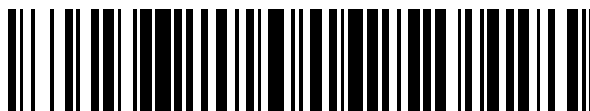


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 174**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4725** (2006.01)

**A61K 31/4178** (2006.01)

**A61K 31/55** (2006.01)

**A61P 31/12** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2011 PCT/US2011/046285**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2012 WO12018829**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2011 E 11815206 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2600835**

54 Título: **Combinaciones de inhibidores del virus de la hepatitis C**

30 Prioridad:

**06.08.2010 US 371399 P**

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

**05.10.2018**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB HOLDINGS IRELAND  
(100.0%)  
Hinterbergstrasse 16  
6312 Steinhausen, CH**

72 Inventor/es:

**GAO, MIN;  
GARDINER, DAVID F.;  
LEMM, JULIE A.;  
MCPHEE, FIONA y  
VOSS, STACEY A.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 685 174 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

Combinaciones de inhibidores del virus de la hepatitis C

5 La presente divulgación se refiere en general a compuestos antivirales y, más específicamente, se refiere a combinaciones de compuestos que pueden inhibir el virus de la hepatitis C (VHC), a composiciones que comprenden dichos compuestos, y a su uso en el tratamiento de la hepatitis C usando dichas combinaciones.

10 El VHC es un importante patógeno humano que infecta a aproximadamente 170 millones de personas en todo el mundo, aproximadamente cinco veces más que el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. Una fracción considerable de estos individuos infectados por el VHC desarrolla una enfermedad hepática progresiva grave, que incluye cirrosis y carcinoma hepatocelular.

15 El VHC es un virus de ARN de cadena positiva. Basándose en una comparación de la secuencia de aminoácidos deducida y la gran similitud en la región 5' no traducida, el VHC se ha clasificado como un género separado en la familia Flaviviridae. Todos los miembros de la familia Flaviviridae son viriones con envuelta que contienen un genoma de ARN de cadena positiva que codifica todas las proteínas específicas de virus conocidas a través de la traducción de un marco de lectura abierto único e ininterrumpido.

20 Se encuentra una considerable heterogeneidad dentro de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos codificada en todo el genoma del VHC debido a la alta tasa de errores de la ARN polimerasa dependiente del ARN codificada que carece de capacidad de corrección de pruebas. Se han caracterizado al menos seis genotipos principales, y se han descrito más de 50 subtipos con distribución en todo el mundo. El significado clínico de la heterogeneidad genética del VHC ha demostrado una propensión a que surjan mutaciones durante el tratamiento de monoterapia; por lo tanto, se desean opciones de tratamiento adicionales para su uso.

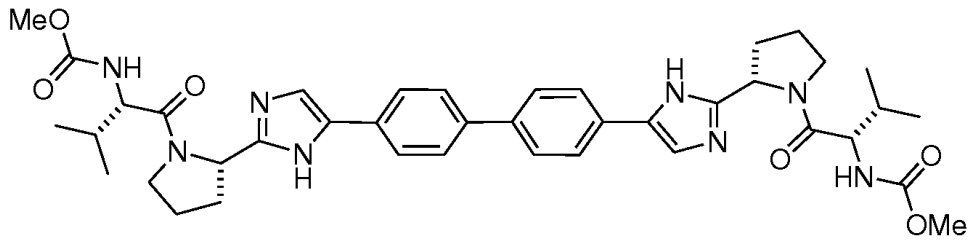
El genoma de ARN del VHC monocatenario tiene aproximadamente 9500 nucleótidos de longitud y tiene un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica una única poliproteína grande de aproximadamente 3000 aminoácidos. En las células infectadas, esta poliproteína se escinde en sitios múltiples mediante proteasas celulares y víricas para producir las proteínas estructurales y no estructurales (NS). En el caso del VHC, la generación de proteínas maduras no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) se efectúa mediante dos proteasas virales. La primera se cree que es una metaloproteasa y se escinde en la unión NS2-NS3; la segunda es una serina proteasa contenida dentro de la región N-terminal de NS3 (también referida en el presente documento como proteasa NS3) y media todas las divisiones subsiguientes aguas abajo de NS3, ambas en cis, en el sitio de escisión NS3-NS4A, y en trans, para los sitios NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B restantes. La proteína NS4A parece cumplir múltiples funciones al actuar como cofactor de la proteasa NS3 y ayudar en la localización de la membrana de NS3 y otros componentes de la replicasa viral. La formación de un complejo NS3/NS4A es necesaria para una actividad proteasa adecuada que dé como resultado una mayor eficacia proteolítica de los eventos de escisión. La proteína NS3 también exhibe actividades nucleósido trifosfatasa y ARN helicasa. NS4B es una proteína integral de membrana involucrada en la formación de la red membranosa donde se cree que se ensamblan complejos de replicación del VHC. NS5B (también referida en el presente documento como polimerasa del VHC) es una ARN polimerasa dependiente de ARN que está implicada en la replicación del VHC con otras proteínas de VHC, incluyendo NS5A, en un complejo de replicasa.

