



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 317 912**

(51) Int. Cl.:

C07H 19/06 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01944522 .0**

(96) Fecha de presentación : **15.06.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1296995**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

(54) Título: **Profármacos 3' de 2'-deoxi- β -L-nucleósidos.**

(30) Prioridad: **15.06.2000 US 212100 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

(73) Titular/es: **Idenix (Cayman) Limited**
c/o Walkers SPV Limited, Box 908-GT
Walker House, 265 Mary Street
Grand Cayman, KY
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) y
L'Université Montpellier II

(72) Inventor/es: **Bryant, Martin, L.;**
Gosselin, Gilles y
Imbach, Jean-Louis

(74) Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 317 912 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

Profármacos 3' de 2'-deoxi- β -L-nucleósidos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a profármacos 3' de 2'-deoxi- β -L-nucleósidos para el tratamiento del virus de hepatitis B.

10 La solicitud reivindica prioridad para la de Solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/212,100, presentada el 15 de junio del 2000.

Contexto de la invención

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

20 El virus de la hepatitis B ha alcanzado niveles epidémicos en todo el mundo. Después de dos a seis meses de periodo de incubación en el cual el huésped no es consciente de la infección, la infección de VHB puede llevar a hepatitis aguda y daño en el hígado, que provoca dolor abdominal, ictericia, y elevados niveles en sangre de ciertas enzimas. VHB puede causar hepatitis fulminante, una forma rápidamente progresiva, a menudo fatal, de enfermedad en la cual se destruyen grandes secciones del hígado. Los pacientes normalmente se recuperan de hepatitis aguda viral.
25 Sin embargo, en algunos pacientes, los altos niveles de antígeno persisten en la sangre durante un periodo extenso e indefinido, provocando una infección crónica. Las infecciones crónicas pueden llevar a hepatitis crónica persistente. Los pacientes infectados con VHB crónica persistente son más comunes en países desarrollados. La hepatitis crónica persistente puede causar fatiga, cirrosis del hígado y carcinoma hepatocelular, un principal cáncer de hígado. En países industrializados de occidente, los grupos de alto riesgo de infección de VHB incluyen aquellos en contacto con
30 portadores de VHB o sus muestras de sangre. La epidemiología de VHB es de hecho muy similar a la del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, lo que explica por qué la infección de VHB es común entre pacientes con SIDA o infecciones asociadas con VIH. Sin embargo, VHB es más contagioso que VIH.

35 El tratamiento diario con α -interferón, una proteína genéticamente fabricada, ha sido prometedor. También se ha desarrollado una vacuna derivada de suero humano para inmunizar a pacientes contra VHB. Las vacunas se han producido a través de injertos genéticos. Mientras que la vacuna ha resultado efectiva, la producción de vacuna resulta problemática porque el suministro de suero humano procedente de portadores crónicos es limitado, y el proceso de purificación es largo y caro. Además, cada lote de vacunas preparado de diferente suero debe probarse en chimpancés para garantizar seguridad. Además, la vacuna no ayuda a pacientes ya infectados con el virus.

40 Un paso esencial en el modo de acción de nucleósidos de purina y pirimidina contra enfermedades virales, y en particular VHB y VIH, es su activación metabólica a través de quinasas celulares y virales, para producir derivados mono-, di- y trifosfato. La especie biológicamente activa de muchos nucleósidos es la forma trifosfato, que inhibe polimerasa ADN o transcriptasa inversa, o provoca el fin de la cadena.

45 Se han identificado un número de nucleósidos sintéticos que muestran actividad contra VHB. El enantiómero (-) de BCH-189 (2', 3'-dideoxi-3'-tiacitidina), conocido como 3TC, reivindicado en la Patente de Estados Unidos 5,539,116 de Liotta, *et al.*, actualmente se emplea en ensayos clínicos par el tratamiento de hepatitis B. Ver también EPA 0 494 119 A1 presentada por Biochem Pharma, Inc. β -2-Hidroximetil-5-(5-fluorocitosina-1-yl)-1,3-oxatolano ("FTC"),
50 reivindicado en las Patentes de Estados Unidos Números 5,814,639 y 5,914,331 de Liotta *et al.*, muestra actividad contra VHB. Ver Furman *et al.*, "The Anti-Hepatitis B Virus Activities, Cytotoxicities, and Anabolic Profile of the (-) and (+) Enantiomers of cis-5-Fluoro-1-{2-(Hydroxymethyl)-1,3oxathiolane-5-yl}-Cytosine" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Diciembre 1992, pág. 2686-2692; and Cheng, *et al.*, *Revista de Química Biológica*, Volumen 267 (20), 13938-13942 (1992).

55 Las Patentes de Estados Unidos Números 5,565,438, 5,567,688 y 5,587,362 (Chu, *et al.*) describe el uso de 2'-fluoro-5-metil- β -L-arabinofuranoliluridina (L-FMAU) para el tratamiento de hepatitis B y virus de Epstein Barr.

60 Penciclovir (PCV, 2-amino-1, 9-dihidro-9-{4-hidroxi-3-(hidroximetil)butil}-6H-purina-6-uno) ha establecido actividad contra hepatitis B. Ver los Números de Patente de Estados Unidos 5,075,445 y 5,684,153.

65 Wang *et al.*, *Aniviral Research*, 40, (1998), 19-44 proporciona una revisión de L-nucleósidos y su actividad biológica. Skaric *et al.*, *Croatia Chemica Acta*, 48(3), 1976, 351-359 describe el enlace de 5'-O-trifenilmetil-4-tiotimidina con N-benciloxicarbonil-D, L-alanina o N-t-butiloxicarbonil-L-fenilalanina. El Número de Patente de Estados Unidos 5,559,101 describe nucleósidos L-ribofuranosil que tiene una actividad como agentes anticáncer, antivirales, antiparasitarios, antihongos, antibacteriales y/o antimicrobiales.

ES 2 317 912 T3

Adefovir (9-{2-(fosfonometoxi)etil} adenina, también referido como PMEA o {{2-6-amino-9H-purina-9-il)etoxi} ácido metilfosfónico, también ha demostrado actividad contra hepatitis B. Ver, por ejemplo, Números de Patente de Estados Unidos 5,641,763 y 5,142,051.

5 La Fundación de Investigación de la Universidad de Yale y de Universidad de Georgia, Inc. describe el uso de L-FDDC (5-fluoro-3'-tia-2',3'-dideoxicitidina) para el tratamiento de virus de hepatitis B en WO 92/18517.

Otros fármacos explorados para el tratamiento de VHB incluyen adenosina arabinosida, limosina, aciclovir, fosfo-
10 noformato, zidovudina, (+)-cianidanol, quinacrina, y 2'-fluoroarabinosil-5-yodouracil.

Los Números de Patente de Estados Unidos 5,444,063 y 5,684,010 de la Universidad de Emory describen el uso de nucleósidos β -D-1,3-dioxolano purina enantioméricamente puros para tratar hepatitis B.

15 WO 96/40164 presentada por la Universidad de Emory, Fundación de Investigación UAB, y el Centro Nacional de Investigación Científica (CNRS) describen un número de dideoxinucleósidos β -L-2'-3 para el tratamiento de hepatitis B.

WO 95/07287 también presentada por la Universidad de Emory, Fundación de Investigación UAB, y el Centro Nacional de Investigación Científica (CNRS) describen nucleósidos 2' o 3' y 2',3'-dideoxi- β -L-pentofuranosil para el
20 tratamiento de infección VIH.

WO 96/13512 presentada por Genencor International, Inc., y Lipitek, Inc., describe la preparación de nucleósidos L-ribofuranosil como agentes anti-tumor y virucidas.

25 WO 95/32984 describe ésteres de lípido de monofosfatos de nucleósido como fármacos inmuno-supresivos.

DE 4224737 describe nucleósidos de citosina y sus usos farmacéuticos.

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

Galvez, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 1994, 35(5), 1198-203, describe la computación celular de β -D-3'-ácido-2',3'-dideoxi-5-fluorocitidina.

35 Mahmoudian, Pharm. Research 1991, 8(1), 43-6, describe análisis de relación cuantitativa estructura-actividad de agentes de VIH como β -D-3'-ácido-2',3'-dideoxi-5-fluorocitidina.

La Patente de Estados Unidos Número 5,703,058 describe nucleósidos (5-carboximido o 5-fluoro)-(2',3'-no saturados o 3'-modificados) de piridina para el tratamiento de VIH o VHB.

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

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

Novicio Pharmaceuticals, Ltd, fue también el primero en describir eritropentofuranonucleósidos 2'-deoxi- β -L, y su uso para el tratamiento de VIH en WO 00/09531. Se describe un método para el tratamiento de infección de hepatitis B en humanos y otros animales huésped que incluye la administración de una cantidad efectiva de pentofuranonucleósido 2'-deoxi- β -L-eritro biológicamente activo (referido de manera alternativa como β -L-dN o β -L-2'-dN) o una sal farmacéuticamente aceptable o un profármaco de la misma, que incluye β -L-deoxiribotimidina (β -L-dT), β -L-deoxiribocitidina (β -L-dC), β -L-deoxiribouridina (β -L-dU), β -L-deoxiriboguanosina (β -L-dG), β -L-deoxiriboadenosina (β -L-dA) y β -L-deoxiriboinosina (β -L-dI), administradas bien solas o en combinación, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable. También se describieron derivados acilados o alquilados 5' y N⁴ (citidina) o N⁶ (adenosina) del compuesto activo, o el 5'-fosfolípido o 5'-lípidos de éter.

Se han intentado varios profármacos. De manera más notable, la Patente de Estados Unidos Número 4,957,924 de Beauchamp describe varios ésteres terapéuticos de aciclovir.

60 A la luz del hecho de que el virus de hepatitis B ha alcanzado niveles virales en todo el mundo, y a los severos y a menudo trágicos efectos sobre el paciente infectado, existe una fuerte necesidad de lograr nuevos agentes farmacéuticos efectivos para tratar a humanos infectados con el virus que tiene baja toxicidad para el huésped.

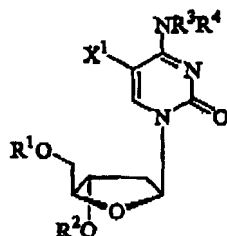
Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos, composiciones y métodos para el
65 tratamiento de paciente humanos u otros huéspedes infectados con VHB.

Resumen de la invención

3'-Profármacos de nucleósidos 2'-deoxi- β -L, o sus sales farmacéuticamente aceptables o formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos compuestos son útiles en la prevención y tratamiento de infecciones de hepatitis B u otras condiciones relacionadas como anticuerpo positivo anti-VHB y condiciones positivas de VHB, inflamación crónica de hígado provocada por VHB, cirrosis, hepatitis aguda, hepatitis fulminante, hepatitis crónica persistente, y fatiga. Estos compuestos o formulaciones también pueden emplearse profilácticamente para evitar o retrasar la progresión de enfermedades clínicas en individuos que son positivos al anticuerpo anti-VHB o antígeno VHB o que han sido expuestos a VHB.

La solicitud también describe compuestos que se emplean en la fabricación de un medicamento para usar en un método para el tratamiento de una infección viral de hepatitis B en un huésped, que incluye un humano, que incluye la administración de una cantidad efectiva de un 3'-profármaco de un nucleósido 2'-deoxi- β -L-biológicamente activo o de una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, administrado bien solo o en combinación o en alternancia con otro agente anti-virus de hepatitis B, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable. El término 2'-deoxi, tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a un nucleósido que no tiene sustituto en la posición 2'. El término 3'-profármaco, tal y como aquí se emplea, se refiere a un nucleósido 2'-deoxi- β -L que tiene un radical biológicamente divisible en la posición 3', incluyendo, pero sin limitar, a acilo, y en una realización, un ácido L-amino.

En una realización particular, el nucleósido β -L 3'-profármaco es β -L-2'-deoxi-deoxicitidina de la fórmula.



o su sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

R¹ es hidrógeno,

R² es un residuo de aminoácido;

X¹ es H; y

R³ y R⁴ son independientemente H, alquilo de cadena recta, ramificada o cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquilo (en particular, dimetilaminometileno), CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilosulfonilo, arilsulfonilo, araquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, trifosfato, o un derivado de fosfato.

En una realización, el residuo de aminoácido es de la fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), donde,

R⁸ es la cadena lateral de un aminoácido y donde, como en prolina, R⁸ puede enlazarse de manera opcional con R¹⁰ para formar una estructura de anillo; o de manera alternativa, R⁸ es un alquilo, arilo, heteroarilo o radical heterocíclico;

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

R¹⁰ y R¹¹ son independientemente hidrógeno, acilo (incluyendo un derivado de acilo unido a R⁸) o alquilo (incluyendo pero sin limitar a metilo, etilo, propilo, y ciclopropilo).

En otra realización preferente, R² es un residuo de aminoácido, y en particular L-valina.

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

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

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

La invención también proporciona combinaciones de al menos dos de los profármacos aquí descritos.

La invención también proporciona al menos uno de los 3'-profármacos en combinación o en alternancia con un segundo nucleósido que muestra actividad contra hepatitis B, incluyendo pero sin limitar un fármaco madre de cualquiera de los profármacos aquí definidos, es decir, 2'-deoxi- β -L-nucleósidos, que incluyen 2'-deoxi- β -L-citidina; 2'-deoxi- β -L-timina; 2'-deoxi- β -L-adenosina; 2'-deoxi- β -L-guanina; 2'-deoxi- β -L-fluorocitidina. De manera alternativa, los 3'-profármacos pueden administrarse en combinación o en alternancia con otro agente anti-virus de hepatitis B, como (-)cis-2',3'-dideoxi-3'-tiacitidina; cis-2',3'-dideoxi-3'-tia-5-fluorocitidina; L-FMAU; adefovir; famciclovir; y entecavir, o cualquier otro compuesto que muestre un EC₅₀ inferior a 10 o 15 micromolares en 2.2.15 células; o sus profármacos o sales farmacéuticamente aceptables.

