muy conocidos para los expertos en la técnica. Los liposomas son bicapas lipídicas que engloban una fracción de fluido acuoso. El ADN se asociará espontáneamente con la superficie externa de liposomas catiónicos (gracias a su carga) y estos liposomas interaccionarán con la membrana celular (Felgner, J. H., Kumar, R., et al. (1994). *Journal of Biological Chemistry* 269: 2550-2561.). In vitro hasta el 90% de determinadas líneas celulares pueden transfectarse. Mediante la inclusión de una pequeña cantidad de un lípido aniónico en un liposoma de otra forma catiónico, el ADN puede incorporarse en la superficie interna del liposoma, protegiéndolo así de la degradación enzimática. (Crespo et al, 1996, citado en Alio, S. F. (1997). *Biochemical Pharmacology* 54: 9-13.). Para facilitar la captación en la célula como endosomas, se han incluido en los liposomas proteínas de direccionamiento, por ejemplo, anticuerpo anti-MHC (Wang, C, y Huang, L. (1987). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 7851-7855.), transferrina (Stavridis, J. C, Deliconstantinos, G., et al. (1986). *Experimental Cell Research* 164: 568-572.), y el virus Sendai o su proteína F (Dzau, J. V., Mann, M. J, Morishita, R., y Kaneda, Y. (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 11421-11425.). El virus Sendai permite además al ADN plasmídico escapar del endosoma al citoplasma, evitando así la degradación. La inclusión de una proteína de unión a ADN (proteína de alta movilidad grupo 1 de 28 kDa) aumenta la transcripción llevando el plásmido al núcleo (Dzau et al. **1997** *Am J Cardiol.* 1997 nov 6;80(9A):331-391).

Los conjugados moleculares consisten en ligandos de proteína o sintéticos a los que se ha unido un agente de unión a ADN. La administración a la célula puede mejorarse usando técnicas similares a las de los liposomas. Las proteínas de direccionamiento incluyen asialoglicoproteína (Wagner, E., Cotten, M., Foisner, R. y Birnstiel, M. L. (1991). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 4255-4259.), transferrina (Wu, C. H., Wilson, J. M. y Wu, G. Y. (1989). *Journal of Biological Chemistry.* 264: 16985-16987.), IgA polimérica (Ferkol, T., Kaetzel, C. S.

y Davis, P. B. (1993). *Journal of Clinical Investigation* 92: 2394-2400.) y adenovirus (Madon, J. y Blum, H. E. (1996). *Hepatology* 24: 474-481.). La expresión del transgén tiende a ser transitoria y está limitada por degradación endosomal/lisosomal.

VI. Composiciones farmacéuticas

5 Los seres humanos que padecen cualquiera de los trastornos descritos en la presente memoria, incluyendo hepatitis B, pueden ser tratados mediante la administración al paciente de una cantidad efectiva de un β -2'-desoxi- β -L-eritropentofuranonucleósido, por ejemplo β -L-2'-desoxiadenosina, β -L-2'-desoxicitidina, β -L-2'-desoxiuridina, β -L-2'-desoxiguanosina o β -L-2'-desoxitimidina o un profármaco o sal farmacéuticamente aceptable de éste en presencia de un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los materiales activos pueden administrarse por cualquier
10 ruta apropiada, por ejemplo, oralmente, parenteralmente, intravenosamente, intradérmicamente, subcutáneamente, o tópicamente, en forma líquida o sólida.

El compuesto activo se incluye en el vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto para inhibir la replicación viral *in vivo*, sin causar efectos tóxicos graves en el paciente tratado. Por "cantidad inhibidora" se quiere decir una
15 cantidad de ingrediente activo suficiente para ejercer un efecto inhibitor según se mide, por ejemplo, por un ensayo tal como los descritos en la presente memoria.

Una dosis preferida del compuesto para todas las afecciones mencionadas anteriormente estará en el intervalo de aproximadamente 1 a 50 mg/kg, preferiblemente 1 a 20 mg/kg de peso corporal por día, más generalmente 0,1 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día. El intervalo de dosificación efectiva del profármaco farmacéuticamente aceptable puede calcularse tomando como base el peso del nucleósido parental que se va a administrar. Si el profármaco presenta actividad en sí mismo, la dosificación efectiva puede estimarse como anteriormente usando el peso del profármaco, o por otros medios conocidos por los expertos en la técnica.

El compuesto se administra convenientemente en cualquier forma unitaria de dosificación adecuada, incluyendo pero no limitado a una que contiene 7 a 3.000 mg, preferiblemente 70 a 1.400 mg de ingrediente activo por forma unitaria de dosificación. Una dosificación oral de 50-1.000 mg es habitualmente conveniente.

Idealmente, el ingrediente activo debe administrarse para conseguir concentraciones pico plasmáticas del compuesto activo de aproximadamente 0,2 a 70 μ M, preferiblemente aproximadamente 1,0 a 10 μ M. Esto puede conseguirse, por ejemplo, por la inyección intravenosa de una disolución 0,1 a 5% del ingrediente activo, opcionalmente en disolución salina, o administrado como un bolo del ingrediente activo.

30 La concentración del compuesto activo en la composición de fármaco dependerá de las velocidades de absorción, inactivación y excreción del fármaco así como de otros factores conocidos para los expertos en la técnica. Debe indicarse que los valores de dosificación también variarán con la gravedad de la afección que se va a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se ajustarán con el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la
35 administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración fijados en la presente memoria sólo son ejemplares y no se pretende que limiten el alcance o práctica de la composición reivindicada. El ingrediente activo puede administrarse de una vez, o puede dividirse en varias dosis más pequeñas para administrarse a intervalos de tiempo variables.

Un modo de administración preferido del compuesto activo es oral. Las composiciones orales incluirán generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Puede estar incluida en cápsulas de gelatina o comprimida en comprimidos. Para el propósito de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en la forma de comprimidos, tabletas, o cápsulas. Pueden incluirse agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes como parte de la composición.

Los comprimidos, píldoras, cápsulas, tabletas y semejantes pueden contener cualquiera de los ingredientes siguientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido alginico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saporífero tal como menta, salicilato de metilo, o sabor a naranja. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede
45 contener, además del material del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso. Además, las formas unitarias de dosificación pueden contener varios materiales adicionales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca, u otros agentes entéricos.

El compuesto puede administrarse como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, chicle o semejantes. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como un agente edulcorante y determinados conservantes, agentes de tinción y colorantes y sabores.

55 El compuesto o derivado o sales farmacéuticamente aceptables de éste también pueden mezclarse con otros materiales activos que no alteran la acción deseada, o con materiales que suplementan la acción deseada, tales

como antibióticos, antifúngicos, antiinflamatorios, inhibidores de proteasa, u otros agentes antivirales nucleósidos o no nucleósidos. Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea, o tópica pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites fijados, polietilen glicoles, glicerina, propilen glicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parental puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiple compuestos por vidrio o plástico.

Si se administra intravenosamente, los vehículos preferidos con disolución salina fisiológica o disolución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una realización preferida, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán al compuesto frente a la eliminación rápida del cuerpo, tales como formulaciones de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como vinil acetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation.

Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también se prefieren como vehículos farmacéuticamente aceptables. Éstos pueden prepararse según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente U.S. No. 4.522.811. Por ejemplo, las formulaciones de liposoma pueden prepararse disolviendo lípido(s) apropiado(s) (tal como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, aracadoil fosfatidil colina, y colesterol) en un disolvente inorgánico que se evapora, dejando tras de sí una película fina de lípido seco en la superficie del contenedor. Se introduce entonces en el contenedor una disolución acuosa del compuesto activo o sus derivados monofosfato, difosfato y/o trifosfato. El contenedor se agita con movimientos circulares a mano para liberar el material lipídico de los laterales del contenedor y para dispersar los agregados lipídicos, formando de esta manera la suspensión liposomal.

VII. Formulaciones de liberación controlada

Todas las patentes U.S. citadas en esta sección se refieren a formulaciones de liberación controlada.

El campo de los polímeros biodegradables se ha desarrollado rápidamente desde que se reportó la síntesis y biodegradabilidad del ácido poliláctico por Kulkarni et al. ("Polylactic acid for surgical implants," *Arch. Surg.*, **1966**, 93, 839). Los ejemplos de otros polímeros que se han reportado como útiles como un material de matriz para dispositivos de administración incluyen polianhídridos, poliésteres tales como poliglicólidos y poliláctido-co-glicólidos, poliaminoácidos tales como polilisina, polímeros y copolímeros de óxido de polietileno, óxido de polietileno terminado con acrílico, poliamidas, poliuretanos, poliortoésteres, poliacrilonitrilos, y polifosfazenos. Véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 4.891.225 y 4.906.474 de Langer (polianhídridos), 4.767.628 de Hutchinson (poliláctido, ácido poliláctido-co-glicólido), y 4.530.840 de Tice, et al. (poliláctido, poliglicólido, y copolímeros). Véase también la patente U.S. No. 5.626.863 de Hubbell, et al que describe hidrogeles fotopolimerizables biodegradables como materiales de contacto de tejidos y vehículos de liberación controlada (hidrogeles de macrómeros polimerizados y entrecruzados que comprenden oligómeros hidrofílicos que tienen extensiones monoméricas u oligoméricas biodegradables, que son monómeros u oligómeros con finalización en caperuza capaces de polimerización y entrecruzamiento); y PCT WO 97/05185 presentada por Focal, Inc. dirigida a hidrogeles multibloque biodegradables para uso como agentes de liberación controlada para la administración de fármacos y agentes de tratamiento de tejidos.

Los materiales degradables de origen biológico son muy conocidos, por ejemplo, gelatina entrecruzada. El ácido hialurónico se ha entrecruzado y usado como un polímero de hinchamiento degradable para aplicaciones biomédicas (Patente U.S. 4.957.744 de Delia Valle et. al.; "Surface modification of polymeric biomaterials for reduced thrombogenicity," *Polym. Mater. Sci. Eng.*, **1991**, 62, 731-735).

Actualmente se usan, o se están explorando para usarse, muchos sistemas de dispersión como vehículos de sustancias, particularmente compuestos biológicamente activos. Los sistemas de dispersión usados para formulaciones farmacéuticas y cosméticas pueden clasificarse bien como suspensiones o emulsiones. Las suspensiones se definen como partículas sólidas que varían en tamaño de unos pocos micrómetros hasta cientos de micrómetros, dispersadas en un medio líquido usando agentes de suspensión. Las partículas sólidas incluyen microesferas, microcápsulas, y nanoesferas. Las emulsiones se definen como dispersiones de un líquido en otro, estabilizadas por una película de interfase de emulsionantes tales como tensioactivos y lípidos. Las formulaciones de emulsión incluyen emulsiones agua en aceite y aceite en agua, emulsiones múltiples, microemulsiones, microgotitas, y liposomas. Las microgotitas son vesículas de fosfolípido unilamelares que consisten en una capa lipídica esférica con una fase de aceite en su interior, como se define en las Patentes U.S. Nos. 4.622.219 y 4.725.442 expedida a Haynes. Los liposomas son vesículas de fosfolípidos preparadas mezclando lípidos polares insolubles en agua con una disolución acuosa. La entropía desfavorable causada por el mezclado del lípido insoluble

en el agua produce un ensamblaje altamente ordenado de membranas cerradas concéntricas de fosfolípido con disolución acuosa atrapada.

5 La Patente U.S. No. 4.938.763 de Dunn, et al., describe un método para formar un implante in situ disolviendo un polímero termoplástico no reactivo, insoluble en agua en un disolvente biocompatible, soluble en agua, para formar un líquido, poniendo el líquido en el cuerpo, y permitiendo que el disolvente se disipe para producir un implante sólido. La disolución de polímero puede ponerse en el cuerpo mediante una jeringa. El implante puede asumir la forma de su cavidad circundante. En una realización alternativa, el implante se forma a partir de polímeros oligoméricos reactivos, líquidos, que no contienen disolvente y que se curan en el lugar para formar sólidos, habitualmente con la adición de un catalizador de curado.

10 Varias patentes describen sistemas de administración de fármacos que pueden usarse para administrar un β -L-2'-desoxinucleósido o un nucleótido u otro fármaco definido de éste. La Patente U.S. No. 5.749.847 describe un método para la administración de nucleótidos en organismos por electroporación. La Patente U.S. No. 5.718.921 describe microesferas que comprenden polímero y fármaco dispersados en ellas. La Patente U.S. No. 5.629.009 describe un sistema de administración para la liberación controlada de factores bioactivos. La Patente U.S. No. 15 5.578.325 describe nanopartículas y micropartículas de copolímeros multibloque hidrofílicos hidrofóbicos no lineales. La Patente U.S. No. 5.545.409 describe un sistema de administración para la liberación controlada de factores bioactivos. La Patente U.S. No. 5.494.682 describe microcápsulas poliméricas entrecruzadas iónicamente.

20 La Patente U.S. No. 5.728.402 de Andrx Pharmaceuticals, Inc. describe una formulación de liberación controlada que incluye una fase interna que comprende el fármaco activo, su sal, éster o profármaco, mezclado con un agente formador de hidrogel, y una fase externa que comprende un recubrimiento que resiste la disolución en el estómago. Las Patentes U.S. Nos. 5.736.159 y 5.558.879 de Andrx Pharmaceuticals, Inc. describe una formulación de liberación controlada para fármacos con baja solubilidad en agua en la que se forma un pasaje in situ. La Patente U.S. No. 5.567.441 de Andrx Pharmaceuticals, Inc. describe una formulación de liberación controlada de una vez al día. La Patente U.S. No. 5.508.040 describe un sistema de administración de fármaco pulsátil multiparticulado. La Patente U.S. No. 25 5.472.708 describe un sistema de administración de fármaco basado en partículas pulsátil. La Patente U.S. No. 5.458.888 describe una formulación en comprimido de liberación controlada que puede prepararse usando una mezcla que tiene una fase interna que contiene el fármaco y una fase externa que comprende un polímero polietilén glicol que tiene un peso molecular en peso medio de 3.000 a 10.000. La Patente U.S. No. 30 5.419.917 describe métodos para la modificación de la velocidad de liberación de un fármaco desde un hidrogel que se basa en el uso de una cantidad efectiva de un compuesto ionizable farmacéuticamente aceptable que es capaz de proporcionar una velocidad de liberación del fármaco desde el hidrogel de orden sustancialmente cero. La Patente U.S. No. 5.458.888 describe una formulación en comprimido de liberación controlada.

35 La Patente U.S. No. 5.641.745 de Elan Corporation, plc describe una formulación farmacéutica de liberación controlada que comprende el fármaco activo en un polímero biodegradable para formar microesferas o nanoesferas. El polímero biodegradable es adecuadamente poli-D,L-láctido o una mezcla de poli-D,L-láctido y poli-D,L-láctido-co-glicólido. La Patente U.S. No. 5.616.345 de Elan Corporation plc describe una formulación de absorción controlada para una administración de una vez al día que incluye el compuesto activo en asociación con un ácido orgánico, y una membrana multi-capas rodeando el núcleo y que contiene una proporción principal de un polímero sintético farmacéuticamente aceptable, formador de película, insoluble en agua y una proporción menor de un polímero sintético farmacéuticamente aceptable, formador de película, soluble en agua. La Patente U.S. No. 40 5.641.515 describe una formulación de liberación controlada basada en nanopartículas biodegradables. La Patente U.S. No. 5.637.320 describe una formulación de absorción controlada para una administración de una vez al día. Las Patentes U.S. Nos. 5.580.580 y 5.540.938 están dirigidas a formulaciones y a su uso en el tratamiento de enfermedades neurológicas. La Patente U.S. No. 5.533.995 está dirigida a un dispositivo transdérmico pasivo con 45 administración controlada de fármaco. La Patente U.S. No. 5.505.962 describe una formulación farmacéutica de liberación controlada.

VIII. Preparación de los compuestos activos

Los β -L-2'-desoxinucleósidos de la presente invención son conocidos en la técnica y pueden prepararse según el método descrito por Holy, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1972**, 37 (12), 4072-87 y *Mol. Phys.* **1967**, 3 (4), 386-95.

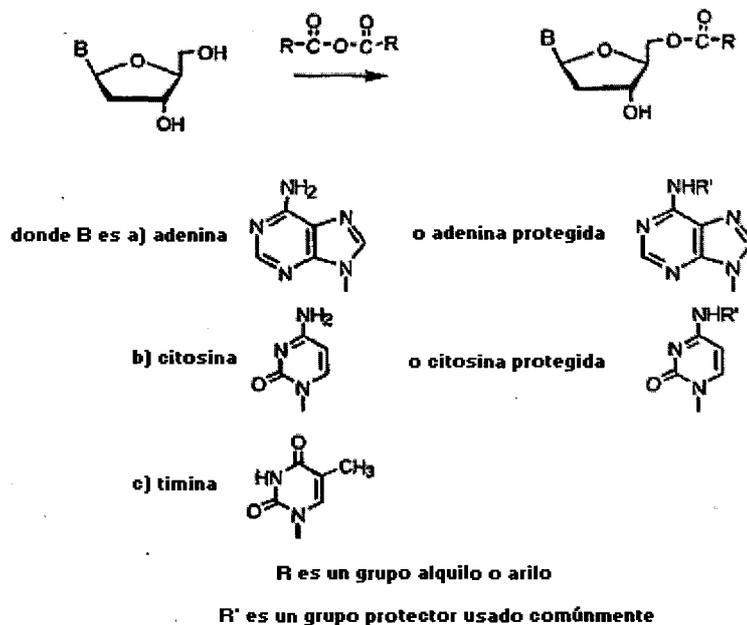
50 Un proceso general para obtener β -L-2'-desoxinucleósidos (β -L-dN) se muestra en la **Figura 1**, usando L-ribosa o L-xilosa como un material de partida.

Los derivados mono. di y trifosfato de los nucleósidos activos pueden prepararse como se describe según métodos publicados. El monofosfato puede prepararse según el procedimiento de Imai et al., *J. Org. Chem.*, junio **1969**, 34 (6), 1547-1550. El difosfato puede prepararse según el procedimiento de Davisson et al., *J. Org. Chem.*, **1987**, 52 (9), 1794-1801. El trifosfato puede prepararse según el procedimiento de Hoard et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87 (8), 1785-1788.

Método para la preparación de derivados β-L-5' de β-L-nucleósidos

Los derivados β-L-5' de un β-L-nucleósido pueden prepararse por cualquier medio conocido en la técnica, particularmente por métodos conocidos para proteger alcoholes primarios con restos acilo, es decir, mediante un anhídrido o con la ayuda de un agente de acoplamiento. Como un ejemplo no limitativo, los derivados β-L-5' pueden prepararse según la secuencia de reacciones siguiente:

5



En una realización preferida, el derivado 5' deriva de un resto aminoacilo. El material de partida clave para este proceso es un β-L-nucleósido sustituido apropiadamente. El β-L-nucleósido puede adquirirse o puede prepararse por cualquier medio conocido incluyendo reacciones de acoplamiento estándar con un resto L-azúcar, tal como desoxirribosa. Los derivados aminoacilo pueden prepararse acoplado selectivamente un aminoácido a un β-L-nucleósido, preferiblemente sin ninguna protección adicional del nucleósido. La reacción de acoplamiento puede conseguirse usando reactivos de acoplamiento apropiados que estimulan el acoplamiento. Algunos ejemplos no limitativos de reactivos de acoplamiento son reactivos de tipo Mitsunobu (por ejemplo, azodicarboxilatos de dialquilo tales como azodicarboxilato de diisopropilo y azodicarboxilato de dietilo) con trifenil fosfina o varios tipos de carbodiimidas.

10

15

La reacción de acoplamiento puede realizarse a cualquier temperatura que consiga los resultados deseados, es decir, que sea adecuada para que la reacción proceda a una velocidad aceptable sin estimular la descomposición o productos secundarios excesivos.

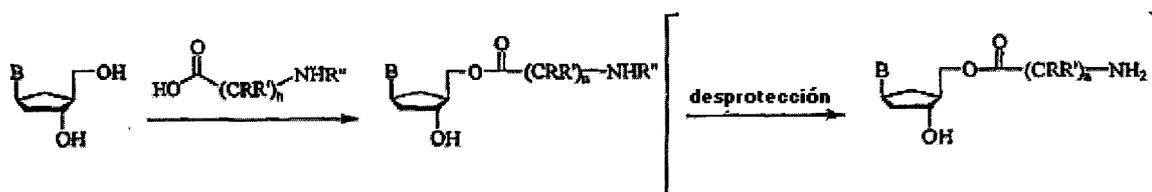
Puede seleccionarse cualquier disolvente de reacción que pueda alcanzar la temperatura necesaria y que pueda solubilizar los componentes de la reacción. Los ejemplos no limitativos son cualquier disolvente aprótico incluyendo, pero no limitado a, disolventes alquilo o halo-alquilo tales como hexano, ciclohexano, diclorometano o dicloroetano, tolueno, acetona, acetato de etilo, ditianos, THF, dioxano, acetonitrilo, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida, o cualquier combinación de éstos.

20

El Esquema 1 es un ejemplo no limitativo de la preparación de un β-L-5'-aminoacil-nucleósido derivado de L-desoxirribonucleósido.

25

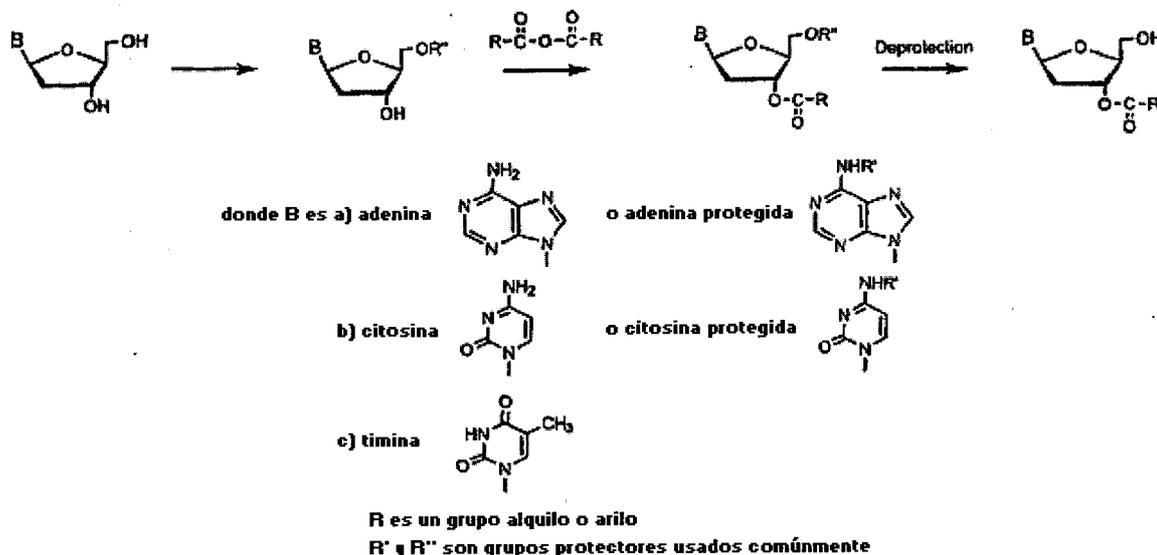
Esquema 1



Método para la preparación de derivados β-L-3' de β-L-nucleósidos

Los derivados β-L-3' de un 2'-desoxi-nucleósido pueden prepararse por cualquier medio conocido en la técnica, particularmente por métodos conocidos para proteger alcoholes secundarios con restos acilo, es decir, mediante un anhídrido o con la ayuda de un agente de acoplamiento. Como un ejemplo no limitativo, los derivados 3' pueden prepararse según la secuencia de reacciones siguiente:

5



Alternativamente, el derivado 3' deriva de un resto aminoácido. El material de partida clave para este proceso es también un β-L-nucleósido sustituido apropiadamente. El β-L-nucleósido puede adquirirse o puede prepararse por cualquier medio conocido incluyendo reacciones de acoplamiento estándar con un resto L-azúcar.

10 Estos derivados aminoácido pueden prepararse en primer lugar protegiendo selectivamente el 5'-hidroxilo con un grupo protector de oxígeno adecuado, tal como un grupo protector acilo o sililo, y opcionalmente protegiendo cualquier amina libre en la base heterocíclica o heteroaromática. Posteriormente, el 3'-hidroxilo libre puede acoplarse con un α o β aminoácido protegido en N.

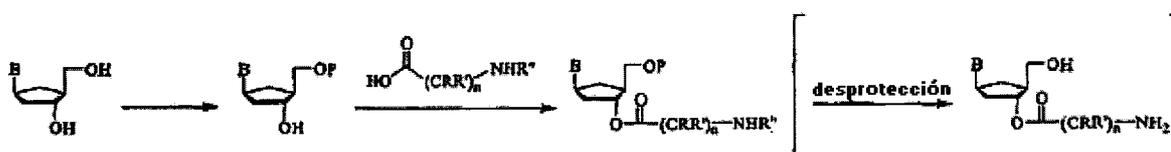
15 Posteriormente, el β-L-nucleósido se acopla al aminoácido usando reactivos de acoplamiento estándar que estimulan el acoplamiento. Algunos ejemplos no limitativos de reactivos de acoplamiento son reactivos de tipo Mitsunobu (por ejemplo, azodicarboxilatos de dialquilo tales como azodicarboxilato de diisopropilo y azodicarboxilato de dietilo) con trifetil fosfina o varios tipos de carbodiimidas.

20 La reacción de acoplamiento puede realizarse a cualquier temperatura que consiga los resultados deseados, es decir, que sea adecuada para que la reacción proceda a una velocidad aceptable sin estimular la descomposición o productos secundarios excesivos.

25 Puede seleccionarse cualquier disolvente de reacción que pueda alcanzar la temperatura necesaria y que pueda solubilizar los componentes de la reacción. Los ejemplos no limitativos son cualquier disolvente aprótico incluyendo, pero no limitado a, disolventes alquilo o halo-alquilo tales como hexano, ciclohexano, diclorometano o dicloroetano, tolueno, acetona, acetato de etilo, ditianos, THF, dioxano, acetonitrilo, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida, o cualquier combinación de éstos.

El Esquema 2 es un ejemplo no limitativo de la preparación de un β-L-3'-aminoácil-nucleósido derivado de L-desoxiribonucleósido.

Esquema 2

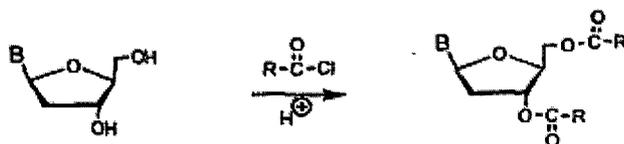


30

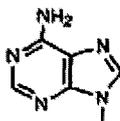
Método para la preparación de derivados β -L-3',5'-bis-O de β -L-nucleósidos

Los derivados β -L-3',5'-bis-O de un β -L-nucleósido pueden prepararse por cualquier medio conocido en la técnica, particularmente por métodos conocidos para proteger alcoholes primarios y secundarios con restos acilo, es decir, mediante un anhídrido o con la ayuda de un agente de acoplamiento. Como un ejemplo no limitativo, los derivados 3',5'-bis-O pueden prepararse según la secuencia de reacciones siguiente:

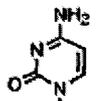
5



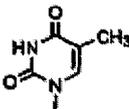
donde B es a)



b) citosina



c) timina



R es un grupo alquilo o arilo

En una realización preferida, el derivado 3',5'-bis-O deriva de un resto aminoácido. El material de partida clave para este proceso es también un β -L-nucleósido sustituido apropiadamente. Los derivados 3',5'-bis-O de los β -L-nucleósidos pueden adquirirse o pueden prepararse por cualquier medio conocido incluyendo reacciones de acoplamiento estándar con un resto L-azúcar, tal como desoxiribosa. Posteriormente, los 3' y 5'-hidroxilos libres pueden acoplarse a un α o β aminoácido protegido en N. La reacción de acoplamiento puede conseguirse usando reactivos de acoplamiento apropiados que estimulan el acoplamiento. Algunos ejemplos no limitativos de reactivos de acoplamiento son reactivos de tipo Mitsunobu (por ejemplo, azodicarboxilatos de dialquilo tales como azodicarboxilato de diisopropilo y azodicarboxilato de dietilo) con trifetil fosfina o varios tipos de carbodiimidas.