45 La norma actual de atención para el tratamiento de la mayoría de los pacientes con infección crónica por VHC es un régimen de interferón alfa pegilado y ribavirina. Sin embargo, una alta proporción de pacientes no responde a esta terapia y el tratamiento se asocia a efectos secundarios significativos. Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar terapias más seguras y efectivas. Aunque varios inhibidores de la molécula pequeña del VHC se encuentran actualmente en ensayos clínicos, según los datos clínicos de varios estudios, es evidente que pueden requerirse combinaciones de inhibidores para lograr una respuesta viral sostenida en pacientes infectados por el VHC. En el tratamiento con inhibidores de la proteasa y con inhibidores del VHC no nucleósidos y nucleósidos se han observado casos de aparición de resistencia durante el tratamiento y rebote viral posterior al tratamiento. Para lograr la máxima eficacia y potencialmente erradicar el virus, será fundamental utilizar terapias de combinación, especialmente las dirigidas a objetivos virales del VHC distintos. Los estudios combinados basados en replicones *in vitro* han demostrado que se pueden lograr efectos aditivos a sinérgicos con diversas combinaciones de inhibidores del VHC.

60 La solicitud de patente de propiedad común WO2008/021927 describe compuestos que inhiben la función de la proteína NS5A codificada por VHC. La patente de EE. UU. N.º Ser. 6.995.174 describe compuestos que inhiben la función de la proteasa NS3 codificada por VHC. La patente de EE. UU. N.º Ser. 7.456.166 describe compuestos que inhiben la función de la polimerasa NS5B. Los documentos US20080050336, US20040106559 y US20070270405 describen los compuestos de fórmula (I), (II) y (III) reivindicados actualmente para su uso en el tratamiento de infecciones por VHC. La presente divulgación muestra combinaciones de un inhibidor de NS5A de VHC específico, un inhibidor de proteasa NS3 de VHC específico e inhibidores de polimerasa NS5B que son útiles para el tratamiento del VHC.

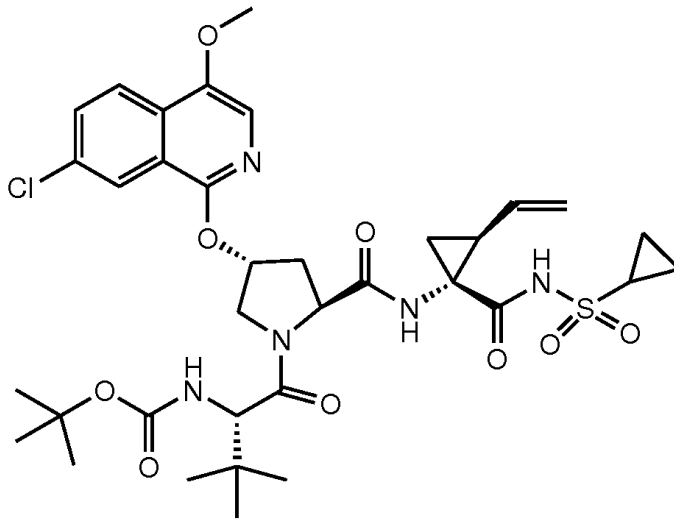
65

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I)



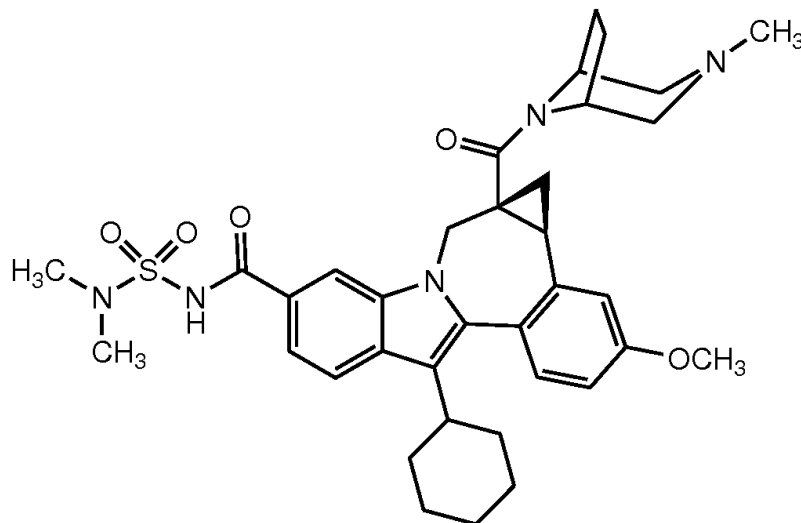
(I),

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (II),



(II),

10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto eficaz para inhibir la función de la polimerasa de VHC, es decir, el compuesto de fórmula (III)



(III),

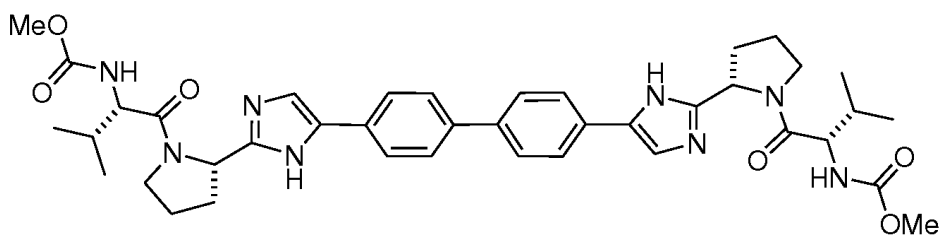
15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una primera realización del primer aspecto, la relación molar del compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al compuesto de fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al compuesto de fórmula (III)), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 1:20:5.