La invención además incluye la administración del profármaco en combinación o alternancia con un modulador inmune u otro modificador farmacéuticamente activo de réplica viral, incluyendo un material biológico como una proteína, péptido, oligonucleótido, o gammaglobulina, incluyendo pero sin limitar a interferón, interleuquina, u oligonucleótidos antisentido con genes que expresan o regulan réplica de hepatitis B.

La eficacia de los padres del compuesto anti-VHB puede medirse de acuerdo con la concentración de compuesto necesaria para reducir el índice de réplica del virus *in vitro*, de acuerdo con los métodos aquí establecidos de manera más particular, por 50% (es decir, el EC₅₀ del compuesto). En realizaciones preferentes, la madre del compuesto de profármaco muestra un EC₅₀ de menos de 15 o preferiblemente, menos de 10 micromolares *in vitro*, cuando se comprobó en 2.2.15 células transfectadas con el virión de hepatitis.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1a y 1b son ejemplos ilustrativos no limitativos de acuerdo con la presente invención de la síntesis de ésteres 3'- y 5'-valina de 2'-deoxi- β -L-citidina (β -L-dC) de 2'-deoxi- β -L-citidina, respectivamente.

La Figura 2 es un ejemplo ilustrativo no limitativo de la presente invención de la síntesis de N⁴-acetil-2'-deoxi- β -L-citidina de 2'-deoxi- β -L-citidina.

La Figura 3 es un ejemplo ilustrativo no limitativo de la presente invención de la síntesis de N⁴[(dimetilamino)metileno]-2'-deoxi- β -L-citidina de 2'-deoxi- β -L-citidina.

La Figura 4 es un ejemplo ilustrativo no limitativo de la presente invención de la síntesis de 3',5'-di-O-acetil-2'-deoxi- β -L-citidina de 2'-deoxi- β -L-citidina.

La Figura 5 es un ejemplo ilustrativo no limitativo de la presente invención de la síntesis de éster 3',5'-di-O-valina de 2'-deoxi- β -L-citidina de 2'-deoxi- β -L-citidina.

La Figura 6 es un ejemplo ilustrativo no limitativo de la presente invención de la síntesis de éster N⁴-(Boc-valina) de 2'-deoxi- β -L-citidina de 2'-deoxi- β -L-citidina.

La Figura 7 es un ejemplo ilustrativo no limitativo de la presente invención de la síntesis de 3',5', N⁴-tri-(L-valina)-2'-deoxi- β -L-citidina de 3',5', N⁴-tri-(Boc-L-valina)-2'-deoxi- β -L-citidina.

La Figura 8 es una gráfica lineal que muestra una técnica estándar de calibración útil para la determinación de solubilidad de varios nucleósidos. La Figura 8a es la curva de calibración determinada para la naturaleza β -D-deoxiribocitosina. La Figura 8b es la curva de calibración determinada para el éster 3',5'-divalinil de β -D-deoxiribocitosina.

La Figura 9a es un ejemplo no limitativo de un perfil HPLC empleado para evaluar la estabilidad del éster 3',5'-divanilil de β -L-deoxiribocitosina a un pH de 7.42. El perfil HPLC indica la presencia de éster 3',5'-divanilil de β -L-deoxiribocitosina junto con 3 metabolitos activos, el éster 3'-valinil de β -L-deoxiribocitosina, el éster 5'-valinil de β -L-deoxiribocitosina y L-dC. La Figura 9b es una gráfica lineal que muestra la concentración relativa de los ésteres 3',5'-divalinil de β -L-deoxiribocitosina y sus metabolitos sobre el tiempo.

De manera similar, la Figura 10a y 11a son ejemplos no limitativos de perfiles HPLC empleados para evaluar la estabilidad del éster 3',5'-divanilil de β -L-deoxiribocitosina a un pH de 7.42 y 4.51, respectivamente. En estos pHs, el perfil HPLC indica la presencia de éster 3',5'-divanilil de β -L-deoxiribocitosina junto con 3 metabolitos activos, el éster 3'-valinil de β -L-deoxiribocitosina, el éster 5'-valinil de β -L-deoxiribocitosina y L-dC.

La Figura 10b y 11b son gráficas lineales que muestran las concentraciones relativas de los ésteres 3',5'-divalinil de β -L-deoxiribocitosina y sus metabolitos sobre el tiempo.

La Figura 12 es un ejemplo no limitativo de un perfil HPLC empleado para evaluar la estabilidad del éster 3',5'-divanilil de β -L-deoxiribocitosina a un pH de 1.23. En este pH, el perfil HPLC indica la presencia de éster 3',5'-divanilil de β -L-deoxiribocitosina sin ninguno de sus 3 metabolitos activos.

La Figura 13 es una gráfica lineal que muestra el metabolismo *in vitro* de éster 3',5'-divanilil de β -L-deoxiribocitosina en plasma humano.

La Figura 14 es una gráfica lineal que muestra el metabolismo intracelular de β -L-deoxiribocitosina (L-dC) en células HepG2.

La Figura 15 es una gráfica lineal que muestra la acumulación intracelular de L-dC en hepatocitos primarios humanos.

La Figura 16 es un gráfico de barras que muestra la respuesta a la dosis antiviral de L-dC tras el tratamiento de una infección de virus de hepatitis B crónica durante 28 días en el modelo de marmota de infección de virus de hepatitis B crónica.

La Figura 17 es una gráfica lineal que muestra la actividad antiviral de L-dC en el modelo de marmota de infección de virus de hepatitis B crónica.

La Figura 18 son gráficas lineales que indican los pesos corporales de marmotas individuales tratadas durante 28 días con L-dC (0.01-10 mg/kg/día) oralmente.

La Figura 19 son gráficas lineales que indican los pesos corporales de marmotas individuales tratadas durante 12 semanas con L-dC (0.01-10 mg/kg/día) oralmente.

Descripción detallada de la invención

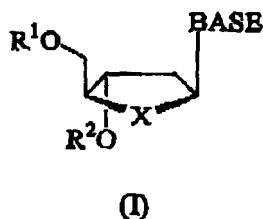
La invención aquí descrita es un compuesto, un método y composición para el tratamiento de virus de hepatitis B en humanos y otros animales huésped. El método incluye la administración de una cantidad efectiva para el tratamiento del VHB de un 3'-profármaco de un β -L-nucleósido como aquí se describe o de una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable. El compuesto de esta invención posee actividad antiviral (es decir, anti-VHB), o se metaboliza con un compuesto que muestre dicha actividad.

En resumen, la presente invención incluye las siguientes características:

- (a) 3'-profármacos β -L-2'-deoxi-nucleósidos, tal y como aquí se describen, y sales farmacéuticamente aceptables, ésteres y composiciones de los mismos.
- (b) 3'-profármacos β -L-2'-deoxi-nucleósidos, tal y como aquí se describen, y sales farmacéuticamente aceptables, ésteres y composiciones de los mismos para uso en el tratamiento o profilaxis de una infección de hepatitis B, especialmente en individuos diagnosticados por tener una infección de hepatitis B o por tener riesgo de infectarse por hepatitis B;
- (c) uso de estos 3'-profármacos β -L-2'-deoxi-nucleósidos, y sales farmacéuticamente aceptables, ésteres y composiciones de los mismos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección de hepatitis B;
- (d) formulaciones farmacéuticas que contienen 3'-profármacos β -L-2'-deoxi-nucleósidos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable;
- (e) 3'-profármacos β -L-2'-deoxi-nucleósidos, o sales farmacéuticamente aceptables, ésteres y composiciones tal y como aquí se describen sustancialmente en ausencia de los enantiómeros opuestos del nucleósido descrito, o sustancialmente aislados de otras entidades químicas;
- (f) procesos para la preparación de 3'-profármacos β -L-2'-deoxi-nucleósidos, tal y como se describe con más detalle a continuación;
- (g) procesos para la preparación de 3'-profármacos β -L-2'-deoxi-nucleósidos sustancialmente en ausencia de enantiómeros del nucleósido descrito, o sustancialmente aislados de otras entidades químicas;
- (h) el tratamiento de un huésped infectado con hepatitis B que incluye la administración de una cantidad efectiva de 3'-profármacos de β -L-2'-deoxi-nucleósido, su sal farmacéuticamente aceptable, éster o composición con un segundo agente anti-hepatitis B.
- (i) el tratamiento de un huésped infectado con hepatitis B que incluye la administración de una cantidad efectiva de 3'-profármacos de β -L-2'-deoxi-nucleósido, su sal farmacéuticamente aceptable, éster o composición con la madre de un β -L-2'-deoxi-nucleósido diferente.
- (j) el tratamiento de un huésped infectado con hepatitis B que incluye la administración de una cantidad efectiva de 3'-profármacos de β -L-2'-deoxi-nucleósido, su sal farmacéuticamente aceptable, éster o composición con la madre de un segundo agente anti-hepatitis B.

I. Compuestos Definidos por esta Invención

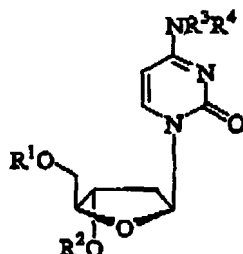
En una realización, la invención proporciona los 3'-profármacos de β -L-nucleósido definidos por la fórmula (I):



o su sal farmacéuticamente aceptable, donde

X es O, R¹ es hidrógeno, R² es (C(C)C(R⁸)(H)(NHW); R⁸ es isopropil y BASE es citosina.

En una realización particular, los 3'-profármacos de β -L-nucleósido es β -L-2'-deoxicitidina de la fórmula:



o su sal farmacéuticamente aceptable, donde

R¹ es hidrógeno,

R² es un residuo de aminoácido; y

R³ y R⁴ son independientemente H, alquilo de cadena recta, ramificada o cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquilenos (en particular, dimetilaminometileno), CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilosulfonilo, arilsulfonilo, araquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, trifosfato, o un derivado de fosfato.

En una realización, el residuo de aminoácido es de la fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), donde,

R⁸ es la cadena lateral de un aminoácido y donde, como en prolina,

R⁸ puede enlazarse de manera opcional con R¹⁰ para formar una estructura de anillo; o de manera alternativa, R⁸ es un alquilo, arilo, heteroarilo o radical heterocíclico;

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

R¹⁰ y R¹¹ son independientemente hidrógeno, acilo (incluyendo un derivado de acilo unido a R⁸) o alquilo (incluyendo pero sin limitar a metilo, etilo, propilo, y ciclopropilo).

En otra realización preferente, R² es un residuo de aminoácido, y en particular L-valina.

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

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

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

II. Definiciones y Uso de Términos

El término alquilo, tal y como aquí se emplea, a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un hidrocarburo saturado recto, ramificado, o cíclico, primario, secundario o terciario de C₁ a C₁₀, y específicamente incluye metilo, trifluorometilo, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmeilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, y 2,3-dimetilbutilo. El término incluye grupos de alquilo tanto sustituidos como no sustituidos. Los radicales por los cuales el grupo alquilo puede sustituirse se seleccionan del grupo consistente en hidroxil, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitrógeno, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, bien protegidos o no protegidos, según sea necesario, tal y como es conocido por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, tal y como se muestra en Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley y Sons, Segunda Edición, 1991, aquí incorporado como referencia.

El término bajo alquilo, tal y como aquí se emplea, y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un grupo alquilo de C₁ a C₁₀ saturado recto, ramificado, o si resulta apropiado, cíclico (por ejemplo, ciclopropil), que incluye formas tanto sustituidas como no sustituidas. A menos que se especifique lo contrario en esta solicitud, cuando el alquilo es un radical adecuado, es preferible el bajo alquilo. De manera similar, cuando el alquilo o bajo alquilo es un radical adecuado, el alquilo no sustituido o el bajo alquilo es preferible.

El término “protegido” tal y como aquí se emplea, a menos que se defina lo contrario, se refiere a un grupo que se añade a un átomo de oxígeno, nitrógeno, fósforo para evitar su reacción o para otros propósitos. Aquellos expertos en la técnica conocen una gran variedad de grupos protectores de oxígeno y nitrógeno de síntesis orgánica. Ejemplos no limitativos se muestran en Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley y Sons, Segunda Edición, 1991.

El término arilo, tal y como aquí se emplea, y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a fenilo, bifenilo, naftilo, y preferiblemente fenilo. El término incluye radicales sustituidos y no sustituidos. El grupo arilo puede sustituirse por uno o más radicales seleccionados del grupo consistente en hidroxil, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitrógeno, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, bien protegidos o no protegidos, como sea necesario, tal y como lo conocen aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, tal y como se muestra en Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley y Sons, Segunda Edición, 1991.

El término purina o bases de pirimidina incluye, pero no se limita a, adenina N⁶-alquilpurinas, N⁶-acilpurinas (donde acilo es C(O)(alkilo, arilo, alkilarilo, o arilarilo), N⁶-benzilpurina, N⁶-halopurina, N⁶-vinilpurina, N⁶-purina acetilénica, N⁶-purina acilo, N⁶-hidroxialquilo purina, N⁶-thioalquilo purina, N²-alquilpurinas, N²-alquilo-6-tiopurinas, tiamina, citosina, 5-fluorocitosina, 5-metilcitosina, 6-azapirimidina, incluyendo 6-azacitosina, 2- y/o 4-mercaptopirimidina, uracil, 5-halouracil, incluyendo 5-fluorouracil, C⁵-alquilopitimidinas, C⁵-benzilpirimidinas, C⁵-halopirimidinas, C⁵-vinilpirimidina, C⁵-pirimidina acetilénica, C⁵-pirimidina acilo, C⁵-hidroxialquilo purina, C⁵-amidopirimidina, C⁵-cianopirimidina, C⁵-nitropirimidina, C⁵-aminopirimidina, N²-alquilpurinas, N²-alquilo-6-tiopurinas, 5-azacitidinil, 5-azauracilil, triazolopiridinil, imidazolopiridinil, pirrolpirimidinil, y pirazolopirimidinil. Las bases de purina incluyen, pero no se limitan a, guanina, adenina, hipoxantina, 2,6-diaminopurina, y 6-cloropurina. Los grupos funcionales de oxígeno y nitrógeno sobre la base pueden protegerse si es necesario o si se desea. Los grupos protectores adecuados son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, e incluyen trimetilsilil, dimetilhexilsilil, t-butildimetilsilil, y t-butildifenilsilil, tritilo, grupos alquilo, y grupos acilo como acetil o propionil, metanesulfonil, y p-toluenosulfonil.