10

La reacción de acoplamiento puede realizarse a cualquier temperatura que consiga los resultados deseados, es decir, que sea adecuada para que la reacción proceda a una velocidad aceptable sin estimular la descomposición o productos secundarios excesivos.

15

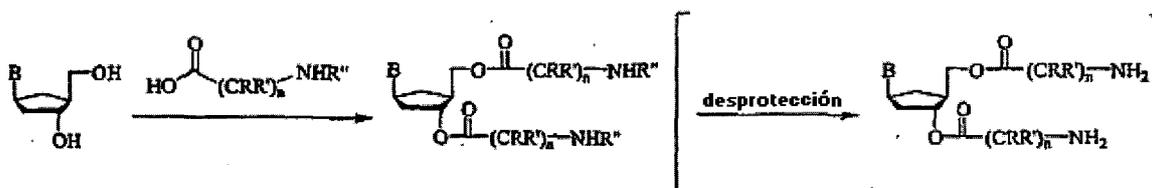
Puede seleccionarse cualquier disolvente de reacción que pueda alcanzar la temperatura necesaria y que pueda solubilizar los componentes de la reacción. Los ejemplos no limitativos son cualquier disolvente aprótico incluyendo, pero no limitado a, disolventes alquilo o halo-alquilo tales como hexano, ciclohexano, diclorometano o dicloroetano, tolueno, acetona, acetato de etilo, ditianos, THF, dioxano, acetonitrilo, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida, o cualquier combinación de éstos.

20

El Esquema 3 es un ejemplo no limitativo de la preparación de un β -L-3,5'-diaminoacil-nucleósido derivado de L-desoxiribonucleósido.

25

Esquema 3



Método opcional para la extensión del resto aminoacilo

Los compuestos del título pueden prepararse haciendo reaccionar el 3' y 5'-hidroxilo con un derivado adecuado, tal como un acilo, y en particular un grupo aminoacilo. Si el nucleósido se derivatiza con un resto aminoacilo, puede ser deseable acoplar adicionalmente la amina libre a un α o β aminoácido protegido en *N*. La reacción de acoplamiento puede conseguirse usando reactivos de acoplamiento apropiados para estimular el acoplamiento. Algunos ejemplos no limitativos de reactivos de acoplamiento son reactivos de tipo Mitsunobu (por ejemplo, azodicarboxilatos de dialquilo tales como azodicarboxilato de diisopropilo y azodicarboxilato de dietilo) con trifenil fosfina o varios tipos de carbodiimidas.

La reacción de acoplamiento puede realizarse a cualquier temperatura que consiga los resultados deseados, es decir, que sea adecuada para que la reacción proceda a una velocidad aceptable sin estimular la descomposición o productos secundarios excesivos.

Puede seleccionarse cualquier disolvente de reacción que pueda alcanzar la temperatura necesaria y que pueda solubilizar los componentes de la reacción. Los ejemplos no limitativos son cualquier disolvente aprótico incluyendo, pero no limitado a, disolventes alquilo o halo-alquilo tales como hexano, ciclohexano, diclorometano o dicloroetano, tolueno, acetona, acetato de etilo, ditianos, THF, dioxano, acetonitrilo, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida, o cualquier combinación de éstos.

Método opcional para la derivatización de la base heteroaromática o heterocíclica

Los compuestos del título pueden prepararse protegiendo opcionalmente cualquier amino libre en la base heterocíclica o heteroaromática, por ejemplo, N^4 -citosina, N^6 -adenina o N^2 -guanina. Por ejemplo, la amina puede protegerse por un resto acilo o un resto dialquilaminometileno por el protocolo general siguiente.



La protección puede realizarse a cualquier temperatura que consiga los resultados deseados, es decir, que sea adecuada para que la reacción proceda a una velocidad aceptable sin estimular la descomposición o productos secundarios excesivos.

Puede seleccionarse cualquier disolvente de reacción que pueda alcanzar la temperatura necesaria y que pueda solubilizar los componentes de la reacción. Los ejemplos no limitativos son cualquier disolvente aprótico incluyendo, pero no limitado a, disolventes alquilo o halo-alquilo tales como hexano, ciclohexano, diclorometano o dicloroetano, tolueno, acetona, acetato de etilo, ditianos, THF, dioxano, acetonitrilo, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida, o cualquier combinación de éstos.

Posteriormente, el 3'-hidroxilo libre puede acoplarse con un α o β aminoácido protegido en *N*. La reacción de acoplamiento puede conseguirse usando reactivos de acoplamiento apropiados que estimulan el acoplamiento. Algunos ejemplos no limitativos de reactivos de acoplamiento son reactivos de tipo Mitsunobu (por ejemplo, azodicarboxilatos de dialquilo tales como azodicarboxilato de diisopropilo y azodicarboxilato de dietilo) con trifenil fosfina o varios tipos de carbodiimidas.

La reacción de acoplamiento puede realizarse a cualquier temperatura que consiga los resultados deseados, es decir, que sea adecuada para que la reacción proceda a una velocidad aceptable sin estimular la descomposición o productos secundarios excesivos.

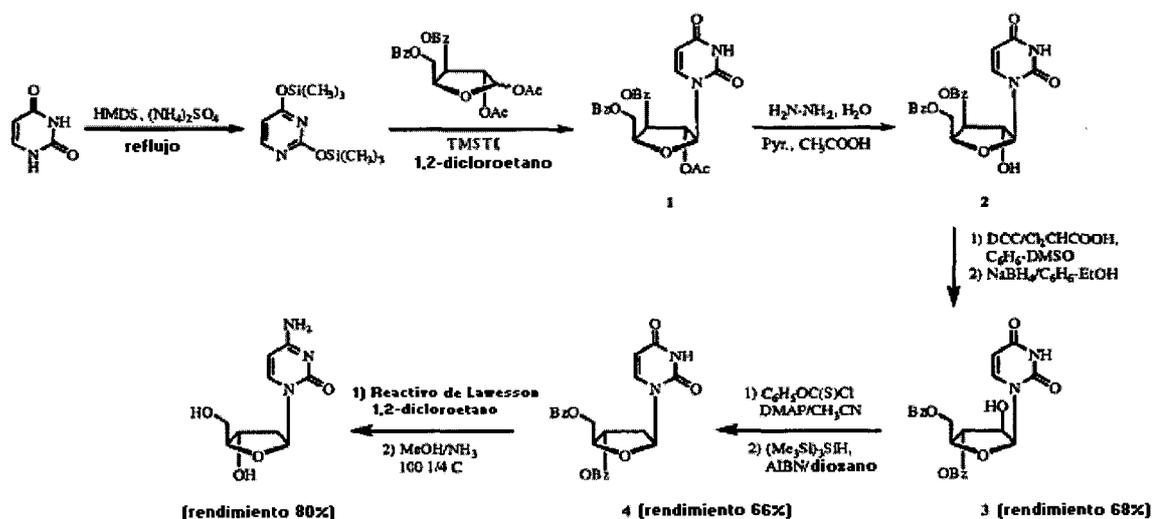
Puede seleccionarse cualquier disolvente de reacción que pueda alcanzar la temperatura necesaria y que pueda solubilizar los componentes de la reacción. Los ejemplos no limitativos son cualquier disolvente aprótico incluyendo, pero no limitado a, disolventes alquilo o halo-alquilo tales como hexano, ciclohexano, diclorometano o dicloroetano, tolueno, acetona, acetato de etilo, ditianos, THF, dioxano, acetonitrilo, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida, o cualquier combinación de éstos.

En una realización alternativa, el derivado N^4 - o N^6 -acilo deriva de un resto aminoacilo, y puede prepararse según la secuencia de reacción siguiente, protegiendo opcionalmente los hidroxilos libres, seguido de una reacción de condensación con el éster amino apropiadamente protegido, y la eliminación de los grupos protectores de hidroxilo, si es necesario.

EJEMPLOS

Los puntos de fusión se determinaron en tubos capilares abiertos en un aparato Gallenkamp MFB-595-010 M y no están corregidos. Los espectros de absorción UV se registraron en un espectrofotómetro Uvikon 931 (KONTRON) en etanol. Los espectros de $^1\text{H-RMN}$ se corrieron a temperatura ambiente en $\text{DMSO-}d_6$ con un espectrómetro Bruker AC 250 o 400. Los desplazamientos químicos se proporcionan en ppm, ajustándose el $\text{DMSO-}d_6$ a 2,49 ppm como referencia. El intercambio de deuterio, los experimentos de desacoplamiento o 2D-COSY se realizaron con el fin de confirmar las asignaciones de protones. Las multiplicidades de señal se representan por s (singlete), d (doblete), dd (doblete de dobletes), t (tripleto), q (cuadruplete), br (ancho), m (multiplete). Todos los valores J están en Hz. Los espectros de masa FAB se registraron en el modo ión positivo ($\text{FAB}>0$) o negativo ($\text{FAB}<0$) en un espectrómetro de masa JEOL DX 300. La matriz fue alcohol 3-nitrobenílico (NBA) o una mezcla (50:50, v/v) de glicerol y tioglicerol (GT). Las rotaciones específicas se midieron en un espectropolarímetro Perkin-Elmer 241 (longitud de paso 1 cm) y se proporcionan en unidades de 10^{-1} grad $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$. Los análisis elementales se realizaron por el "Servicio de Microanálisis del CNRS, División de Vernaison" (Francia). Los análisis indicados por los símbolos de los elementos o funciones estaban en $\pm 0,4\%$ de los valores teóricos. La cromatografía en capa fina se realizó en láminas de aluminio pre-recubiertas de Gel de Sílice 60 F_{254} (Merck, Art. 5554), consiguiéndose la visualización de los productos por absorbanza UV seguido de carbonización con 10% ácido sulfúrico etanólico y calentamiento. La cromatografía en columna se realizó en Gel de Sílice 60 (Merck, Art. 9385) a presión atmosférica.

Realización de referencia 1

Síntesis estereoespecífica de 2'-desoxi- β -L-citidina1-(3,5-Di-O-benzoil- β -L-xilofuranosil)uracilo (**2**)

Se añadió hidrato de hidrazina (1,4 mL, 28,7 mmoles) a una disolución de 1-(2-O-acetil-3,5-di-O-benzoil- β -L-xilofuranosil)uracilo **1** [Ref.: Gosselin, G.; Bergogne, M.-C.; Imbach, J.-L., "Synthesis and Antiviral Evaluation of β -L-Xylofuranosyl Nucleosides of the Five Naturally Occurring Nucleic Acid Bases", Journal of Heterocyclic Chemistry, oct-nov. 1993, 30, 1229-1233] (4,79 g, 9,68 mmoles) en piridina (60 mL) y ácido acético (15 mL). La disolución se agitó toda la noche a temperatura ambiente. Se añadió acetona (35 mL) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. La mezcla de reacción se evaporó bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice [eluyente: gradiente por etapas de metanol (0-4%) en diclorometano para proporcionar **2** (3,0 g, 68%) que se cristalizó de ciclohexano/diclorometano: $\text{pf} = 111-114^\circ\text{C}$; $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ 11,35 (br s, 1H, NH), 7,9-7,4 (m, 11H, 2 $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$, H-6), 6,38 (d, 1H, OH-2', $J_{\text{OH-2}'}$ = 4,2 Hz), 5,77 (d, 1H, H-1', $J_{1'-2'}$ = 1,9 Hz), 5,55 (d, 1H, H-5, J_{5-6} = 8 Hz), 5,54 (dd, 1H, H-3', $J_{3'-2'}$ = 3,9 Hz y $J_{3'-4'}$ = 1,8 Hz), 4,8 (m, 1H, H-4'), 4,7 (m, 2H, H-5' y H-5''), 4,3 (m, 1H, H-2'); MS: $\text{FAB}>0$ (matriz GT) m/z 453 (M+H) $^+$, 105 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$); $\text{FAB}<0$ (matriz GT) m/z 451 (M-H) $^-$, 121 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2$), 111 (B) $^-$; Anal. Calcd para $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 58,09; H, 4,76; N, 5,96. Encontrado: C, 57,71; H, 4,42; N, 5,70.

1-(3,5-Di-O-benzoil- β -L-arabinofuranosil)uracilo (**3**)

A una disolución de 1-(3,5-di-O-benzoil- β -L-xilofuranosil)uracilo **2** (8 g, 17,7 mL) en una mezcla anhidra benceno-DMSO (265 mL, 6:4, v/v) se añadieron piridina anhidra (1,4 mL), dicitohexilcarbodiimida (10,9 g, 53 mmoles) y ácido dicloroacético (0,75 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, se diluyó con acetato de etilo (400 mL) y se añadió una disolución de ácido oxálico (4,8 g, 53 mmoles) en metanol (14 mL). Después de agitarla durante 1h, la disolución se filtró. El filtrado se lavó con una disolución saturada de NaCl

(2x500mL), disolución al 3% de NaHCO₃ (2x500mL) y agua (2x500mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se evaporó bajo presión reducida. El residuo resultante se solubilizó en una mezcla EtOH absoluto-benceno (140 mL, 2:1, v/v). A esta disolución a 0°C se añadió NaBH₄ (0,96 g, 26,5 mmoles). Después de agitarla durante 1h, la disolución se diluyó con acetato de etilo (400 mL), se filtró. El filtrado se lavó con una disolución saturada de NaCl (400 mL) y agua (400 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se evaporó bajo presión reducida. El material crudo resultante se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice [eluyente: gradiente por etapas de metanol (0-3%) en diclorometano para proporcionar **3** (5,3 g, 66%) que se cristalizó de acetonitrilo: pf = 182-183°C; ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): δ 11,35 (br s, 1H, NH), 8,0-7,5 (m, 11H, 2 C₆H₅CO, H-6), 6,23 (br s, 1H, OH-2'), 6,15 (d, 1H, H-1', J_{1-2'} = 4 Hz), 5,54 (d, 1H, H-5, J₅₋₆ = 8,1 Hz), 5,37 (t, 1H, H-3', J_{3-2'} = J_{3-4'} = 2,6 Hz), 4,7-4,6 (m, 2H, H-5' y H-5''), 4,5 (m, 1H, H-4'), 4,4 (m, 1H, H-2'); MS: FAB>0 (matriz GT) m/z 453 (M+H)⁺, 341 (S)⁺, 113 (BH₂)⁺, 105 (C₆H₅CO)⁺; FAB<0 (matriz GT) m/z 451 (M-H)⁻, 121 (C₆H₅CO₂)⁻, 111 (B)⁻; Anal. Calcd para C₂₃H₂₀N₂O₈: C, 61,06; H, 4,46; N, 6,19. Encontrado: C, 60,83; H, 4,34; N, 6,25.

1-(3,5-Di-O-benzoil-β-L-eritro-pentofuranosil)uracilo (**4**)

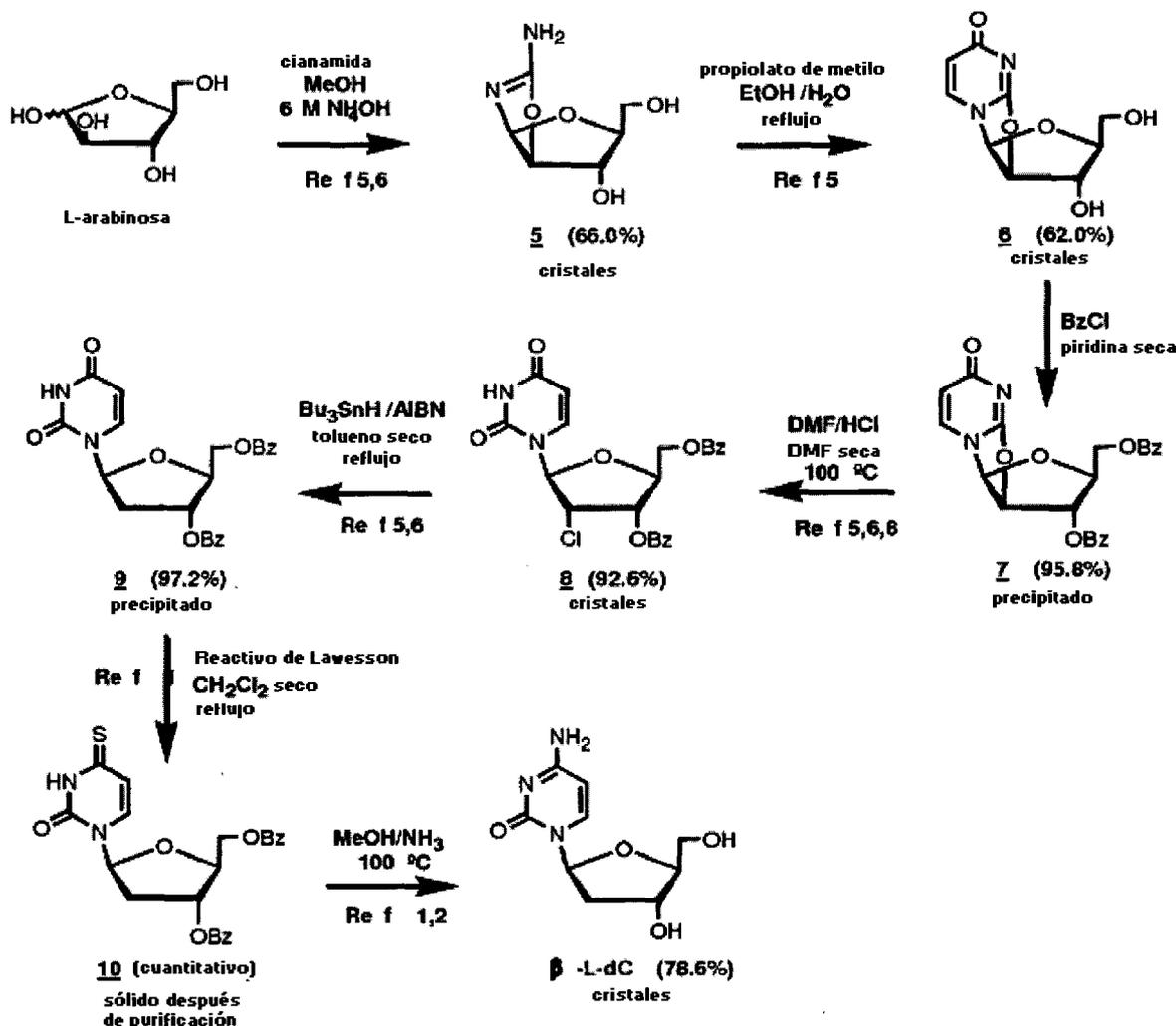
A una disolución de 1-(3,5-di-O-benzoil-β-L-arabinofuranosil)uracilo **3** (5,2 g, 11,4 mmoles) en 1,2-dicloroetano anhidro (120 mL) se añadieron cloruro de fenoxitiocarbonylo (4,7 mL, 34,3 mL) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 12,5 g, 102,6 mmoles). La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 1h y se evaporó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano (300 mL) y la disolución orgánica se lavó sucesivamente con una disolución enfriada en hielo de 0,2 N ácido clorhídrico (3x 200 mL) y agua (2x200 L), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó bajo presión reducida. El material crudo se co-evaporó varias veces con dioxano anhidro y se disolvió en este disolvente (110 mL). A la disolución resultante se añadieron bajo argón hidruro de tris-(tiimetilsilil)silano (4,2 mL, 13,7 mmoles) y α,α'-azoisobutironitrilo (AIBN, 0,6 g, 3,76 mmoles). La mezcla de reacción se calentó y se agitó a 100°C durante 1 hora bajo argón, se enfrió hasta temperatura ambiente y se evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice [eluyente: gradiente por etapas de metanol (0-5%)] para proporcionar **4** (2,78 g, 56%) que se cristalizó de EtOH: pf = 223-225°C; H-RMN (DMSO-*d*₆): δ 11,4 (br s, 1H, NH), 8,0-7,5 (m, 11H, 2 C₆H₅CO, H-6), 6,28 (t, 1H, H-1', J = 7 Hz), 5,5 (m, 2H, H-1' y H-5), 4,6-4,4 (m, 3H, H-4', H-5' y H-5''), 2,6 (m, 2H, H-2' y H-2''); MS: FAB>0 (matriz GT) m/z 437 (M+H)⁺, 3,325 (S)⁺; FAB<0 (matriz GT) m/z 435 (M-H)⁻, 111 (B)⁻; Anal. Calcd para C₂₃H₂₀N₂O₇: C, 63,30; H, 4,62; N, 6,42. Encontrado: C, 62,98; H, 4,79; N, 6,40.

2'-Desoxi-β-L-citidina (β-L-dC)

Se añadió reactivo de Lawesson (1,72 g, 4,26 mmoles) bajo argón a una disolución de 1-(3,5-di-O-benzoil-2-desoxi-β-L-eritro-pentofuranosil)uracilo **4** (2,66 g, 6,1 mmoles) en 1,2-dicloroetano anhidro (120mL) y la mezcla de reacción se agitó bajo reflujo durante 2 horas. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice [eluyente: gradiente por etapas de acetato de etilo (0-8%) en diclorometano] para proporcionar el intermedio 4-tio como una espuma amarilla. Se calentó una disolución de este intermedio tio (1,5 g, 3,31 mmoles) en amoniaco metanólico (saturado previamente a -10°C y tapado firmemente) (50 mL) a 100°C en una bomba de acero inoxidable durante 3h y se enfrió a 0°C. La disolución se evaporó bajo presión reducida. El material crudo resultante se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice [eluyente: gradiente por etapas de metanol (0-20%) en diclorometano]. Finalmente, se combinaron las fracciones apropiadas, se filtraron a través de una unidad Millex HV-4 (0,45 μm, Millipore) y se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar la 2'-desoxi-β-L-citidina (β-L-dC) deseada como una espuma (0,6 g, 80%) que se cristalizó de EtOH absoluto: pf=198-199°C; ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): δ 7,77 (d, 1H, H-6, J₆₋₅ = 7,4 Hz), 7,10 (br d, 2H, NH₂), 6,13 (t, 1H, H-1', J = 6,7 Hz), 5,69 (d, 1H, H-5, J₅₋₆ = 7,4 Hz), 5,19 (d, 1H, OH-3', J_{OH-3'} = 4,1 Hz), 4,96 (t, 1H, OH-5', J_{OH-5'} = J_{OH-5''} = 5,2 Hz), 4,1 (m, 1H, H-3'), 3,75 (m, 1H, H-4'), 3,5 (m, 2H, H-5' y H-5''), 2,0 (m, 1H, H-2'), 1,9 (m, 1H, H-2''); MS: FAB>0 (matriz GT) m/z 228 (M+H)⁺, 112 (BH₂)⁺; FAB<0 (matriz GT) m/z 226 (M-H)⁻; [α]_D²⁰ = - 69 (c 0,52, DMSO) [[α]_D²⁰ = + 76 (c 0,55, DMSO) para una sal hidrocloreto disponible comercialmente del enantiómero D]. Anal. Calcd para C₉H₁₃N₃O₄: C, 47,57; H, 5,77; N, 18,49. Encontrado: C, 47,35; H, 5,68; N, 18,29.

Realización de referencia 2

Síntesis estereoselectiva de 2'-desoxi-β-L-citidina (β-L-dC)

2-Amino-β-L-arabinofurano-[1',2':4,5]-oxazolina (**5**)

- 5 Una mezcla de L-arabinosa (170 g, 1,13 moles: Fluka, >99,5%, ref 10839), cianamida (100g, 2,38 moles: Fluka, >98%, ref 28330), metanol (300 mL), y 6M NH₄OH (50 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 3 días y se mantuvo a -10°C toda la noche. El producto se recogió con succión, se lavó sucesivamente con metanol y éter, y se secó en vacío. Rendimiento, 130 g (66,0%) del compuesto analíticamente puro **5**, p.f. 170-172°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ ppm 6,35 (br s, 2H, NH₂), 5,15 (d, 1H, H-1, J=5,6 Hz), 5,45 (br s, 1H, OH-3), 4,70 (br s, 1H, OH-5), 4,55 (d, 1H, H-2, J = 5,6 Hz), 4,00 (br s, 1H, H-3), 3,65 (m, 1H, H-4), 3,25 (m, 2H, H-5, H-5').

O^{2,2'}-anhidro-β-L-uridina (**6**)

- 15 Una disolución de compuesto **5** (98,8 g, 0,57 moles) y propiolato de metilo (98 mL: Fluka, >97%, ref 81863) en 50% etanol acuoso (740 mL) se puso a reflujo durante 5 horas, se enfrió y se concentró bajo presión reducida a la mitad del volumen original. Después de precipitar con acetona (600 ml), el producto se recogió con succión, se lavó con etanol y éter, y se secó. El licor madre se concentró parcialmente, el concentrado se precipitó con acetona (1.000 ml), el sólido se recogió con succión, y se lavó con acetona y éter para suministrar otra cosecha del producto. Rendimiento global, 80 g (62%) del compuesto **6**, p.f. 236-240°C; ¹H RMN (DMSO-d₆): δ ppm 7,87 (d, 1H, H-6, J = 7,4 Hz), 6,35 (d, 1H, H-1', J = 5,7 Hz), 5,95 (d, 1H, H-5, J = 7,4 Hz), 5,90 (d, 1H, OH-3'), 5,20 (d, 1H, H-2', J = 5,7 Hz), 5,00 (m, 1H, OH-3'), 4,44 (br s, 1H, H-3'), 4,05 (m, 1H, H-4'), 3,25 (m, 2H, H-5, H-5').

20

3',5'-Di-O-benzoil- O^{2,2'}-anhidro-β-L-uridina (7)

A una disolución del compuesto **6** (71,1 g, 0,31 moles) en piridina anhidra (1.200 ml) se añadió cloruro de benzoilo (80,4 mL: Fluka, p.a., ref 12930) a 0°C y bajo argón. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas con exclusión de humedad atmosférica y se paró por la adición de etanol. Los disolventes se evaporaron bajo presión reducida y el residuo resultante se coevaporó con tolueno y etanol absoluto. La mezcla cruda se diluyó con etanol y el precipitado se recogió con succión, se lavó sucesivamente con etanol y éter, y se secó. Rendimiento, 129 g (95,8%) de compuesto **7**, p.f. 254°C; ¹H RMN (DMSO-d₆): δ ppm 8,1-7,4 (m, 11H, C₆H₅CO, H-6), 6,50 (d, 1H, H-1', J = 5,7 Hz), 5,90 (d, 1H, H-5, J = 7,5 Hz), 5,80 (d, 1H, H-2', J = 5,8 Hz), 5,70 (d, 1H, H-3') 4,90 (m, 1H, H-4'), 4,35 (m, 2H, H-5, H-5').

3',5'-Di-O-benzoil-2'-cloro-2'-desoxi-β,L-uridina (8)

A una disolución del compuesto **7** (60,3 g, 0,139 moles) en dimetilformamida (460 ml) se añadió a 0°C una disolución a 3,2 N de HCl/DMF (208 ml, preparada *in situ* añadiendo 47,2 ml de cloruro de acetilo (Fluka, p.a., ref 00990) a 0°C a una disolución de 27,3 mL de metanol y 133,5 mL de dimetilformamida). La mezcla de reacción se agitó a 100°C durante 1 hora con exclusión de humedad atmosférica, se enfrió, y se vertió en agua (4.000 mL). El precipitado del compuesto **8** se recogió con succión, se lavó con agua, y se recristalizó de etanol. Los cristales se recogieron, se lavaron con etanol frío y éter, y se secaron bajo presión reducida. Rendimiento, 60,6 g (92,6%) de compuesto **8**, p.f. 164-165°C; ¹H RMN (DMSO-d₆): δ ppm 8,7 (br s, 1H, NH), 8,1-7,3 (m, 11H, C₆H₅CO, H-6), 6,15 (d, 1H, H-1', J = 4,8 Hz), 5,5 (m, 2H, H-5, H-2'), 4,65 (m, 4H, H-3', H-4', H-5', H-5').

3',5'-Di-O-benzoil-2'-desoxi-β,L-uridina (9)

Una mezcla del compuesto **8** (60,28 g, 0,128 moles), hidruro de tri-n-butilestano (95 mL: Fluka, >98%, ref 90915) y azabisobutironitrilo (0,568 g: Fluka, >98%, ref 11630) en tolueno seco (720 ml) se puso a reflujo con agitación durante 5 horas y se enfrió. El sólido se recogió con succión y se lavó con tolueno frío y éter de petróleo. El filtrado se concentró bajo presión reducida y se diluyó con éter de petróleo para depositar una cosecha adicional de compuesto **9**. Rendimiento, 54,28 g (97,2%) de compuesto **9**; p.f. 220-221°C; ¹H RMN (CDCl₃): δ ppm 8,91 (br s, 1H, NH), 8,1-7,5 (m, 11H, C₆H₅CO y H-6), 6,43 (q, 1H, H-1', J_{1,2'} = 5,7 Hz y J_{1,2''} = 8,3 Hz), 5,7-5,6 (m, 2H, H-3' y H-5), 4,8-4,6 (m, 3H, H-5', H-5'' y H-4'), 2,8-2,7 (m, 1H, H-2'), 2,4-2,3 (m, 1H, H-2'').