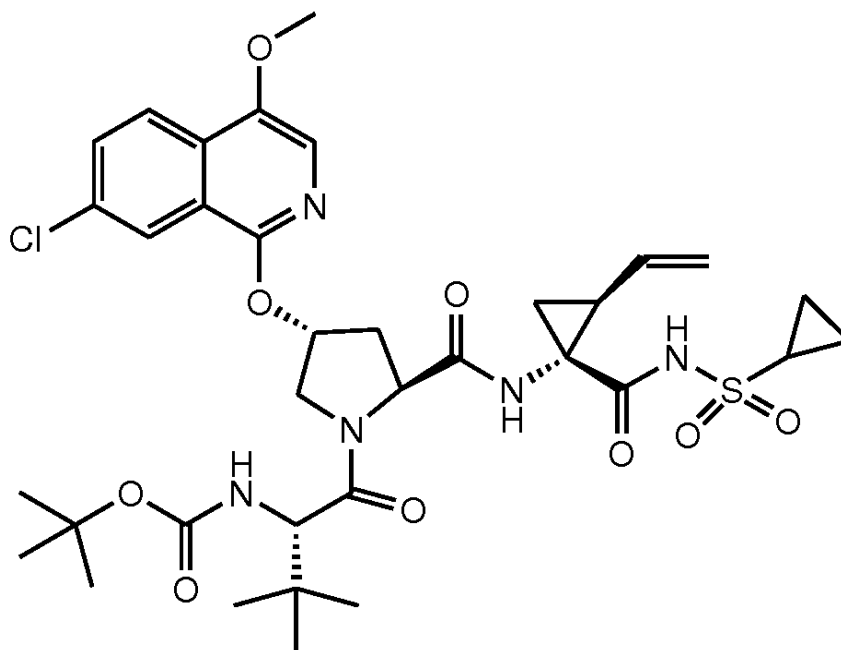
En una segunda realización del primer aspecto, la relación molar del compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al compuesto de fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al compuesto de fórmula (III)), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 1:250:1000.

En un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula (I)



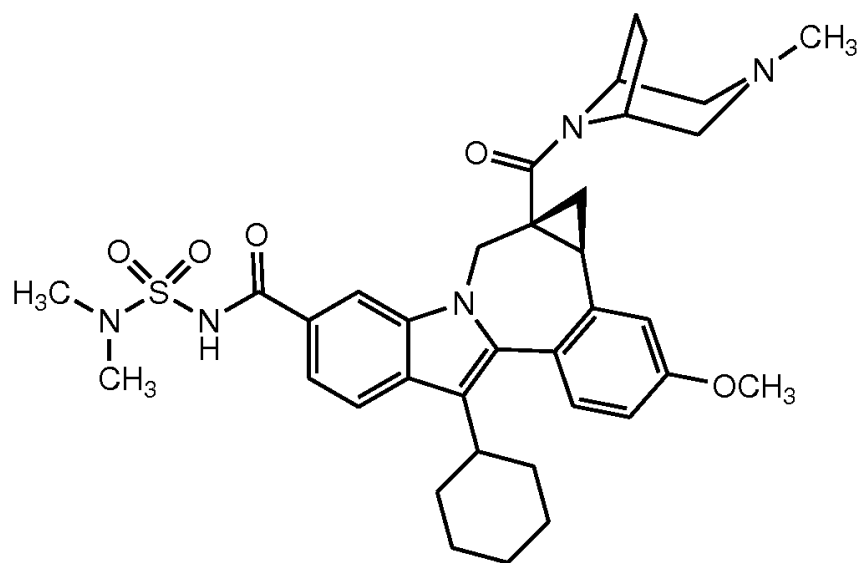
(I),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (II),



(II),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto eficaz para inhibir la función de la polimerasa de VHC, es decir, el compuesto de fórmula (III)



(III),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de la infección por VHC en un paciente.

5 En una primera realización del segundo aspecto, la relación molar del compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al compuesto de fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al compuesto de fórmula (III)), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 1:20:5.

10 En una segunda realización del segundo aspecto, la relación molar del compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al compuesto de fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al compuesto de fórmula (III)), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 1:250:1000.

Tal como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados indicados:

15 Tal como se usan en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

20 Ciertos compuestos de la presente divulgación pueden existir en diferentes formas conformacionales estables que pueden ser separables. La asimetría de torsión debida a la rotación restringida alrededor de un enlace sencillo asimétrico, por ejemplo debido a impedimentos estéricos o tensión en el anillo, puede permitir la separación de diferentes conformeros, comúnmente conocidos como atropisómeros. La presente divulgación incluye cada isómero conformacional de estos compuestos y mezclas de los mismos.

25 Los compuestos de la presente divulgación pueden existir como sales farmacéuticamente aceptables. El término "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, representa sales o formas bipolares de los compuestos de la presente divulgación que son solubles en agua o en aceite o dispersables, que son adecuadas para el uso en contacto con tejidos de pacientes sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación acorde con una relación beneficio/riesgo razonable, y son efectivos para su uso previsto. Las sales pueden prepararse durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos o por separado haciendo reaccionar un átomo de nitrógeno adecuado con un ácido adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, alcanforato, canforsulfonato; digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, formiato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, mesitilensulfonato, metanosulfonato, naftilensulfonato, nicotinato, 2-naftalensulfonato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tricloroacetato, trifluoroacetato, fosfato, glutamato, bicarbonato, para-

30 toluenosulfonato y undecanoato. Los ejemplos de ácidos que se pueden emplear para formar sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, maleico, succínico y cítrico.

40 Las sales de adición básicas pueden prepararse durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos haciendo reaccionar un protón ácido con una base adecuada tal como hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico o con amoniaco o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Los cationes de sales farmacéuticamente aceptables incluyen litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, así como cationes de amina cuaternaria no tóxicos como amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina,

trietilamina, dietilamina, etilamina, tributilamina, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, dicitclohexilamina, procaína, dibencilamina, N,N-dibencilfenetilamina y N,N'-dibenciletilendiamina. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina y piperazina.