El término acilo se refiere a un éster de ácido carboxílico en el que la molécula no-carbonil del grupo éster de alquilo recto, ramificado o cíclico o bajo alquilo, alcoxialquilo que incluye metoximetilo, aralquilo incluyendo benzilo, ariloxialquilo como fenoximetilo, arilo que incluye fenilo opcionalmente sustituido por halógeno, C1 a C4 alquilo o C1 a C4 alcoxi, ésteres de sulfato como alquilo o aralquil sulfonilo que incluye metanesulfonilo, el éster mono, di o trifosfato, tritilo o monometoxitritilo, benzilo sustituido, trialquilisilil (por ejemplo, dimetil-t-butilsilil) o difenilmethylsilil. Los grupos arilo en los ésteres óptimamente comprenden un grupo fenilo. El término “bajo acilo” se refiere a un grupo acilo en el que el radical no-carbonilo es bajo alquilo.

El término aminoácido incluye aminoácidos α , β , γ o δ que ocurren de manera natural o sintéticamente, e incluye pero sin limitar a, aminoácidos encontrados en proteínas, p. ej., glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina. En una realización preferente, el aminoácido se encuentra en la configuración L. De manera alternativa, el aminoácido puede derivarse de alanilo, valinilo, leucinilo, isoleucinilo, prolinilo, fenilalaninilo, triptofanilo, metioninilo, glicinilo, serinilo, treoninilo, cisteinilo, trisoinilo, asparaginilo, glutaminilo, aspartoilo, glutaroilo, lisinilo, argininilo, histidinilo, β -alanilo, β -valinilo, β -leucinilo, β -isoleucinilo, β -fenilalaninilo, β -triptofanilo, β -metioninilo, β -glicinilo, β -serinilo, β -treoninilo, β -cisteinilo, β -tirosinilo, β -asparaginilo, β -glutaminilo, β -aspartoilo, β -glutaroilo, β -lisinilo, β -argininilo o β -histidinilo.

El término heteroarilo o heteroaromático, tal y como aquí se emplea, se refiere a un radical aromático que incluye al menos un sulfuro, oxígeno, nitrógeno o fósforo en el anillo aromático. El término heterocíclico se refiere a un grupo cíclico no aromático donde hay al menos un heteroátomo, como oxígeno, sulfuro, nitrógeno o fósforo en el anillo. Ejemplos no limitativos de grupos heteroarilo y heterocíclicos incluyen furilo, furanilo, piridilo, pirimidilo, tienilo, isotiazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, pirazinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, quinolilo, isoquinolilo, benzotienilo, isobenzofurilo, pirazolilo, indolilo, isoindolilo, bencimidazolilo, purinilo, carbazolilo, oxazolilo, tiazolilo, isotiazol-

lilo, 1,2,4-tiadiazolilo, isooxazolilo, pirrolilo, quinazolinilo, cinolinilo, ftalacinilo, xantínilo, hipoxantínilo, tiofeno, furán, pirrol, isopirrol, pirazola, imidazola, 1,2,3-triazola, 1,2,4-triazola, oxazola, isoxazola, tiazola, isotiazola, pirimidina o piridacina, y teridinilo, aciridinas, tiazola, isotiazola, 1,2,3-oxadiazola, tiamina, piridina, piracina, piperacina, pirrolidina, oxaciranos, fenacina, fenotiacina, morfolinilo, pirazolilo, piridacinilo, piracinilo, quinoxalinilo, xantínilo, hipoxantínilo, teridinilo, 5-azacotidinilo, 5-azauracililo, triazolopiridinilo, imidazolopiridinilo, pirrolopirimidinilo, pirazolopyrimidinilo, adenina, N6-aquilopurinas, N6-bencilopurina, N6-halopurina, N6-vinipurina, N6-purina acetiloénica, N6-acilo purina, N6-hidroxi alquilo purina, N6-tioalquilo purina, tiamina, citosina, 6-azapirimidina, 2-mercaptopirimidina, uracil, N5-alquilopirimidinas, N5-bencilopirimidinas, N5-halopirimidinas, N5-vinilopirimidina, N5-pirimidina acetiloénica, N5-acilo pirimidina, N5-hidroxi alquilo purina, y N6-tioalquilo purina, e isoxazolilo. Los radicales heteroaromáticos y heterocíclicos puede sustituirse de manera opcional tal y como se ha descrito anteriormente por arilo, incluyendo la sustitución por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo seleccionado de halógeno, haloalquilo, alquilo, alcoxi, hidroxi, derivados de carboxil, amido, amino, alquilamino, dialquilamino. Los heteroaromáticos pueden hidrogenarse parcialmente o totalmente, tal y como se desee. Como un ejemplo no limitativo, puede emplearse dihidropiridina en lugar de piridina. Los grupos funcionales de oxígeno y nitrógeno sobre el grupo heteroarilo pueden protegerse tanto como se necesite o desee. Grupos protectores adecuados son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, e incluyen trimetilsililo, dimetilhexilsililo, t-butildimetilsililo, y t-butildifenilsililo, tritilo o tritilo sustituido, grupos de alquilo, grupos de acilo como acetilo y propionilo, metanosulfonilo, y p-toluenosulfonilo.

Tal y como aquí se emplea, el término “sustancialmente libre de enantiómero” o “sustancialmente en ausencia de enantiómero” se refiere a una composición de nucleósido que incluye al menos 95% a 98% por peso, e incluso más preferentemente de 99% a 100% por peso, del enantiómeros designado de ese nucleósido. En una realización preferente, en los métodos y compuestos de esta invención, los compuestos están sustancialmente libres de enantiómeros.

De manera similar, el término “aislado” se refiere a una composición de nucleósido que incluye al menos 85% a 90% por peso, preferentemente 95% a 98% por peso, e incluso más preferentemente de 99% a 100% por peso, del nucleósido, constando el resto de otras especies o enantiómeros químicos.

El término “independientemente” se emplea aquí para indicar que la variable que se aplica independientemente varía independientemente de aplicación a aplicación. Por lo tanto, en un compuesto del tipo R“XYR”, donde R es “independientemente carbono o nitrógeno”, “las dos R” pueden ser carbono, “las dos R” pueden ser nitrógeno, o una “R” puede ser carbono y la otra “R” nitrógeno.

El término huésped, tal y como aquí se emplea, se refiere a un organismo unicelular o multicelular en el cual se puede realizar una réplica del virus, incluyendo líneas celulares y animales, y preferiblemente un humano. De manera alternativa, el huésped puede transportar una parte del genoma viral de hepatitis B, cuya réplica o función puede alterarse por los compuestos de la presente invención. El término huésped se refiere específicamente a células, células transfectadas con todo o parte del genoma VHB y animales, en particular primates (incluyendo chimpancés) y humanos. Sin embargo, las aplicaciones veterinarias, en ciertas indicaciones, se anticipan claramente por la presente invención (como los chimpancés).

Los términos “sales farmacéuticamente aceptables” y “complejos farmacéuticamente aceptables” se emplean a lo largo de la memoria para describir cualquier forma farmacéuticamente aceptable de un compuesto de nucleósido, que, tras la administración a un paciente, facilite el compuesto de nucleósido y muestre mínimos efectos toxicológicos no deseables, si los hay. Las farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de bases orgánicas y ácidos farmacéuticamente aceptables. Ejemplos no limitativos de dichas sales son (a) sales ácidas de adición formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido hidrocórico, ácido hidrobromico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, y similares), y sales formadas con ácidos orgánicos como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmoico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácidos naftalenedisulfónicos, y ácido poligalacturónico; (b) sales base de adición formadas con cationes como aquellas derivadas de metales alcali, aquellas derivadas de metales terrestres de alcalina, sodio, potasio, cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio, potasio, y similares, o con un catión orgánico formado a partir de N-N-dibenciletileno-diamina, amonio, o etilenediamina; o (c) combinaciones de (a) y (b); p. ej., sal de tanato de cinc y similares.

Los profármacos farmacéuticamente aceptables se refieren a un compuesto que se metaboliza, por ejemplo se hidroliza u oxidiza, en el huésped para formar el compuesto de la presente invención. Ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos protectores biológicamente volubles sobre un radical funcional del compuesto activo. Los profármacos incluyen compuestos que se oxidizan, reducen, aminatan, desaminatan, hidroxilizan, deshidroxilizan, hidrolizan, deshidrolizan, alquilatan, desalquilatan, acilatan, desacilatan, fosforilizan, desfosforilizan para producir el compuesto activo. Los compuestos de esta invención poseen actividad antiviral contra VHB, o se metabolizan con un compuesto que muestra dicha actividad.

III. Formulaciones de Sal de Nucleótido o Profármaco

En casos en los que los compuestos son suficientemente básicos o estables para formar ácido estable no tóxico o sales base, la administración del compuesto como sal farmacéuticamente aceptable puede resultar apropiada. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales ácidas orgánicas de adición formadas con ácidos, que forman un anión farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succi-

nato, benzoato, ascorbato, α -quetoglutarato y α -glicerofosfato. Sales inorgánicas adecuadas también pueden formarse, incluyendo, sales de sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden obtenerse empelando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico como amina con un ácido adecuado ofreciendo un anión fisiológicamente aceptable. También pueden realizarse sales de metal de alcali (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metal terrestre de alcalina (por ejemplo calcio) de ácidos carboxílicos.

Cualquiera de los nucleósidos aquí descritos puede administrarse como un profármaco nucleótido para aumentar la actividad, biodisponibilidad, estabilidad o sino para alterar las propiedades del nucleósido. Se conocen un número de ligando profármaco de nucleótido. En general, la alquilación, acilación u otra modificación lipofílica del mono, di o trifosfato del nucleósido incrementará la estabilidad del nucleótido. Ejemplos de grupos sustituyentes que pueden reemplazar uno o más hidrógenos en el radical de fosfato son alquilo, arilo, esteroides, carbohidratos, incluyendo azúcares, 1,2-diacylglicerol y alcoholes. Muchos se describen en R. Jones y N. Bischofberger, *Antiviral Research*, 27 (1995)1-17. Cualquiera de estos puede emplearse en combinación con los nucleósidos descritos para conseguir un efecto deseado.

El nucleósido activo β -L-3'-profármaco puede proporcionarse como un 5'-fosfoéter lípido o como un 5'-éter lípido, tal y como se describe en las siguientes referencias, aquí incorporadas como referencia: Kucera, L.S., N. Iyer, E. Leake, A. Raben, Modest E.K., D.L.W., and C. Piantadosi. 1990. "Análogos nuevos de éter interactivos con la membrana que muestran producción de VIH-1 infeccioso y producen la formación de virus defectuoso" *AIDS Res. Hum. Retro Viruses*. 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, C.A. Wallen, S. Piantadosi, and E.J. Modest. 1991. "Síntesis y evaluación de conjugados nuevos de lípido de éter para actividad anti-HIV". *J. Med. Chem.* 34:1408.1414; Hosteller, K.Y., D.D. Richman, D.A. Carson, L.M. Stuhmiller, G.M. T. van Wijk, and H. van den Bosch. 1992. "Inhibición altamente mejorada de la replica de virus de inmunodeficiencia humana del tipo 1 en células CEM y HT4-6C por 3'-deoxithimidina difosfato dimiristoilglicerol, un profármaco lípido de 3'-deoxytimidina". *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2025.2029; Hosteller, K.Y., L.M. Stuhmiller, H.B. Lenting, H. van den Bosch, and D.D. Richman, 1990. "Síntesis y actividad retroviral de análogos fosfolípicos de acidotimidina y otros nucleósidos antivirales". *J. Biol. Chem.* 265:61127.

Ejemplos no limitativos de patentes de Estados Unidos que describen sustituyentes lipofílicos adecuados que pueden incorporarse covalentemente en el nucleósido, preferentemente en la posición 5'-OH de las preparaciones de nucleósido o lipofílicas, incluyen Patentes U.S. Nos. 5,149,794 (Sep. 22, 1992, Yatvin *et al.*); 5,194,654 (Mar. 16, 1993, Hostetler *et al.*, 5,223,263 (Junio 29, 1993, Hostetler *et al.*); 5,256,641 (Oct. 26, 1993, Yatvin *et al.*); 5,411,947 (May 2, 1995, Hostetler *et al.*); 5,463,092 (Oct. 31, 1995, Hostetler *et al.*); 5,543,389 (Ag. 6, 1996, Yatvin *et al.*); 5,543,390 (Ag. 6, 1996, Yatvin *et al.*); 5,543,391 (Ag. 6, 1996, Yatvin *et al.*); y 5,554,728 (Sep. 10, 1996; Basava *et al.*), todas aquí incorporadas como referencia. Solicitudes de patente extranjeras que muestran sustituyentes lipofílicos que pueden unirse a 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.

El 3'-profármaco puede administrarse como cualquier derivado que tras la administración al receptor, es capaz de proporcionar directamente o indirectamente, el 3'-profármaco del compuesto madre o que muestra la propia actividad. Ejemplos no limitativos son las sales farmacéuticamente aceptables (de manera alternativa referidas como "sales fisiológicamente aceptables"), y la pirimidina N⁴, o derivados de N² y/o N⁶-purina alquilada (en particular con dimetilaminometileno) acilata (en particular con acetilo o aminoacetilo) del compuesto activo. En una realización no limitativa, el grupo acilo es un éster ácido carboxílico en el que el radical no- carbonilo del grupo éster se selecciona del alquilo o bajo alquilo recto, ramificado o cíclico, alcoxilalquilo incluyendo metoximetilo, aralquilo incluyendo bencilo, ariloxilalquilo como fenoximetilo, arilo incluyendo fenilo opcionalmente sustituido por halógeno, alquilo C₁ a C₄ o alcoxi C₁ a C₄, ésteres de sulfonato como alquilo o aralquilo sulfonil incluyendo metanosulfonilo, fosfato, incluyendo pero sin limitar a éster mono, di o trifosfato, tritil o monometoxitritil, bencilo sustituido, trialkilsilil (p. ej., dimetilo-5-butilosililo) o difenilmetsilililo. Los grupos arilo en los ésteres opcionalmente constan de un grupo fenilo.