3', 5'-Di-O-benzoil-2'-desoxi-β-L-4-tio-uridina (10)

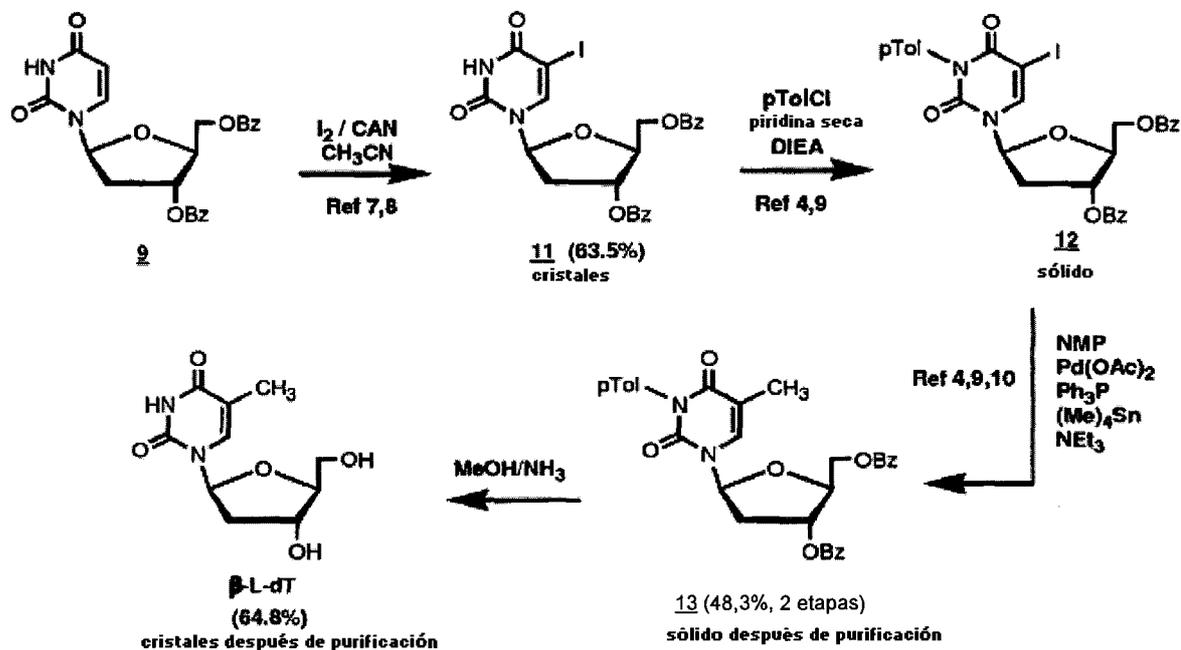
Una disolución del compuesto **9** (69 g, 0,158 moles) y reactivo de Lawesson (74 g: Fluka, >98%, ref 61750) en cloruro de metileno anhidro (3.900 ml) se puso a reflujo bajo argón toda la noche. Después de evaporar el disolvente, el residuo crudo se purificó por una cromatografía en columna en gel de sílice [eluyente: gradiente de metanol (0-2%) en cloruro de metileno] para suministrar compuesto puro **10** (73 g) en rendimiento cuantitativo; ¹H RMN (CDCl₃): δ ppm 9,5 (br s, 1H, NH), 8,1-7,4 (m, 10H, C₆H₅CO), 7,32 (d, 1H, H-6, J = 7,7 Hz), 6,30 (dd, 1H, H-1', J = 5,6 Hz y J = 8,2 Hz), 6,22 (d, 1H, H-5, J = 7,7 Hz), 5,6 (m, 1H, H-3'), 4,7 (m, 2H, H-5', H-5''), 4,5 (m, 1H, H-4'), 2,8 (m, 1H, H-2'), 2,3 (m, 1H, H-2'').

2'-Desoxi-β-L-citosina

Una disolución del compuesto **10** (7,3 g, 0,016 moles) en metanol saturado con amoníaco previamente saturado a -5°C, tapado firmemente, y mantenido en un congelador (73 mL) se calentó a 100°C en un cilindro de acero inoxidable durante 3 horas. Después de enfriar cuidadosamente, el disolvente se evaporó bajo presión reducida. Una disolución acuosa del residuo se lavó con acetato de etilo y se evaporó a sequedad. Dicho procedimiento se realizó en otras 9 muestras (cada una 7,3 g) del compuesto **10** (cantidad total de **10** = 73 g). Los 10 residuos se combinaron, se diluyeron con etanol absoluto y se enfriaron para proporcionar 2'-desoxi-β-L-citosina como cristales. Las trazas de benzamida se eliminaron de los cristales de 2'-desoxi-β-L-citosina por un procedimiento de extracción sólido-líquido (a reflujo en acetato de etilo durante 1 hora). Rendimiento, 28,75 g (78,6%) de compuesto **6**; p. f. 141-145°C; ¹H RMN (DMSO) δ ppm 8,22 y 8,00 (2 br s, 2H, NH₂), 7,98 (d, 1H, H-6, J = 7,59 Hz), 6,12 (t, 1H, H-1', J = 6,5 Hz y J = 7,6 Hz), 5,89 (d, 1H, H-5, J = 7,59 Hz), 5,3 (br s, 1H, OH-3'), 5,1 (br s, 1H, OH-5'), 4,2 (m, 1H, H-3'), 3,80 (q, 1H, H-4', J = 3,6 Hz y J = 6,9 Hz), 3,6-3,5 (m, 2H, H-5', H-5''), 2,2-2,0 (m, 2H, H-2', H-2''); FAB<0, (GT) m/e 226 (M-H)⁻, 110 (B)⁻; FAB>0 (GT) 228 (M+H)⁺, 112 (B+2H)⁺; [α]_D²⁰ -56,48 (c = 1,08 en DMSO); UV (pH 7) λ_{max} = 270 nm (ε = 10.000).

Ejemplo 1

Síntesis estereoselectiva de 2'-desoxi-β-L-timidina (β-L-dT)

3',5'-Di-O-benzoyl-2'-desoxy-5-yodo-β-L-uridina (**11**)

- 5 Una mezcla del compuesto **9** (105,8 g, 0,242 moles), yodo (76,8 g: Fluka, 99,8%, ref 57650), nitrato de amonio y de cerio (CAN) (66,4 g: Aldrich, >98,5%, ref 21,547-3) y acetonitrilo (2.550 ml) se agitó a 80°C durante 3h y la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente dando lugar a la cristalización del compuesto **11** (86,6 g, 63,5%); p. f. 192-194°C; ¹H RMN (DMSO) δ ppm 8,34 (s, 1H, NH), 8,2-7,2 (m, 11H, 2 C₆H₅CO, H-6), 6,31 (q, 1H, H-1', J= 5,5 Hz y J= 8,7 Hz), 5,5 (m, 1H, H-3'), 4,7 (m, 2H, H-5', H-5''), 4,5 (m, 1H, H-4'), 2,7 (m, 1H, H-2'), 2,3 (m, 1H, H-2''); FAB<0, (GT) m/e 561 (M-H)⁻, 237 (B)⁻; FAB>0 (GT) 563 (M+H)⁺; [α]_D²⁰ + 39,05 (c = 1,05 en DMSO); UV (EtOH 95) v_{max} = 281 nm (ε = 9.000), v_{min} = 254 nm (ε = 4.000), v_{max} = 229 nm (ε = 31.000); Anal. Calcd para C₂₃H₁₉IN₂O₇: C, 49,13 H, 3,41 N, 4,98 I, 22,57. Encontrado: C, 49,31 H, 3,53 N, 5,05 I, 22,36.

3',5'-Di-O-benzoyl-2'-desoxy-3-N-toluoyl-β-L-timidina (**13**)

- 15 A una disolución del compuesto **11** (86,6g, 0,154 moles) en piridina anhidra (1.530 ml) que contiene diisopropiletilamina (53,6 ml: Aldrich, >99,5%, ref 38,764-9) se añadió, por partes a 0°C, cloruro de *p*-toluoylo (40,6 ml: Aldrich, 98%, ref 10,663-1). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, se añadió agua para parar la reacción y la mezcla de reacción se extrajo con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a sequedad para proporcionar 3',5'-di-O-benzoyl-2'-desoxy-3-N-toluoyl-5-yodo-β-L-uridina cruda (**12**) que se puede usar para la siguiente etapa sin más purificación.
- 20 Una disolución de la mezcla cruda **12**, acetato de paladio (3,44 g: Aldrich, >99,98%, ref 37,987-5), trifenilfosfina (8,0 g: Fluka, >97%, ref 93092) en *N*-metilpirolidinona (1.375 mL: Aldrich, >99%, ref 44,377-8) con trietilamina (4,3 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después, se añadió tetrametilestano (42,4 mL: Aldrich, >99%, ref 14,647-1) gota a gota a 0°C bajo argón. Después de agitar a 100-110°C toda la noche, la mezcla de reacción se vertió en agua y se extrajo con éter dietílico. La disolución orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de sílice [eluyente: gradiente por etapas de acetato de etilo (0-10%) en tolueno] para proporcionar el compuesto **13** como una espuma (42,3 g, 48,3% para las 2 etapas). ¹H RMN (DMSO) δ ppm 8,3-7,2 (m, 15H, 2 C₆H₅CO, 1 CH₃C₆H₄CO, H-6), 6,29 (t, 1H, H-1', J= 7,0 Hz), 5,7 (m, 1H, H-3'), 4,7-4,5 (m, 3H, H-5', H-5'', H-4'), 2,7-2,6 (m, 2H, H-2', H-2''); FAB<0, (GT) m/e 567 (M-H)⁻, 449 (M-CH₃C₆H₄CO)⁻, 243 (B)⁻, 121 (C₆H₅COO)⁻; FAB>0 (GT) 1137 (2M+H)⁺, 569 (M+H)⁺, 325 (M-B)⁺, 245 (B+2H)⁺, 119 (CH₃C₆H₅CO)⁺.

2'-Desoxi-β-L-timidina

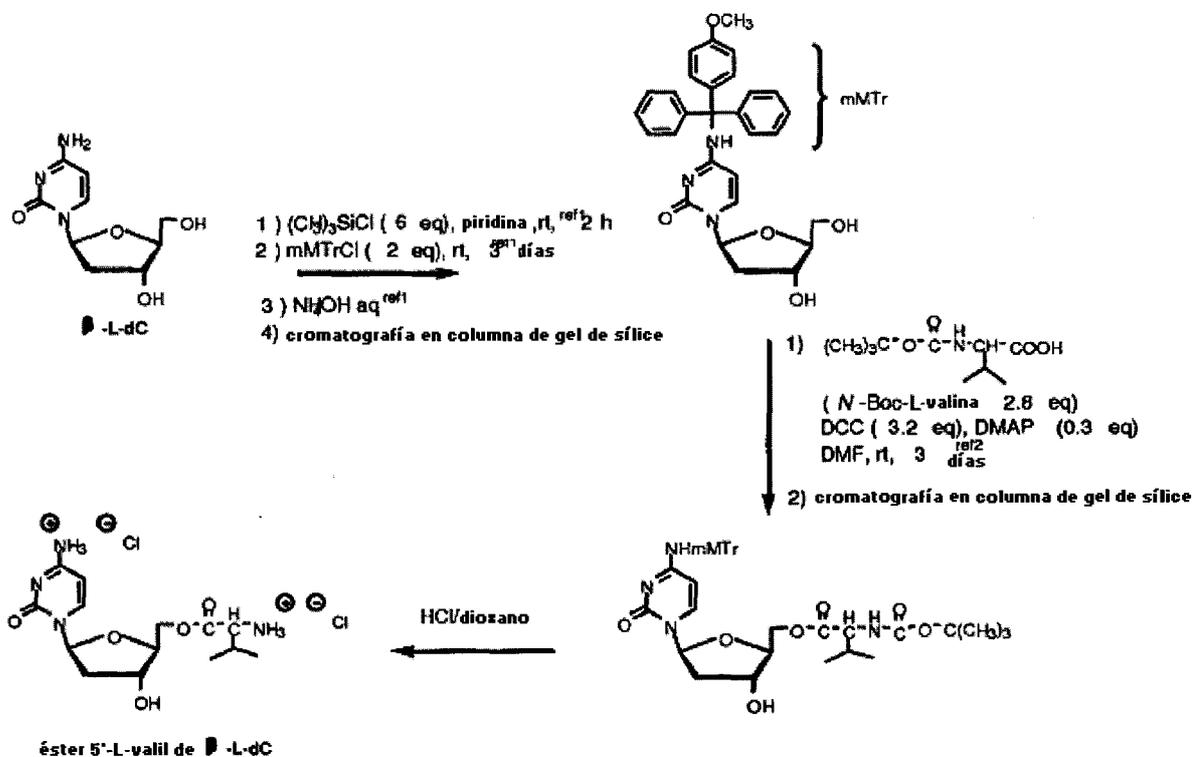
Una disolución del compuesto **13** (42,3 g, 0,074 moles) en metanol saturada previamente con amoníaco a -5°C, tapada firmemente, y mantenida en un congelador (1.850 mL) se agitó a temperatura ambiente durante dos días. Después de evaporar el disolvente, el residuo se diluyó con agua y se lavó varias veces con acetato de etilo. La

capa acuosa se separó, se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice [eluyente; gradiente por etapas de metanol (0-10%) en cloruro de metileno] para proporcionar 2'-desoxi- β -L-timidina pura (11,62 g, 64,8%) que se cristalizó de etanol; p.f. 185-188°C; $^1\text{H RMN}$ (DMSO) δ ppm 11,3 (s, 1H, NH), 7,70 (s, 1H, H-6), 6,2 (pt, 1H, H-1'), 5,24 (d, 1H, OH-3', J = 4,2 Hz), 5,08 (t, 1H, OH-5', J = 5,1 Hz), 4,2 (m, 1H, H-3'), 3,7 (m, 1H, H-4'), 3,5-3,6 (m, 2H, H-5', H-5''), 2,1-2,0 (m, 2H, H-2', H-2''); FAB<0, (GT) m/e 483 (2M-H)⁺, 349 (M+T-H)⁺, 241 (M-H)⁺, 125 (B)⁺; FAB>0 (GT) 243 (M+H)⁺, 127 (B+2H)⁺; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -13,0 (c = 1,0 en DMSO); UV (pH 1) ν_{max} = 267 nm (ϵ = 9.700), ν_{min} = 234 nm (ϵ = 2.000).

Realización de referencia 3

Síntesis química de éster 5'-L-valil de β -L-dC

- 10 Como un ejemplo ilustrativo de la síntesis de ésteres amino de β -L-dC, se sintetiza éster 5'-L-valil de β -L-dC protegiendo en primer lugar el grupo amina de β -L-dC usando $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$. El β -L-dC protegido experimenta esterificación por la adición de N-Boc L-valina. El éster se desprotege para rendir éster 5'-L-valil de β -L-dC. Otros métodos para sintetizar ésteres de aminoácido se describen en las Patentes U.S. Nos. 5.700.936 y 4.957.924. El éster L-valinil 5'-O de L-Da, L-dC, L-dT y L-dU son realizaciones preferidas de esta descripción



15

Ref 1: por modificación de un procedimiento descrito previamente en la serie D: Nyilas, A. et al. Tetrahedron **1990**, 46 (6), 2149-2164.

Ref 2: por modificación de un procedimiento descrito previamente para éster L-valil de aciclovir: Beauchamp, L.M. et al. Antiviral Chemistry & Chemotherapy **1992**, 3 (3), 157-164.

20 Realización de referencia 4

^4N -mMTTr-2'-desoxi- β -L-citidina (**1**, Figura 1)

- Se recogió β -L-dC (1 g; 4,40 mmoles) en piridina seca (44 ml). Después de una protección transitoria con grupo trimetilsililo (TMSCl, 3,34 ml, 26,4 mmoles) seguido de la adición de mMTTrCl (3,38 mg, 11 mmoles) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 540 mg, 4,40 mmoles) la mezcla de reacción se agitó durante 3 días a temperatura ambiente {A. Nyilas; C. Glemarec; J. Chattopadhyaya; Tetrahedron Lett. 1990, **46**, 2149-2164}. Después de extracción con bicarbonato de sodio, la capa orgánica se lavó con agua, se evaporó y se recogió en dioxano (40 mL). Se añadió amoniaco acuoso (8,5 ml) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó toda la noche. Después de evaporar todos los materiales volátiles, el residuo sólido se purificó en columna de gel de sílice [eluyente: gradiente por etapas de MeOH (0-10%) en CH_2Cl_2], proporcionando el compuesto deseado **1** (1,02 g, 46,5%) como una espuma. $^1\text{H RMN}$ (DMSO- d_6) δ ppm 8,39 (br s, 1H, NH, D_2O intercambiable), 7,70 (d, 1H, H-6, J = 7,3 Hz), 7,4-6,8 (m, 14H, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{OCH}_3$), 6,23 (d, 1H, H-5, J = 7,3 Hz), 6,02 (t, 1H, H-1', J = 6,5 Hz), 5,16 (d, 1H, OH-3', J =

30

3,8 Hz, D₂O intercambiable), 4,9 (br s, 1H, OH-5', D₂O intercambiable), 4,1 (m, 1H, H-3'), 3,7 (m, 4H, H-4', OCH₃), 3,5 (m, 2H, H-5', H-5''), 2,1-1,8 (2m, 2H, H-2', H-2''); FAB<0, (GT) m/e 498 (M-H)⁻, 382 (B)⁻; 226 (M-mMTr)⁻; FAB>0 (GT) 500 (M+H)⁺, 273 (mMTr)⁺; UV (EtOH 95) λ_{max} = 279 nm; λ_{min} = 250 nm.

Realización de referencia 5

5 Éster 5'-L-N-(terc-butoxicarbonil) valina de ⁴N-mMTr-2'-desoxi-β-L-citidina (2, Figura 1)

A una disolución del compuesto **1** (1 g, 2,00 mmoles) en DMF seco (34 ml) se añadieron sucesivamente 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 37 mg, 0,3 mmoles), N-(terc-butoxi-carbonil)-L-valina (Boc-Val-OH, 587 mg, 2,7 mmoles), y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 660 mg, 3,2 mmoles) [L. M. Beauchamp; G. F. Orr; P. De Miranda; T. Burnette; T. A. Krenitsky; Antiviral Chem. Chemother. 1992, 3, 157-164.]. La disolución se agitó a temperatura ambiente. Después de 40h, la mezcla de reacción se recargó con DMAP (37 mg, 0,3 mmoles), Boc-Val-OH (587 mg, 2,7 mmoles) y DCC (660 mg, 3,2 mmoles) adicionales y se agitó a temperatura ambiente durante 40h. La mezcla se filtró, el DMF se eliminó del filtrado bajo presión reducida, y el residuo se cromatografió en una columna de gel de sílice [eluyente: gradiente por etapas de MeOH (0-10%) en CH₂Cl₂] para suministrar el compuesto deseado **2** (515 mg, 37%) como una espuma. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ ppm 8,44 (br s, 1H, NH, D₂O intercambiable), 7,7-6,8 (m, 15H, H-6 y (C₆H₅)₂C(C₆H₄)OCH₃), 6,26 (d, 1H, H-5, J = 7,3 Hz), 6,06 (t, 1H, H-1', J = 6,6 Hz), 5,7 (bs, 1H, OH-3', D₂O intercambiable), 4,2-4,0 (m, 3H, H-3', H-4' y CH), 3,8-3,9 (m, 2H, H-5', H-5''), 3,7 (s, 3H, OCH₃), 2,0-1,9 (m, 3H, H-2', H-2''), CH), 1,36 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0,86 (m, 6H, (CH₃)₂CH); FAB<0, (GT) m/e 1395 (2M-H)⁻, 697 (M-H)⁻, 425 (M-mMTr)⁻, 382 (B)⁻; 216 (BocVal-H)⁻; FAB>0 (GT) 384 (B+2H)⁺, 273 (mMTr)⁺; 57 (CH₃)₃C⁺; UV (EtOH 95) λ_{max} = 279 nm; λ_{min} = 249 nm.

20 Realización de referencia 6

Hidrocloruro de éster 5'-L-valina de 2'-desoxi-β-L-citidina (3, Figura 1)

El compuesto **2** (500 mg, 0,715 mmoles) se disolvió en una disolución al 20% de ácido trifluoroacético en CH₂Cl₂ (25 ml) y se añadió triisopropilsilano (1,47 ml, 71,5 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y el éster valina se precipitó en Et₂O como la sal trifluoroacetato. Después de varias coevaporaciones con agua, el precipitado se recogió en agua (2 ml), se trató con una disolución saturada de HCl en dioxano (20 ml) y se evaporó bajo presión reducida. Este tratamiento se repitió 3 veces y el compuesto deseado **3** se precipitó finalmente en éter (207 mg, 73%) como la sal hidrocloruro. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ ppm 9,7 (br s, 1H, 1/2NH₂, D₂O intercambiable), 8,6 (br s, 4H, 1/2NH₂, NH₃, D₂O intercambiable), 7,98 (d, 1H, H-6 J = 7,8 Hz), 6,17 (d, 1H, H-5, J = 7,8 Hz), 6,11 (pt, 1H, H-1'), 5,5 (bs, <1H, OH-3', D₂O intercambiable), 4,4 (m, 2H, H-5', H-5''), 4,3 (m, 1H, H-3'), 4,2-4,0 (m, 2H, H-4', CH), 3,8-3,9, 3,7 (s, 3H, OCH₃), 2,3-2,1 (m, 3H, H-2', H-2''), CH), 0,94 (dd, 6H, (CH₃)₂CH, J = 3,7 y 6,6 Hz); FAB<0, (GT) m/e 361 (M+Cl)⁻, 325 (M-H)⁻, 116 (Val-H)⁻, 110 (B)⁻; 216 (BocVal-H)⁻; FAB>0 (GT) 653 (2M+H)⁺, 327 (M+H)⁺; 112 (B+2H)⁺; [α]_D²⁰ -28,57 (c = 0,49 en DMSO); UV (EtOH 95) λ_{max} = 272 nm (ε 8.700); λ_{min} = 255 nm (ε 7.600); HPLC rt = 8,37min (gradiente de 0 a 50% CH₃N en 20 mM tampón acetato de trietil amonio programado durante un periodo de 30 min con una velocidad de flujo de 1 ml/min).

35 Realización de referencia 7

N⁴-Acetil-2'-desoxi-β-L-citidina (4, Figura 2)

A una suspensión del nucleósido, β-L-dC (415 mg, 1,83 mmoles) en N,N-dimetilformamida (9,2 ml) se añadió anhídrido acético (207 μl, 2,20 mmoles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24h [V. Bhat; B. G. Ugarkar; V. A. Sayeed, K. Grimm; N. Kosora; P. A. Domenico; E. Stocker, Nucleosides & Nucleotides, 1989, 8 (2), 179-183]. Después de eliminar el DMF bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice [eluyente: 15% MeOH en CH₂Cl₂] para suministrar el compuesto deseado (310 mg, 63%) que se cristalizó de etanol; rap 128-170°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ ppm 10,86 (s, 1H, NH, D₂O intercambiable), 8,31 (d, 1H, H-6, J = 7,5 Hz), 7,18 (d, 1H, H-5, J = 7,5 Hz), 6,09 (t, 1H, H-1', J = 6,3 Hz), 5,25 (d, 1H, OH-3', D₂O intercambiable, J = 4,2 Hz), 5,03 (t, 1H, OH-5', D₂O intercambiable, J = 5,0 Hz), 4,1-4,2 (m, 1H, H-3'), 3,8 (m, 1H, H-4'), 3,4-3,6 (m, 2H, 2H, H-5', H-5''), 2,2-2,3 (m, 1H, H-2'), 2,08 (s, 3H, CH₃), 2,0-1,9 (m, 1H, H-2''); FAB<0, (GT) m/e 806 (3M-H)⁻, 537 (2M-H)⁻, 360 (M+G-H)⁻, 268 (M-H)⁻, 152 (B)⁻; FAB>0 (GT) 808 (3M+H)⁺, 539 (2M+H)⁺, 362 (M+G+H)⁺, 270 (M+H)⁺, 154 (B+2H)⁺, 117 (S)⁺; UV (H₂O) λ_{max} = 297 nm (ε 8.300); λ_{min} = 270 nm (ε 3.500); λ_{max} = 245 nm (ε 14.400); λ_{min} = 226 nm (ε 5.800); [α]_D²⁰ - 81,31 (c = 1,07 en DMSO).

Realización de referencia 8

50 N⁴-[(Dimetilamino)metilen]-2'-desoxi-β-L-citidina (5, Figura 3)

El compuesto del título se preparó según un procedimiento publicado desarrollado para la preparación del enantiómero D correspondiente [S.G. Ken, y T.I. Kalman, J. Pharm. Sci. 1994, 83, 582-586]. Una disolución de L-dC (500 mg, 2,20 mmoles) en DMF (4,8 ml) se trató con dimetilformamida dimetilacetil (2,8 ml, 21,08 mmoles), y se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La disolución se evaporó bajo presión reducida, y se coevaporó con etanol. La cristalización de etanol/éter rindió el compuesto del título (501,2 mg, 81%) como cristales amarillos claros, pf 174-176°C (lit: 188-190°C para el enantiómero D); ¹H RMN (DMSO-d₆) δ ppm 8,60 (s, 1H, N=CH), 8,00 (d, 1H, H-

6), 6,15 (t, J = 6,6 Hz, 1H, H-1'), 5,96 (d, J = 7,2 Hz, 1H, H-5), 5,22 (d, J = 4,2 Hz, 1H, OH-3'), 5,01 (t, J = 5,2 Hz, 1H, OH-5'), 4,20 (m, 1H, H-4'), 3,80 (m, 1H, H-3'), 3,56 (m, 2H, H-5' y H-5''), 3,15 y 3,02 (2s, 3H y 3H, N(CH₃)₂), 2,22-1,90 (2m, 1H y 1H, H-2' y H-2''); FAB>0 (GT) 847 (3M+H)⁺, 565 (2M+H)⁺, 283 (M+H); FAB<0, (GT) m/z 599 (2M+Cl)⁻, 317 (M+Cl)⁻, 165 (B)⁻.

5 Realización de referencia 9

3', 5'-Di-O-acetil-2'-desoxi-β-L-citidina (6, Figura 4)

El compuesto del título se ha sintetizado en una etapa empezando a partir del L-dC y según un procedimiento desarrollado por Breiner et al [R. G. Breiner; W. Rose; J. A. Dunn; J. E. Mae Diarnid y J. Bardos; J. Med. Chem. **1990**, 33, 2596-2603] para la preparación del enantiómero D. Una disolución de L-dC (765 mg, 3,37 mmoles) y cloruro de acetilo (960 μl, 13,48 mmoles) en ácido acético glacial (4,8 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 min, se añadió cloroformo seco (3,5 ml) y la agitación se continuó durante 24h. La disolución se evaporó bajo presión reducida y se coevaporó con etanol. La cristalización de etanol rindió 78% del compuesto deseado, pf 192.193°C (lit: 187-189°C para el enantiómero D [Breiner et al. J. Med. Chem. **1990**, 33, 2596-2603]); ¹H RMN (DMSO-d₆) δ ppm 9,8 y 8,7 (2 br s, <3H, NH₃⁺, D₂O intercambiable), 8,0 (d, 1H, H-6 J = 7,8 Hz), 6,18 (d, 1H, H-5, J = 7,8 Hz), 6,08 (t, 1H, H-1', J = 6,7 Hz), 5,2 (m, 1H, H-3'), 4,3-4,1 (m, 3H, H-4', H-5', H-5''), 2,4-2,5 (m, 2H, H-2', H-2''), 2,06 y 2,03 (2 s, 6H, 2 CH₃); FAB<0, (GT) m/e 968 (3M+Cl)⁻, 657 (2M+Cl)⁻, 438 (M+G+Cl)⁻, 346 (M+Cl)⁻, 310 (M-H)⁻, 110 (B)⁻; 59 (CH₃COO)⁻; FAB>0 (GT) 623 (2M+H)⁺, 312 (M+H)⁺, 201 (S)⁺, 112 (B+2H)⁺, 43 (CH₃CO)⁺; [α]_D²⁰ 36,27 (c = 1,02 en DMSO); UV (MeOH) λ_{max} = 277 nm (ε 9.900); λ_{min} = 246 nm (ε 5.000).