5 La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas, que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de compuestos de las Fórmulas (I) y (II), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, un inhibidor de NS5B,

10 es decir, el compuesto de Fórmula (III) y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad total de cada componente activo que es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente, por ejemplo, una reducción sostenida en la carga viral. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya sea que se administren en combinación, en serie o simultáneamente. El vehículo(s), diluyente(s) o excipiente(s) deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para su receptor. De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, también se proporciona un proceso para la preparación de una formulación farmacéutica que incluye mezclar compuestos de Fórmulas (I) y (II), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, con un inhibidor de la polimerasa NS5B, es decir, el compuesto de Fórmula (III), y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son adecuados para el uso en contacto con los tejidos de pacientes sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación acorde con una relación beneficio/riesgo razonable, y son efectivos para su uso previsto.

25 Las formulaciones farmacéuticas se pueden presentar en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de ingredientes activos por dosis unitaria. Habitualmente, las composiciones farmacéuticas de esta divulgación se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces por día o como alternativa, como una infusión continua. Dicha administración puede usarse como terapia crónica o aguda. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales del vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo de la afección que se esté tratando, la gravedad de la afección, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción del compuesto empleado, la duración del tratamiento, y la edad, el sexo, el peso y la condición del paciente. Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis o subdosis diaria, como se ha indicado anteriormente en este documento, o una fracción apropiada de la misma, de un ingrediente activo. En general, el tratamiento se inicia con pequeñas dosificaciones sustancialmente menores que la dosis óptima del compuesto. A partir de entonces, la dosificación se incrementa en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo esas circunstancias. En general, el compuesto se administra lo más deseablemente a un nivel de concentración que generalmente proporcionará resultados antivirales efectivos sin causar efectos secundarios perjudiciales o nocivos.

40 Dado que las composiciones de esta divulgación comprenden una combinación de tres o más compuestos que tienen actividad anti-VHC, todos los compuestos pueden estar presentes en una dosis que es menor o igual que la dosificación administrada normalmente en un régimen de monoterapia. Los niveles de dosificación de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 250 miligramos por kilogramo ("mg/kg") de peso corporal por día, preferiblemente entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día de cada uno de los compuestos de la presente divulgación son típicos en una monoterapia para la prevención y el tratamiento de la enfermedad mediada por el VHC. Las composiciones de esta divulgación pueden formularse conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, por ejemplo, en forma de un comprimido monolítico y/o bi/multicapa o pueden administrarse por separado del agente o agentes terapéuticos o profilácticos.

50 Las formulaciones farmacéuticas pueden adaptarse para su administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (que incluye subcutánea, intracutánea, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, intravenosa o intradérmica). Dichas formulaciones se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica de farmacia, por ejemplo, asociando el ingrediente activo con el vehículo(s) o excipiente(s).

60 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para su administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones de agua en aceite.

65 Por ejemplo, para la administración oral en forma de comprimido o cápsula, el componente de fármaco activo se puede combinar con un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable no tóxico oral tal como etanol, glicerol y agua. Los polvos se preparan triturando el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclándolo con un vehículo farmacéutico triturado de forma similar, tal como un hidrato de carbono comestible, como, por ejemplo, almidón o manitol. También puede estar presente un agente aromatizante, conservante, dispersante y colorante.

Las cápsulas se fabrican preparando una mezcla en polvo, como se ha descrito anteriormente, y rellenando las fundas de gelatina formadas. Se pueden añadir deslizantes y lubricantes tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol sólido a la mezcla de polvo antes de la operación de llenado. También se puede añadir un agente disgregante o solubilizante tal como agar-agar, carbonato cálcico o carbonato sódico para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiere la cápsula.

Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita y goma de xantano. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla de polvo, granulando o golpeando, añadiendo un lubricante y disgregante, y comprimiendo en comprimidos. Se prepara una mezcla en polvo mezclando el compuesto, se tritura adecuadamente, con un diluyente o base como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente, con un aglutinante tal como carboximetilcelulosa, un alginato, gelificante o polivinilpirrolidona, un retardante de solución tal como parafina, un acelerador de resorción tal como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción tal como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla en polvo se puede granular humedeciendo con un aglutinante tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y forzándola a través de un tamiz. Como alternativa a la granulación, la mezcla de polvo se puede pasar a través de la máquina de comprimidos y el resultado son trozos imperfectamente formados que se rompen en gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para evitar que se peguen a troqueles que forman los comprimidos mediante la adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral. La mezcla lubricada se comprime en comprimidos. Los compuestos de la presente divulgación también pueden combinarse con un vehículo inerte de flujo libre y comprimirse en comprimidos directamente sin pasar por las etapas de granulación o golpeo. Se puede proporcionar un recubrimiento protector transparente u opaco que consiste en una capa de sellado de goma laca, un recubrimiento de azúcar o material polimérico, y un recubrimiento pulido de cera. Se pueden añadir colorantes a estos recubrimientos para distinguir diferentes dosis unitarias.

Los fluidos orales tales como solución, jarabes y elixires se pueden preparar en forma de unidad de dosificación de manera que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada del compuesto. Los jarabes se pueden preparar disolviendo el compuesto en una solución acuosa adecuadamente aromatizada, mientras que los elixires se preparan mediante el uso de un vehículo no tóxico. También pueden añadirse solubilizantes y emulsionantes tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxietileno sorbitol, conservantes, aditivos del sabor tales como aceite de menta o edulcorantes naturales, o sacarina u otros edulcorantes artificiales, y similares.