Las modificaciones el 3'-profármaco o compuesto madre, y especialmente en el N⁴ pirimidinilo; o posiciones de purina N² y/o N⁶, pueden afectar la biodisponibilidad e índice de metabolismo de las especies activas, proporcionando de este modo control del envío de las especies activas. Además, las modificaciones pueden afectar la actividad antiviral del compuesto, en algunos casos incrementando la actividad sobre el compuesto madre. Esto puede evaluarse fácilmente preparando el derivado y examinando su actividad antiviral de acuerdo con los métodos aquí descritos, u otros métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

IV. Estereoquímica

Debido a que los carbonos 1' y 4' del azúcar (aquí referidos genéricamente como porción molecular de azúcar) de los nucleósidos son quirales, sus sustituyentes de no-hidrógeno (CH₂OR y la base pirimidina o purina, respectivamente) pueden ser bien cis (en el mismo lado) o trans (en lados opuestos) con respecto al sistema de anillo del azúcar. Por lo tanto, los cuatro isómeros ópticos se representan por las siguientes configuraciones (cuando la porción molecular de azúcar se orienta en un plano horizontal de modo que el oxígeno "primario" (que está atrás entre los átomos C1 y C4): "β" o "cis" (con ambos grupos "arriba", que corresponde a la configuración de los nucleósidos que ocurren de manera

natural, es decir, la configuración D), “ β ” o cis (con ambos grupos “abajo”, que es la configuración de los que ocurren de manera no natural, es decir, la configuración L), “ α ” o “trans” (con el sustituyente C2 “arriba” y el sustituyente C4 “abajo”), y “a” o “trans” (con el sustituyente C2 “abajo” y el sustituyente C4 “arriba”).

- 5 Los nucleósidos de la presente invención son lo de la configuración β -L. En una realización preferente, el 2'-deoxi- β -L-nucleósido se administra sustancialmente en forma de un único isómero, es decir, al menos aproximadamente 95% en la estereo configuración designada.

V. Terapia de Combinación y Alternancia

10

- En terapia de combinación, dosis efectivas de dos o más agentes se administran juntas, mientras que en la terapia de alternancia una dosis efectiva de cada agente se administra en serie. Las dosis dependerán de los índices de absorción, inactivación y excreción del fármaco así como de otros factores conocidos por aquellos expertos en la técnica. Debe señalarse que los valores de las dosis también variarán con la severidad de la condición que se pretende aliviar. Además, hay que entender que para cada sujeto particular, deberían ajustarse regímenes y programas de dosis específicos durante un tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona responsable de la administración y supervisión de la administración de las composiciones.

- 20 Por ejemplo, en cualquiera de las realizaciones aquí descritas, si el 3'-profármaco del β -L-2'-deoxinucleósido de la presente invención se administra en combinación o en alternancia con un segundo nucleósido o inhibidor de transcripción inversa de no-nucleósido que se haya fosforilado con una forma activa, en una realización, un segundo compuesto es uno que puede fosforilarse por una enzima que es diferente con la que se ha fosforilado el nucleósido seleccionado β -L-2'-nucleósido de la presente invención *in vitro*. Ejemplos de enzimas quinasa son timidina quinasa, citosina quinasa, guanosina quinasa, adenosina quinasa, deoxicitidina quinasa, 5'-nucleotidasa y deoxi-guanosina quinasa.

25

- Por lo tanto, en una realización la invención proporciona una combinación de dos o más profármacos de nucleósido de la presente invención, preferiblemente nucleósidos que se fosforilan por medio de distintas enzimas, o que actúan a través de distintas rutas biológicas. En otra realización, la invención proporciona al menos un profármaco en combinación o alternancia con un nucleósido que muestra actividad contra hepatitis B, incluyendo pero sin limitar un fármaco matriz de cualquiera de los profármacos aquí definidos, es decir, 2'-deoxi- β -L-nucleósidos, incluyendo 2'-deoxi- β -L-citidina; 2'-deoxi- β -L-timina; 2'-deoxi- β -L-adenosina; 2'-deoxi- β -L-guanina; 2'-deoxi- β -L-5-fluorocitidina; 2',3'-dideoxi-3'-tiacitidina; 2',3'-dideoxi-3'-tia-5-fluorocitidina. De manera alternativa, los compuestos de la presente invención pueden también administrarse en combinación o en alternancia con uno de los agentes conocidos contra el virus de la hepatitis B, como entecavir, cis-2-hidroxiometil-5-(5-fluorocitosina-1-il)-1,3-oxatiolano, preferentemente sustancialmente en la forma de (-)-isómero óptico (“FTC”, ver WO 92/14743); el (-)-enantiómero de cis-2-hidroxiometil-5-(citosina-1-yl)-1,3-oxatiolano (3TC); β -D-1,3-dioxolano purina nucleósidos Patente U.S. Nos. 5,444,063 y 5,654,010; β -D-dioxolano nucleósidos como β -D-dioxolanil-guanina (DXG), β -D-dioxolanil-2,6-diaminopurina (DAPD), y β -D-dioxolanil-6-cloropurina (ACP), L-FDDC (5-fluoro-3'-tia-2',3'-dideoxicitidina), L-enantiómeros de 3'-fluoro-modificado β -2'-deoxiribonucleosido 5'-trifosfatos, carbovir, interferon, penciclovir y famciclovir, L-FMAU, famciclovir, penciclovir, BMS-200475, bis pom PMEA (adefovir, dipivoxil); lobucavir, ganciclovir, o ribavirin; o cualquier otro compuesto que muestre un EC₅₀ o menos de 15 micromolares en 1.2.15 células; u sus profármacos o sales farmacéuticamente aceptables.

- 45 La terapia de combinación o alternancia también pueden tomarse para combatir la resistencia al fármaco. Se ha reconocido que las variantes de virus resistentes a los fármacos pueden aparecer tras un prolongado tratamiento con un agente antiviral. La resistencia a los fármacos normalmente ocurre por mutación de un gen que codifica una enzima empleada en la réplica viral. La eficacia de un fármaco contra la infección de hepatitis B puede prolongarse, aumentar, o reestablecerse con la administración del compuesto en combinación o en alternancia con un segundo, quizás un tercer, compuesto antiviral que induce una mutación diferente a la provocada por el fármaco principal. De manera alternativa, la farmacocinética, biodistribución u otro parámetro del fármaco puede alterarse a través de dicha terapia de combinación o alternancia. En general, la terapia de combinación normalmente se prefiere sobre la terapia de alternancia porque produce múltiples tensiones en el virus.

- 55 En otra realización, el profármaco se administra en combinación o en alternancia con un modulador inmune u otro modificador farmacéuticamente activo de réplica viral, incluyendo un material biológico, como proteína, péptido, oligonucleótido, o gammaglobulina, incluyendo pero sin limitar, interferón, interleuquina, u oligonucleótidos antisentido con genes que expresan o regulan la réplica de hepatitis B.

- 60 Puede emplearse cualquier método de alternancia que proporcione tratamiento al paciente. Ejemplos no limitativos de patrones de alternancia incluyen 1-6 semanas de administración de una cantidad efectiva de un agente seguido de 1-6 semanas de administración de una cantidad efectiva de un segundo agente anti-VHB. El programa de alternancia puede incluir periodos sin tratamiento. La terapia de combinación generalmente incluye la administración simultánea de un radio efectivo de dosis de dos o más agentes anti-VHB.

- 65 A la luz del hecho de que VHB a menudo se encuentra en pacientes que también son positivos del anticuerpo anti-VIH o del antígeno VIH o que se han expuesto a VIH, los compuestos activos anti-VHB aquí descritos o sus derivados o profármacos pueden administrarse en el modo apropiado en combinación o el alternancia con medicamentos anti-VIH.

El segundo agente antiviral para el tratamiento de VIH, en una realización, puede ser un inhibidor de transcrita inversa (un “RTI”), que puede ser bien un nucleósido sintético (un “NRTI”) o un compuesto no-nucleósido (un “NNRTI”). En una realización alternativa, en el caso de VIH, el segundo (o tercer) agente antiviral puede ser un inhibidor de proteasa. En otras realizaciones, el segundo (o tercer) compuesto puede ser un análogo de pirofosfato, o un inhibidor de enlace de fusión. Una lista compilando datos recogidos *in vitro* e *in vivo* para un número de compuestos antivirales se encuentra en Schinazi, *et al.*, Mutaciones en genes retrovirales asociados con resistencia a los fármacos, International Antiviral News, Volumen 1(4), International Medical Press 1996.

Los agentes activos anti-VHB también pueden administrarse en combinación con antibióticos, otros compuestos antivirales, agentes antifúngicos u otros agentes farmacéuticos administrados para el tratamiento de infecciones secundarias.

VI. Composiciones Farmacéuticas

Los humanos que sufren cualquiera de los desordenes aquí descritos, incluyendo hepatitis B, pueden tratarse mediante la administración al paciente de una cantidad efectiva de 3'-profármaco de un 2'-deoxi- β -L-nucleósido de la presente invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, en presencia de un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los materiales activos pueden administrarse a través de una ruta apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica, en forma líquida o sólida.

El compuesto activo se incluye en el portador o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad efectiva para enviar al paciente una cantidad efectiva del compuesto para inhibir la réplica viral *in vivo*, sin provocar serios efectos tóxicos en el paciente tratado. Por medio de “cantidad inhibidora” se entiende una cantidad suficiente de ingrediente activo para ejercer un efecto inhibidor tal y como se mide, por ejemplo, en un ensayo como los aquí descritos.

Una dosis preferente del compuesto para todas las condiciones arriba mencionadas se situará en el rango desde aproximadamente 1 a 50 mg/kg, preferiblemente 1 a 20 mg/kg de peso corporal por día, más generalmente entre 0.1 y aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día. El rango de dosis efectiva del profármaco farmacéuticamente aceptable puede calcularse en base al peso del nucleósido matriz que se va a enviar. Si el profármaco muestra actividad por sí mismo, la dosis efectiva puede calcularse como se ha indicado anteriormente empujando el peso del profármaco, o mediante otros medios conocidos por aquellos expertos en la técnica.

El compuesto se administra de manera conveniente en unidad en cualquier forma adecuada de dosis, incluyendo pero sin limitar, aquella que contiene de 7 a 3000 mg, preferiblemente de 70 a 1400 mg de ingrediente activo por forma de dosis de unidad. Una dosis oral de 50-1000 mg es normalmente conveniente.

Idealmente, el compuesto activo debería administrarse para conseguir combinaciones de plasma en pico del compuesto activo de desde aproximadamente 0.2 a 70 μ M, preferiblemente de desde aproximadamente 1.0 a 10 μ M. Esto puede conseguirse, por ejemplo, a través de inyección intravenosa de una solución 0.1 a 5% del ingrediente activo, opcionalmente en salina, o administrarse como un bolo alimenticio del ingrediente activo.

La concentración del compuesto activo en la composición del fármaco dependerá de los índices de absorción, inactivación y excreción del fármaco así como de otros factores conocidos por aquellos expertos en la técnica. Debe señalarse que los valores de las dosis también variarán con la severidad de la condición que se pretende aliviar. Además, hay que entender que para cada sujeto particular, deberían ajustarse regímenes y programas de dosis específicos durante un tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona responsable de la administración y supervisión de la administración de las composiciones, y que los rangos de concentración aquí establecidos son únicamente ejemplos y que no pretenden limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada. El ingrediente activo puede administrarse una vez, o puede dividirse en un número de dosis más pequeñas en intervalos variantes de tiempo.

Un modo preferente de administración del compuesto activo es el oral. Las composiciones orales normalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden estar introducidos en cápsulas de gelatina o comprimidos en pastillas. Con el propósito de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y emplearse en forma de pastillas, grageas o cápsulas. Los agentes de enlace farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición.

Las pastillas, píldoras, cápsulas, grageas y similares pueden contener uno de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente como almidón o lactosa, un agente desintegrante como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante como estearato de magnesio o estearato; un deslizante como dióxido de sílica coloidal; un agente endulzante como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante como menta, salicilato de metilo, o saborizante de naranja. Cuando la forma de unidad de dosis se encuentra en una cápsula, puede contener, además del material del tipo arriba mencionado, un portador líquido como un aceite graso. Adicionalmente, las formas de unidad de dosis pueden contener varios otros materiales que modifican la forma física de la unidad de dosis, por ejemplo, capas de azúcar, laca, u otros agentes entéricos.

El compuesto puede administrarse como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, goma de mascar o similares. El jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como agente endulzante y ciertos conservantes, tintes y colorantes y saborizantes.

El compuesto o un derivado farmacéuticamente aceptable o sales del mismo pueden también mezclarse con otros materiales activos que no afectan a la acción deseada, o con materiales que complementan la acción deseada, como agentes antibióticos, antifúngicos, antiinflamatorios, inhibidores de proteasa, u otros agentes antivirales de nucleósido o no-nucleósido. Las soluciones o suspensiones empleadas para aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tó-
pica pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, soluciones de salina,
aceites fijadas, glicoles de polietileno, glicerina, glicol de propileno u otros disolventes sintéticos; agentes antibac-
terianos como alcohol de bencilo o parabenos de metilo; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito de sodio;
agentes quelantes como ácido etilendiaminetetraacético; búferes como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el
ajuste de tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas
desechables o viales con múltiples dosis hechos de cristal o plástico.

Si se administra por vía intravenosa, los portadores preferentes son salina fisiológica o búfer salino de fosfato (PBS).