Realización de referencia 10

20 Diéster 3',5'-L-N-(t-Butoxicarbonyl)valina de 2'-desoxi-β-L-citidina (9, Figura 5)

Una disolución de N⁴-(dimetilamino)metilen]-2'-desoxi-β-L-citidina (7, 500 mg, 1,77 mmoles) en DMF (35 ml) se trató con Boc-Val-OH (1,31 g, 6,03 mmoles), DMAP (86,5 mg, 0,71 mmoles), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) (1,36 g, 7,09 mmoles), y se agitó a temperatura ambiente durante 40 horas. Se añadieron cantidades adicionales de Boc-Val-OH (655 mg, 3,01 mmoles), DMAP (43,2 mg, 0,35 mmoles), EDC (680 mg, 3,55 mmoles), y la disolución se agitó durante 20 horas adicionales. Después de evaporar bajo presión reducida, el residuo se recogió en CH₂Cl₂, y se extrajo varias veces con agua. La capa orgánica se lavó con disolución salina concentrada (100 ml), se secó (Na₂SO₄), y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar 8 como un material crudo, que se usó para la siguiente etapa sin más purificación. El residuo se recogió en dioxano (18 ml), se trató con NH₄OH acuoso al 26%, y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La disolución se evaporó bajo presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice usando un gradiente por etapas de MeOH (0-5%) en CH₂Cl₂, para proporcionar el compuesto del título (698,7 mg, 58% de 9). ¹H RMN (DMSO-d₆) δ ppm 7,58 (d, 1H, H-6), 7,29-7,18 (m, 4H, NH-Boc y NH₂), 6,20 (t, J = 6,6 Hz, 1H, H-1'), 5,75 (d, J = 7,3 Hz, 1H, H-5), 5,20 (br. s, 1H, H-3'), 4,29 (m, 2H, H-5' y H-5''), 4,14 (br. s, 1H, H-4'), 3,86 (m, 2H, CH-NH-Boc), 2,31-2,21 (m, 2H, H-2' y H-2''), 2,13-1,98 (m, 2H, CH(iPr)), 1,38 y 1,36 (2s, 18H, tBu), 0,88 y 0,85 (2 d, J = 6,8 Hz, 12H, CH(CH₃)₂); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ ppm 172,67 y 172,46, 166,41, 156,64 y 155,70, 141,39, 95,43, 85,78, 82,03, 79,14, 75,57, 64,90, 60,37 y 60,11, 37,40, 30,33, 29,00, 19,83-19,12; FAB>0 (GT) 626 (M+H)⁺, 112 (B+2H)⁺, 255 (M-Boc)⁺; FAB<0, (GT) m/z 1249 (2M-H)⁻, 624 (M-H)⁻.

Realización de referencia 11

Hidrocloreto de éster 3,5'-L-valina de 2'-desoxi-β-L-citidina (10, Figura 5)

40 Una disolución de 9 (675 mg, 1,08 mmoles) en dioxano (30 ml) se trató con una disolución de HCl al 26% en dioxano (30 ml), y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h 55. La suspensión blanca resultante se evaporó bajo presión reducida. El residuo sólido blanco se recogió en la cantidad mínima de MeOH y se precipitó en éter para proporcionar el compuesto del título 10 como un sólido blanco, pf 187°C (descomp.); ¹H RMN (DMSO-d₆) δ ppm 9,79 (br s, 1H, 1/2NH₂), 8,72 (br s, 7H, 1/2NH₂ y NH₃⁺), 8,04 (d, 1H, H-6), 6,21 (d, J = 7,8 Hz, 1H, H-5), 6,16 (t, J = 6,9 Hz, 1H, H-1'), 5,39 (m, 1H, H-3'), 4,50-4,40 (m, 3H, H-4', H-5' y H-5''), 3,90 (2 br. d, 2H, CH-NH₃⁺), 2,63-2,50 (2m, 2H, H-2' y H-2''), 2,21 (m, 2H, CH(iPr)), 1,02-0,94 (m, 12H, CH(CH₃)₂); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ ppm 169,50 y 168,94, 161,02, 148,50, 145,26, 95,18, 87,19, 82,15, 76,14, 65,77 y 65,59, 58,12 y 58,07, 37,00, 30,16, 19,26-18,51; FAB>0 (GT) 426 (M+H)⁺, 112 (B+2H)⁺; FAB<0, (GT) m/z 885 (2M+Cl)⁻, 460 (M+Cl); UV (H₂O) λ_{max} = 270 nm (ε 7.600).

Realización de referencia 12

50 Éster N⁴-Boc-Valinil de 2'-desoxi-β-L-citidina (13, Figura 5)

Una mezcla de L-dC (1,80 g, 7,92 mmoles) y trietilamina (8,8 ml, 63,14 mmoles) en THF anhidro (80 ml) se trató con clorotrimetilsilano (6 ml, 47,28 mmoles) y se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La reacción se paró por la adición de una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (26 ml) y agua (10 mL). La capa acuosa se extrajo tres veces con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con disolución salina concentrada, se secaron (Na₂SO₄) y se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar una espuma-aceite amarillo claro crudo que contenía 11, que se usó para la siguiente etapa sin más purificación. Este residuo se recogió en CH₂Cl₂ (104 ml), se trató con N-

(terc-butoxicarbonil)-L-valina (Boc-Val-OH, 1,72 g, 7,90 mmoles), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-
 tris(dimetilamino) fosfonio (BOP, 4,20 g, 9,50 mmoles), trietilamina (2,2 ml, 15,78 mmoles), y se agitó a temperatura
 ambiente durante 2 días. La disolución se diluyó con EtOAc y se extrajo dos veces con NaHCO₃ sat. La capa
 orgánica se secó (Na₂SO₄) y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar **12** como un material crudo, que se
 usó para la siguiente etapa sin más purificación. Este residuo se recogió en dioxano (80 ml), se trató con disolución
 ac. al. 26% de NH₄OH, y se agitó a temperatura ambiente durante 6h45. La disolución se evaporó bajo presión
 reducida, se coevaporó con EtOH absoluto, y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice, usando un
 gradiente por etapas de MeOH (5-10%) en CH₂Cl₂, para proporcionar el compuesto del título **13** como una espuma
 (1,64 g, rendimiento global 48,5%). ¹H RMN (DMSO-d₆) δ ppm 10,88 (s, 1H, NH-4), 8,40 (d, 1H, H-6), 7,26 (d, J = 7,4
 Hz, 1H, H-5), 7,06 (d, J = 8,2 Hz, 1H, CH-NH-Boc), 6,15 (t, J = 6,3 Hz, 1H, H-1'), 5,32 (d, J = 4,2 Hz, 1H, OH-3'), 5,09
 (t, J = 5,2 Hz, 1H, OH-5'), 4,27 (m, 1H, H-3'), 4,06 (pt, J = 7,5 Hz, 1H, CH-NH-Boc), 3,91 (m, 1H, H-4'), 3,63 (m, 2H,
 H-5' y H-5''), 2,35 (m, 1H, H-2''), 2,06 (m, 2H, H-2' y CH(CH₃)₂), 1,43 (s, 9H, tBu), 0,92 (pt, J = 6,6 Hz, 6H, CH(CH₃)₂);
¹³C RMN (DMSO-d₆) δ ppm 174,41, 162,94, 156,47, 155,24, 146,10, 96,06, 88,79, 87,10, 79,09, 70,75, 61,78, 61,55,
 41,74, 30,63, 29,02, 19,91 y 19,10; FAB>0 (GT) 853 (2M+H)⁺, 427 (M+H)⁺, 311 (B+2H)⁺, 255 (M-Boc)⁺; FAB<0, (GT)
 m/z 851 (2M-H)⁻, 425 (M-H)⁻, 309 (B)⁻.

Realización de referencia 13

3',5'-N⁴-Trivalil-2'-desoxicitidina (14, Figura 7)

El material de partida, 3',5'-N⁴-tri(Boc-valil)-2'-desoxicitidina se disolvió en CH₂Cl₂, pero había algo de material
 insoluble por lo que la muestra se filtró a través de Perlita. Esto resultó en un incremento en el volumen del CH₂Cl₂
 usado. El reactivo HCl/dioxano se añadió con agitación. En pocos segundos pudo observarse algo de burbujeo en la
 disolución y la mezcla se volvió turbia. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hr.
 Durante este tiempo, el precipitado se volvió más cristalino. La mezcla se filtró rápidamente, la torta del filtro se lavó
 con CH₂Cl₂, y se secó en la bomba para proporcionar 0,16g (69%) de cristales color crema claro. Los reactivos y
 condiciones se describen más explícitamente en la **Tabla 1** siguiente.

Tabla 1

Reactivo	Mol. Unidad	Peso/Vol calc	Mol/pts	Peso/Vol usado	Mol/pts	Equiv
3',5'-N ⁴ -triBoc-Val-2'-dC (CyVal2a-2a)	825,0 FW	0,30 g	0,00036	0,3 g	0,00036	1,00
CH ₂ Cl ₂	5,0 partes	1,5 mL	5	3,0 mL	10	10,0
HCl, 3,9 M en dioxano	256,0 mL/mol	0,47 g	0,00182	0,5 g	0,00195	5,37
3',5'-N ⁴ -triVal-2'-dC, cruda	634,0 FW	0,23 g	cal-obt	0,16 g	69,4%	

Realización de referencia 14

Método de ensayo por HPLC para DiBocValil-2'-dC y DiBocValil-2'-dU

Se preparó una muestra de 1,0 mg/mL disolviendo el compuesto deseado en etanol absoluto. La disolución se diluyó
 con una disolución que contenía 50% MeOH y 50% KH₂PO₄ (0,015M, pH=3,30-3,50) hasta que se obtuvo una
 concentración de 0,16 mg/mL. (Nota: todos los disolventes usados se desgasificaron antes del uso.). Se inyectaron
 inmediatamente 20 µL de la disolución en una columna de HPLC de WATERS (NOVAPAK C18-4pm-3,9 X 150 mm).
 La velocidad de flujo se ajustó a 1 mL/min con una temperatura de columna de 35°C. Para detectar los compuestos,
 la longitud de onda de detección se ajustó a 275 nm para Di-Boc 2'dC, 260 nm para Di-Boc2'dU y 204 para las
 impurezas después de 15 minutos. La columna se corrió con KH₂PO₄ (0,015M, pH=3,30-3,50, ajustado con H₃PO₄ al
 10% v/v) en la Bomba A y acetonitrilo de grado HPLC en la Bomba B. El patrón de gradiente se indica en la **Tabla 2**.

Tabla 2

#	Tiempo	Módulo	Evento	Volumen
1	0,01	Bombas	T. Caudal	1
2	0,01	Bombas	B. Conc	45
3	12,00	Bombas	B. Conc	45
4	20,00	Bombas	B. Conc	70
5	28,00	Bombas	B. Conc	70
6	28,00	Bombas	B. Conc	45
7	32,00	Bombas	B. Conc	45
8	32,01	SCL-10Avp	PARADA	0

IX. Farmacocinética de los compuestos activos

5 Las ADN polimerasas humanas y la función mitocondrial no se vieron afectadas por L-dC *in vitro*. L-dC no fue tóxico para células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), células progenitoras de la médula ósea y numerosas líneas celulares de origen humano u otro origen de mamífero no humano.

10 Los nucleósidos y análogos de nucleósidos antivirales ejercen su efecto antiviral como derivados trifosfato intracelulares al nivel de la polimerasa viral durante la replicación del virus. Como los nucleósidos naturales (D-desoxicitidina y D-timidina) y análogos de nucleósidos antivirales (por ejemplo, lamivudina y zidovudina), L-dC se activó intracelularmente por fosforilación. En hepatocitos humanos, la desoxicitidina quinasa (dCK) fue la responsable de la conversión inicial dependiente de la dosis de L-dC a un derivado 5'-monofosfato (MP). L-dC-MP se convirtió en una forma 5'-difosfato (DP), que se convirtió posteriormente en el metabolito intracelular predominante 5'-trifosfato (TP). El nivel de L-dC-TP alcanzó 72,4 μM en células HepG2 expuestas a 10 μM L-dC (90,1 μM en hepatocitos primarios humanos) a las 24 horas y tuvo una vida media intracelular de 15,5 horas. La exposición de células HepG2 o hepatocitos humanos en cultivo primario a L-dC también produjo un segundo derivado TP, β -L-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (L-dU-TP). El nivel de L-dU-TP alcanzó 18,2 μM en células HepG2 expuestas a 10 μM L-dC (43,5 μM en hepatocitos primarios humanos) a las 24 horas.

20 En cultivos de hepatocitos primarios humanos y en una línea celular de hepatoma humano (HepG2), el metabolito principal de L-dC fue L-dC-TP. La exposición de estas células a L-dC también dio lugar a la formación de L-dU-TP. L-dC-TP y L-dU-TP no inhibieron las ADN polimerasas humanas α , β y γ hasta concentraciones de 100 μM , la mayor concentración ensayada.

Realización de referencia 15

Estudio de solubilidad

25 Se comparó la solubilidad de la desoxiribocitosina natural (D-dC), el éster 3'-valinil de L-dC y el éster 3',5'-valinil de L-dC en agua. La solubilidad de L-dC se evaluó en primer lugar analizando los datos de HPLC (es decir, área bajo la curva) por inyecciones sucesivas de varias concentraciones muy conocidas de β -L-dC, como se muestra en la **Tabla 3**. El HPLC se corrió en una columna C18 Nova-Pack (3,9 x 150 mm) en un gradiente de 0 a 25% de CH_3CN en 20 mM de tampón acetato de trietilamonio (TEAAc) programado durante un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. La concentración de la disolución frente al área bajo la curva produjo una relación lineal con $y = 4150049477x + 4334,46845$ (**Figura 8a**).

Tabla 3

Concentración (mol/l)	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	10^{-5}
Área	4175916	2031950	440122	55264

35 A partir de esto, se preparó una disolución saturada con desoxiribocitosina natural (D-dC); se tomaron 3 muestras y se inyectaron en el HPLC. Se determinó que la concentración de esta disolución saturada era 1,07, 1,08 y 0,96 mol/L; por lo tanto, la disolución saturada tenía una concentración saturada media de 1,03 mol/L ó 272 g/L. Los resultados se tabulan en la **Tabla 4**.

Tabla 4

Resultados	Área	Concentración (mol/L)
1ª Muestra	4420674000	1,07
2ª Muestra	4475191000	1,08
3ª Muestra	3983845000	0,96

De manera similar, se evaluó la solubilidad del hidrocloreto del éster 3'-valinil de β -L-dC en agua. La curva de calibración se determinó por inyecciones sucesivas de varias concentraciones del hidrocloreto del éster 3'-valinil de β -L-dC en el HPLC y midiendo el área bajo la curva, como se muestra en la **Tabla 5**. De nuevo, el HPLC se corrió en una columna C18 Nova-Pack (3,9 x 150 mm) en un gradiente de 0 a 25% de CH₃CN en 20 mM de tampón acetato de trietilamonio (TEAAc) programado durante un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. La concentración de la disolución frente al área bajo la curva produjo una relación lineal con $y = 3176423963 x - 33051,63$.

10 **Tabla 5**

Concentración (mol/l)	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
Área	3.166.842	1.514.479	254.296	119.668	19.269

A partir de esto, se intentó una disolución saturada para el hidrocloreto del éster 3'-valinil de β -L-dC; sin embargo, no se obtuvo. Por lo tanto, la máxima cantidad del hidrocloreto del éster 3'-valinil de β -L-dC fácilmente disponible en el laboratorio se disolvió en agua. Se recogieron 3 muestras, y se determinó a partir del área bajo la curva del HPLC, que tenían una concentración media de 1,013, 0,996 y 1,059 mol/L. Los resultados se tabulan en la **Tabla 6**.

15 **Tabla 6**

Resultados	Área	Concentración (mol/L)
1ª Muestra	3218013000	1,013
2ª Muestra	3162471000	0,996
3ª Muestra	3362725000	1,059

Los tres resultados estaban todos en el intervalo predicho calculado a partir de la curva de calibración, indicando una solubilidad completa del compuesto a estas altas concentraciones, indicando que una disolución saturada de esta muestra es mayor que la media de las tres muestras, es decir, mayor de 1,023 mol/L ó 408 g/L.

Se evaluó la solubilidad del hidrocloreto del éster 3',5'-divalinil de β -L-dC en agua. La curva de calibración se determinó por inyecciones sucesivas de varias concentraciones del hidrocloreto del éster 3',5'-divalinil de β -L-dC en el HPLC y midiendo el área bajo la curva, como se muestra en la **Tabla 7**. El HPLC se corrió en una columna C18 Nova-Pack (3,9 x 150 mm) en un gradiente de 0 a 25% de CH₃CN en 20 mM de tampón acetato de trietilamonio (TEAAc) programado durante un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. La concentración de la disolución frente al área bajo la curva produjo una relación lineal con $y = 3176423963 x - 33051,63$ (**Figura 8b**).

25 **Tabla 7**

Concentración (mol/l)	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
Área	2863372	1466574	211046	115678	14435

A partir de esto, se intentó una disolución saturada para el hidrocloreto del éster 3',5'-divalinil de β -L-dC; sin embargo, no se obtuvo. Por lo tanto, la máxima cantidad del hidrocloreto del éster 3',5'-divalinil de β -L-dC fácilmente disponible en el laboratorio se disolvió en agua. Se recogieron 3 muestras, y se determinó a partir del área bajo la curva del HPLC, que tenían una concentración media de 2,8, 2,4 y 2,4 mol/L. Los resultados se tabulan en la **Tabla 8**.

Tabla 8

Resultados	Area	Concentración (mol/L)
1ª Muestra	8336188000	2,8
2ª Muestra	7054012000	2,4
3ª Muestra	6970838000	2,4

5 Los tres resultados estaban todos en el intervalo predicho calculado a partir de la curva de calibración, indicando una solubilidad completa del compuesto a estas altas concentraciones, indicando que una disolución saturada de esta muestra es mayor que la media de las tres muestras, es decir, mayor de 2,5 mol/L ó 1.337 g/L.

Se hicieron estudios de solubilidad similares en el hidrocloreto del éster 5'-valinil de β -L-dC (más de 5,1 mol/L ó 1.664 g/L) e hidrocloreto del éster 3'5'-diacetil de β -L-dC (3,3 mol/L ó 1.148 g/L). Los resultados acumulativos se tabulan en la **Tabla 9**.

Tabla 9

Compuesto	Solubilidad (mol/L)	Solubilidad (g/L)
D-dC	1,03	272
5'-val-L-dC	> 5,1	> 1.664
3'-val-L-dC	> 1,023	> 408
3'5'-diacetil-L-dC	3,3	1.148
3'5'-dival-L-dC	> 2,5	> 1.337

10

Estudio log P - Tampón fosfato

15 Aproximadamente 1,5 mg de D-dC se disolvieron en 2,2 mL de disolución de tampón fosfato 0,02 M (A, 100 mL, pH 7,2), preparado a partir de una mezcla de disolución de fosfato de potasio monobásico (28,5 mL) y disolución de fosfato de potasio dibásico (71,5 mL), saturado con octanol-1 (B). A 1 mL de esta disolución, se añadió 1 mL de octanol-1 (B) saturado con disolución de tampón fosfato 0,02 M (A). La mezcla resultante se agitó y se centrifugó; se recogieron tres muestras de cada fase y se analizaron por HPLC, como se muestra en la **Tabla 10**. El HPLC se corrió en una columna C18 Nova-Pack (3,9 x 150 mm) en un gradiente de 0 a 25% de CH₃CN en 20 mM de tampón acetato de trietilamonio (TEAAc) programado durante un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. Se encontró que el log P de D-dC es -1,41; por lo tanto, D-dC prefiere agua a octanol.

20

Tabla 10

	ESTUDIO 1						ESTUDIO 2					
	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³
ÁREA	1944848 1	213072 0	219737 7	7983 8	8217 2	8015 9	238014 1	232665 4	233905 9	9312 3	9027 5	8965 1
MEDI A	2092193			80723			2348618			91016		
P (B/A)	0,039						0,039					
LOGP	-1,41						-1,41					

25 De manera similar, aproximadamente 1,5 mg del hidrocloreto del éster 3'-valina de L-dC se disolvieron en 2,5 mL de disolución de tampón fosfato 0,02 M (A, 100 mL, pH 7,2), preparado a partir de una mezcla de disolución de fosfato de potasio monobásico (28,5 mL) y disolución de fosfato de potasio dibásico (71,5 mL). La disolución se saturó con octanol-1 (B). A 1 mL de esta disolución, se añadió 1 mL de octanol-1 (B) saturado con disolución de tampón fosfato 0,02 M (A). La mezcla resultante se agitó y se centrifugó; se recogieron tres muestras de cada fase y se analizaron

por HPLC, como se muestra en la **Tabla 11**. El HPLC se corrió en una columna C18 Nova-Pack (3,9 x 150 mm) en un gradiente de 0 a 25% de CH₃CN en 20 mM de tampón acetato de trietilamonio (TEAAc) programado durante un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto.

Tabla 11

	Estudio 1						Estudio 2					
	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³
Área	3352735	/	3417723	100544	96843	103466	3458180	3448062	3412971	100179	/	101731
Media	3385227			100284			3439738			100955		
P (B/A)	0,0296						0,0293					
logP	-1,53						-1,53					

5

Se encontró que el log P del hidrocloreto del éster 3'-valina de L-dC es -1,53; por lo tanto, el éster 3'-valina de L-dC prefiere agua a octanol a un grado mayor que D-dC.

Se calcularon los valores log P para el hidrocloreto del éster 5'-valina de L-dC y el hidrocloreto del éster 3',5'-divalina de L-dC. Los resultados se tabulan en la **Tabla 12**. Sin embargo, debe indicarse que el valor log P para el hidrocloreto del éster 3',5'-divalina de L-dC es probablemente menor que el medido (-0,86). Se observó una conversión significativa del éster divalina en el éster 3' ó 5'-monoalilil o incluso L-dC durante el experimento. Se detectó un 50% de conversión del hidrocloreto del éster 3',5'-divalina de L-dC en la fase acuosa y 14% en la fase orgánica. Esta conversión se debe a la inestabilidad de los ésteres en el tampón fosfato a un pH de 7 (véanse las realizaciones de referencia 14 y 15).

10

Tabla 12

Compuesto	log P (octanol/agua)
D-dC	-1,41
hidrocloreto del éster 3'-valina de L-dC	-1,53
hidrocloreto del éster 5'-valina de L-dC	-1,42
hidrocloreto del éster 3',5'-divalina de L-dC	-0,86
hidrocloreto del éster 3',5'-diacetil de L-dC	-0,74

Estudio log Pⁱ - agua MilliQ

Con el fin de evitar la conversión del éster divalina en los monoésteres y L-dC, se realizó un estudio alternativo de log P usando agua MilliQ (Aⁱ) en lugar del tampón fosfato (pH de 6,5 en lugar de 7,2). Es importante indicar que sólo puede considerarse en agua la forma hidrocloreto del éster divalinil. Aproximadamente 1,5 mg del hidrocloreto del éster 3',5'-divalinil de L-dC se disolvieron en 2,2 mL de agua MilliQ (Aⁱ, pH 6,5) saturada con octanol-1 (B). A 1 mL de esta disolución, se añadió 1 mL de octanol-1 (B) saturado con agua MilliQ (Aⁱ). La mezcla resultante se agitó y se centrifugó; se recogieron tres muestras de cada fase y se analizaron por HPLC, como se muestra en la **Tabla 13**. El HPLC se corrió en una columna C18 Nova-Pack (3,9 x 150 mm) en un gradiente de 0 a 25% de CH₃CN en 20 mM de tampón acetato de trietilamonio (TEAAc) programado durante un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. Se encontró que el log Pⁱ de la 3',5'-divalina en estas condiciones era -2,72, indicando el fuerte efecto de los contraiones en el tampón fosfato. No se observó conversión de la divalina en los monoésteres o L-dC ni en la fase acuosa ni en la orgánica.

20

25

Tabla 13

	ESTUDIO 1						ESTUDIO 2					
	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³
ÁREA	3278293	3292150	3282281	5484	5776	6496	3282927	3327122	3297985	5829	5615	6139
MEDIA	3284241			5919			3302678			5861		
P' (B/A)	1,80 X 10 ⁻³						1,77 X 10 ⁻³					
LOG P'	-2,7						-2,75					

De manera similar, aproximadamente 1,5 mg del hidrocloreuro del éster 5'-valinil de L-dC se disolvieron en 2,2 mL de agua MilliQ (A', pH 6,5) saturada con octanol-1 (B). A 1 mL de esta disolución, se añadió 1 mL de octanol-1 (B) saturado con agua MilliQ (A'). La mezcla resultante se agitó y se centrifugó; se recogieron tres muestras de cada fase y se analizaron por HPLC, como se muestra en la **Tabla 14**. El HPLC se corrió en una columna C18 Nova-Pack (3,9 x 150 mm) en un gradiente de 0 a 25% de CH₃CN en 20 mM de tampón acetato de trietilamonio (TEAAc) programado durante un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. Se encontró que el log P de la 5'-valina en estas condiciones era -2,75, de nuevo un valor menor que el encontrado en el estudio log P usando el tampón fosfato.

Tabla 14

	ESTUDIO 1						ESTUDIO 2					
	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³
ÁREA	3722494	3771963	3788317	6545	5082	/	3619900	3975353	4062284	8484	9454	5877
MEDIA	3760924			5813			3885845			7938		
P' (B/A)	1,54 X 10 ⁻³						2,04 X 10 ⁻³					
LOG P'	-2,81						-2,69					

En estas condiciones, los valores log P' para el hidrocloreuro del éster 5'-valinil de L-dC y el hidrocloreuro del éster 3',5'-divalinil de L-dC son muy similares (**Tabla 15**).

Tabla 15

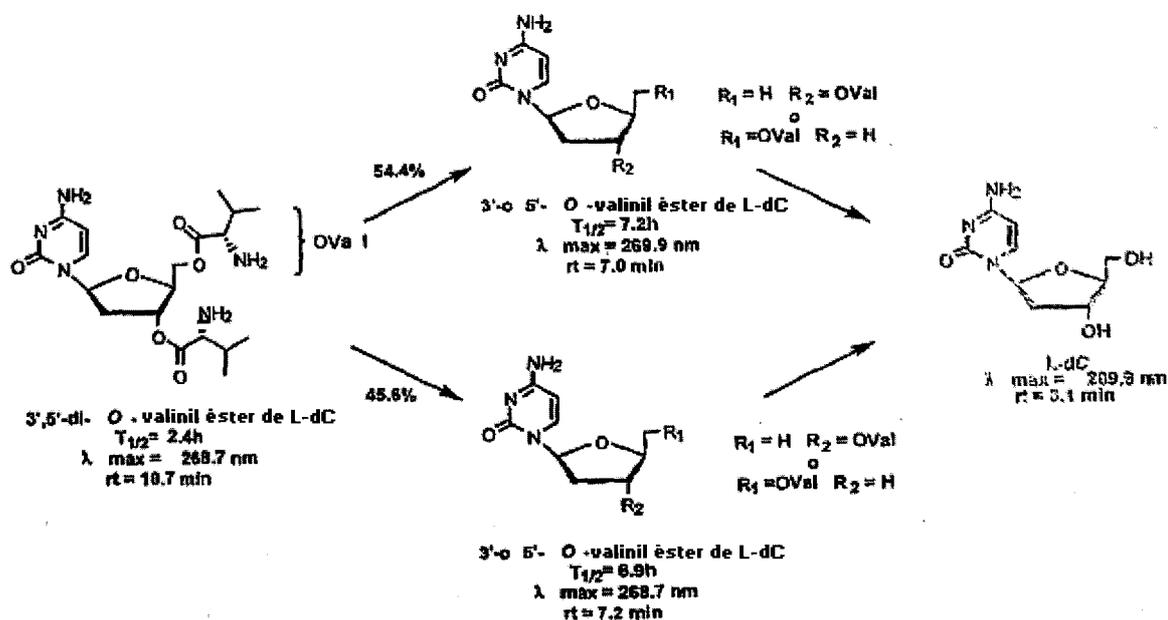
Compuesto	log P (octanol/agua)	log P' (octanol/agua)
hidrocloreuro del éster 5'-valina de L-dC	-1,42	-2,75
hidrocloreuro del éster 3',5'-divalina de L-dC	-0,86	-2,72

Estudio de estabilidad a pH 7,4

Se calculó la velocidad de descomposición de cada metabolito del hidrocloreuro del éster 3'-valina de L-dC. Se determinó que la vida media del hidrocloreuro del éster 3'-valina de L-dC a un pH de 7,40 era 7 horas en una disolución 0,2M Tris-HCl a 37°C. En estas condiciones, el hidrocloreuro del éster 3'-valina de L-dC se transforma simplemente en L-dC. No se detectó citosina, así, no hubo una rotura detectable de la unión glicosídico.