Cuando sea apropiado, las formulaciones de la unidad de dosificación para la administración oral se pueden microencapsular. La formulación también se puede preparar para prolongar o mantener la liberación, por ejemplo, recubriendo o incrustando material particulado en polímeros, cera o similares.

Los compuestos de fórmulas (I) y (II) y sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con el inhibidor de polimerasa NS5B de fórmula (III) también se pueden administrar en forma de sistemas de administración de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar a partir de varios fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Los compuestos de fórmula (I) y (II), y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, junto con el inhibidor de polimerasa NS5B de fórmula (III) también se pueden administrar mediante el uso de anticuerpos monoclonales como vehículos individuales a los que se acoplan las moléculas del compuesto. Los compuestos también se pueden acoplar con polímeros solubles como vehículos de fármacos dirigibles. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamidafenol, polihidroxietilaspirtamidafenol o polietilenoóxido-polilisina sustituida con restos de palitoilo. Además, los compuestos se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, polepsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropirilos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para su administración transdérmica se pueden presentar como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo prolongado de tiempo. Por ejemplo, el ingrediente activo puede administrarse desde el parche por iontoforesis como se describe generalmente en *Pharmaceutical Research*, 3 (6), 318 (1986).

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica se pueden formular como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, aerosoles, o aceites.

Para los tratamientos del ojo u otros tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las formulaciones se aplican preferiblemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el ingrediente activo se puede emplear con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, el ingrediente activo se

puede formular en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de aceite en agua.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para las administraciones tópicas en el ojo incluyen gotas oculares en las que el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso.

5 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en la boca incluyen losanges, pastillas y enjuagues bucales.

10 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal se pueden presentar como supositorios o enemas.

15 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal donde el vehículo es un sólido incluyen un polvo grueso que se administra de la manera en que se toma el rapé, es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido, para la administración como un aerosol nasal o gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo.

20 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración por inhalación incluyen polvos o nieblas de partículas finas, que pueden generarse por medio de varios tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores presurizados a dosis medidas.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización.

25 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en estado criodesecado (liofilizado) que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar suspensiones y soluciones de inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

30 Debe entenderse que, además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, aquellos adecuados para la administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

El término "paciente" incluye tanto seres humanos como otros mamíferos.

40 El término "tratar" se refiere a: (i) evitar que ocurra una enfermedad, trastorno o afección en un paciente que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o afección, pero al que todavía no se le ha diagnosticado que la padece; (ii) inhibir la enfermedad, trastorno o afección, es decir, detener su desarrollo; y (iii) aliviar la enfermedad, trastorno o afección, es decir, causar la regresión de la enfermedad, trastorno y/o afección.

45 La Tabla 1 a continuación enumera algunos ejemplos ilustrativos de compuestos que se pueden administrar con las composiciones de esta divulgación. Las composiciones de la divulgación se pueden administrar con otros compuestos de actividad anti-VHC en terapia de combinación, conjunta o separadamente, o combinando los compuestos en una composición.

50 Tabla de referencia 1

Nombre de marca	Clase fisiológica	Tipo de inhibidor u objetivo	Compañía Fuente
VHC-796	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Wyeth/Viropharma
NM-283	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Idenix/Novartis
GL-59728	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Gene Labs/Novartis
GL-60667	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Gene Labs/Novartis
2'C MeA	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Gilead
PSI-6130	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Roche
R-1626	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Roche
GL-59728	Antiviral	Inhibidor de la replicasa NS5B	Genelabs
PF-00868554	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Pfizer
ANA-598	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Anadys Pharmaceuticals, Inc., San Diego, California, EE. UU.
IDX-375	Antiviral	Inhibidor de la replicasa no nucleósido	Idenix Pharmaceuticals, Cambridge,



			MA, EE. UU.
IDX-184	Antiviral	Inhibidor de la nucleósido NS5B polimerasa	Idenix Pharmaceuticals, Cambridge, MA, EE. UU.
INX-189	Antiviral	Profármaco de un inhibidor de la nucleósido NS5B polimerasa	Inhibitex Inc, Alpharetta, GA, EE. UU.
BILB-1941	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Boehringer Ingelheim Canada Ltd R & D, Laval, QC, Canadá
BI-207127	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Boehringer Ingelheim Canada Ltd R & D, Laval, QC, Canadá
PSI-7851	Antiviral	Inhibidor de la nucleósido polimerasa	Pharmasset, Princeton, NJ, EE. UU.
PSI-938	Antiviral	Inhibidor de la nucleósido polimerasa	Pharmasset, Princeton, NJ, EE. UU.
PSI-879	Antiviral	Inhibidor de la nucleósido polimerasa	Pharmasset, Princeton, NJ, EE. UU.
VCH-759	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Vertex
VCH-916	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Vertex
VCH-222	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Vertex
BMS-929075	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Bristol-Myers Squibb
GS-9190	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Gilead
ABT-333	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Laboratorios Abbott
ABT-072	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Laboratorios Abbott
MK-0608	Antiviral	Inhibidor de la nucleósido polimerasa	Merck
MK-3281	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Merck
GSK-625433	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	GSK
XTL-2125	Antiviral	Inhibidor de la polimerasa NS5B no nucleósido	Presidio

Las composiciones de la presente divulgación también pueden usarse como reactivos de laboratorio. Los compuestos pueden ser útiles para proporcionar herramientas de investigación para el diseño de ensayos de replicación viral, la validación de sistemas de ensayo con animales y estudios de biología estructural para mejorar aún más el conocimiento de los mecanismos de la enfermedad del VHC. Además, los compuestos de la presente divulgación son útiles para establecer o determinar el sitio de unión de otros compuestos antivirales, por ejemplo, mediante inhibición competitiva.