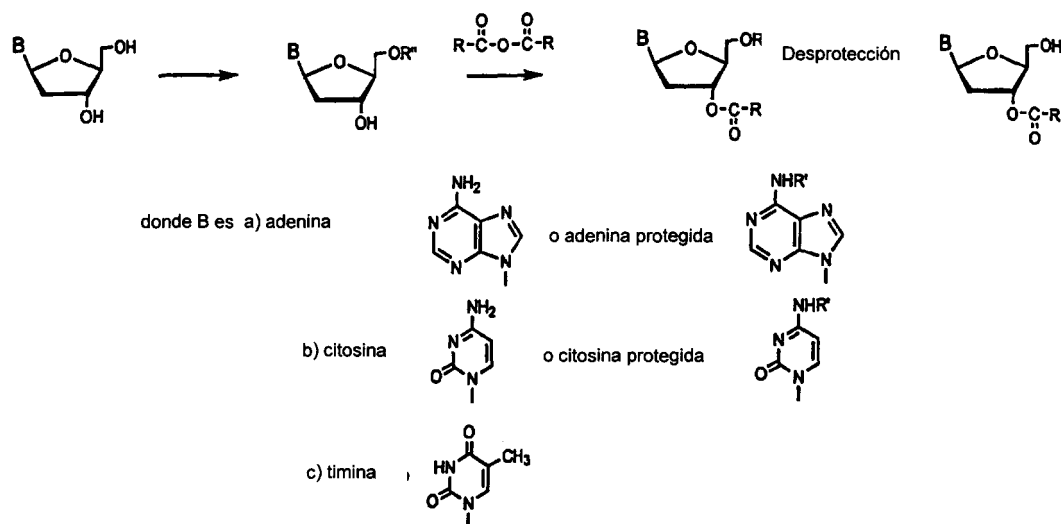
En una realización preferente, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de envío microencapsulado. Pueden emplearse polímeros biocompatibles biodegradables, como acetato de vinilo etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones resultarán aparentes para aquellos expertos en la técnica. Los materiales pueden obtenerse en el mercado en Alza Corporation.

Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales a antígenos virales) también son preferentes como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, tal y como se describe en Patente U.S No. 4,522,811. Por ejemplo, las formulaciones con liposomas pueden prepararse disolviendo los lípidos apropiados (como fosfatidil etanolamina de estearoilo, fosfatidil colina de estearoilo, fosfatidil colina de aradoilo, y colesterol) en un disolvente inorgánico que se evapora a continuación, dejando detrás una capa fina de lípido seco sobre la superficie del contenedor o recipiente. Después, una solución acuosa del compuesto activo o sus derivados de monofosfato, difosfato, y/o trifosfato se introducen en el recipiente. A continuación, se gira el recipiente manualmente para liberar el material lípido de los costados del recipiente y para dispersar los agregados lípidos, formando de este modo la suspensión liposomal.

VII. Procesos para la Preparación de Compuestos Activos

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

Los derivados β -L-3' de β -L-nucleósidos pueden realizarse a través de cualquier medio conocido en la técnica, especialmente a través de métodos conocidos para proteger alcoholes secundarios con partículas moleculares de acilo, es decir, por medio de un anhídrido o con la ayuda de un agente de acoplamiento. Como un ejemplo no limitativo, los derivados 3' pueden prepararse de acuerdo con la siguiente secuencia de reacción:



R es un grupo alquilo o arilo
R' y R'' son grupos protectores comúnmente empleados

De manera alternativa, el derivado 3' se deriva de una partícula molecular de aminoacilo. El material inicial clave para este proceso es también un nucleósido β -L adecuadamente sustituido. El nucleósido β -L puede comprarse o puede prepararse a través de medios conocidos que incluyen reacciones de enlace con partícula molecular L-azúcar.

Estos derivados de aminoacilo pueden realizarse protegiendo primero de manera selectiva el hidroxilo 5' con un grupo adecuado protector de oxígeno, como un grupo protector de acilo o sililo, y opcionalmente protegiendo cualquier amina libre en la base heterocíclica o heteroaromática. A continuación, el hidroxil libre 3' puede enlazarse con un α N-protéido o un aminoácido β .

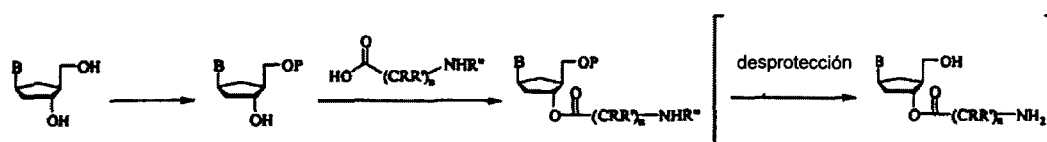
Posteriormente, el β -L-nucleósido se enlaza con el aminoacilo empleando reagentes de enlace estándares que potencian el enlace. Ejemplos no limitativos de reagentes de enlace son reagentes del tipo Mitsunobu (por ejemplo, azodicarboxilatos de dialquilo como azodicarboxilato de diisopropilo y azodicarboxilato de dietilo) con fosfina trifenil o varios tipos de carbodiimidas.

La reacción de enlace puede llevarse a cabo a cualquier temperatura para alcanzar los resultados deseados, es decir, que sea adecuada para que la reacción tenga lugar a una velocidad aceptable sin potenciar la descomposición o excesivos productos secundarios.

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

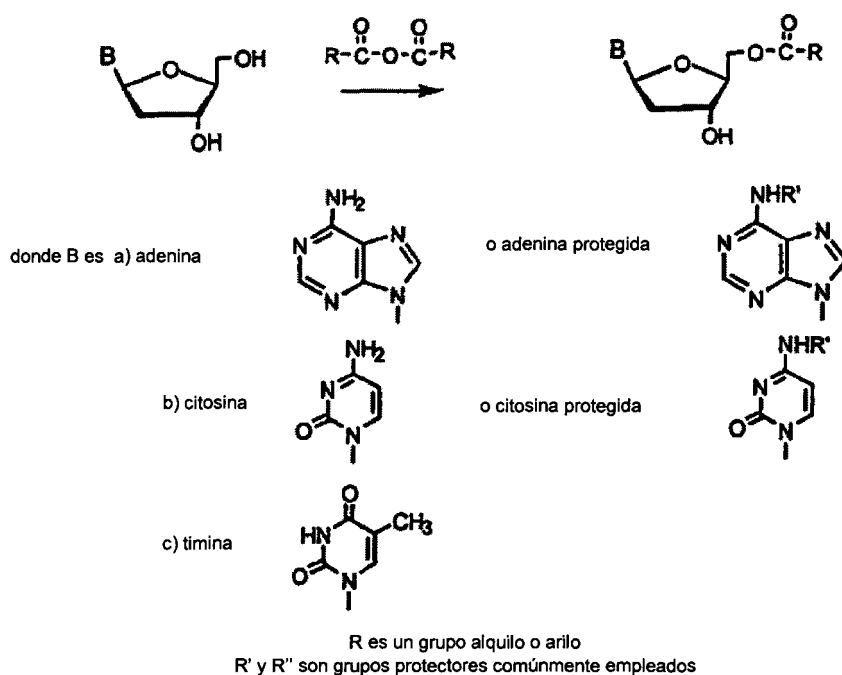
Esquema 1 es un ejemplo no limitativo de la preparación de β -L-3'-aminoacilo-nucleósido derivado de L-deoxiribonucleósido.

Ejemplo 1



B. Método la preparación de derivados β -L-5' de β -L-nucleósidos

Los derivados β -L-5' de β -L-nucleósidos pueden realizarse a través de cualquier medio conocido en la técnica, particularmente a través de métodos conocidos para proteger alcoholes primarios con partículas moleculares de acilo, es decir, por medio de un anhídrido o con la ayuda de un agente de acoplamiento o enlace. Como un ejemplo no limitativo, los derivados β -L-5' pueden prepararse de acuerdo con la siguiente secuencia de reacción:



En una realización preferente, el derivado 5' se deriva de una partícula molecular de aminoacilo. El material inicial clave para este proceso es un nucleósido β -L adecuadamente sustituido. El nucleósido β -L puede comprarse o puede prepararse a través de medios conocidos que incluyen reacciones de enlace estándar con una partícula molecular L-azúcar, como deoxiribosa. Los derivados de aminoacilo pueden realizarse enlazando de manera selectiva un

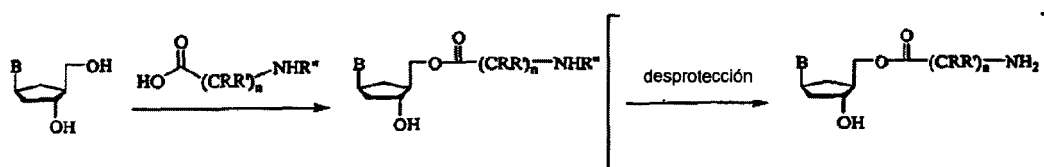
aminoácido con un β -L-nucleósido, preferiblemente sin ninguna protección adicional del nucleósido. La reacción de enlace puede conseguirse usando reagentes de enlace adecuados que potencian el enlace. Algunos ejemplos no limitativos de reagentes de enlace son reagentes del tipo Mitsunobu (por ejemplo, azodicarboxilatos de dialquilo como azodicarboxilato de diisopropilo y azodicarboxilato de dietilo) con fosfina trifenil o varios tipos de carbodiimidas.

La reacción de enlace puede llevarse a cabo a cualquier temperatura que alcance los resultados deseados, es decir, que sea adecuada para que la reacción tenga lugar a una velocidad aceptable sin potenciar la descomposición o excesivos productos secundarios.

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

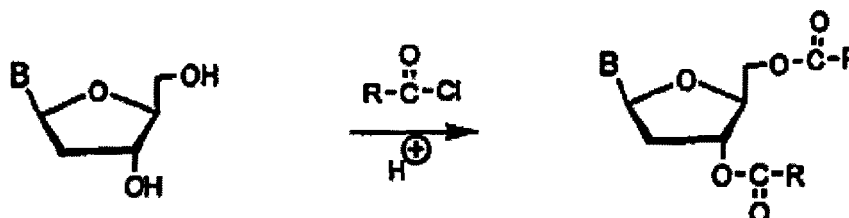
Esquema 2 es un ejemplo no limitativo de la preparación de β -L-5'-aminoacilo-nucleósido derivado de L-deoxiribonucleósido.

Ejemplo 2

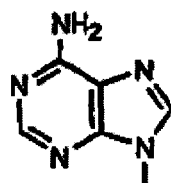


C. Método para la preparación de derivados β -L-3',5'-bis-O de β -L-nucleósidos

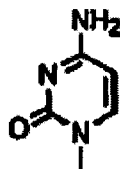
Los derivados β -L-3',5'-bis-O de β -L-nucleósidos pueden realizarse a través de cualquier medio conocido en la técnica, en particular a través de métodos conocidos para proteger alcoholes primarios y secundarios con partículas moleculares de acilo, es decir, por medio de un anhídrido o con la ayuda de un agente de acoplamiento. Como un ejemplo no limitativo, los derivados 3',5'-bis-O pueden prepararse de acuerdo con la siguiente secuencia de reacción:



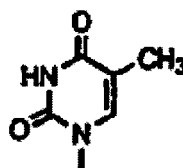
donde B es a) adenina



b) citosina



c) timina



R es un grupo alquilo o arilo

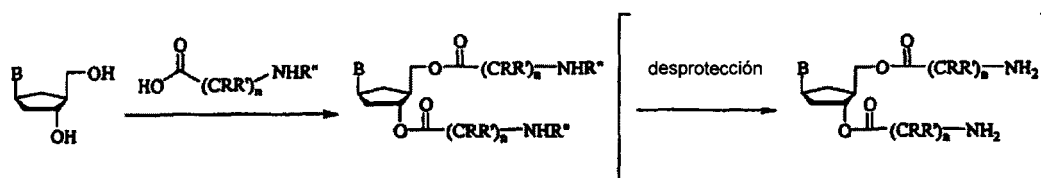
En una realización preferente, el derivado 3',5'-bis-*O* se deriva de una partícula molecular de aminoácido. El material inicial clave para este proceso es un nucleósido β -L adecuadamente sustituido. Los derivados β -L-3',5'-bis-*O* de β -L-nucleósidos pueden comprarse o pueden prepararse a través de medios conocidos que incluyen reacciones de enlace estándar con una partícula molecular L-azúcar, como deoxiribosa. Posteriormente, el hidroxil libre 3'- y 5'- puede enlazarse con un α N-protégido o un aminoácido β . La reacción de enlace puede conseguirse usando reagentes de enlace adecuados que potencian el enlace. Algunos ejemplos no limitativos de reagentes de enlace son reagentes del tipo Mitsunobu (por ejemplo, azodicarboxilatos de dialquilo como azodicarboxilato de diisopropilo y azodicarboxilato de dietilo) con fosfina trifenil o varios tipos de carbodiimidas.

La reacción de enlace puede llevarse a cabo a cualquier temperatura que alcance los resultados deseados, es decir, que sea adecuada para que la reacción tenga lugar a una velocidad aceptable sin potenciar la descomposición o excesivos productos secundarios.

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

Esquema 3 es un ejemplo no limitativo de la preparación de β -L-3',5'-di-aminoácido-nucleósido derivado de L-deoxiribonucleósido.

Ejemplo 3



D. Método opcional para la extensión de la partícula molecular de aminoácido

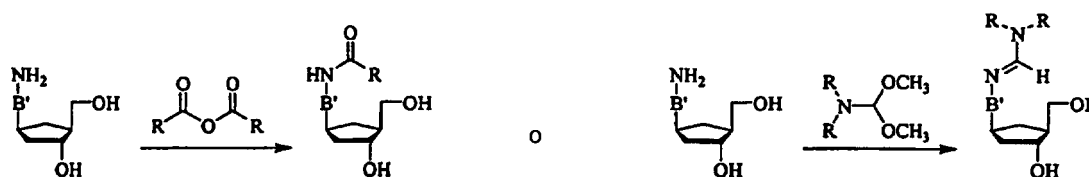
Los compuestos del título pueden realizarse haciendo reaccionar 3' y 5'-hidroxil con un derivado adecuado, como un acilo, en particular un grupo acilo. Si el nucleósido se deriva con una partícula molecular de aminoácido, puede resultar deseable enlazar la amina libre o un α -N-protégido o un aminoácido β . La reacción de enlace puede conseguirse usando reagentes de enlace adecuados que potencian el enlace. Algunos ejemplos no limitativos de reagentes de enlace son reagentes del tipo Mitsunobu (por ejemplo, azodicarboxilatos de dialquilo como azodicarboxilato de diisopropilo y azodicarboxilato de dietilo) con fosfina trifenil o varios tipos de carbodiimidas.