De manera similar, se calculó la velocidad de descomposición de cada metabolito del hidrocloreuro del éster 3',5'-divalina de L-dC. Se determinó que la vida media del hidrocloreuro del éster 3',5'-divalina de L-dC a un pH de 7,42 era 2,4 horas en una disolución 0,2M Tris-HCl a 37°C. En estas condiciones, el hidrocloreuro del éster 3',5'-divalina de L-dC se hidroliza parcialmente en el 3'- y 5'-valinil-L-dC, que se transforman posteriormente en L-dC. No se detectó citosina, así, no hubo una rotura detectable de la unión glicosídico (**Esquema 4, Figuras 9a y 9b**).

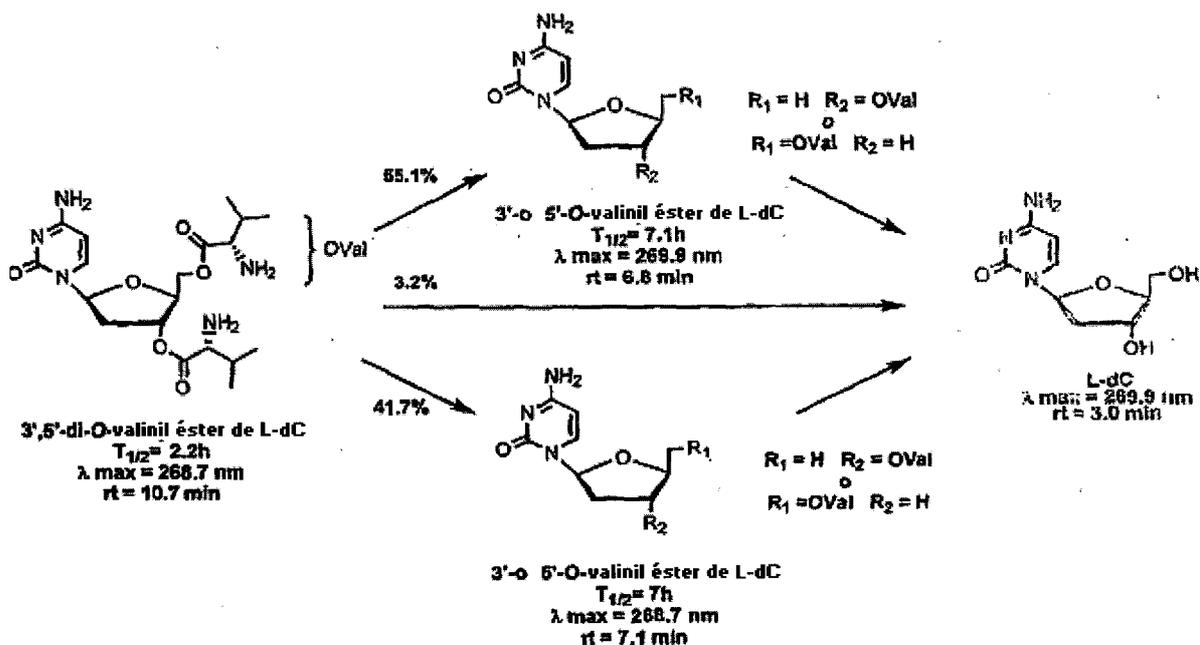
Esquema 4



Estudio de estabilidad a pH 7,20

5 Se determinó que la vida media del hidrocloreto del éster 3',5'-divalina de L-dC a un pH de 7,20 era 2,2 horas en un tampón fosfato 20 mM. En estas condiciones, el hidrocloreto del éster 3',5'-divalina de L-dC se hidroliza parcialmente en el 3'- y 5'-valinil-L-dC, que se transforman posteriormente en L-dC. No se detectó citosina, así, no hubo una rotura detectable de la unión glicosido (Esquema 5, Figuras 10a y 10b).

Esquema 5



10 Estudio de estabilidad a pH 4,5

Se determinó que la vida media del hidrocloreto del éster 3'-valina de L-dC a un pH de 4,5 era 8,6 días en un tampón acetato 20 mM. De nuevo, el hidrocloreto del éster 3'-valina de L-dC se transforma simplemente en L-dC. No se detectó citosina, así, no hubo una rotura detectable de la unión glicosido.

De manera similar, se determinó que la vida media del hidrocloreto del éster 3',5'-divalina de L-dC a un pH de 4,51 era 44 horas en un tampón acetato 20 mM. En estas condiciones, el hidrocloreto del éster 3',5'-divalina de L-dC se hidroliza parcialmente en el 3'- y 5'-valinil-L-dC, que se transforman posteriormente en L-dC. No se detectó citosina, así, no hubo una rotura detectable de la unión glicosídica (**Figuras 11a y 11b**).

5 *Estudio de estabilidad a pH 1,2*

Se determinó que la vida media del hidrocloreto del éster 3'-valina de L-dC a un pH de 1,2 era mayor de 48 horas en una disolución tampón KCl-HCl 135 mM. No se detectó citosina, así, no hubo una rotura detectable de la unión glicosídica.

10 De manera similar, se hicieron estudios de estabilidad en el hidrocloreto del éster 5'-valina de L-dC. Este compuesto es totalmente estable a un pH de 1,2, sin detectarse otros metabolitos o productos de descomposición durante hasta 23 horas. No se detectó rotura de unión glicosídica después de hasta 2 días en disolución.

Se encontró que el éster 3',5'-diacetil de L-dC tiene una vida media a un pH de 1,2 de 11,2 horas. En estas condiciones el compuesto se hidrolizó parcialmente en los derivados 3'- ó 5'-, que se transformaron posteriormente en L-dC. No se detectó rotura de unión glicosídica después de hasta 2 días en disolución.

15 Se encontró que el éster 3',5'-divalinil de L-dC es totalmente estable a un pH de 1,23, ya que no se detectaron otros compuestos hasta 48 horas en estas condiciones. No se detectó rotura de unión glicosídica después de hasta 2 días en disolución (**Figura 12**).

Alternativamente, cuando la posición N⁴ de L-dC se enmascara con dimetilaminometileno o acetilo, la vida media del compuesto a un pH de 1,2 es sólo de 26 minutos ó 50 minutos, respectivamente.

20 *Biodisponibilidad de dosis única de L-dC en el mono cinomolgus*

Se determinó la farmacocinética de L-dC después de administración IV y oral de L-dC a monos cinomolgus. En este estudio, se administraron 10 mg/kg de L-dC radiomarcado con tritio ([³H]) a tres monos cinomolgus como una única dosis IV. Después de un periodo de lavado de seis semanas, los mismos tres monos recibieron una dosis oral idéntica de L-dC. Se recogieron muestras de sangre para análisis de farmacocinética pre-dosis y a las 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 6, 8 y 24 horas después de la dosificación. Se recogieron muestras de orina para análisis de farmacocinética mediante bote de recogida pre-dosis y durante los intervalos post-dosis siguientes: 0-2, 2-4, 4-8, y 8-12 horas, y después durante intervalos de 12 horas posteriormente a lo largo de 336 horas post-dosis. El fármaco se detectó y se determinó la concentración usando una técnica de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa. Los datos del nivel de fármaco en sangre y orina se analizaron por un método matemático no modelado y las AUC se derivaron por la regla trapezoidal lineal.

Administración intravenosa de L-dC. La C_{max} media de L-dC después de administración IV fue 95,7 µM y se produjo en el tiempo de muestreo más temprano (15 minutos post-dosis) para todos los animales. Las concentraciones plasmáticas de L-dC disminuyeron con el tiempo después del bolo IV con un t_{1/2} medio de 1,59 horas. El aclaramiento total (CL) y aclaramiento renal (CLR) de L-dC después de la administración IV promediaron 0,53 L/h/kg y 0,46 L/h/kg, respectivamente. El volumen aparente medio de distribución (V_d) de 1,22 L/kg indicó que L-dC tenía una distribución tisular extravascular significativa.

La excreción urinaria fue rápida, con 71% de la dosis administrada recuperada en 2 horas. L-dC representó la mayor parte (94%) de la dosis recuperada en la orina. El aclaramiento renal (0,46 L/h/kg) representó el 87% del aclaramiento total de L-dC y sugirió que la excreción renal era la ruta principal de eliminación.

40 L-dU se detectó en el plasma y orina, indicando que también se producía eliminación metabólica de L-dC después de la administración IV. Se detectaron niveles bajos de L-dU en plasma en el límite de detección (límite de detección inferior (LLOD)= 0,1 µM). La excreción renal de L-dU fue 4,0% de la dosis total recuperada en orina. Con la excepción de L-dU, no se detectaron otros metabolitos en el plasma u orina.

Administración oral de L-dC. La C_{max} fue 3,38 µM y se produjo a un T_{max} de 2,33 horas. La concentración plasmática de L-dC declinó de una manera bifásica con un t_{1/2} terminal medio de 2,95 horas y estuvo por debajo de los límites de detección a las 24 horas en todos los monos. L-dC se absorbió por el tracto intestinal con una biodisponibilidad oral media (F) de 16,4%.

L-dU se detectó en el plasma y orina, lo que sugiere que se producía la eliminación metabólica de L-dC después de la administración oral. Se detectaron niveles bajos de L-dU en plasma en el LLOD. Con la excepción de L-dU, no se detectaron otros metabolitos en el plasma u orina.

50 Aproximadamente el 8,5% de la dosis oral administrada se recuperó en la orina en las 12 horas. Después de 72 horas, se recuperó el 15,5% ± 8%. L-dC representó la mayor parte (~69%) del fármaco excretado en la orina. La excreción renal de L-dU fue 29% de la dosis total recuperada. No se recogieron heces.

La **Tabla 16** presenta un resumen de los resultados farmacocinéticos para administración IV y oral de L-dC en monos cinomolgus.

Tabla 16 Análisis de farmacocinética después de administración intravenosa y oral de L-dC (10 mg/kg) en el mono cinomolgus

Ruta (h)	AUC _{última} (mM-h)	t _{1/2} (h)	C _{max} (mM)	T _{max} (h)	CL (L/h/kg)	CL _R (L/h/kg)	V _d (L/kg)	F (%)
IV	81,1	1,59	95,7	0	0,53	0,46	1,22	-
(3)	(± 5,7)	(± 0,09)	(± 13)		(± 0,04)		(± 0,11)	
Oral	13,7	2,95	3,38	2,33	-	-	-	16,4
(3)	(± 4,3)	(± 1,3)	(± 1,3)	(± 1,5)				(± 5,0)

5 Valor medio (± SD).

Biodisponibilidad de dosis única de L-dC en el mono rhesus

Se determinó la farmacocinética de L-dC después de administración oral a monos rhesus. En este estudio, se administraron 10 mg/kg de L-dC radiomarcado con tritio ([³H]) a tres monos rhesus como una única dosis oral. Se recogieron muestras de sangre para análisis de farmacocinética pre-dosis y a las 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 6, 8 y 24 horas después de la dosificación. Se recogieron muestras de orina para análisis de farmacocinética mediante un bote de recogida pre-dosis y durante los intervalos post-dosis siguientes: 0-2, 2-4, 4-8, y 8-12 horas, y después a intervalos de 12 horas posteriormente a lo largo de 336 horas post-dosis. El fármaco se detectó y se determinó la concentración usando una técnica de HPLC en fase inversa. Los datos del nivel de fármaco en sangre y orina se analizaron por un método matemático no modelado y las AUC se derivaron por la regla trapezoidal lineal.

15 Los valores promedios AUC_{0,25-8} y C_{max} fueron 12,2 mgM.h y 3,23 mgM, respectivamente. La C_{max} se produjo a un T_{max} de 0,83 horas. El t_{1/2} medio fue 3,34 horas y la concentración plasmática de L-dC estuvo por debajo de los niveles de detección a las 24 horas en todos los monos. El aclaramiento renal medio de L-dC fue 0,273 L/h/kg. No se observaron metabolitos en el plasma de los monos que recibieron L-dC.

20 Aproximadamente el 8,5% de la dosis oral administrada (biodisponibilidad oral de L-dC ~16%) se recuperó en la orina en las 8 horas. Después de 48 horas, se recuperó el 15%. L-dC representó la mayor parte (~77%) del fármaco excretado en la orina. La excreción renal de L-dU fue 23% de la dosis total recuperada. Con la excepción de L-dU, no se detectaron otros metabolitos.

La AUC y C_{max} para L-dC después de administración oral a monos rhesus fueron similares a las observadas en monos cinomolgus.

25 *Biodisponibilidad de dosis única de L-dC en la rata*

30 Se determinaron la farmacocinética y biodisponibilidad de L-dC en ratas. En este estudio, se administraron 10 mg/kg de L-dC radiomarcado con [³H] a tres ratas Sprague-Dawley hembras como una única dosis IV. Un segundo grupo de animales recibió una dosis oral idéntica de L-dC. Se recogieron muestras de sangre para análisis farmacocinéticos a las 0,17, 0,33, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 horas después de la dosificación. También se recogió orina a las 8 y 24 horas después de la dosificación. El fármaco se detectó y se determinó la concentración en plasma y orina usando una técnica de HPLC en fase inversa. Los datos se analizaron por un método matemático no modelado y las AUC se derivaron por la regla trapezoidal lineal.

35 Administración intravenosa de L-dC. El valor AUC_{0,25-8} promedio fue 30,1 mM.h. La C_{max} de L-dC fue 91,1 mgM y se produjo al tiempo de muestreo más temprano (10 minutos post-dosis) para todos los animales. Las concentraciones plasmáticas de L-dC declinaron de una manera bifásica después del bolo IV con un t_{1/2} medio de 1,21 horas. La CL de L-dC promedió 1,44 L/h/kg. El V_d medio de 2,53 L/kg indicó que L-dC tenía una distribución tisular extravascular significativa. No se observaron metabolitos en el plasma de las ratas que recibieron L-dC.

L-dC representó la mayor parte de la radiactividad recuperada en la orina. L-dU se detectó en la orina, lo que sugirió que se producía la eliminación metabólica de L-dC después de la administración IV.

40 Administración oral de L-dC. El valor AUC_{0,25-8} promedio fue 4,77 mM.h. La C_{max} media fue 1,50 mgM y se produjo a un T_{max} de 1,0 hora. La concentración plasmática de L-dC declinó con un t_{1/2} de 2,52 horas. L-dC tuvo una captación limitada desde el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad oral media (F) de 15,4%. No se observaron metabolitos en el plasma de las ratas después de la administración oral de L-dC.

L-dC representó la mayor parte de la radiactividad recuperada en la orina. L-dU se detectó en el plasma y la orina, lo que sugirió que se producía la eliminación metabólica de L-dC después de la administración oral.

La **Tabla 17** presenta un resumen de los resultados de farmacocinética para L-dC tanto IV como oral.

5

Tabla 17 Análisis farmacocinético después de administración intravenosa y oral de L-dC (10 mg/kg) en la rata

Ruta (h)	AUC ₀₋₂₅₋₂₈ (mM-h)	t _{1/2} (h)	C _{max} (mM)	T _{max} (h)	CL (L/h/kg)	V _d (L/kg)	F (%)
IV	30,1	1,21	91,1	0	1,44	2,53	-
(3)	(± 4,7)	(± 0,06)	(± 6,6)		(± 0,29)	(± 0,60)	
Oral	4,77	2,52	1,50	1,0	-	-	15,4
(3)	(± 2,1)	(± 1,3)	(± 068)				(± 4,6)

Valor medio (± SD).

Biodisponibilidad de dosis única de L-dC en la marmota

Se determinaron la farmacocinética y biodisponibilidad de L-dC en marmotas. En este estudio, se administraron 10 mg/kg de L-dC radiomarcado con [3H] a tres marmotas como una única dosis IV. Se recogieron muestras de sangre para análisis farmacocinéticos a los 2, 5, 15 y 30 minutos y 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0 y 24 horas post-dosis. Después de un periodo de lavado de siete días, los mismos animales recibieron 10 mg/kg de L-dC como una única dosis oral. Se recogieron muestras de sangre para análisis farmacocinéticos a los 15 y 30 minutos y 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 8,0 y 24 horas post-dosis. Se recogió orina durante el periodo de 24 horas post-dosis. Se determinaron los niveles de fármaco en plasma, CL, t_{1/2} y F. Los niveles de fármaco se determinaron usando un método de HPLC con detección de radiactividad en línea y conteo de centelleo.

Administración intravenosa de L-dC. La C_{max} media de L-dC fue 112 µM y se produjo al tiempo de muestreo más temprano (2 minutos post-dosis) para todos los animales. Las concentraciones plasmáticas de L-dC declinaron de una manera bifásica después del bolo IV con un t_{1/2} medio de 2,85 horas. La CL de L-dC promedió 0,39 L/h/kg. El V_d medio fue 1,17 L/kg. L-dC representó la mayor parte de la radiactividad recuperada en la orina. L-dU se detectó en el plasma y la orina, indicando que se producía la eliminación metabólica de L-dC después de la administración IV. Los niveles de L-dU detectados intermitentemente en el plasma estuvieron en o por debajo del límite de cuantificación del ensayo con una C_{max} media de 0,75 µM.

Administración oral de L-dC. La C_{max} fue 1,37 µM y se produjo a un T_{max} de 3 horas. Las concentraciones plasmáticas de L-dC disminuyeron con un t_{1/2} medio de 5,22 horas. L-dC se absorbió por el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad oral que varió de 5,60 a 16,9% con una media de 9,57%. L-dC representó la mayor parte de la radiactividad recuperada en la orina. L-dU se detectó en el plasma y la orina, indicando que se producía la eliminación metabólica de L-dC después de la administración oral. L-dU en el plasma estuvo cerca del límite de cuantificación con una C_{max} media de 0,19 µM.

La **Tabla 18** presenta un resumen de los resultados de farmacocinética para L-dC tanto IV como oral.

Tabla 18 Análisis farmacocinético de L-dC (10 mg/kg) después de administración intravenosa y oral en la marmota

Ruta (h)	AUC _{t→24} ^a (µM.h)	t _{1/2} (h)	C _{max} (mM)	T _{max} (h)	CL (L/h/kg)	V _d (L/kg)	F (%)
IV	174	2,85	112	0	0,39	1,17	-
(3)	(± 120) ^b	(± 130)	(± 33)		(± 0,3)	(± 0,36)	
PO	11,3	5,22	1,37	3,0	-	-	9,57
(3)	(± 4,7)	(± 2,7)	(± 0,22)	(± 1)			(± 6,4)

a t = 0,033 horas para administración IV y 0,25 horas para administración PO

b. Valor medio (± SD)

Biodisponibilidad de los profármacos de L-dC

Se evaluó la biodisponibilidad de L-dC, el 5' monoéster de L-dC, el éster divalina de L-dC, y el éster diacetil de L-dC en monos cinomolgus, con y sin L-dT. Cuando el éster divalina de L-dC se administró oralmente a los monos, se absorbió aproximadamente el 73% de la dosis. Del éster divalina de L-dC absorbido, más del 99% se convirtió rápidamente en L-dC para proporcionar una alta concentración de L-dC en el plasma y ausencia de éster divalina de L-dC detectable. Se detectó una baja concentración plasmática del éster monovalina de L-dC poco después de la administración oral del éster divalina de L-dC. Se detectó una baja concentración plasmática de β -L-2'-desoxiuridina (L-dU) intermitentemente. No se detectaron otros metabolitos. Los resultados se proporcionan en la **Tabla 19**. Como se indica, la combinación del éster 3',5'-divalil de L-dC con L-dT proporcionó la mayor biodisponibilidad de L-dC.

10 **Tabla 19**

	L-dC parental (pm= 227,22)	L-dC ³ 5'-valina (pm= 399,27)	L-dC 3'-valina (pm= 399,27)	L-dC di-valina (pm= 534,87)	L-dC di-acetil (pm= 347,75)
%BA ¹	16,4 ± 5,0	39,0 ± 11,4	85,1 ± 24,5	72,7 ± 22,0	23,0 ± 6,5
%BA con L-dT ²	11,9 ± 1,7	ND	ND	74,6 ± 9,9	24,9 ± 4,0

¹estimado respecto a AUC de L-dC (dosis oral)

²coadministrado con 10 mg/kg L-dT

³Estudio de actividad específica de 5'-mono-valina basado en dosis de radiactividad total

ND, no determinado

15 Pureza= 87% L-dC-mono-valina, 12% L-dC

Biodisponibilidad de dosis única de dival-LdC en mono cinomolgus

Tres monos cinomolgus (*Macaca fascicularis*) machos pre-tratados recibieron 10 mg/kg de dival-L-dC intravenosamente con una cantidad traza de fármaco marcado con tritio [³H] (250 μ Ci) disuelto en disolución salina estéril al 0,9%. Después de un periodo de lavado de 6 semanas, los mismos tres animales recibieron una dosis oral idéntica de dival-L-dC. Se recogieron muestras de sangre en tubos heparinizados en pre-dosis (~18 horas) y a las 0,25, 0,50, 1, 2, 3, 4, 6, 8, y 24 horas después de la dosificación. También se recogió orina de 0-2, 2-4, 4-8, 8-12 y después a intervalos de 12 horas hasta las 336 horas post-dosis. El fármaco se cuantificó en plasma y orina con una técnica de cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS). Después de la administración de dival-L-dC, el curso de tiempo de la concentración plasmática de L-dC se analizó por un método matemático no modelado y el área bajo las curvas (AUC) de tiempo-concentración se derivó por la regla trapezoidal lineal. La biodisponibilidad (F) de L-dC después de administración IV y PO de dival-L-dC se calculó a partir de las AUC de L-dC, donde $F = AUC_{po}/AUC_{iv} \times dosis_{iv}/dosis_{po}$.

La dival-L-dC administrada intravenosamente se convirtió rápidamente en L-dC después de la administración intravenosa. Dival-L-dC se detectó en el plasma a los 15 minutos (1,39 μ M) y a los 30 minutos (0,36 μ M, 1 de 3 animales) [límite inferior de cuantificación (LLOQ)= 0,23 μ M ó 100 ng/mL]. Dival-L-dC no se detectó en el plasma después de 30 minutos post-dosificación. La forma parcialmente desesterificada de dival-L-dC, éster de β -L-2'-desoxicitidina-5'-valina, se detectó en el plasma a los 15 minutos (3,23 μ M) y disminuyó en concentración hasta 0,08 μ M a las 2 horas (LLOQ= 0,031 μ M ó 10 ng/mL). L-dC representó la mayor parte del fármaco presente en el plasma después de la administración intravenosa. El valor de AUC_{0,25-8} medio para L-dC fue 19,8 μ Mh. El pico de concentración plasmática media (C_{max}) de L-dC fue 24,6 μ M (LLOQ= 0,088 μ M ó 20 ng/mL) y se produjo en el tiempo de muestreo más temprano (15 minutos post-dosis) en todos los animales. La concentración plasmática de L-dC declinó de una manera bifásica con un t_{1/2} medio de 1,73 horas. El aclaramiento corporal total (CL) y el volumen aparente de distribución (V_d) de L-dC promediaron 1,01 L/h/kg y 2,46 L/kg, respectivamente, indicando que L-dC tenía una distribución tisular extravascular significativa. La unión de dival-L-dC y L-dC a proteínas plasmáticas humanas ex vivo fue 13,3% ± 2,6% y 19,7% ± 5,9%, respectivamente. El impacto de la unión a proteínas plasmáticas humanas en los niveles de fármaco libre dival-L-dC y L-dC fue mínimo, sugiriendo que no se anticipan interacciones de los fármacos que implican un desplazamiento del sitio de unión.

La excreción urinaria fue rápida con 58 ± 3% de la dosis administrada de dival-L-dC excretada en las 2 horas después de la administración intravenosa. L-dC representó la mayor parte (~93%) del fármaco excretado en la orina. L-dU también se detectó en el plasma y la orina. Esto sugirió que también se produce la eliminación metabólica de L-dC después de la administración de dival-L-dC. Se detectaron niveles bajos de L-dU en el plasma a puntos de tiempo intermitentes en dos de tres animales a concentraciones que variaron de 0,22 μ M a 0,88 μ M (LLOQ= 0,22 μ M ó 50 ng/mL). No hubo niveles detectables de L-dU a ningún punto de tiempo en el tercer mono. La excreción renal de L-dU y la forma parcialmente desesterificada de dival-L-dC, éster β -L-2'-desoxicitidina-5'-valina fue menor, representando aproximadamente 2,5% y 3,7% de la dosis total recuperada, respectivamente. Se detectó dival-L-dC

en la orina de uno de tres animales a las 2 horas después de la administración IV, lo que representó aproximadamente 0,15% de la dosis recuperada.

Debido a las bajas concentraciones intermitentes tanto de los ésteres monoalmina como L-dU en el plasma y la orina, no fue factible realizar análisis farmacocinéticos de estos metabolitos. La aparición del éster monoalmina de dival-L-dC no fue inesperada ya que representa y media en la conversión de dival-L-dC a L-dC. Además, los estudios de metabolismo celular *in vitro* en hepatocitos primarios de mono, rata y humanos y en extractos de células HepG2 demostraron que L-dC no se desamina directamente a L-dU sino que L-dC monofosfato (-MP) se convierte a L-dU-MP, que se activa a L-dU difosfato (-DP), y trifosfato (-TP), o se metaboliza a L-dU, que entonces se detecta en el compartimento extracelular (plasma). L-dU no fue citotóxico ($CC_{50} > 200 \mu\text{M}$) y L-dU-TP tuvo una CI_{50} *in vitro* frente a la polimerasa de ácido desoxiribonucleico (ADN) del virus de la hepatitis B de $5,26 \mu\text{M}$ (véase Microbiología y Virología, Sección 10).

El dival-L-dC administrado oralmente también se convirtió rápidamente en L-dC después de la administración oral y no fue detectable en muestras de plasma en ningún punto de tiempo (LLOQ de dival-L-dC en disolución= $0,23 \mu\text{M}$ ó 100 ng/mL). El metabolito parcialmente desesterificado de dival-L-dC, éster β -L-2'-desoxicidina-5'-valina, se detectó en plasma a los 30 minutos y 1 hora a concentraciones que variaron de $0,034 \beta$ a $0,107 \beta$ (LLOQ de monoéster en disolución= $0,031 \mu\text{M}$ ó 10 ng/mL). No se detectó dival-L-dC en el plasma.

L-dC representó la mayor parte (>99% a C_{max}) de los niveles del fármaco en plasma después de la administración oral de dival-L-dC. El valor de $AUC_{0,25-8}$ medio para L-dC fue $14,0 \mu\text{M h}$. La C_{max} de L-dC fue $8,26 \mu\text{M}$ (LLOQ de L-dC en disolución = $0,088 \mu\text{M}$ ó 20 ng/mL) y se produjo a las 0,67 horas después de la administración de dival-L-dC. La concentración plasmática de L-dC declinó de una manera bifásica con un $t_{1/2}$ medio de 2,28 horas. La biodisponibilidad media oral de L-dC después de la administración de dival-L-dC fue $72,7 \pm 22\%$.

También se detectó L-dU en el plasma indicando que se produce la eliminación metabólica de L-dC después de la administración oral de dival-L-dC. Fueron detectables bajos niveles de L-dU en el plasma desde los 30 minutos a las 4 horas en dos de tres animales de concentraciones que variaron de $0,24 \mu\text{M}$ a $0,66 \mu\text{M}$ (LLOQ de L-dU en disolución= $0,22 \mu\text{M}$ ó 50 ng/mL) y en un animal sólo a las 8 horas a una concentración de $0,39 \mu\text{M}$.