Los compuestos de esta divulgación también pueden usarse para tratar o prevenir la contaminación viral de materiales y por lo tanto reducir el riesgo de infección viral del personal de laboratorio o médico o pacientes que entran en contacto con tales materiales, por ejemplo, sangre, tejido, instrumentos y prendas de vestir quirúrgicos, instrumentos y prendas de vestir de laboratorio, y aparatos o materiales de extracción o transfusión de sangre.

## Ejemplos

### Compuestos

El inhibidor de NS5A del VHC (compuesto de fórmula (I)) se puede preparar siguiendo el procedimiento descrito en las solicitudes de patente de propiedad común WO2008/021927 o WO2009/020825. El inhibidor de la proteasa NS3 del VHC (compuesto de fórmula (II)) se puede preparar siguiendo el procedimiento descrito en las patentes de propiedad común patente de Estados Unidos n.º se serie 6.995.174 y la solicitud de patente de Estados Unidos de propiedad común 12/547.158. El inhibidor de NS5B del VHC de fórmula (III) puede prepararse por el procedimiento descrito en la patente de Estados Unidos de propiedad común n.º de serie 7.456.166.

La actividad antiviral del inhibidor NS5A (fórmula (I); 60 mg QD) y el inhibidor de la proteasa NS3 (fórmula (II); 600 mg BID) solo (Grupo A) o con interferón alfa pegilado y ribavirina (Grupo B) durante 24 semanas en respondedores nulos del genotipo 1 de VHC. El objetivo principal fue determinar la proporción de sujetos que alcanzaron ARN del VHC indetectable (<10 UI/ml) en las semanas 2 y 4 de la terapia y 24 semanas después del tratamiento. Se realizó un análisis intermedio de la semana 12. Veintiún pacientes (11 del Grupo A, 10 del Grupo B) fueron repartidos al azar en una cohorte centinela. La mediana de edad fue de 55 años; 13 eran hombres y 16 eran blancos.

Tabla 2

	Grupo A: Inhibidor NS5A e inhibidor de la proteasa NS3 (n = 11)	Grupo B: Inhibidor NS5A, inhibidor de la proteasa NS3, interferón alfa pegilado y ribavirina (n = 10)
Genotipo 1a (n)	9	9
Mediana basal de ARN del VHC, UI/ml	6,9 log <sub>10</sub>	6,7 log <sub>10</sub>
Disminución promedio del ARN del VHC en la semana 2, UI/ml	-5,1 log <sub>10</sub>	-5,3 log <sub>10</sub>
RVR* n (%)	7 (63,6 %)	6 (60 %)
eRVR* n (%)	4 (36,4 %)	6 (60 %)
cEVR* n (%)	5 (45,5 %)	9 (90 %)**
RVR (respuesta virológica rápida) = ARN del VHC indetectable en la semana 4 de tratamiento eRVR (respuesta virológica rápida extendida) = ARN del VHC indetectable tanto en la semana 4 como en la semana 12 de tratamiento cRVR (respuesta virológica rápida completa) = ARN del VHC indetectable en la semana 12 de tratamiento * análisis por intención de tratar; avance = fracaso ** Un sujeto con ARN del VHC <25 UI/ml en la semana 12, indetectable (UD, <10 UI/ml) en el nuevo análisis.		

Como se muestra en la Tabla 2, seis (54,5 %) sujetos experimentaron un avance viral mientras que todos los sujetos en el Grupo B mantuvieron la supresión viral. El avance viral se produjo exclusivamente en individuos infectados con el genotipo 1a, y se produjo ya en la semana 3 y hasta la semana 12. Los dos sujetos del genotipo 1b en el grupo A permanecieron indetectables con el ARN del VHC. Los seis sujetos con avance recibieron interferón alfa pegilado y ribavirina adicionales. El ARN del VHC se redujo a indetectable en dos sujetos y a <25 UI/ml en otros dos sujetos, mientras que los otros dos tuvieron  $\geq 1,5 \log_{10}$  disminuciones en el ARN del VHC. No se registraron muertes, eventos adversos significativos o interrupciones debido a eventos adversos durante el periodo de análisis. La diarrea fue el evento adverso más común y fue principalmente de leve a moderada en gravedad.

Los resultados muestran que mientras el tratamiento con el inhibidor NS5A de fórmula (I) y el inhibidor de la proteasa NS3 de fórmula (II) con o sin interferón alfa pegilado y ribavirina demostraron tasas de RVR similares en respondedores nulos del genotipo 1 infectados con VHC, seis de los once sujetos que reciben las dos moléculas pequeñas solo experimentó un avance viral en la semana 12, mientras que la combinación de cuatro fármacos mantuvo la supresión viral en todos los sujetos. Por lo tanto, el tratamiento con agentes antivirales de acción directa sin interferón alfa pegilado y ribavirina requeriría uno o más agentes terapéuticos adicionales para prevenir el avance viral.