La reacción de enlace puede llevarse a cabo a cualquier temperatura que alcance los resultados deseados, es decir, que sea adecuada para que la reacción tenga lugar a una velocidad aceptable sin potenciar la descomposición o excesivos productos secundarios.

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

E. Método opcional para derivación de la base heteroaromática o heterocíclica

Los compuestos del título pueden hacerse opcionalmente protegiendo cualquier amino libre en la base heterocíclica o heteroaromática, por ejemplo, N⁴-citosina, N⁶-adenina, N²-guanina. Por ejemplo, la amina puede protegerse por una partícula molecular de acilo o una partícula molecular de dialquilaminometileno, por el siguiente protocolo general.



La reacción de enlace puede llevarse a cabo a cualquier temperatura que alcance los resultados deseados, es decir, que sea adecuada para que la reacción tenga lugar a una velocidad aceptable sin potenciar la descomposición o excesivos productos secundarios.

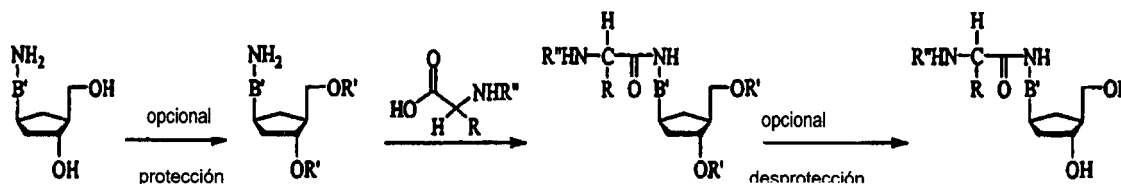
Puede seleccionarse cualquier disolvente de reacción que pueda alcanzar la temperatura necesaria y que puede solubilizar los componentes de la reacción. Ejemplos no limitativos son cualquier disolvente aprótico, incluyendo pero sin limitar, disolventes de alquilo o halo-alquilo, como hexano, ciclohexano,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

Posteriormente, el 3'-hidroxil libre puede enlazarse con un α N-protégido o un aminoácido β . La reacción de enlace puede conseguirse usando reagentes de enlace adecuados que potencian el enlace. Algunos ejemplos no limitativos de reagentes de enlace son reagentes del tipo Mitsunobu (por ejemplo, azodicarboxilatos de dialquilo como azodicarboxilato de diisopropilo y azodicarboxilato de dietilo) con fosfina trifenil o varios tipos de carbodiimidas.

La reacción de enlace puede llevarse a cabo a cualquier temperatura que alcance los resultados deseados, es decir, que sea adecuada para que la reacción tenga lugar a una velocidad aceptable sin potenciar la descomposición o excesivos productos secundarios.

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

En una realización alternativa, el derivado N4- o N6-acilo se deriva de una partícula molecular de aminoácido, y puede prepararse de acuerdo con las siguiente secuencia de reacción, mediante la protección opcional de los hidroxilos libres, seguido de una reacción de condensación con el éster de amino apropiadamente protegido, y la retirada de los grupos protectores de hidroxil, si es necesario.



Ejemplos

Ejemplo 1

⁴N-mMTr-2'-deoxi- β -L-citidina (1, Figura 1)

Se tomó β -L-dC (1 g; 4.40 mmol) en piridina seca (44 ml). Tras una protección pasajera con el grupo trimetilsilil (TMSCl, 3.34 ml, 26.4 mmol) seguido de adición de mMTrCl (3.38 mg, 11 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 540 mg, 4.40 mmol). La mezcla de la reacción se agitó durante 3 días a temperatura ambiente {A. Nyilas; C. Glemarec; J. Chattopadhyaya; Tetrahedro Lett. 1990, 46, 2149-2164}. Tras la extracción de bicarbonato de sodio, la capa orgánica se lavó con agua, se evaporó y se introdujo en dioxano (40 mL). Se añadió amoníaco acuoso (8.5 ml) en gotas y la mezcla de la reacción se agitó durante la noche. Tras la evaporación de materiales volátiles, el residuo sólido se purificó sobre columna gel de sílice {eluyente: gradiente en pasos de MeOH (0-10%) in CH₂Cl₂}, dando el compuesto deseado 1 (1.02 g, 46.5%) como una espuma. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ ppm 8.39 (br s, 1H, NH, D₂O intercambiable), 7.70 (d, 1H, H-6, J = 7.3 Hz), 7.4-6.8 (m, 14H, (C₆H₅)₂C(C₆H₄)OCH₃), 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 = 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) $\lambda_{\max}$ = 279 nm; $\lambda_{\min}$ = 250 nm.

Ejemplo 2

5'-L-N-(tert-butoxicarbonil) éster valina de ⁴N-mMTr-2'-deoxi- β -L-citidina (2, Figura 1)

A una solución de compuesto 1 (1 g, 2.00 mmol) en DMF seco (34 ml) se añadieron sucesivamente 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 37 mg, 0.3 mmol), N-(tert-butoxi-carbonil)-L-valina (Boc-Val-OH, 587 mg, 2.7 mmol), y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 660 mg, 3.2 mmol). {L. M. Beauchamp; G. F. Orr; P. De Miranda; T. Burnette; T. A. Krenitsky; Antiviral Chem. Chemother. 1992, 3 157-164.}. La solución se agitó a temperatura ambiente. Después de

ES 2 317 912 T3

40 horas, la mezcla de la reacción se volvió a cargar con DMAP adicional (37 mg, 0.3 mmol), Boc-Val-OH (587 mg, 2.7 mmol) y DCC (660 mg, 3.2 mmol) y se agitó durante 40 horas. La mezcla se filtró, el DMF se retiró del filtrado bajo presión reducida, y el residuo se sometió a cromatografía sobre una columna gel de sílice {eluyente: gradiente en pasos de MeOH (0-10%) in CH₂Cl₂} para permitir el compuesto deseado 2 (515 mg, 37%) como una espuma. ¹H NMR (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.

Ejemplo 3

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

El compuesto 2 (500 mg, 0.715 mmol) se disolvió en una solución 20% de ácido trifluoroacético en CH₂Cl₂ (25 ml) y se añadió triisopropilsilano (1.47 ml, 71.5 mmol). La mezcla de la reacción se agitó durante una hora a temperatura ambiente y el éster de valina se precipitó en Et₂O como la sal de trifluoroacetato. Tras varias evaporaciones con agua, el precipitado se introdujo en agua (2 ml), se trató con una solución 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 de hidrocloruro. ¹H NMR (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, 1 H, H-1'), 5.5 (bs, <1H, OH-3', D₂O exchangeable), 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, 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 in DMSO); UV (EtOH 95) λ_{max} = 272 nm (ε 8700); λ_{min} = 255 nm (ε 7600); HPLC rt = 8.37 min (gradiente de 0 a 50% CH₃N en 20 mM búfer de acetato de amonio trietil programado durante un periodo de 30 minutos con una velocidad de flujo de 1 ml/min).

Ejemplo de Referencia 4

N⁴-acetil-2'-deoxi-β-L-citidina (4, Figura 2)

A una suspensión del nucleósido, β-L-dC (415 mg, 1.83 mmol) en N,N-dimetilformadida (9.2 ml) se añadió anhídrido acético (207 μl, 2.20 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas [V. Bhat; B. G. Ugarkar; V. A. Sayeed, K. Grimm; N. Kosora; P. A. Domenico; E. Stocker, Nucleosides & Nucleotides, 1989, 8 (2), 179-183]. Tras la retirada de DMF bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía de columna gel de sílice [eluyente: 15% MeOH en CH₂Cl₂] para permitir el compuesto deseado (310 mg, 63%) que se cristalizó a partir de etanol; rap 128-170°C; ¹H NMR (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, 1 H, 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 8300); λ_{min} = 270 nm (ε 3500); λ_{max} = 245 nm (ε 14400); λ_{min} = 226 nm (ε 5800); [α]_D²⁰ - 81.31 (c = 1.07 en DMSO).

Ejemplo de Referencia 5

N⁴-[(Dimetilamino)metileno]-2'-deoxi-β-L-citidina (5, Figura 3)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento publicado desarrollado para la preparación del correspondiente enantiómero D [S. G. Kerr, y T.I. Kalman, J. Pharm. Sci, 1994, 83, 582-586]. Se trató una solución de L-dC (500 mg, 2.20 mmol) en DMF (4.8 ml) con dimetilformadida dimetilacetal (2.8 ml, 21.08 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución se evaporó bajo presión reducida, y se evaporó con etanol. La cristalización a partir de etanol/éter produjo el compuesto del título (501.2 mg, 81%) como cristales amarillos claros. mp 174-176°C (lit.: 188-190°C para el D-enantiómero); ¹H NMR (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)⁻.

Ejemplo de Referencia 6

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

- 5 El compuesto del título se ha sintetizado en un paso comenzando con L-dC y le sigue un procedimiento desarrollado por Breiner *et al*. R. G. Breiner; W. Rose; J. A., Dunn; J. E. Mae Diarmid y J. Bardos; J. Med. Chem. 1990, 33, 2596-2603) para la preparación de D-enantiómero. Una solución de L-dC (765 mg, 3.37 mmol) y cloruro de acetilo (960 μl, 13.48 mmol) en ácido acético glacial (4.8 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se añadió cloroformo seco (3.5 ml) y la agitación continuó durante 24 horas. La solución se evaporó bajo presión reducida y se co-evaporó con etanol. La cristalización a partir de etanol produjo el 78% del compuesto deseado, mp 192.193°C (lit: 187-189°C para el D-enantiómero [Breiner *et al*. J. Med. Chem. 1990, 33, 2596-2603]); ¹H NMR (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 (2s, 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 9900); λ_{min} = 246 nm (ε 5000).

Ejemplo de Referencia 7

3,5'-L-N(t-Butoxicarbonil) diéster valina de 2'-deoxi-β-L-citidina (9, Figura 5)

- 20 Se trató una solución de N⁴-[(Dimetilamino)metileno]-2'-deoxi-β-L-citidina (7, 500 mg, 1.77 mmol) en DMF (35 ml) con Boc-Val-OH (1.31 mg, 6.03 mmol), DMAP 86.5 mg, 0.71 mmol, 1-(3-dimetilaminopropil)-3-hidrocloruro etilcarbodiimida (EDC) (1.36 g, 7.09 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 40 horas. Se añadieron cantidades adicionales de Boc-Val-OH (655 mg, 3.01 mmol), DMAP (43.2 mg, 0.35 mmol), EDC (680 mg, 3.55 mmol), y la solución se agitó durante 20 horas adicionales. Tras la evaporación bajo presión reducida, el residuo se introdujo en CH₂Cl₂, y se extrajo varias veces con agua. La capa orgánica se lavó con agua salada (100 ml), se secó (Na₂SO₄), y se evaporó bajo presión reducida para dar 8 como material crudo, que se empleó para el siguiente paso sin purificación adicional. El residuo se introdujo en dioxano (18 ml), se trató con 26% de NH₄OH₄ acuoso, y se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La solución se evaporó bajo presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando un gradiente en pasos de MeOH (0-5%) en CH₂Cl₂, para dar el compuesto título (698.7 mg, 58% de 9). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ ppm 7.58 (d, 1 H, 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 NMR (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)⁻.

Ejemplo de Referencia 8

3,5'-L-éster Valina de 2'-deoxi-β-L-citidina-hidrocloruro (10, Figura 5)

- 45 Se trató una solución de 9 (675 mg, 1.08 mmol) en dioxano (30 ml) con una solución de 26% HCl en dioxano (30 ml), y se agitó a temperatura ambiente durante una hora y 55 minutos. La suspensión blanca resultante se evaporó bajo presión reducida. El residuo blanco sólido se introdujo en una cantidad mínima de MeOH y se precipitó en éter para dar el compuesto título 10 como sólido blanco.
- 50 mp 187°C (descomp.); ¹H NMR (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 NMR (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 7600).

Ejemplo de Referencia 9

60 N⁴-Boc-éster valinilo de 2'-deoxi-β-L-citidina (13, Figura 6)

- 65 Se trató una mezcla de L-dC (1.80 g, 7.92 mmol) y trietilamina (8.8 ml, 63.14 mmol) en THF anhidroso (80 ml) con clorotrimetilsilano (6 ml, 47.28 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se enfrió mediante la adición de una solución saturada acuosa de NH₄Cl (26 ml) y agua (10 mL). La capa acuosa se extrajo tres veces con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, lavaron con agua salada, secaron (Na₂SO₄) y se evaporaron bajo presión reducida para dar una espuma-aceite cruda de color amarillo claro que contenía 11, que se empleó para el siguiente paso sin purificación adicional. Este residuo se introdujo en CH₂Cl₂ (104 ml), se trató con N-(tert-butoxicarbonil)-L-valina (Boc-Val-OH, 1.72 g, 7.90 mmol), trietilamina (2.2 ml, 15.78 mmol), y se agitó a

ES 2 317 912 T3

temperatura ambiente durante 2 días. La solución se diluyó con EtOAc y se extrajo dos veces con NaHCO₃ saturado. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se evaporó bajo presión reducida para dar 12 como material crudo, que se empleó para el siguiente paso sin purificación adicional. El residuo se introdujo en dioxano (80 ml), se trató con 26% solución acuosa NH₄OH, y se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas y 45 minutos. La solución se evaporó bajo presión reducida, se co-evaporó con EtOH absoluto, y el residuo se purificó a través de cromatografía sobre gel de sílice, empleando un gradiente en pasos de MeOH (5-10%) en CH₂Cl₂ para dar el compuesto título 13 como una espuma. (1.64 g, 48.5% producción total). ¹H NMR (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 NMR (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)⁻.