Después de la administración oral, dival-L-dC se absorbió rápidamente desde el tracto gastrointestinal y se convirtió en L-dC por metabolismo intestinal de primer paso y/o hepático. Ni el metabolismo de dival-L-dC ni de L-dC se asoció con enzimas microsomales hepáticas. Después de la administración de niveles altos de dosis de dival-L-dC, el éster monoalmina de L-dC se detectó transitoriamente antes de la conversión a L-dC. No se detectó dival-L-dC después de la administración oral. Se detectaron niveles plasmáticos bajos intermitentes de L-dU en, o por debajo, del límite inferior de cuantificación del ensayo. L-dU se formó por desaminación de L-dC después de la captación celular de L-dC.

Aproximadamente $31 \pm 8\%$ de la dosis oral administrada se recuperó en la orina en las 4 horas. Después de 72 horas, se recuperó $39 \pm 8\%$. L-dC representó la mayor parte (~95%) del fármaco excretado en la orina. La excreción renal de L-dU y la forma parcialmente desesterificada de dival-L-dC, éster β -L-2'-desoxicidina-5'-valina fue menor, representando aproximadamente el 2,5% y 0,2% de la dosis total recuperada, respectivamente. No se detectó dival-L-dC en la orina.

La **Tabla 20** representa un resumen de los resultados farmacocinéticos para L-dC después de dosificación de dival-L-dC tanto IV como oral.

Tabla 20 Análisis farmacocinético después de administración intravenosa y oral de dival-L-dC (10 mg/kg) en monos cinomolgus

Parámetro farmacocinético²

Ruta (h)	$AUC_{0,25-8}$ ($\mu\text{M h}$)	$t_{1/2}$ (h)	C_{max} (μM)	T_{max} (h)	CL (L/h/kg)	V_d (L/kg)	F (%)
IV	19,8	1,73	24,5	0	1,01	2,46	-
(3)	($\pm 5,2$)	($\pm 0,33$)	($\pm 2,6$)		($\pm 0,32$)	($\pm 0,47$)	
Oral	14,0	2,28	8,26	0,67	-	-	72,7
(3)	($\pm 2,4$)	($\pm 1,4$)	($\pm 0,71$)	($\pm 0,3$)			(± 22)

(3) Valor medio [\pm desviación estándar (SD)].

La **Tabla 21** presenta un esquema de la formación de la forma de metabolito dival-L-dC, el derivado monoalmina de L-dC, L-dC y L-dU después de la administración IV y oral de dival-L-dC. También se indica la C_{max} de cada metabolito.

Tabla 21 Formación de metabolitos para la administración IV y PO de dival-L-dC

Intravenosa (10 mg/kg Dival-L-dC)				
	dival-L-dC→	mono-val-L-dC→	L-dC→→	L-dU
C_{max}	1.39 μM	3.23 μM	24.6 μM	0.88 μM

Oral (10 mg/kg dival-L-dC)				
	val-L-dC→	mono-val-L-dC→	L-dC→→	L-dU
C_{max}	No detectado	0.11 μM	8.26 μM	0.66 μM

Biodisponibilidad oral de L-dC a través de dival-L-dC en mono cinomolgus

- 5 Tres monos cinomolgus (*Macaca fascicularis*) machos pre-tratados recibieron 10 mg/kg de dival-L-dC oralmente con una cantidad traza de fármaco marcado con tritio [^3H] (250 μCi) disuelto en disolución salina estéril al 0,9%. Se recogieron muestras de sangre en tubos heparinizados en pre-dosis (~18 horas) y a las 0,25, 0,50, 1, 2, 3, 4, 6, 8, y 24 horas después de la dosificación. se recogió orina de 0-2, 2-4, 4-8, 8-12 y después a intervalos de 12 horas hasta las 336 horas post-dosis. El fármaco se cuantificó en plasma y en orina usando análisis por HPLC. Después de la administración de dival-L-dC, el curso de tiempo de la concentración plasmática de L-dC se analizó por un método matemático no modelado y el área bajo las curvas (AUC) de tiempo-concentración se derivó por la regla trapezoidal lineal. El dival-L-dC se absorbió rápidamente y se convirtió en L-dC después de la administración oral. El análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) radiocromatográfico de las muestras de plasma confirmó que la mayor parte de la radiactividad recuperada era L-dC. Dival-L-dC sólo se detectó en un animal a los 15 minutos post-dosis a una concentración de 0,35 μM . La forma parcialmente desesterificada de dival-L-dC, éster β -L-2'-desoxicidina-5'-valina, no se detectó en el plasma ni orina. Aproximadamente el 26% de la dosis oral administrada se recuperó en la orina en las 8 horas. Después de 72 horas, se recuperó el 31%. L-dC representó la mayor parte (~89%) del fármaco excretado en la orina. La excreción renal de L-dU fue menor, representando aproximadamente el 10% de la dosis recuperada. No se detectó dival-L-dC o su forma parcialmente desesterificada, ni otros metabolitos, en la orina.
- 10
- 15
- 20 El perfil farmacocinético global fue comparable al determinado en el estudio farmacocinético como se demuestra por proporciones C_{max} a AUC similares. Se detectaron bajos niveles de L-dU en el plasma de dos de tres animales con una C_{max} media de 0,33 μM . No se detectó L-dU en el plasma del tercer animal. El nivel de L-dU estaba en o por debajo del límite de cuantificación, impidiendo el análisis farmacocinético.

Metabolismo in vitro de dival-L-dC

- 25 Se realizaron estudios para determinar la estabilidad y unión a proteínas de dival-L-dC y sus metabolitos desesterificados en plasma humano. Dival-L-dC se incubó en plasma humano a 37°C y se analizaron muestras a varios puntos de tiempo hasta 24 horas (Figura 13). No hubo dival-L-dC detectable a las 24 horas con conversión completa a L-dC. También se observaron dos metabolitos adicionales (éster β -L-2'-desoxicidina-5'-valina y éster β -L-2'-desoxicidina-valina). La naturaleza transitoria de estos metabolitos indicó que son intermedios en la conversión de dival-L-dC a L-dC. Se determinó que la vida media *in vitro* de dival-L-dC en plasma humano a 37°C es aproximadamente 39 min.
- 30

También se investigó el impacto de la unión a proteínas de plasma humano en los niveles libres de dival-L-dC y L-dC usando un método de ultrafiltración. La unión a proteínas del plasma de dival-L-dC fue $13,3 \pm 2,6\%$. La unión de L-dC a proteínas del plasma fue $19,7 \pm 5,9\%$. Este estudio muestra que el impacto de la unión a proteínas de plasma humano en dival-L-dC y L-dC es mínimo y sugiere que no se anticipan interacciones del fármaco que implican desplazamiento del sitio de unión.

35

Activación metabólica y perfil intracelular de L-dC

- El metabolismo celular de L-dC se examinó usando células HepG2 y hepatocitos primarios humanos. El análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) demostró que L-dC se fosforilaba extensamente en hepatocitos. El metabolito principal en células HepG2 expuestas a 10 μM de L-dC durante 24 horas era L-dC-TP que alcanzó $72,4 \pm 1,8 \mu\text{M}$ (véase la Tabla 23). En hepatocitos primarios humanos, la concentración de L-dC-TP a las 24 horas fue $90,1 \pm 37 \mu\text{M}$, similar al nivel de fosforilación en células HepG2. La exposición de hepatocitos a L-dC dio lugar a la activación de un segundo derivado 5'-trifosfato, L-dU-TP. En células HepG2 expuestas a 10 μM de L-dC, el nivel de L-dU-TP alcanzó 18,2 μM (43,5 μM en hepatocitos primarios humanos) a las 24 horas. En hepatocitos primarios de rata y mono el grado de fosforilación de L-dC fue ligeramente menor.
- 40
- 45

Tabla 23 Activación de L-dC (10 μ M) en hepatocitos

Células ^a	n	Metabolito (10 μ M)						
		L-dC-MP	L-dU-MP	L-dC-DP	L-dC-DP-colina	L-dU-DP	L-dC-TP	L-dU-TP
HepG2	3	23,3 \pm 0,86	6,73 \pm 0,41	10,2 \pm 1,9	25,6 \pm 0,08	2,69 \pm 0,45	72,4 \pm 1,8	18,2 \pm 1,0
Hepatocitos primarios humanos	3	27,6 \pm 15	5,74 \pm 2,4	7,19 \pm 2,3	15,8 \pm 1,8	3,93 \pm 1,6	90,1 \pm 37	43,5 \pm 27
Hepatocitos primarios de mono	1	11,2	2,54	7,66	10,4	3,11	39,3	21,9
Hepatocitos primarios de rata	3	5,09 \pm 2,1	3,53 \pm 0,97	1,52 \pm 0,38	8,82 \pm 3,1	7,90 \pm 1,4	14,2 \pm 3,1	46,9 \pm 5,2

(a) Las células se incubaron durante 24 horas con [³H]-L-dC, actividad específica: ensayo HepG2= 0,5 Ci/mmol; ensayo de hepatocitos humanos, de mono y de rata= 1,0 Ci/mmol.

5 Además de los derivados fosforilados de L-dC y L-dU, se observó la formación de un metabolito [β -L-2'-desoxiliponucleótido. En cultivos de células HepG2 y hepatocitos primarios expuestos a 10 μ M de L-dC durante 24 horas se detectó [3-L-2'-desoxicitidina-5'-difosfocolina (L-dC-DP-colina) a una concentración de 25,6 μ M (intervalo 25,6-25,7 μ M) y 12,3 μ M (intervalo 8,82-15,8 μ M), respectivamente.

10 El perfil metabólico obtenido después de una exposición de 24 horas de células HepG2 a 10 μ M de [3H]-L-dC se muestra en la **Figura 14**. La vida media intracelular aparente del L-dC-TP fue 15,5 \pm 0,34 horas, que se correlacionó con una actividad antiviral prolongada después de la retirada del fármaco en los experimentos de rebote del virus. El patrón de fosforilación detectado en hepatocitos primarios humanos fue cualitativamente y cuantitativamente similar al obtenido usando células HepG2 (**Figura 15**).

Quinasas celulares asociadas con la activación metabólica

15 La D-desoxicitidina (dCyd) es un sustrato natural de la quinasa dCyd citosólica (dCK) y la timidina quinasa mitocondrial (TK2) para la conversión a dCyd-5'-monofosfato (dCMP). La timidina quinasa citosólica (TK1) y TK2 utilizan D-timidina (Thd) como un sustrato natural para la conversión a Thd-5'-monofosfato (TMP). La quinasa celular implicada en la fosforilación inicial de L-dC se identificó en estudios de competición usando L-dC y las Thd y dCyd endógenas naturales. La fosforilación intracelular de L-dC disminuyó de manera dependiente de la dosis por dCyd pero no por Thd. Así, dCyd actuó como un inhibidor de la fosforilación de L-dC. El cambio en la fosforilación intracelular de L-dC fue similar cuando las células HepG2 se expusieron tanto a Thd como dCyd o dCyd sola. La inhibición de la fosforilación de L-dC sólo por la desoxipirimidina natural, dCyd, sugirió que dCK estaba implicada en la fosforilación de L-dC.

25 El papel de estas actividades nucleósido pirimidina quinasas en la fosforilación de L-dC se investigó además en líneas celulares deficientes en quinasa. Hubo una disminución significativa en la cantidad de metabolitos fosforilados de L-dC en células deficientes para dCK. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la fosforilación de L-dC en células deficientes para TK1. Estos datos fueron consistentes con los estudios de competición descritos anteriormente e indicaron que dCK juega un papel crítico en la fosforilación de L-dC a L-dC-MP.

30 Usando extractos citosólicos de células HepG2 como una fuente de enzima, las cinéticas en estado estacionario para la fosforilación de L-dC, Thd, y dCyd fueron similares como se indica por los valores de la constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad inicial máxima (V_{max}) (L-dC: K_m de 5,75 mM y V_{max} de 1,12 nmoles/min/mg de proteína; Thd: K_m de 4,06 mM y V_{max} de 1,26 nmoles/min/mg de proteína; dCyd: K_m de 4,85 mM y V_{max} de 2,15 nmoles/min/mg de proteína). Además, la eficiencia de la fosforilación de L-dC, Thd y dCyd fueron similares como se define por su V_{max}/K_m correspondientes en valores (0,19, 0,31 y 0,44, respectivamente).

35 Además, el grado de fosforilación intracelular de L-dC se comparó con el de los sustratos endógenos naturales, Thd y dCyd en extractos de hígado de marmota. Esto se hizo para apoyar el ensayo antiviral en el modelo de marmota de infección crónica por el virus de la hepatitis B. La fosforilación de L-dC fue similar a la de los sustratos endógenos. Además, el nivel de fosforilación de L-dC fue comparable al de L-dC y al de los sustratos endógenos en extractos de hígado humano.

X. Actividad de los compuestos activos frente a VHB resistente a fármaco

Los β -L-2'-desoxinucleósidos, y en particular β -L-2'-desoxicitidina y β -L-2'-desoxitimidina, son inhibidores potentes y selectivos de VHB resistente a fármaco (M552V). Los recombinantes de VHB que contienen la mutación YMDD (definida como sustituciones de aminoácidos en la tirosina, metionina, aspartato, locus de unión a nucleótido aspartato de la polimerasa de VHB) pueden usarse para generar líneas celulares que expresan VHB resistente a lamivudina, aunque estos genomas son frecuentemente menos competentes para la replicación que el VHB de tipo salvaje *in vitro* (Fu y Cheng, 1998). Estos sistemas recombinantes proporcionan la mejor estrategia para abordar la cuestión de la resistencia. Se intentó determinar la actividad de LdT (IND 60.459) frente a cepas de VHB resistentes a lamivudina (mutantes YMDD) mediante el uso de ensayos de transfección transitoria usando células de hígado Huh-7, el sistema celular preferido para dichas evaluaciones, según la estrategia descrita por Ono *et al*, 2001. Sin embargo, en las células Huh-7, LdT presentó una baja actividad incluso frente a VHB de tipo salvaje. Mientras las células Huh-7 fosforilan lamivudina bastante bien, hubo una fosforilación mínima de LdT al trifosfato activo. Estos resultados se resumieron en los materiales enviados a la Agencia para el LdT End of Phase 2 Meeting (IND 60.459; Serie 024). Por lo tanto, el sistema de Ono *et al* no es apropiado para el análisis de estos fármacos.

Como una estrategia alternativa, los genomas de VHB mutado se introdujeron en células HepG2 mediante transfección transitoria. Estos experimentos de manera similar tampoco tuvieron éxito, debido principalmente a la transfectabilidad baja y variable de estas células, que impidió la obtención de valores consistentes para eficacia antiviral.

Una manera más apropiada de abordar la cuestión de la resistencia para LdT y LdC es usar líneas celulares HepG2 estables que expresan virus VHB recombinantes con genomas de tipo salvaje así como mutaciones de resistencia a lamivudina en las posiciones 552 y 515 ó 528, respectivamente. Comparado con los métodos anteriores, estas líneas celulares estables ofrecen niveles de expresión de polimerasa consistentes combinado con una buena proporción señal a ruido.

La actividad *in vitro* de los fármacos LdT (telbivudina) y LdC se determinó frente a mutantes del virus de la hepatitis B (VHB) resistentes a lamivudina. Los mutantes de VHB biológicamente relevantes (subtipo ayw) que se ha determinado que confieren resistencia a terapia con lamivudina en el entorno clínico surgen en el gen de la polimerasa y comprenden dos únicas mutaciones, M552V y M552I, encontradas en el resto del sitio activo clave YMDD así como dos dobles mutantes L515M/M552V y L515M/M552I. [El mutante L515M referido en la presente memoria es equivalente a las mutaciones L526M y L528M en el dominio B frecuentemente citadas en estudios de resistencia de VHB: la diferencia en la numeración refleja las inserciones/delecciones en la secuencia entre diferentes genotipos de VHB].

Materiales y métodos

Las construcciones de ADN recombinante correspondientes a estos mutantes resistentes a lamivudina se crearon por mutagénesis dirigida a sitio. El sistema de ensayo comprendió líneas celulares estables que portaban cada uno de los genomas mutantes transfectados, así como un genoma de VHB control de tipo salvaje. La actividad antiviral de LdT (telbivudina) y LdC, junto con los fármacos control lamivudina y PMEA, se determinó frente a genomas de VHB mutantes y de tipo salvaje en las líneas celulares de ensayo respectivas.

LdT (telbivudina) y LdC demostraron una actividad mínima frente al mutante único M552I o los mutantes dobles L515M/M552V y L515M/M552I aunque LdC alcanzó una CE_{50} frente al mutante L515M/M552V. Sin embargo, a diferencia de lamivudina, ambos fármacos retienen una actividad antiviral casi completa frente al genoma de VHB del mutante único M552V. La mutación M552V es significativamente resistente a lamivudina y se piensa que es un intermedio clave en la ruta principal para el desarrollo de resistencia exitosa a lamivudina. En los pacientes tratados con lamivudina, el mutante M552V aparece típicamente 4 a 8 semanas antes del surgimiento del doble mutante L515M/M552V altamente resistente (Gauthier *et al*, 1999), que representa según consta el 60-70% de toda la resistencia a lamivudina en pacientes con hepatitis B (Ahmed *et al*, 2000).

Estos resultados sugieren que la actividad de LdT (telbivudina) y LdC frente al mutante M552V puede ayudar a suprimir una proporción principal de surgimiento mediado por YMDD de resistencia antiviral en los pacientes. Acoplado con la mejor supresión cuantitativa de replicación de VHB observada para los pacientes tratados con LdT (comparado con receptores de lamivudina) en el ensayo clínico de Fase IIB actual, estos resultados sugieren que la resistencia de VHB a LdT mediada por YMDD probablemente es sustancialmente menos frecuente que la observada con tratamiento con lamivudina.

En estudios clínicos controlados de lamivudina (100 mg qd), administrada a pacientes infectados con VHB, la prevalencia de VHB mutante en YMDD fue 14 a 32% después de un año de tratamiento y tanto como 58% después de dos a tres años de tratamiento. El virus mutante estaba asociado con evidencia de respuesta disminuida al tratamiento respecto a pacientes tratados con lamivudina sin mutaciones YMDD.

El análisis genotípico de aislados virales obtenidos de pacientes con replicación renovada de VHB mientras recibían lamivudina sugiere que una reducción en la sensibilidad de VHB a lamivudina está asociada con mutaciones que resultan en una sustitución metionina a valina o isoleucina en el resto YMDD del dominio catalítico de la polimerasa

de VHB (posición 552) y una sustitución leucina a metionina en la posición 515 ó 528 (dependiendo del genotipo/subtipo de VHB).

5 En el momento actual, no hay un sistema de infección de VHB basado en células que pueda usarse para evaluar la actividad de agentes antivirales frente a células infectadas con aislados de VHB resistentes a lamivudina de pacientes. El modelo DHBV *in vitro* no se ha mostrado útil para seleccionar mutaciones resistentes a fármaco porque los hepatocitos primarios de pato usados en este modelo no pueden mantenerse más de unas pocas semanas en cultivo celular. La relevancia de la selección de mutantes resistentes a fármaco en el modelo de marmota *in vivo* es dudosa porque el espectro de mutantes resistentes a lamivudina en la marmota no concuerda con el identificado en pacientes infectados con VHB.

10 Los recombinantes de VHB que contienen la mutación YMDD pueden usarse para generar líneas celulares que expresan VHB resistente a lamivudina, aunque estos genomas son frecuentemente menos competentes para la replicación que el VHB de tipo salvaje *in vitro* (Fu y Cheng, 1998). Estos sistemas recombinantes proporcionan la mejor estrategia para abordar la cuestión de la resistencia. Se intentó determinar la actividad de LdT (IND 60.459) frente a cepas de VHB resistentes a lamivudina (mutantes YMDD) mediante el uso de ensayos de transfección transitoria usando células de hígado Huh-7, el sistema celular preferido para dichas evaluaciones, según la estrategia descrita por Ono *et al*, 2001. Sin embargo, en las células Huh-7, LdT presentó una baja actividad frente incluso a VHB de tipo salvaje. Investigaciones adicionales revelaron que mientras las células Huh-7 fosforilan lamivudina bastante bien, había una fosforilación mínima de LdT al trifosfato activo. Estos resultados se resumieron en los materiales enviados a la Agencia para la reunión al final de la Fase 2 para LdT (IND 60.459; Serie 024). Por lo tanto, el sistema de Ono *et al* no es apropiado para el análisis de este tipo de fármaco.

Como una estrategia alternativa, los genomas de VHB mutado se introdujeron en células HepG2 mediante transfección transitoria. Estos experimentos de manera similar tampoco tuvieron éxito, debido principalmente a la transfectorialidad baja y variable de estas células, lo que impidió la obtención de valores consistentes para eficacia antiviral.

25 Un manera más apropiada de abordar la cuestión de la resistencia para LdT y LdC es usar líneas celulares HepG2 estables que expresan virus VHB recombinantes con genomas de tipo salvaje así como mutaciones de resistencia a lamivudina en las posiciones 552 y 515 ó 528, respectivamente. Comparado con los métodos anteriores, estas líneas celulares estables ofrecen niveles de expresión de polimerasa consistentes combinado con una buena proporción señal a ruido.

30 **Ejemplo 2**

Transfecciones de células HepG2 para crear líneas celulares estables resistentes a lamivudina

Se obtuvieron células transformadas de manera estable que portan las características de genomas de VHB resistente a lamivudina y de tipo salvaje para ensayar la actividad de LdT y LdC frente a los mutantes junto con lamivudina y adefovir como controles.

35 **Medio de crecimiento de HepG2**

EMEM (Mediatech, Cat#MT 10-010-CV)

10% FBS (Mediatech, Cat#MT 35-011-CV)

1x L-Glutamina (2 mM final)

1x Penicilina-Estreptomicina (100 U.I./100 µg por ml final)

40 1x Piruvato de Na (1 mM final)

1x Aminoácidos no esenciales (NEAA, 0,1 mM final)

Medio de transfección de HepG2

EMEM (Mediatech, Cat#MT 10-010-CV)

10% FBS (Mediatech, Cat#MT 35-011-CV)

45 1x L-Glutamina (2 mM final)

1x Piruvato de Na (1 mM final)

1x NEAA (0,1 mM final)

Medio de crecimiento/selección de la línea celular estable HepG2

EMEM (Mediatech, Cat#MT 10-010-CV)

10% FBS (Mediatech, Cat#MT 35-011-CV)

1x L-glutamina (2 mM final)

5 1x Penicilina-Estreptomicina (100 U.I./µg por ml final)

1x Piruvato de Na (1 mM final)

1x NEAA (0,1 mM final)

500 µg/ml Geneticina (G-418, Life Technologies Cat# 10131)

Construcciones

10 pCMV-WT (ayw)

pCMV-M552V

pCMV-M552I

pCMV-L515M/M552V

pCMV-L515M/M552I

15 pCMV-neo

20 Todas las construcciones contienen el genoma de VHB donado detrás del promotor CMV. Los plásmidos VHB que contienen genes de polimerasa con mutación puntual se obtuvieron por mutagénesis dirigida a sitio usando pCMV-hbv como parental y un kit comercial (kit QuikChange de Stratagene, Cat.# 200518-5) como se ha descrito previamente (Allen et al., 1998). pCMVhbv (proporcionado amablemente por el Dr. C. Seeger, Fox Chase Cancer Institute) contiene un subtipo de genoma de VHB más largo ayw. La construcción que contiene una única mutación L515M no se generó, porque se piensa que esta mutación confiere sólo resistencia mínima a lamivudina; en lugar de esto funciona como una mutación compensadora (Gauthier et al, 1999).

25 El plásmido pCMV-neo se usó para conferir resistencia al antibiótico G-418 (neomicina). Este plásmido contiene el núcleo de pEGFP-N1 (Clontech Cat# 6085-1) con el casete de expresión Kan^r/Neo^r dirigido por SV40 pero sin el casete de expresión EGFP.

Preparación de las células para transfección: Las células se plaquearon en placas de 6 pocillos recubiertos con colágeno (Biocoat, Becton Dickinson, Cat-# 35-4400) a 2×10^5 células por pocillo en 3 mL de medio de crecimiento de HepG2. Las células se incubaron toda la noche a 37°C.

30 *Preparación de complejo Fugene:ADN:* Cada construcción se usó para transfectar 2 pocillos de una placa de 6 pocillos recubiertos con colágeno. Los controles incluyeron 1 pocillo que contenía la construcción de tipo salvaje pCMVhbv sin ADN pCMV-neo y 1 pocillo que contenía sólo el plásmido neo^R. Las células se transfectaron con Fugene (Roche cat#1815091) según el protocolo sugerido por el fabricante con una proporción Fugene a ADN de 3:1 (3 µl de Fugene + 1 µg de ADN plasmídico superenrollado/pocillo). Brevemente, se diluyeron 6 µL de Fugene en 200 µl de medio EMEM sin suero en un tubo de microcentrífuga. Se añadieron 2 µg del ADN plasmídico de VHB respectivo junto con 0,2 µg de ADN pCMVneo. La disolución se mezcló cuidadosamente y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

40 *Transfección de las células:* Las placas de 6 pocillos se aspiraron y se alimentaron con 2 ml de medio de transfección de HepG2. La disolución de complejo Fugene:ADN se añadió lentamente a las células mientras se movía con rotación la placa para dispersar uniformemente la disolución. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se añadió medio de crecimiento/selección de la línea celular estable HepG2.

Ejemplo 3

Selección de colonias y subclones de la línea celular estable

45 Las células transfectadas se alimentaron dos veces a la semana durante 2 semanas y 1/2 hasta que se formaron colonias daras resistentes a G418. Las colonias que parecieron ser "clonales" (no en contacto con ninguna otra colonia) se tomaron de la placa de 6 pocillos con una punta de pipeta y se pusieron en una placa de colágeno de 96 pocillos BD en 150 µL de medio de crecimiento/selección de la línea celular estable HepG2. Se tomaron 16 colonias por construcción.

El medio se cambió cada 3-4 días. Las colonias que expresaban VHB se identificaron mediante el ensayo de 100 µl de sobrenadante de cultivo para la presencia de HBeAg mediante ELISA (véase más adelante). Las colonias positivas se subclonaron por dilución limitante en placas de 96 pocillos de colágeno y el sobrenadante del cultivo se cribó por ELISA 2 semanas después (el medio se cambió cada 3-4 días). Los pocillos positivos se expandieron, se prepararon preparaciones madre congeladas y la línea celular se subclonó de nuevo por dilución limitante y el sobrenadante del cultivo se cribó por ELISA 2 semanas después.

Ejemplo 4

Ensayo de las líneas celulares transfectadas de manera estable

Los clones de la línea celular estable se cribaron para la expresión del genoma viral por dos ensayos. El primer ensayo fue un ensayo ELISA semi-cuantitativo que mide la producción de antígeno e del virus de la hepatitis B (HBeAg), una proteína viral marcadora que se correlaciona bien con la replicación viral. Las líneas celulares que produjeron altos niveles de HbeAg se ensayaron para la producción de genomas virales replicativos usando el ensayo de polimerasa endógena.

ELISA de HbeAg del sobrenadante de cultivo de la línea celular estable: El anticuerpo de captura fue un mAb anti-HBeAg de ratón usado a 10 µg/ml. Se usaron 100 µl de sobrenadante del cultivo directamente de la placa de cultivo celular de 96 pocillos. El anticuerpo de detección fue un anticuerpo policlonal (conejo) anti-HBc/eAg (DAKO, Cat# B0586) a una dilución 1:3.000 en 10% FCS/TNE). Se usó anti-IgG de conejo de cabra conjugada con peroxidasa (1:10.000; Zymed Cat# 81-6120) para revelar y el sustrato fue o-fenilendiamina (Zymed Cat# 00-2003) en tampón citrato/fosfato. El revelado se paró con 2N Na₂SO₄ antes de la lectura de densidad óptica (D.O.) a 490nm en un lector de placas Fusion (Packard Instruments).