## 20 Líneas celulares

La línea celular Huh-7 utilizada para estos estudios se obtuvo del Dr. Ralf Bartenschlager (Universidad de Heidelberg, Heidelberg, Alemania) y se propagó en DMEM que contenía el 10 % de SFB, 10 U/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomina. Los replicones de VHC usados en estos estudios se generaron en Bristol-Myers Squibb usando el procedimiento descrito en el documento WO2004014852. La secuencia codificante del replicón del VHC del genotipo 1b publicada (Lohmann, V., F. Korner, J.-O. Koch, U. Herian, L. Theilmann, y R. Bartenschlager 1999, Science 285: 110-113) fue sintetizada por Operon Technologies, Inc. (Alameda, CA) utilizando la secuencia expuesta en EMBL N.º de acceso AJ242652, nucleótidos 1801 a 7758. El replicón funcional se ensambló entonces en el plásmido pGem9zf (+) (Promega, Madison, WI) utilizando técnicas convencionales de biología molecular. Para crear un replicón que codifica un informador de luciferasa, el gen que codifica la proteína Renilla luciferasa humanizada se introdujo corriente arriba del gen de la neomicina fosfotransferasa. El replicón resultante consiste en (i) la UTR 5' del VHC fusionada a los primeros 12 aminoácidos de la proteína de la cápside, (ii) el gen de la Renilla luciferasa, (iii) el gen de la neomicina fosfotransferasa (neo), (iv) la IRES del virus de encefalomiocarditis (EMCV) y (v) los genes NS3 a NS5B del VHC y la UTR 3' del VHC.

Las líneas celulares del replicón del VHC se aislaron de las colonias como se describe por Lohman, et. al (Lohmann, V., F. Korner, J.-O. Koch, U. Herian, L. Theilmann, y R. Bartenschlager 1999, Science 285: 110-113) y se usó para todos los experimentos. Brevemente, los clones del replicón se linealizaron con transcritos de Sca I y de ARN sintetizados *in vitro* usando el kit de transcripción T7 MegaScript (Ambion, Austin, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se introdujeron de 10 a 20 µg de ARN del replicón transcrito *in vitro* en 4-5 X 10<sup>6</sup> células Huh-7 mediante transfección con reactivo DMRIE-C (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) siguiendo los protocolos del fabricante. Después de 24 h, se añadieron medios selectivos que contenían geneticina a 0,5 mg/ml (G418, Gibco-BRL, Rockville, MD) y los medios se cambiaron cada 3 a 5 días. Después de aproximadamente 4 semanas, las células se expandieron para un análisis posterior. Las células se mantuvieron a 37 °C en DMEM (Gibco-BRL, Rockville, MD) con el 10 % de suero de ternero inactivado con calor (Sigma), penicilina/estreptomina, y 0,5 mg/ml de G418.

*Citotoxicidad del cultivo celular y ensayos de luciferasa*

Para determinar la eficacia del compuesto, las células del replicón del VHC se sembraron a una densidad de  $10^4$  por pocillo en placas de 96 pocillos en medio DMEM que contenía el 10 % de FBS. Después de la incubación durante la noche, los compuestos diluidos en serie en DMSO, o DMSO solo, se añadieron a pocillos individuales hasta una concentración final de DMSO del 0,5 %. Las placas celulares se incubaron luego a 37 °C durante 3 días antes de analizar la citotoxicidad y la inhibición del VHC. La viabilidad celular se midió usando un ensayo Alamar Blue y se calcularon los valores  $CC_{50}$  utilizando la ecuación de la mediana del efecto.

A continuación, las placas se lavaron dos veces con PBS y se analizó la actividad renilla luciferasa usando un sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo (Promega Corporation, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron en un Contador de Luminiscencia y Centelleo de Microplacas TopCount NXT (Packard Instrument Company). La concentración eficaz al 50 % ( $CE_{50}$ ) se calculó utilizando Excel Fit (versión 2.0, Build 30). Los valores conocidos de x (concentración de compuesto) e y (% con respecto a los pocillos de control solo con DMSO) se usaron para calcular la  $CE_{50}$  con la ecuación 205 de Excel Fit, representada como  $y = A + ((BA)/(1+((C/x)^D)))$ , en la que A y B son iguales a las mesetas inferiores y superiores de la curva, respectivamente, C es igual al valor de x en el medio de la curva, y D es igual al factor de pendiente.

*Estudios de combinación*

Para los estudios de combinación de inhibidores, los inhibidores de NS5A, los inhibidores de la proteasa NS3 y la polimerasa NS5B del VHC se probaron cada uno a once concentraciones. Se prepararon soluciones madre, 200 veces la concentración de ensayo final deseada, por dilución 3 veces en DMSO antes de la adición a células/medios. Los compuestos se probaron como monoterapias y en combinaciones a diversas relaciones de concentración. Las células se expusieron a compuestos durante 3 días y luego se determinó la cantidad de inhibición de VHC usando el ensayo de luciferasa como se ha descrito anteriormente. Las citotoxicidades potenciales de estos agentes combinados también se analizaron en paralelo mediante tinción con azul de Alamar. El grado de antagonismo, aditividad o sinergia se determinó en un rango de concentraciones de fármaco, y las curvas de respuesta de combinación se ajustaron para evaluar los efectos antivirales de las combinaciones de tratamiento con fármaco. El efecto combinado de los fármacos en combinación se analizó utilizando el método de Chou T. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. Pharmacological Reviews. 2006; 58(3):621-81.

Todas las estimaciones se calcularon utilizando el software de bioestadística SAS Proc NLIN y una logística de cuatro parámetros. Todos los índices de combinación se probaron para la salida de la aditividad usando métodos de isoblograma. Los intervalos de confianza asintóticos también se calcularon para cada uno de los índices de combinación. Estos intervalos se utilizan para probar la desviación de la aditividad comparando los límites con: un límite inferior del intervalo mayor que 1 indica antagonismo, un límite superior de menos de 1 que indica sinergia, y un valor de 1 contenido en el intervalo indica aditividad.