Ejemplo de Referencia 10

3,5'-N⁴-Trivalilo-2'-deoxicitidina (14, Figura 7)

El material de inicio, 3',5'-N⁴-tri(Boc-valil)-2'-deoxicitidina se disolvió en CH₂Cl₂, pero hubo algo de material insoluble de modo que la muestra se filtró a través de Perlita. Esto dio como resultado un aumento del volumen de CH₂Cl₂ empleado. El reagente HCl/dioxano se añadió a continuación con la agitación. En unos pocos segundos, se pudieron observar unas burbujas en la solución y a continuación la mezcla se convirtió en turbia. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora. Durante este tiempo, el precipitado se volvió más cristalino. La mezcla se filtró rápidamente, los sedimentos filtrados se lavaron con CH₂Cl₂ y después se secaron en la bomba para dar 0.16 g (69%) de cristales blanco crema. Los reagentes y condiciones se describen de manera más explícita a continuación en la Tabla 1.

TABLA 1

Reagente	Unidad Mol	Wt/Vol calc	Mol/pts	Wt/Vol usad	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, crudo	634.0 FW	0.23 g	calc-obt	0.16 g	69.4%	

Ejemplo de Referencia 11

Método de Ensayo HPLC de DiBoc Valil-2'-dC y DiBocValil-20-dU

Se realizó una muestra de 1.0 mg/mL disolviendo el compuesto deseado en etanol absoluto. La solución se diluyó a continuación con una solución 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 se gasificaron antes de su uso). 20 μl de la solución se inyectaron inmediatamente en la columna HPLC de WATERS (NOVAPACK C18 - 4 pm - 3,9 X 150 mm). La velocidad de flujo se estableció en 1 mL/min con una temperatura de columna de 35°C. Para detectar los compuestos, la detección de longitud de onda se estableció en 275 nm para Di-Boc 2'dC, 260 nm para Di-Boc2'dU y 204 para impurezas después de 15 minutos. La columna funcionó con KH₂PO₄ (0.015M, pH = 3.30-3.50, se ajustó con H₃PO₄ 10% v/v) en la Bomba A y acetonitrilo de grado HPLC en la Bomba B. El patrón del gradiente se indica en la Tabla 2.

TABLA 2

#	Tiempo	Módulo	Hecho	Volumen
1	0.01	Bombas	T. Flujo	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	STOP	0

VIII. Actividad anti-VHB de los Compuestos Activos

Las polimerasas de ADN humano y la función mitocondrial no se vieron afectadas por L-dC *in vitro*. L-dC fue no-citotóxico para células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs), células progenitoras de la médula ósea, y numerosas líneas celulares y otras de origen mamífero no humano.

La actividad antiviral y la seguridad de L-dC se investigaron en dos estudios usando el modelo de marmota de infección de hepatitis B crónica. En el estudio inicial, marmotas crónicamente infectadas con VHW (>1011 equivalentes de genoma/ML suero) fueron tratadas con una formulación líquida de L-dC a través de ruta oral una vez al día durante 28 días. Los animales de control recibieron lamivudina o la formulación líquida sin el fármaco. En la dosis más alta testada (10 mg/kg/día), la carga viral descendió tanto como 6 logaritmos desde la línea base a través del ensayo de reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (PCR). La recuperación del virus después del tratamiento se detectó antes de la Semana 2. Todos los animales ganaron peso y no se observó toxicidad relacionada con el fármaco durante la fase de cuatro semanas del tratamiento o el periodo de ocho semanas que siguió al tratamiento.

La concentración 50% efectiva *in vitro* (EC₅₀) para la reducción de ácido desoxirribonucleico (ADN) viral extracelular por L-dC fue 0.24 μ M contra VHB y 0.87 μ M contra DVHB. Además, L-dC redujo los intermediarios de replicación (RI) de ADN intracelulares de VHB con un EC₅₀ de 0.51 μ M. El 90% de la concentración efectiva (EC₉₀) de L-dC contra la replicación de VHB fue 1.07 μ M. Las relaciones de actividad estructural (SAR) muestran que la sustitución del grupo hidroxilo en la posición 3' (3'-OH) amplió la actividad antiviral desde hepadnavirus a otros virus incluyendo el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y ciertos virus del herpes. La sustitución en la base disminuyó la potencia y la selectividad antiviral.

El segundo estudio usando el modelo de marmota con infección de virus de hepatitis B crónica examinó el efecto antiviral y la seguridad de L-dC en combinación con un segundo nucleósido de investigación [β -L-2'-deoxitimidina (L-dT)]. Se incluyó en este estudio un grupo de tratamiento en el que se empleó L-dC como único agente (1 mg/kg/día). No se observó toxicidad relacionada con el fármaco para L-dC solo o en combinación con L-dT durante la fase de 12 semanas del tratamiento o durante el periodo de 12 semanas que siguió al tratamiento. No hubo cambios en el peso corporal en relación a los animales de control o en la química de suero o parámetros hematológicos. Las biopsias del hígado realizadas al final del tratamiento mostraron que no hubo ninguna evidencia histomorfológica o cambios en los tejidos adiposos (esteatosis microvesicular). La combinación de L-dC (1 mg/kg/día) más L-dT (1 mg/kg/día) fue sinérgico y redujo la carga viral hasta 8 logaritmos desde la línea base.

Los nucleósidos antivirales y los análogos de nucleósidos ejercen su efecto antiviral como los derivados intracelulares de fosfato en el nivel de polimerasa viral durante la replicación del virus. Al igual que los nucleósidos naturales (D-deoxiciditina y D-timidina) y los análogos de nucleósido (p. ej., lamivudina y zidovudina), L-dC fue activado intracelularmente mediante fosforilación. En hepatocitos humanos, la deoxiciditina quinasa (dCK) fue la responsable de la conversión inicial dependiente de dosis de L-dC a un derivado 5'-monofosfato (MP). A continuación, L-dC MP se convirtió a una forma 5'-difosfato (DP), que seguidamente se convirtió al metabolito predominante intracelular 5'-trifosfato (TP). El nivel L-dC-TP alcanzó 72.4 μ M en células HepG2 expuestas a 10 μ M L-dC (90.1 μ M en hepatocitos primarios humanos) en 24 horas y tuvieron una vida media intracelular de 15.5 horas. En ensayos de polimerasa endógena, L-dC-TP inhibió la polimerasa de ADN asociada con el virón de VHW con una concentración inhibidora del 50% (IC₅₀) de 1.82 μ M. El mecanismo detallado de inhibición de polimerasa VHB ADN por L-dC se encuentra en investigación. La exposición de células HepG2 o hepatocitos humanos en cultivo primario de L-dC también produjo un segundo derivado TP, β -L-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (L-dU-TP). El nivel L-dU-TP alcanzó 18.2 μ M en células HepG2 expuestas a 10 μ M L-dC (43.5 μ M en hepatocitos humanos primarios) en 24 horas. En ensayos de polimerasa endógena, L-dC-TP inhibió la polimerasa de ADN asociada con el virón de VHW con un IC₅₀ de 5.26 μ M.

En cultivos de hepatocitos humanos primarios y en una línea celular de hepatoma humano (HepG2) el principal metabolito de L-dC fue L-dC-TP. La exposición de estas células a L-dC también llevó a la formación de L-dU-TP. Ensayos farmacológicos *in vitro* mostraron que L-dC-TP inhibió la síntesis de ADN de hepadnavirus con un IC_{50} de 1.82 μ M, contra la polimerasa de ADN asociada con el virión. L-dU-TP inhibió la síntesis de ADN de hepadnavirus con un IC_{50} de 5.26 μ M. L-dC-TP y L-dU-TP no inhibieron polimerasas de ADN humano, α , β y γ hasta concentraciones de 100 μ M, según la máxima concentración examinada.

La habilidad de los compuestos activos para inhibir el crecimiento del virus en cultivos celulares 2.2.15 (células HepG2 transformadas con virión de hepatitis) puede evaluarse tal y como se describe con detalle a continuación.

Un resumen y descripción del ensayo para efectos antivirales en este sistema de cultivo y el análisis VHB ADN se han descrito en Korba y Milman, 1991, Antiviral Res., 15:217). Las evaluaciones antivirales se llevan a cabo en dos fragmentos separados de células. Todos los pozos, en todas las placas, se cultivan en la misma densidad y al mismo tiempo.

Debido a variaciones inherentes en los niveles de VHB ADN intracelulares y extracelulares, solamente las depresiones mayores que 3.5-veces (para ADN del virión VHB) o 3.0-veces (para intermediarios de réplica VHB ADN) desde los niveles medios para estas formas VHB ADN en células no tratadas se consideran estadísticamente significativos ($P < 0.05$). Los niveles de VHB ADN integrado en cada preparación celular de ADN (que permanece constante sobre una base por célula en estos experimentos) se emplean para calcular los niveles de formas intracelulares VHB ADN, asegurando de este modo que se comparen cantidades iguales de ADN entre muestras separadas.

Los valores típicos para ADN de virión VHB extracelular en células no tratadas oscilan entre 50 y 150 pg/ml en medio de cultivo (promedio de aproximadamente 76 pg/ml). Los intermediarios de réplica de VHB ADN intracelular en células no tratadas oscilan entre 50 y 100 μ g/pg ADN celular (promedio de aproximadamente 74 pg/ μ g ADN celular). En general, las depresiones en los niveles de VHB ADN intracelular debido al tratamiento con compuestos antivirales son menos pronunciados, y ocurren de manera más lenta que las depresiones en los niveles de ADN virión de VHB (Korba y Milman, 1991, Antiviral Res. 15:217).

El modo en que los análisis de hibridización se llevaron a cabo da como resultado una equivalencia de aproximadamente 1.0 pg de VHB ADN intracelular para 2-3 copias genómicas por célula y 1.0 pg/ml de VHB ADN extracelular para 3×10^5 partículas virales/mL.

Ejemplos

Ejemplo 12

Estudio de Solubilidad

Se comparó la solubilidad de deoxiribocitosina natural (D-dC), el éster 3'-valinil y el éster 3'-5'-divalinil de L-dC en agua. La solubilidad de L-dC se examinó en primer lugar analizando los datos de HPLC (es decir, el área bajo la curva) mediante sucesivas inyecciones de varias concentraciones bien conocidas de β -L-dC, tal y como se muestra en la Tabla 3. El HPLC funcionó en una columna Nova-Pack C18 (3.9 x 150 mm) sobre un gradiente de 0 a 25% de CH_3CN en 20 mm de búfer de acetato de trietilamonio (TEAAc) programado en un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. La concentración de la solución contra el área bajo la curva produjo una relación lineal con $y = 4150049477 x - 4334.46845$ (Figura 8a).

TABLA 3

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

A partir de esto, se preparó una solución saturada con deoxiribocitosina natural (D-dC); se tomaron 3 muestra y se inyectaron en el HPLC. La concentración de esta solución saturada se determinó para que fuera 1.07, 1.08 y 0.96 mol/L; por lo tanto, las solución saturada tuvo una media de concentración saturada de 1.03 mol/L o 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 de hidrocloreuro de éster 3'-valinil de β -L-dC en agua. La curva de calibración se determinó mediante sucesivas inyecciones de varias concentraciones del hidrocloreuro de éster 3'-valinil de β -L-dC en el HPLC y midiendo el área bajo la curva, tal y como se muestra en la Tabla 5. De nuevo, el HPLC funcionó sobre una columna Nova-Pack C18 (3.9 x 150 mm) sobre un gradiente de 0 a 25% de CH_3CN en 20 mm de búfer de acetato de trietilamonio (TEAAc) programado en un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. La concentración de la solución contra el área bajo la curva produjo una relación lineal con $y = 3176423963 x - 33051.63$.

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 obtener una solución saturada de hidrocloreuro de éster 3'-valinil de β -L-dC; sin embargo, no se obtuvo ninguna. Por consiguiente, la cantidad máxima de hidrocloreuro de éster 3'-valinil de β -L-dC fácilmente disponible en el laboratorio se disolvió en agua. Se recogieron 3 muestras y se determinaron a partir del área bajo la curva del HPLC para que tuvieran una concentración media de 1.013, 0.996 y 1.059 mol/L. Los resultados se tabulan en la Tabla 6.

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 coinciden con el rango predicho calculado a partir de la curva de calibración, indicando solubilidad completa del compuesto en aquellas concentraciones elevadas, indicando que una solución saturada de esta muestra es mayor que el promedio de las tres muestras, es decir, mayor que 1.023 mol/ o 408 g/L.

Se evaluó la solubilidad de hidrocloreuro de éster 3'-valinil de β -L-dC en agua. La curva de calibración se determinó mediante sucesivas inyecciones de varias concentraciones de hidrocloreuro de éster 3'-valinil de β -L-dC en el HPLC y midiendo el área bajo la curva, tal y como se muestra en la Tabla 7. El HPLC funcionó sobre una columna Nova-Pack C18 (3.9 x 150 mm) sobre un gradiente de 0 a 25% de CH_3CN en 20 mm de búfer de acetato de trietilamonio (TEAAc) programado en un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. La concentración de la solución contra el área bajo la curva produjo una relación lineal con $y = 3176423963 x - 33051.63$ (Figura 8b).

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 obtener una solución saturada de hidrocloreuro de éster 3'-divalínil de β -L-dC; sin embargo, no se obtuvo ninguna. Por consiguiente, la cantidad máxima de hidrocloreuro de éster 3'-divalínil de β -L-dC fácilmente disponible en el laboratorio se disolvió en agua. Se recogieron 3 muestras y se determinaron a partir del área bajo la curva del HPLC para que tuvieran una concentración media de 2.8, 2.4 y 2.4 mol/L. Los resultados se tabulan en la Tabla 8.

TABLA 8

Resultados	Área	Concentración (mol/L)
1ª Muestra	8336188000	2.8
2ª Muestra	7054012000	2.4
3ª Muestra	6970838000	2.4

Los tres resultados coinciden con el rango predicho calculado a partir de la curva de calibración, indicando solubilidad completa del compuesto en aquellas concentraciones elevadas, indicando que una solución saturada de esta muestra es mayor que el promedio de las tres muestras, es decir, mayor que 2.5 mol/ o 1337 g/L.