Ensayo de polimerasa endógena (EPA) del lisado celular. Las células se crecieron en placas de colágeno de 12 pocillos hasta el 100% de confluencia durante 3-4 días y los lisados citosólicos se prepararon en 1ml de 50mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0,2%NP-40. Los EPA se realizaron esencialmente como se describe (Seifer et al., 1998). Brevemente, las nucleocápsides de VHB intracelulares se inmunoprecipitaron de los lisados citoplásmicos toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo anti-HBc/eAg (DaKo Cat# B0586) y se inmovilizaron en lechos de sefarsa de proteína A CL-4B (Amersham Pharmacia Cat# 17-0780-01). Las cápsides inmovilizadas se lavaron, las reacciones de polimerasa endógena se iniciaron en un volumen de reacción de 50 µl que contenía 50mM Tris-HCl pH7,4, 75mM NH₄Cl, 1mM EDTA, 20mM MgCl₂, 0,1 mM β-ME, 0,5%NP-40, 100 µM dGTP, TTP, dCTP, frío y 50 nM ³³P-dATP (Perkin Elmer Life Sciences Cat# NEG 612H), y se incubó toda la noche a 37°C. Después de digestión con 1 mg/ml de Proteinasa K (Roche, Cat# 1373196) durante 1 h a 37°C, se liberó el ADN de VHB marcado con ³³P mediante extracción con fenol/cloroformo. Los ácidos nucleicos se precipitaron finalmente con volúmenes iguales de 5M NH₄-acetato y 2,5 volúmenes de 100% EtOH y se separaron en un gel de agarosa nativo 1% en tampón Tris-borato. Los geles se fijaron con 7% TCA, se secaron, o se transfirieron a una membrana de nilón cargada positivamente (Pall Biodyne Plus Cat# 60406) toda la noche a temperatura ambiente mediante transferencia capilar en 0,4 N NaOH. Los geles/membranas secados se expusieron a una pantalla phosphorimager (Molecular Dynamics) toda la noche a temperatura ambiente, se escanearon (Storm 860, Molecular Dynamics) y se cuantificaron con software ImageQuant (Molecular Dynamics).

Las líneas celulares clonales que se seleccionaron por tener alta expresión de HBeAg así como alto nivel de producción de genomas replicativos se designaron como sigue:

Línea celular	Virus
WT3/C1	Tipo salvaje (ayw)
V1/C9	M552V
I2	M552I
MV5/B3	L515M/M552V
MI4	L515M/M552I

Ejemplo 5

Ensayo antiviral

LdT (telbivudina, Idenix), LdC-HCl (Idenix), Lamivudina (Moravec) y PMEa (Moravec)

PMEa es el componente activo del profármaco adefovir.

Se sembraron placas de colágeno I de 12 pocillos Biocoat (Becton Dickinson Cat#35-4500) con células a una densidad de 0,5-1x10⁶ células por pocillo en 2 ml de DMEM que contenía 5% FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U.I. penicilina/100 µg/mL estreptomina, y 0,5mg/mL G-418.

Las diluciones de fármaco se prepararon en fresco en 100% DMSO como preparaciones madre 200x. Para cada experimento, se almacenaron 4 alícuotas de cada serie de dilución del fármaco a -20°C hasta su uso. Una vez las células alcanzan la confluencia, se inicia el tratamiento con el fármaco añadiendo 10 µL de la dilución del fármaco a 2 ml de DMEM + 5% FBS fresco. Así, la concentración final de DMSO no excede el 0,5%. El pocillo control sin fármaco recibe sólo 10 µl de DMSO. Las células se tratan en días alternos con 2 mL de fármaco/medio fresco durante un total de 8 días. Los lisados celulares se recogen en el día 10 como se describe a continuación:

Aspirar el medio y lavar la monocapa de células cuidadosamente una vez con 1 mL de PBS.

Añadir 1 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5/150 mM NaCl/5 mM MgCl₂/0,2% NP-40). Almacenar en hielo durante 30 min a 4 h.

10 Recoger las células lisadas. Transferir a tubos de microfuga de 1,5 ml.

Aclarar el lisado centrifugando durante 5 min a RT y 14.000 rpm.

Transferir el lisado aclarado a tubos frescos. Congelar rápidamente en nieve carbónica y almacenar a -80°C hasta que se esté listo para continuar con los ensayos de polimerasa endógena esencialmente como se ha descrito anteriormente.

15 Las CE₅₀ se generaron a partir de los datos de phosphorimager por ajuste de curva usando software Xifit.

La **Tabla 24** resume los resultados obtenidos cuando LdT y LdC, así como los controles de lamivudina y PMEA, se ensayaron para actividad frente a los diferentes genomas de VHB mutantes y de tipo salvaje expresados en células HepG2 transfectadas de manera estable. Las actividades antivirales se presentan en la **Tabla 24a**. Los valores de CE₅₀ obtenidos para los diferentes fármacos frente al virus de tipo salvaje generalmente concuerdan bien con los valores reportados en la bibliografía, excepto que el valor medio de CE₅₀ para LdT es mayor que el valor típico de aproximadamente 200 nM observado en la mayor parte de nuestros estudios anteriores. La actividad antiviral de LdT en cultivo celular es bastante variable y la potencia de LdT en ensayos de cultivo celular no parece ser predictiva de la eficacia observada en pacientes en el entorno clínico.

25 Respecto a la actividad observada frente a mutantes resistentes a lamivudina, PMEA retuvo una actividad significativa frente a todos los mutantes de acuerdo con reportes previos (véase Gilead FDA briefing document, 2002). Frente a los dos dobles mutantes o el único mutante M552I, LdT, LdC y lamivudina fueron altamente inactivos (CE₅₀ > 1 mM), aunque LdC mostró una actividad marginal frente al mutante L515M/M552V con una CE₅₀ de aproximadamente 780 µM. El descubrimiento principal del presente estudio fue que LdT y LdC retuvieron una actividad casi completa frente al mutante único M552V, mientras la actividad de la lamivudina frente a este mutante disminuyó significativamente.

35 El efecto de los mutantes resistentes a lamivudina en la eficacia observada de los fármacos puede observarse mejor a partir del análisis de veces de resistencia presentado en la **Tabla 24b**. Los resultados obtenidos en este estudio están muy de acuerdo con estudios previos (como se resume en el Gilead FDA Advisory Committee Briefing Document, 2002). No está claro a partir de la **Tabla 24b** que LdT, LdC y lamivudina muestren veces de resistencia sustanciales cuando se ensayan frente a los dobles mutantes o el mutante único M552I. Sin embargo, el estado del mutante único M552V es muy diferente. LdT y LdC presentan una actividad antiviral esencialmente invariable frente a este mutante, con cambios en las veces de resistencia respectivas de 1,2 y 2,1 veces, mientras lamivudina muestra una resistencia de 24,8 veces en nuestras manos y una resistencia de 153 veces según el grupo Glaxo (Allen et al, 1998).

40 Tanto LdT como LdC fueron relativamente inactivos frente a las cepas de VHB doble mutantes encontradas comúnmente en los pacientes con hepatitis B con resistencia a lamivudina establecida. Si estos resultados *in vitro* son predictivos de la actividad clínica, entonces los resultados sugieren que LdT y el profármaco LdC que se están investigando actualmente en clínica pueden tener una actividad anti-VHB mínima en pacientes con resistencia a lamivudina establecida, que portan las cepas de VHB doble mutantes. Sin embargo, dos reportes de resumen recientes en la bibliografía han resaltado el problema que resulta con transfectantes de laboratorio que algunas veces tienen un valor predictivo bajo respecto a la actividad en la clínica. Un informe de los virólogos de Gilead (Delaney *et al.*, 2001) sugirió una actividad *in vitro* mínima para entecavir frente a cepas de VHB mutantes YMDD, mientras otro resumen en la misma reunión (AASLD 2001) describió los resultados de un gran estudio prospectivo realizado por el esponsor de entecavir (Bristol Myers Squibb), en el que el tratamiento con entecavir produjo reducciones sustanciales de ADN de VHB en pacientes con hepatitis B resistentes a lamivudina (REF xxx). Así, a la vista del valor predictivo clínico problemático para los resultados de laboratorio relacionados con VHB, puede ser deseable realizar un estudio clínico pequeño para LdT (y LdC) en pacientes con VHB resistente a lamivudina, a pesar de la actividad mínima *in vitro* para estos dos compuestos frente a cepas de VHB doble mutantes.

55 Los estudios demostraron una actividad anti-viral esencialmente inalterada para LdT y LdC frente al mutante de VHB M552V, a diferencia de lamivudina. La mutación M552V es crítica para el desarrollo de resistencia a lamivudina, ya que se piensa que es la primera etapa en la ruta que da lugar al doble mutante M515L/M552V, que representa el 60-70% de resistencia a lamivudina en pacientes con hepatitis B (Ahmed et al, 2000). Este descubrimiento *in vitro* es

importante para la comprensión global del perfil de resistencia potencial de LdT (telbivudina), ya que la actividad frente a la mutación clave M552V puede ayudar a suprimir el surgimiento de resistencia viral en pacientes con hepatitis B que se están tratando con LdT (telbivudina).

5 Aunque pueden establecerse patrones clínicos de resistencia antiviral sólo a partir de ensayos clínicos, la actividad inalterada de LdT y LdC frente a los mutantes de VHB M552V, acoplada con la mejor supresión cuantitativa de la replicación de VHB observada para pacientes tratados con LdT en el estudio clínico de Fase IIB actual, sugiere que la resistencia de VHB mediada por YMDD a LdT probablemente sea sustancialmente menos frecuente de lo que se observa con tratamiento con lamivudina.

10 **Tabla 24.** Perfil de inhibición [(a) eficacia antiviral; y (b) veces de resistencia] de LdT, LdC, Lamivudina y PMEA frente a virus VHB de tipo salvaje y mutantes resistentes a lamivudina derivados de líneas celulares estables según se determina por EPA de nucleocápsides intracelulares.

Tabla 24a. Eficacia antiviral

Línea Celular	Virus	Fármaco			
		LdT	LdC-HCl	Lam	PMEA
		CE ₅₀ (µM)	CE ₅₀ (µM)	CE ₅₀ (µM)	CE ₅₀ (µM)
WT3/C1	WT (ayw)	0,65 ± 0,28	0,18 ± 0,09	0,05 ± 0,03	0,33 ± 0,17
V1/C9	M552V	0,85 ± 0,48	0,36 ± 0,13	0,96 ± 0,36	1,02 ± 0,22
I2	M552I	≥1.000	≥1.000	≥1.000	1,6 ± 1,12
MV5/B3	L515M/M552V	≥1.000	777 ± 99	≥1.000	0,62 ± 0,3
MI4	L515M/M552I	≥823 ± 307	≥1.000	≥1.000	1,49 ± 0,3

Tabla 24b Veces de resistencia

Línea Celular	Virus	Fármaco			
		LdT	LdC-HCl	Lam	PMEA
		X Resist.	X Resist.	X Resist.	X Resist.
WT3/C1	WT (ayw)	1	1	1	1
V1/C9	M552V	1,2 ± 0,4	2,1 ± 0,5	24,8 ± 17,8	3,8 ± 2,3
I2	M552I	≥1.360 ± 363	≥6.733 ± 4.245	≥22.922 ± 9.063	4,6 ± 3,0
MV5/B3	L515M/M552V	≥1.360 ± 363	≥5.051 ± 2.717	≥22.922 ± 9.063	3,3 ± 2,9
MI4	L515M/M552I	≥1.049 ± 226	≥6,733 ± 4.245	≥22.922 ± 9.063	3,6 ± 1,1

15

Todos los números en ambas tablas representan valores medios +/- SD obtenidos a partir de tres a cuatro experimentos independientes.

CE₅₀= concentración efectiva que reduce la producción de virus un 50% en cultivo celular

Veces de resistencia= CE₅₀ para el VHB mutante dividido por la CE₅₀ para el VHB de tipo salvaje

20 Ahmed SNS, Tavan D, Pichoud C, et al. "Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B." *Hepatology* **2000**, 32, 1078-1088.

Allen MI, Deslauriers M, Webster A, et al. "Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine." *Hepatology* **1998**, 27 (6), 1670-1677.

25 Delaney WE, Huijing Y, Westland CE, et al. "In vitro cross resistance testing of adefovir, entecavir, and β-L-thymidine (L-DT) against drug-resistant strains of HBV." *Hepatology* **2001**, 34 (No.4, Pt 2), 628A, abstract #1825.

Fu L y Cheng, YC. "Role of additional mutations outside the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase in L(-)SddC (3TC) resistance." *Biochem Pharmacol.* **1998**, *55*, 1567- 1572.

Gauthier J, Bourne EJ, Lutz, MW et al. "Quantitation of hepatitis B viremia and emergence of YMDD variants in patients with chronic hepatitis B treated with lamivudine." *J. Infectious Dis* **1999**, *180*, 1757-62.

5 Gilead FDA Advisory Committee Briefing Document. "Adefovir dipivoxil for the treatment of chronic hepatitis B." NDA 21-449. Tabla 1 p12. 5 julio, 2002

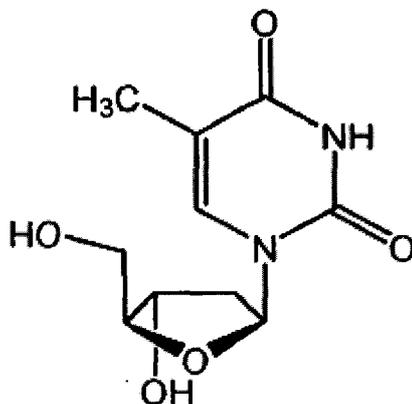
Ono SK, Kato N, Shiratori Y, et al, "The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance." *J. Clin Invest.* **2001**, *107*, 449-455.

10 Seifer M, Hamatake R, Bifano M, Standing DN. "Generation of replication-competent hepatitis B virus nucleocapsids in insect cells." *J. Virol.* **1998**, *72*, 2765-2776.

Esta invención se ha descrito con referencia a sus realizaciones preferidas. Las variaciones y modificaciones de la invención serán obvias para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada anterior de la invención. Se pretende que todas estas variaciones y modificaciones estén incluidas en el alcance de esta invención

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un huésped infectado con una forma resistente a fármaco del virus de la hepatitis B que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa, que comprende un compuesto β -L-2'-desoxinucleósido de la fórmula:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable, o éster 3' ó 5'-aminoácido, incluyendo el éster L-valinil de éste; en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

2. Una composición farmacéutica para uso según se reivindica en la reivindicación 1 en el que dicha forma resistente a fármaco del virus de la hepatitis B que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa es una forma resistente a lamivudina del virus de la hepatitis B que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa.

3. La composición farmacéutica para uso según se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2 que comprende además una cantidad efectiva de uno o más otros agentes anti-virus de la hepatitis B (anti-VHB), en el que los otros agentes anti-VHB se seleccionan del grupo que consiste en 3TC (2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina), FTC (β -2-Hidroximetil-5-5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatolano), L-FMAU (2'-fluoro-5-metil- β -L-arabinofuraniluridina), DAPD ((-)- β -D-2,6-diaminopurina dioxolano), DXG ((-)-beta-D-Dioxolano guanina), famciclovir, penciclovir, BMS-200475 (2-amino-1,9-dihidro-9-[(1S,3R,4S)-4-hidroxi-3-(hidroximetil)-2-metilenclopentil]-6H-puirin-6-ona, monohidrato), bis pom PMEA (adefovir, dipivoxil, o ácido {2-(6-amino-9H-purin-9-il)etoxi}metilfosfónico), lobucavir, ganciclovir, tenofovir, Lfd4C (β -L-5-fluoro-2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxicitidina), foscarnet (fosfonoformato trisodio), isoprinosina, levamizol, N-acetilcistina (NAC), interferón, interferón pegilado, ISS ("Secuencia inmunoestimuladora"), ribavirin, PC1323 (ácido disulfónico de batocuproína) y ácido poliadencíclico poliuridílico.

4. La composición farmacéutica para uso según se reivindica en la reivindicación 3 en la que al menos uno de los agentes anti-VHB es interferón.

5. La composición farmacéutica para uso según se reivindica en la reivindicación 4 en la que el interferón se selecciona del grupo que consiste en interferón alfa, interferón alfa pegilado, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2b pegilado, ROFERON®-A (interferón alfa-2a), PEGASYS® (interferón alfa-2a pegilado), INTRON®A (interferón alfa-2b), PEG-INTRON® (interferón alfa-2b pegilado), interferón beta, interferón gamma, interferón tau, interferón omega, interferón de consenso, INFERGEN (interferón alfacon-1), OMNIFERON (interferón natural), REBIF (interferón beta-1a), interferón omega, interferón alfa oral, interferón gamma-1b, SuperFeron (IFN-alfa multi-subtipo humano natural), y HuFeron (IFN-beta humano).

6. Uso de la composición farmacéutica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3-5 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un huésped infectado con una forma resistente a fármaco de VHB que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa.

7. El uso según la reivindicación 6 en el que dicha forma resistente a fármaco de VHB que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa es una forma resistente a lamivudina del virus de la hepatitis B que presenta una mutación en el codón 552 de metionina a valina en la región de la ADN polimerasa.

8. El uso de la reivindicación 6 o reivindicación 7 o la composición para uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el huésped es un mamífero.