*Resultados*

Tabla 3: Estudios de triple combinación usando Inhibidores de proteasa de NS3, NS5A y NS5B

Exp <sup>a</sup>	IP NS3 CE <sub>50</sub> , nM	Inhibidor NS5A CE <sub>50</sub> , nM	Inhibidor NS5B CE <sub>50</sub> , nM	Índices de combinación (intervalo de confianza)			Resultado general
				50 % de efectividad	75 % de efectividad	90 % de efectividad	
1	1,2	0,003	5,4	1,00 (0,92, 1,08)	1,05 (0,93, 1,17)	1,11 (0,91, 1,30)	Aditividad
2	0,705	0,002	2,4	0,93 (0,85, 1,01)	1,01 (0,88, 1,14)	1,1 (0,88, 1,31)	Aditividad
3	0,825	0,002	2,8	1,01 (0,94, 1,08)	0,97 (0,88, 1,06)	0,93 (0,79, 1,07)	Aditividad

IP = inhibidor de proteasa

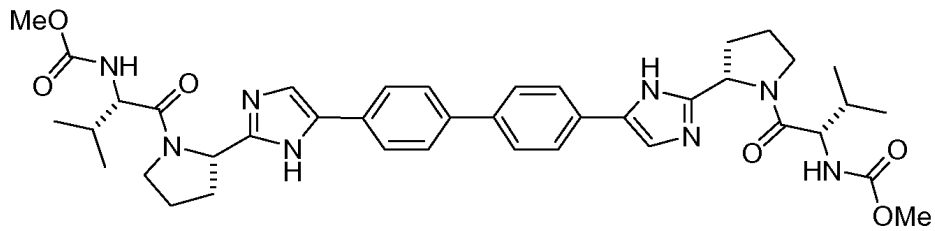
<sup>a</sup> Compuestos probados en una relación molar de 250:1:1000, IP de NS3 a inhibidor de NS5A a inhibidor de NS5B

La resistencia a la terapia antiviral se ha convertido en un problema importante en el tratamiento de pacientes con infecciones virales crónicas. Para lograr respuestas virales sostenidas, será fundamental utilizar terapias combinadas, especialmente aquellas dirigidas a objetivos virales de VHC distintos.

Estos resultados demuestran que el tratamiento de combinación de células de replicón con el inhibidor de NS5A de fórmula (I), el inhibidor de proteasa NS3 del VHC de fórmula (II) y el inhibidor de NS5B de fórmula (III) producen efectos antivirales aditivos. De manera importante, no se observaron efectos antagonistas ni citotoxicidad potenciada con ninguna de estas combinaciones. Por lo tanto, estas combinaciones son candidatos excelentes para los regímenes de combinación en pacientes infectados por el VHC.

REIVINDICACIONES

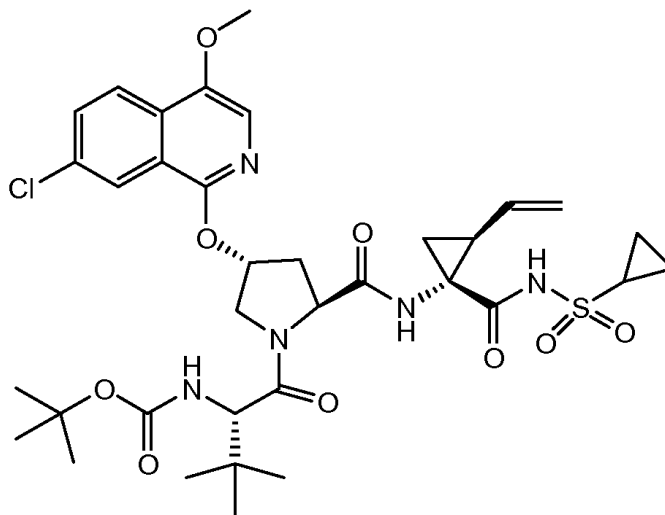
1. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I)



5

(I),

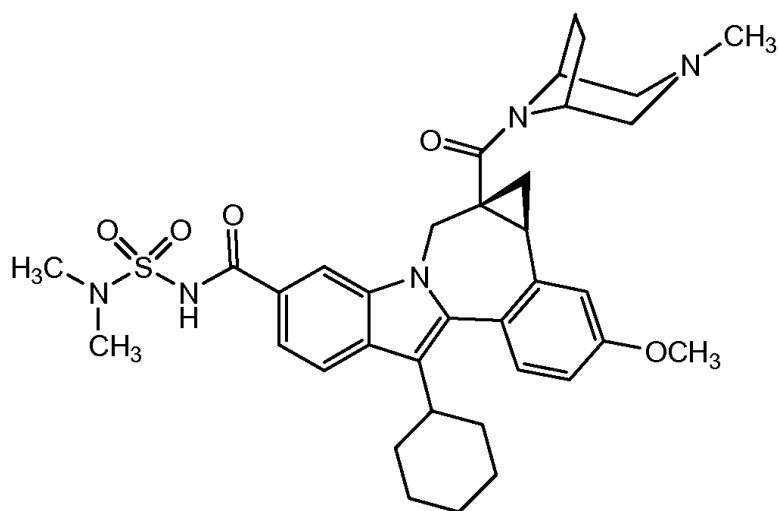
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (II),



10

(II),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (III)



15

(III),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 2. La composición de la reivindicación 1 en la que la relación molar entre el compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el compuesto de fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el compuesto de fórmula (III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 1:20:5.

10 3. La composición de la reivindicación 1 en la que la relación molar entre el compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el compuesto de fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el compuesto de fórmula (III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 1:250:1000.

4. Una composición como se define en la reivindicación 1 para usar en un método para tratar la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en un paciente.