9. El uso o composición para uso según se reivindica en la reivindicación 8 en el que el huésped es un ser humano.

Figura 1a Síntesis de ésteres 3'-valinil de 2'-desoxi- β -L-citidina

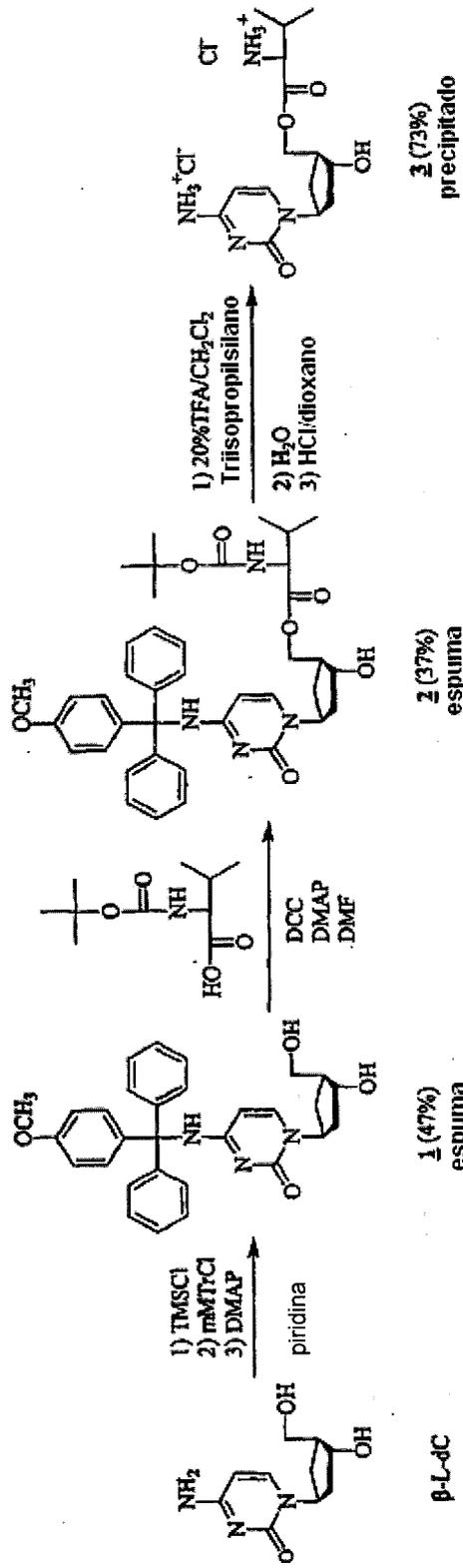


Figura 1b Síntesis de ésteres 5'-valinil de 2'-desoxi- β -L-citidina

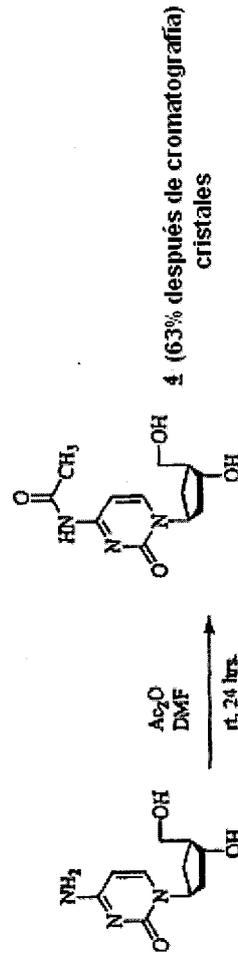


Figura 2 Síntesis de N^4 -acetil-2'-desoxi- β -L-citidina

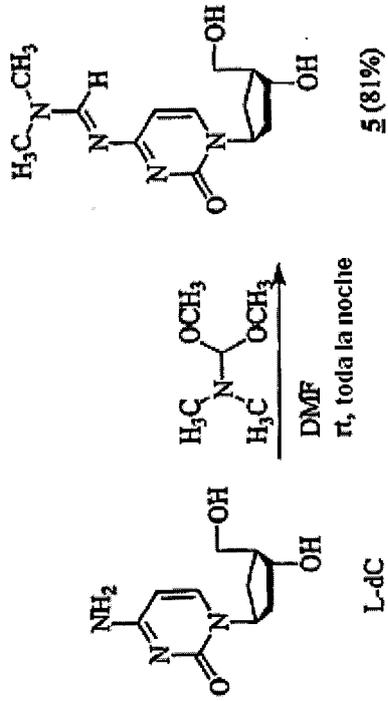


Figura 3 Síntesis de N^N -[(dimetilamino)metilén]-2'-desoxi- β -L-citridina

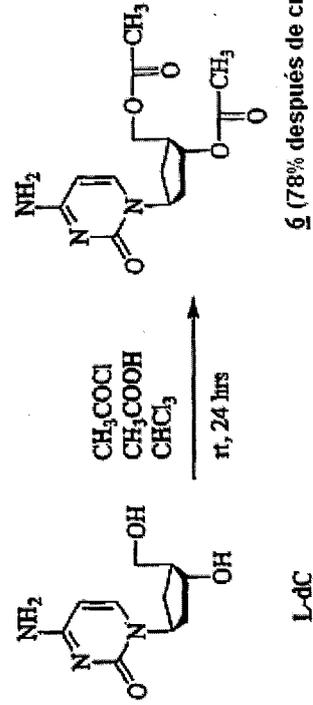


Figura 4 Síntesis de 3',5'-di-O-acetil-2'-desoxi- β -L-citridina

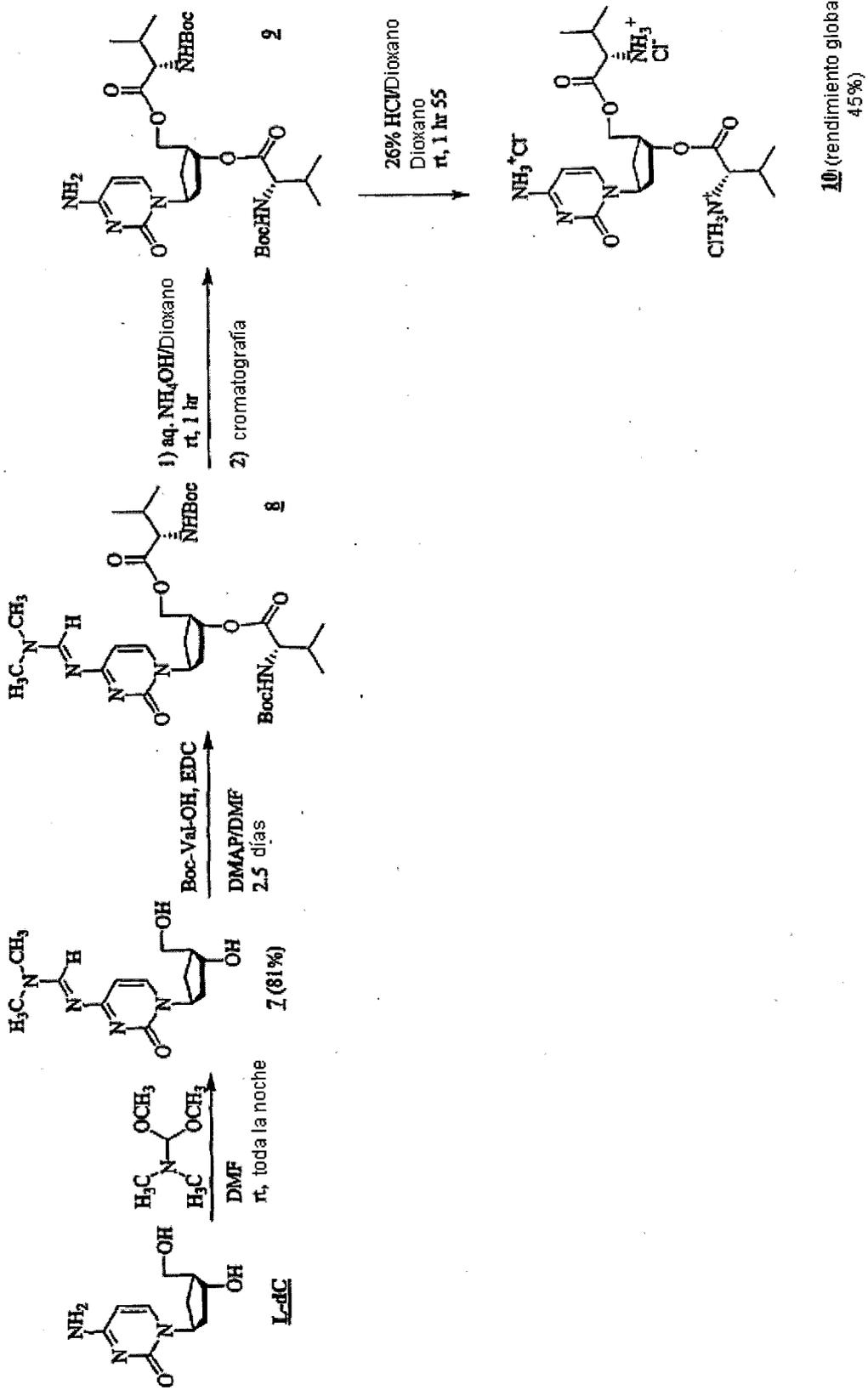


Figura 5 Síntesis de ésteres 3,5'-di-O-valinil de 2'-desoxi-β-L-citidina

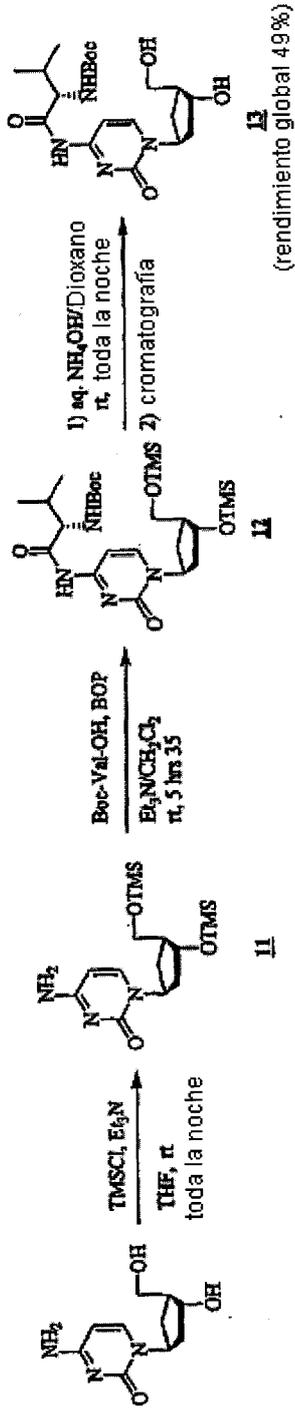


Figura 6 Síntesis de éster N^4 -Boc-valinil de 2'-desoxi- β -L-citidina

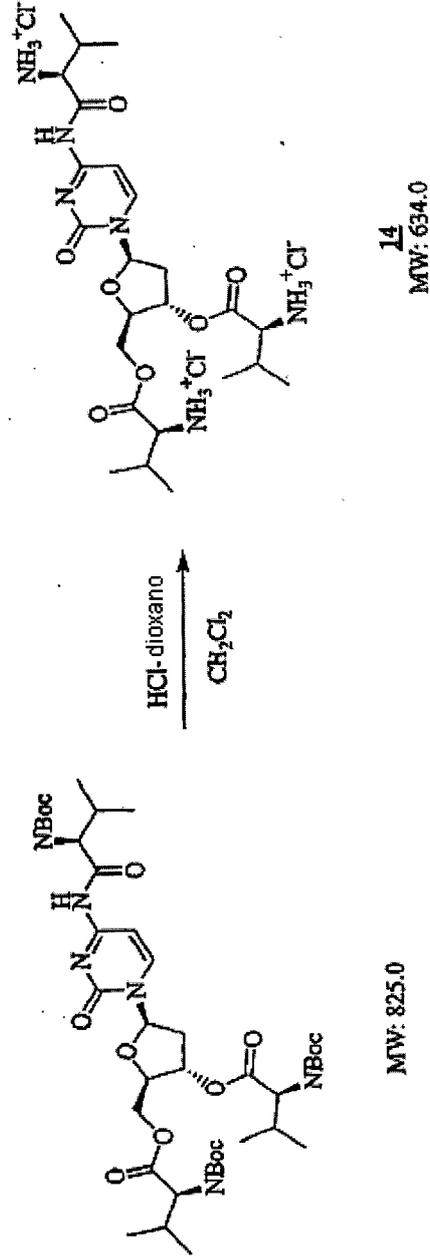


Figura 7 Síntesis de 3',5'- N^4 -tri-(L-valinil)-L-2'-desoxicitidina

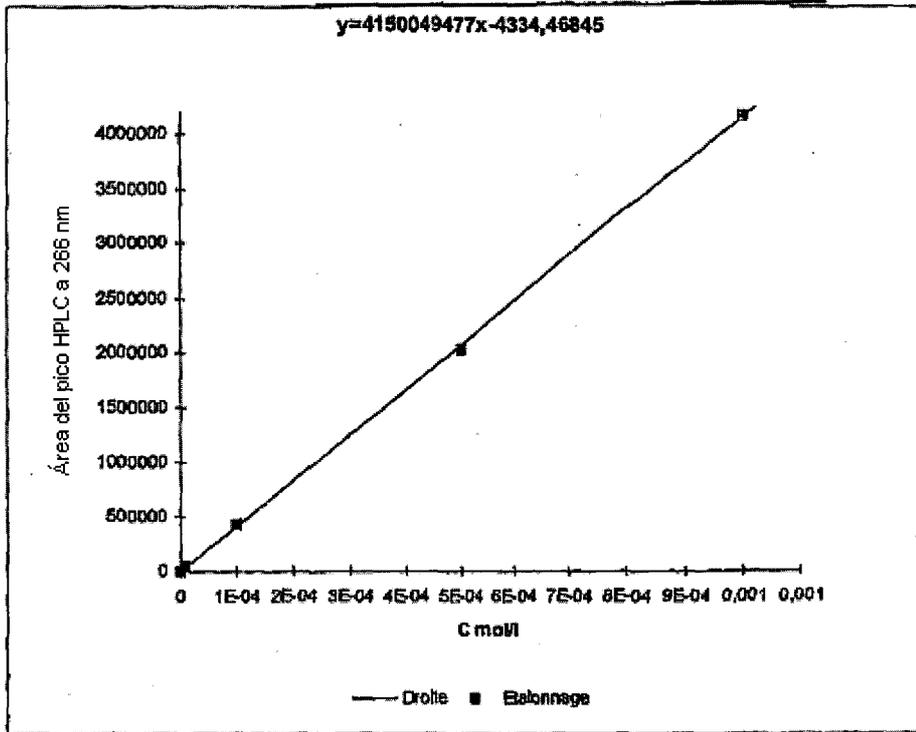


Figura 8a Curva de Calibración de Solubilidad para D-dC

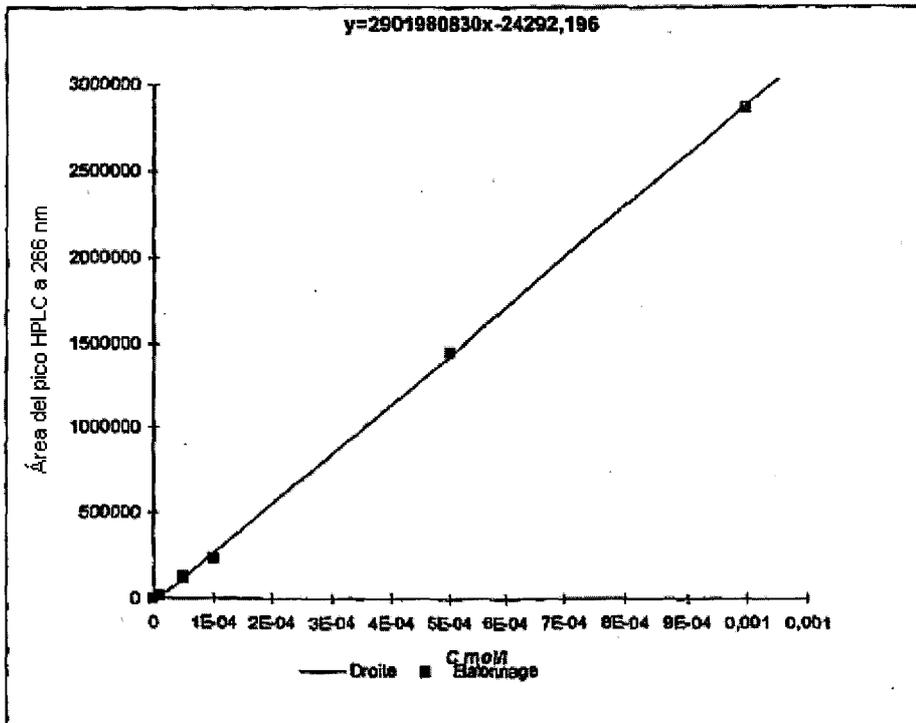


Figura 8b Curva de Calibración de Solubilidad para el Éster 3',5'-Divalinil de L-dC

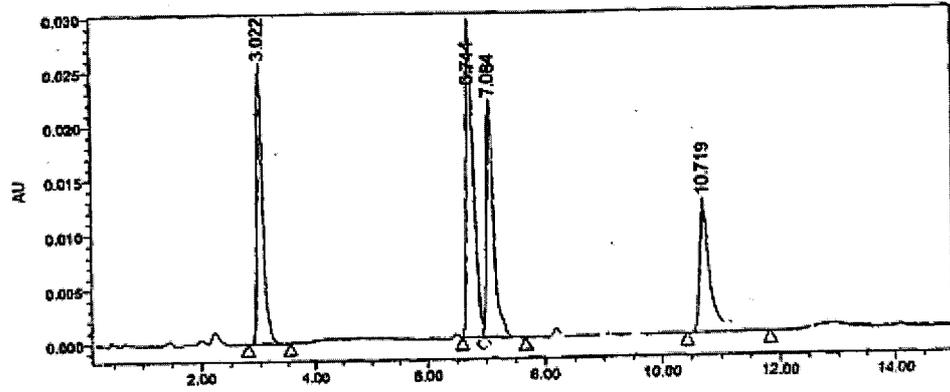


Figura 9a Perfil de HPLC - 7,5 horas a pH de 7,42

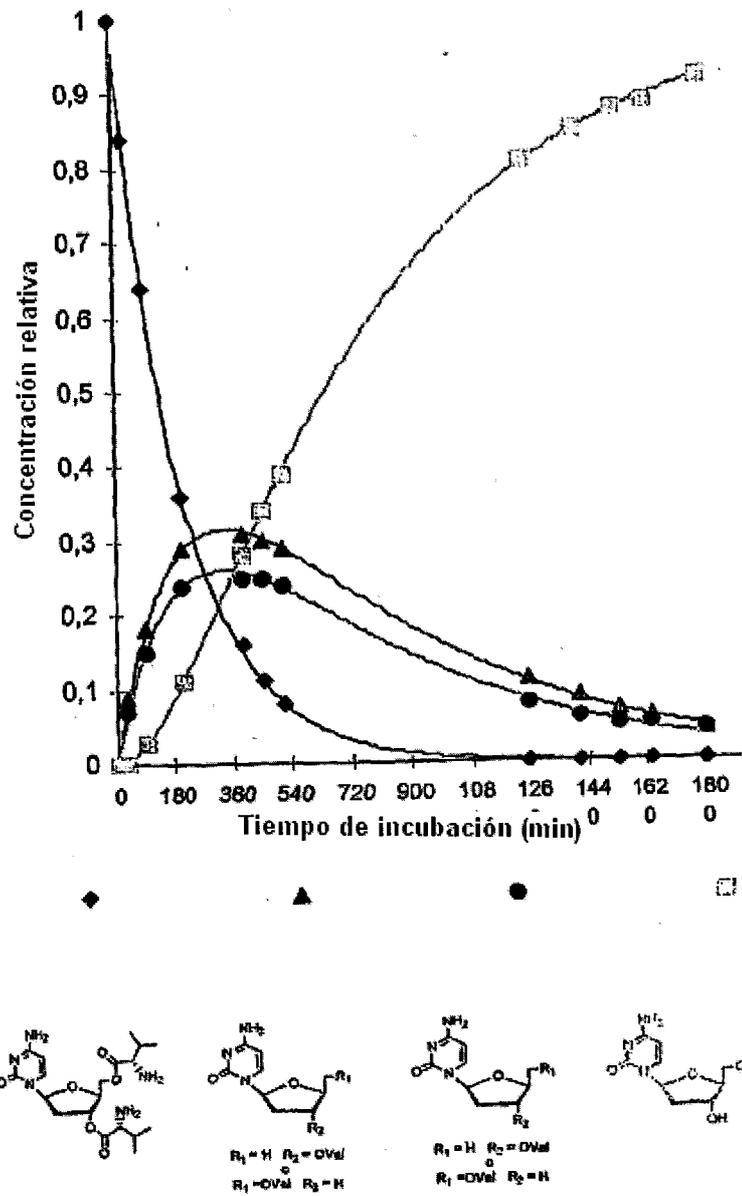


Figura 9b Curvas de cinética a pH de 7,42

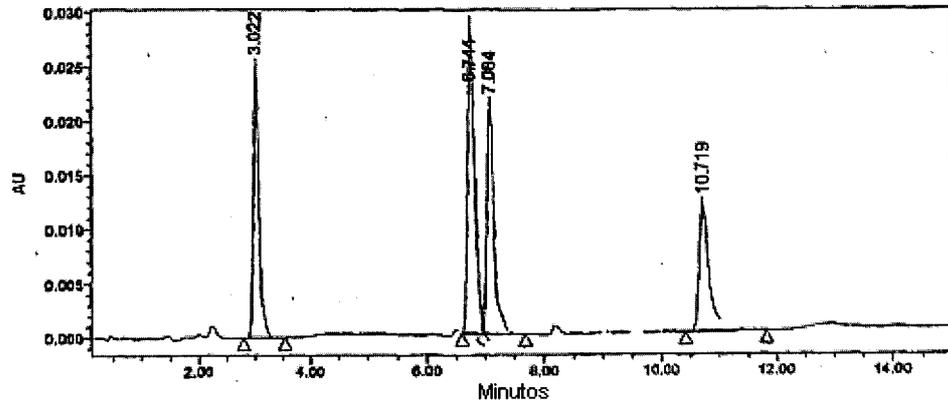


Figura 10a Perfil de HPLC - 5,33 horas a pH de 7,20

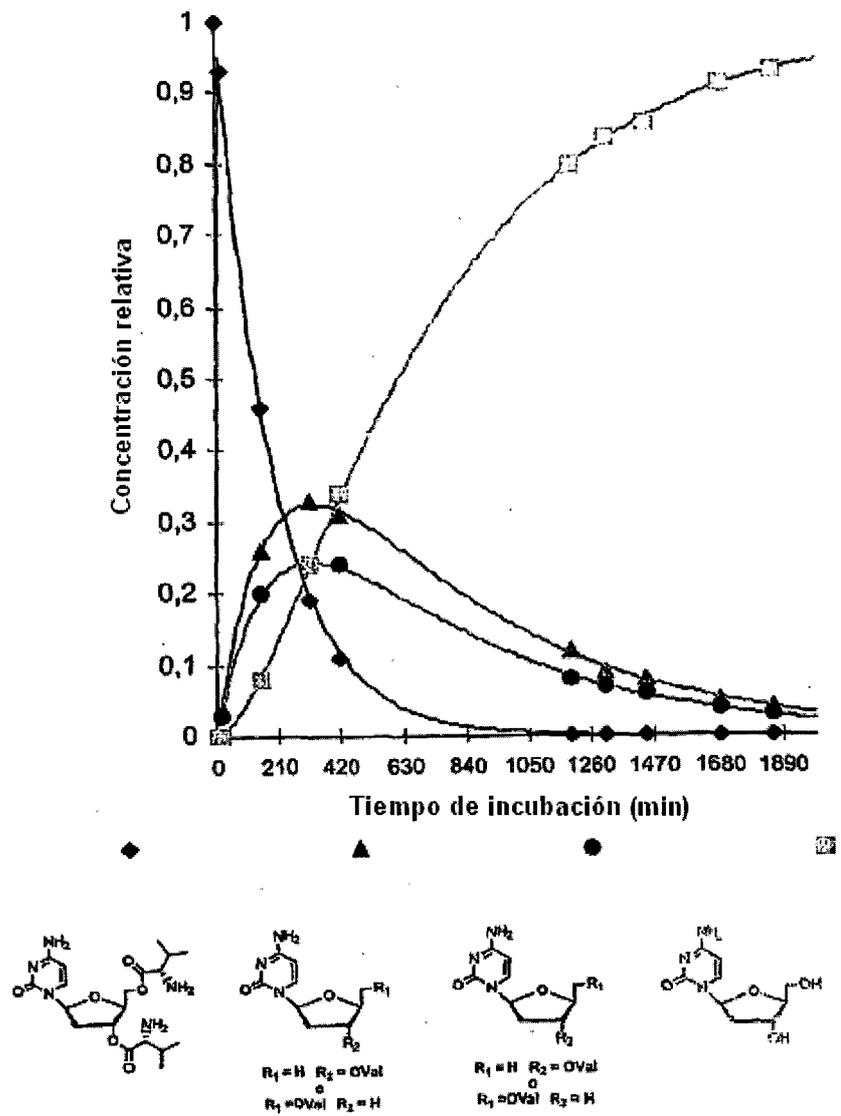


Figura 10b Curvas de Cinética a pH de 7,20

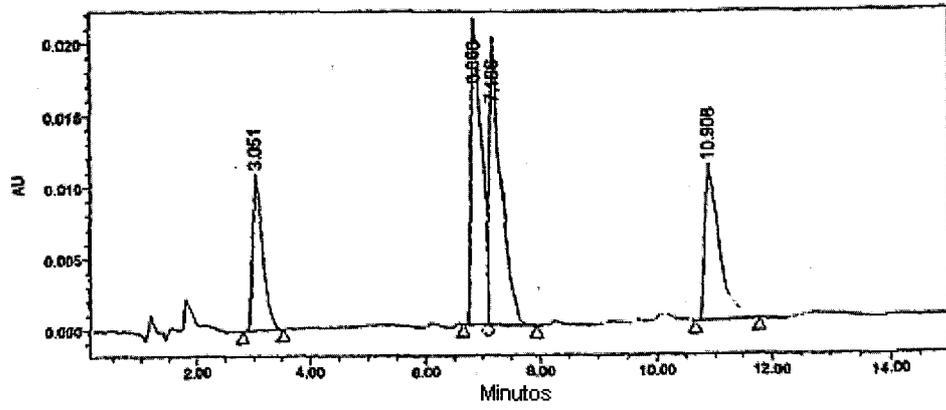


Figura 11a Perfil de HPLC - 95,7 horas a pH de 4,51

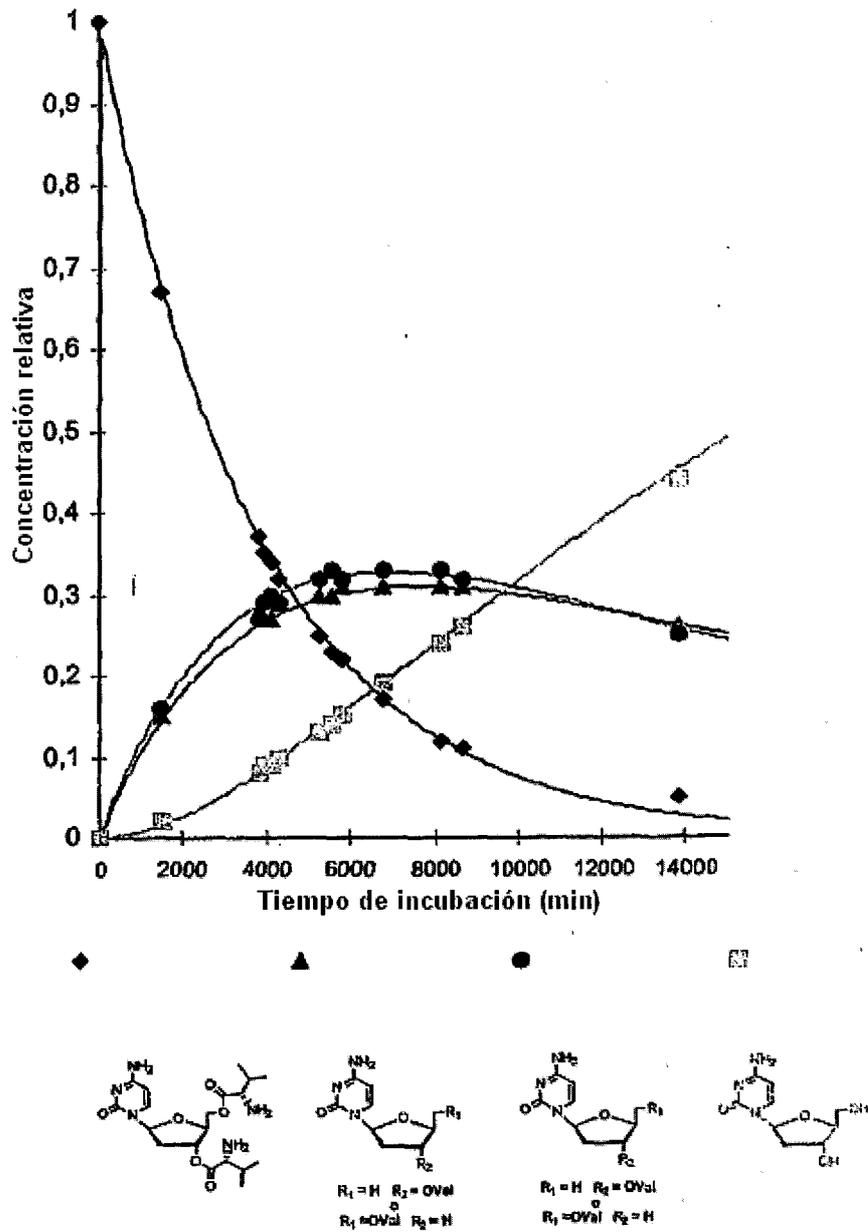


Figura 11b Curvas de cinética a pH de 4,51

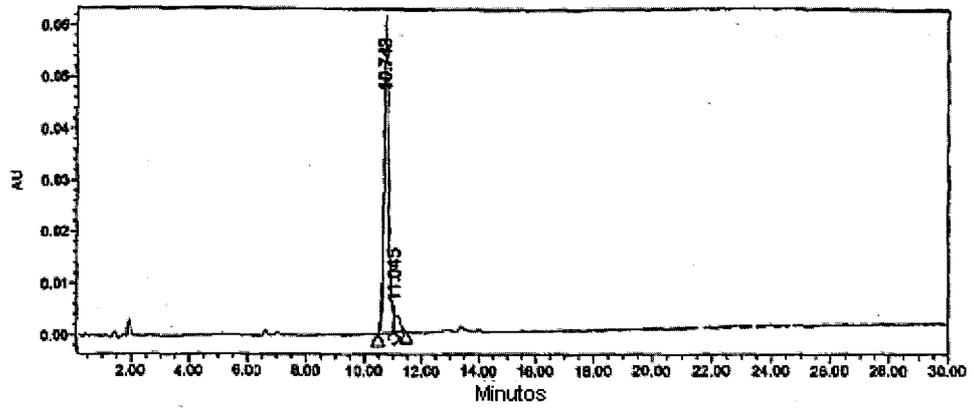


Figura 12 Perfil de HPLC - 48 horas a pH de 1,23

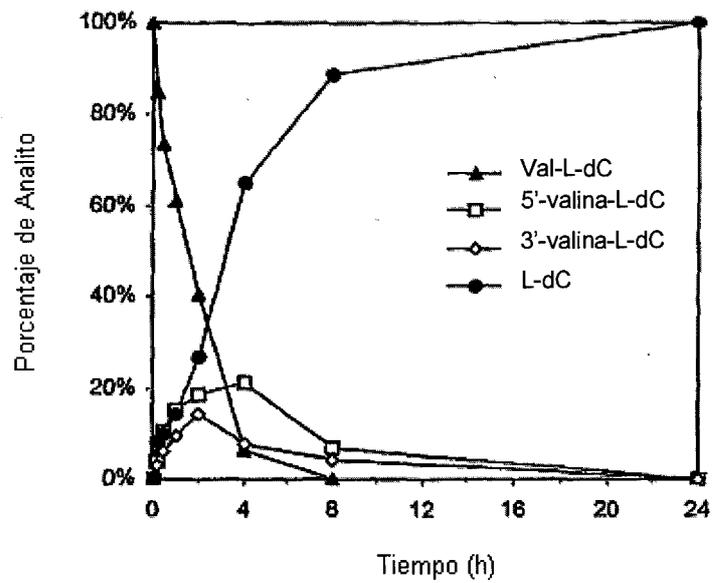


Figura 13 Metabolismo *in vitro* de 3',5'-Dival-L-dC en Plasma Humano

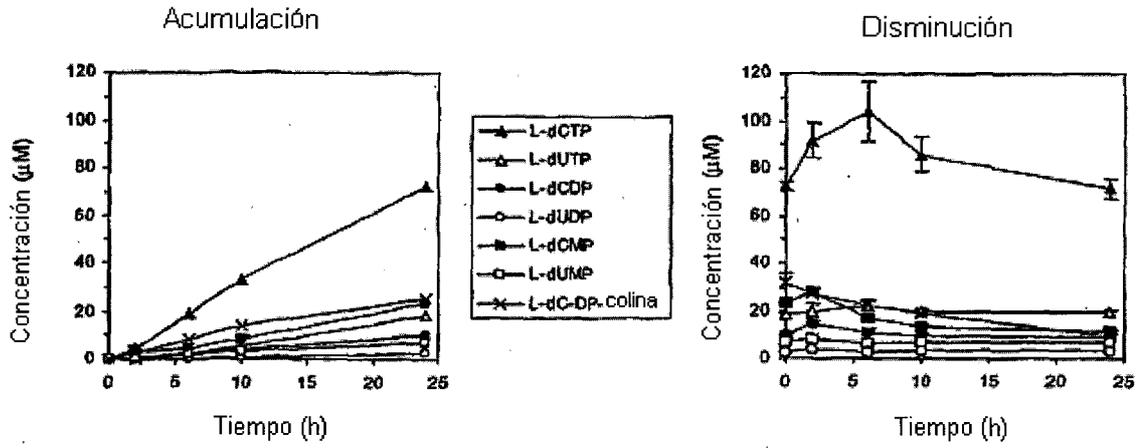


Figura 14 Metabolismo Intracelular de L-dC en Células HepG2

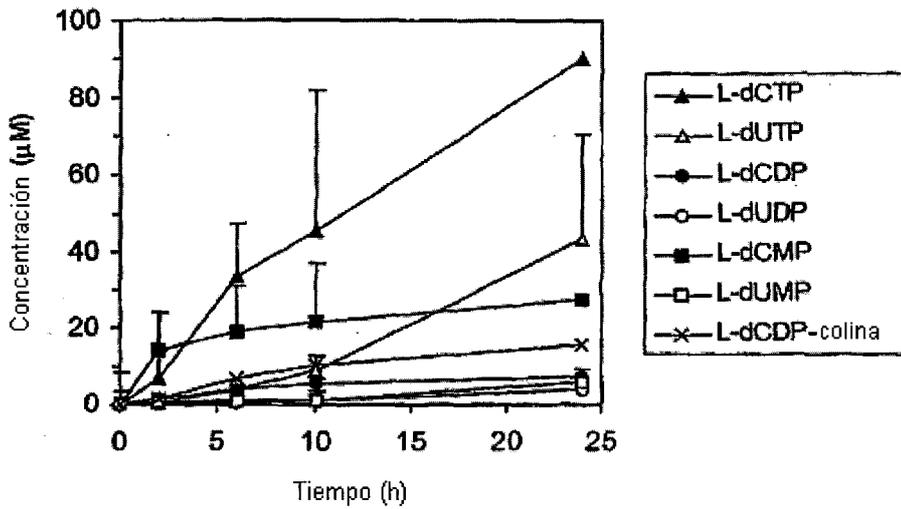


Figura 15 Metabolismo Intracelular de L-dC en Hepatocitos Primarios Humanos

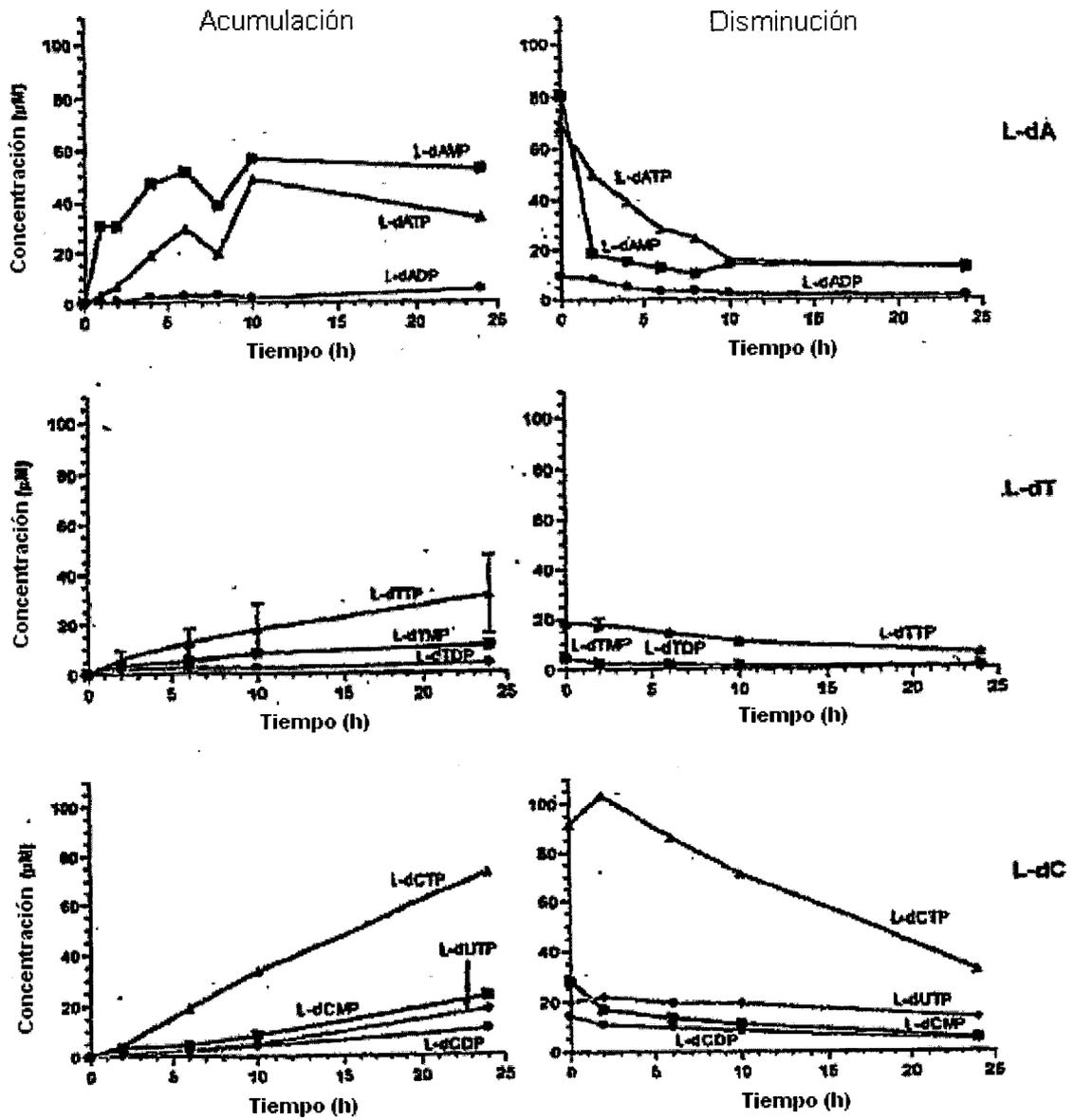


Figura 16 Acumulación y Disminución de L-dA, L-dT, y L-dC en células HepG2