Estudios similares de solubilidad se realizaron en hidrocloreuro de éster 5'-valínil de β -L-dC (más de 5.1 mol/L o 1664 g/L) e hidrocloreuro de éster 3',5'-diacetil de β -L-dC (3.3 mol/L o 1148 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	> 1664
3'-val-L-dC	> 1.023	> 408
3'5'-diacetil-L-dC	3.3	1148
3'5'-dival-L-dC	> 2.5	> 1337

Ejemplo 13

Estudio de Logaritmo P - Búfer de Fosfato

Se disolvieron aproximadamente 1.5 mg de D-dC en 2.2 mL de 0.02 M de solución de búfer de fosfato (A, 100 mL, pH 7.2), hecho a partir de una mezcla de solución monobásica de fosfato de potasio (28.5 mL) y solución dibásica de fosfato de potasio (71.5 mL), saturado con octanol-1 (B). A 1 mL de esta solución, se añadió 1 mL de octanol-1 (B) saturado con 0.02 M solución de búfer de fosfato (A). La mezcla resultante se agitó y se centrifugó; se recogieron tres muestras de cada fase y se analizaron a través de HPLC, tal y como se muestra en la Tabla 10. El HPLC funcionó sobre una columna Nova-Pack C18 (3.9 x 150 mm) sobre un gradiente de 0 a 25% de CH_3CN en 20 mm de búfer de acetato de trietilamonio (TEAAc) programado en un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. Se descubrió que el logaritmo P de D-dC es -1.41; por lo tanto, D-dC prefiere agua que octanol.

ES 2 317 912 T3

TABLA 10

	Estudio 1						Estudio 2					
	A¹	A²	A³	B¹	B²	B³	A¹	A²	A³	B¹	B²	B³
Área	1948481	2130720	2197377	79838	82172	80159	2380141	2326654	2339059	93123	90275	89651
Media	2092193			80723			2348618			91016		
P(B/A)	0.039						0.039					
logP	-1.41						-1.41					

De manera similar, se añadieron aproximadamente 1.5 mg de L-dC-3'-hidrocloruro de éster de valina en 2.5 mL de 0.02 M solución de búfer de fosfato (A, 100 mL, pH 7.2), hecho a partir de una mezcla de solución monobásica de fosfato de potasio (28.5 mL) y solución dibásica de fosfato de potasio (71.5 mL). La solución se saturó a continuación con octanol-1 (B). A 1 mL de esta solución, se añadió 1 mL de octanol-1 (B) saturado con 0.02 M solución de búfer de fosfato (A). La mezcla resultante se agitó y se centrifugó; se recogieron tres muestras de cada fase y se analizaron a través de HPLC, tal y como se muestra en la Tabla 11. El HPLC funcionó sobre una columna Nova-Pack C18 (3.9 x 150 mm) sobre un gradiente de 0 a 25% de CH₃CN en 20 mm de búfer de acetato de trietilamonio (TEAAc) programado en 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					

Se describió que el logaritmo P de L-dC-3'-hidrocloruro de éster de valina es -1.53; por lo tanto, L-dC-3'-éster de valina prefiere agua que octanol hasta un grado mayor que D-dC.

Los valores del logaritmo P se calcularon para L-dC-5'-hidrocloruro de éster de valina y L-dC-3',5'-hidrocloruro de éster de divalina. Los resultados se tabulan en la Tabla 12. Sin embargo, debe señalarse que el valor del logaritmo P para L-dC-3',5'-hidrocloruro de éster de divalina es probablemente inferior que el que se ha medido (-0.86). Se observó una conversión significativa del éster de divalina en el éster 3'- o 5'-monovalinil o incluso L-dC durante el experimento. El 50% de la conversión de L-dC-3',5'-hidrocloruro de éster de divalina se detectó en la fase acuosa y el 14% en la fase orgánica. Esta conversión se debe a la inestabilidad de los ésteres en el búfer de fosfato en un pH de 7 (ver ejemplos 15 y 16).

TABLA 12

Compuesto	log P (octanol/agua)
D-dC	-1.41
L-dC-3'-valina éster hidrocloruro	-1.53
L-dC-5'-valina éster hidrocloruro	-1.42
L-dC-3',5'-divalina éster hidrocloruro	-0.86
L-dC-3',5'-diacetil éster hidrocloruro	-0.74

Ejemplo 14

Estudio del Logaritmo P' - Agua MilliQ

Con el fin de evitar la conversión del éster de divalina en mono ésteres y L-dC, se llevó a cabo un estudio de un logaritmo P' alterno usando agua MilliQ (A') en lugar del búfer de fosfato (pH de 6.5 en lugar de 7.2). Es importante señalar que solamente la forma de hidrocloreuro del éster divalínico puede considerarse en agua. Aproximadamente 1.5 mg de L-dC-3',5'-hidrocloreuro de éster de divalínico se disolvieron en 2.2 mL de agua MilliQ (A', pH 6.5) saturada con octanol-1 (B). A 1 mL de esta solución, se añadió 1 mL de octanol-(B) saturado con agua MilliQ (A'). La mezcla resultante se agitó y se centrifugó; se recogieron tres muestras de cada fase y se analizaron a través de HPLC, tal y como se muestra en la Tabla 13. El HPLC funcionó sobre una columna Nova-Pack C18 (3.9 x 150 mm) sobre un gradiente de 0 a 25% de CH₃CN en 20 mm de búfer de acetato de trietilamonio (TEAAc) programado en un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. Se descubrió que el logaritmo P' de 3',5'-divalina bajo estas condiciones fue -2.72, indicando el fuerte efecto de los iones contadores en el búfer de fosfato. No se observó ninguna conversión de divalina con los monoésteres o L-dC ni en la fase acuosa ni en la fase orgánica.

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
Promedio	3284241			5919			3302678			5861		
P' (B/A')	1.80 x10 ⁻³						1.77 x 10 ⁻³					
Log P'	-2.7						-2.75					

De manera similar, se disolvieron aproximadamente 1.5 mg de L-dC-5'-hidrocloreuro de éster de valínico en 0.02 M de agua MilliQ (A', pH 6.5) saturada con octanol-1 (B). A 1 mL de esta solución, se añadió 1 mL de octanol-(B) saturado con agua MilliQ (A'). La mezcla resultante se agitó y se centrifugó; se recogieron tres muestras de cada fase y se analizaron a través de HPLC, tal y como se muestra en la Tabla 14. El HPLC funcionó sobre una columna Nova-Pack C18 (3.9 x 150 mm) sobre un gradiente de 0 a 25% de CH₃CN en 20 mm de búfer de acetato de trietilamonio (TEAAc) programado en un periodo de quince minutos con una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. Se descubrió que el logaritmo P' de 5'-valina bajo estas condiciones fue -2.75, de nuevo un valor inferior al encontrado en el estudio con el logaritmo P usando el búfer de fosfato.

TABLA 14

	Estudio 1						Estudio 2					
	A1'	A2'	A3'	B1	B2	B3	A1'	A2'	A3'	B1	B2	B3
Área	3722494	3771963	3788317	6545	5082	/	3619900	3975353	4062284	8484	9454	5877
Promedio	3760924			5813			3885845			7938		
P' (B/A')	1.54 x 10 ⁻³						2.04 x 10 ⁻³					
log P'	-2.81						-2.69					

Bajo estas condiciones, los valores del logaritmo P' para hidrocloreuro de éster L-dC-5'-valínico e hidrocloreuro de éster L-dC-3',5'-divalínico son muy similares (Tabla 15).

TABLA 15

Compuesto	log P (octanol/agua)	log P' (octanol/agua)
L-dC-5'-valina éster hidrocloreuro	-1.42	-2.75
L-dC-3',5'-divalina éster hidrocloreuro	-0.86	-2.72

Ejemplo 15

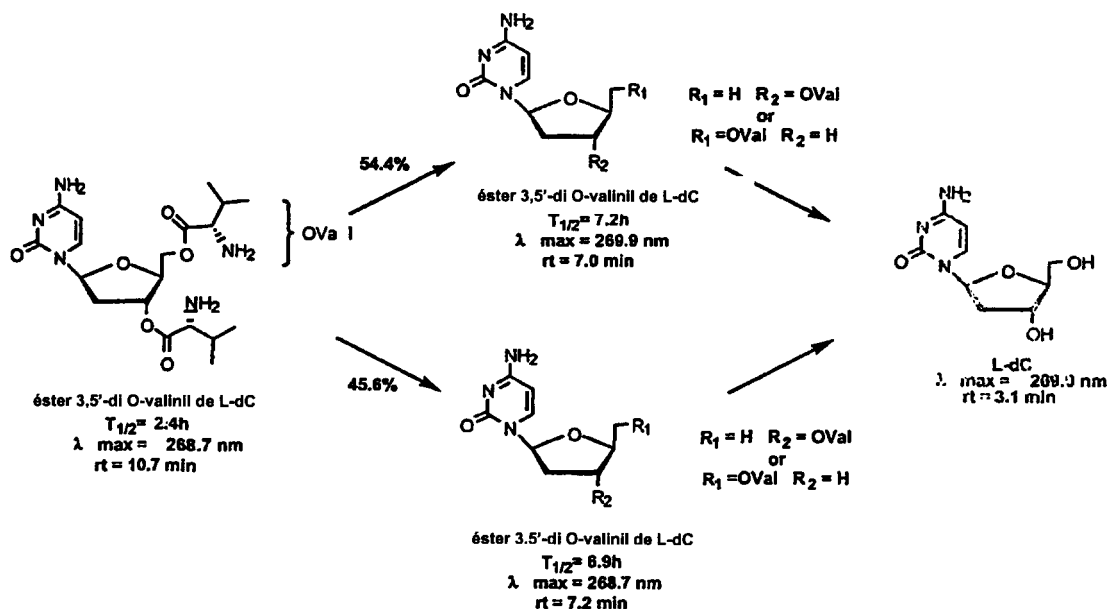
Estudio de Estabilidad en pH 7.4

Se calculó la velocidad de descomposición de cada metabolito de hidrocloreuro de éster L-dC-3'-valínico. Se determinó que la vida media de hidrocloreuro de éster L-dC-3'-valínico en pH de 7.40 fue 7 horas en una solución de 0.2M Tris-HCl a 37°C. En estas condiciones, hidrocloreuro de éster L-dC-3'-valínico simplemente se transforma en L-dC. No se detectó citosina, por lo tanto, no hubo ninguna rotura detectable de enlace de glicósido.

ES 2 317 912 T3

De manera similar, se calculó la velocidad de descomposición de cada metabolito de hidrocloreuro de éster L-dC-3',5'-divalina. Se determinó que la vida media de hidrocloreuro de éster L-dC-3',5'-divalina en pH de 7.42 fue 2.4 horas en una solución de 0.2M Tris-HCl a 37°C. En estas condiciones, hidrocloreuro de éster L-dC-3',5'-divalina se hidroliza parcialmente en el 3'- y 5'-valinil-L-dC, que más tarde se transforman en L-dC. No se detectó citosina, por lo tanto, no hubo ninguna rotura detectable de enlace de glicosido (Esquema 4, Figuras 9a y 9b).

Esquema 4

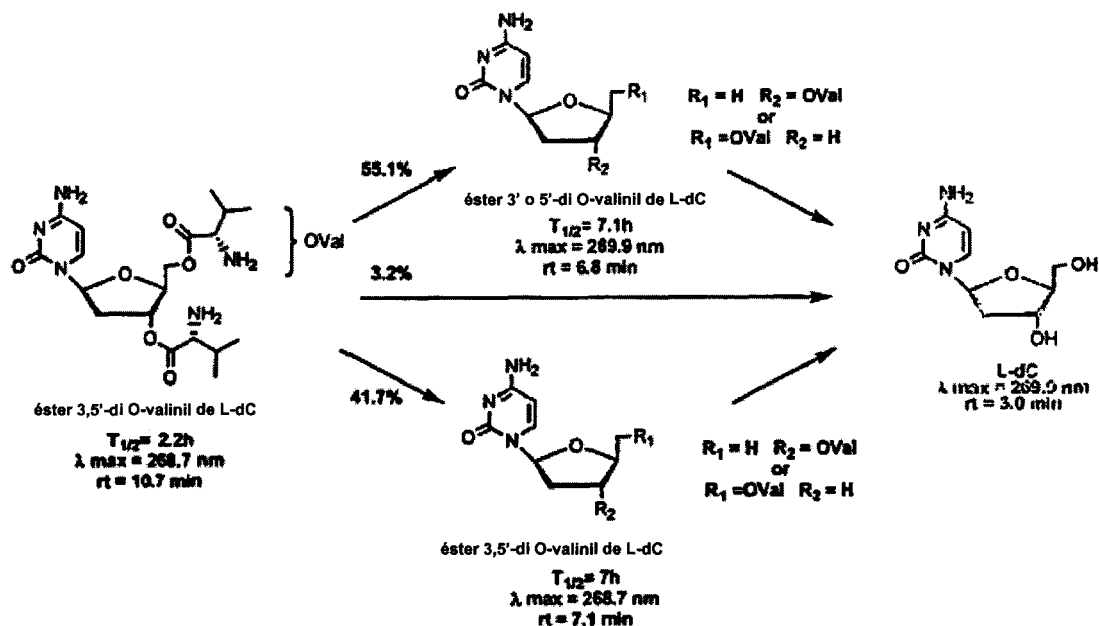


Ejemplo de Referencia 16

Estudio de Estabilidad en pH 7.20

Se determinó que la vida media de hidrocloreuro de éster L-dC-3',5'-divalina en pH de 7.20 fue 2.2 horas en un búfer de fosfato de 20 mM. En estas condiciones, hidrocloreuro de éster L-dC-3',5'-divalina se hidroliza parcialmente en el 3'- y 5'-valinil-L-dC, que más tarde se transforman en L-dC. No se detectó citosina, por lo tanto, no hubo ninguna rotura detectable de enlace de glicosido (Esquema 5, Figuras 10a y 10b).

Esquema 5



Ejemplo 17

Estudio de Estabilidad en pH 4.5

5 Se determinó que la vida media de hidrocloreto de éster L-dC-3'-valina en pH de 4.5 fue 8.6 horas en un búfer de fosfato de 20 mM. De nuevo, hidrocloreto de éster L-dC-3'-valina simplemente se transforma en L-dC. No se detectó citosina, por lo tanto, no hubo ninguna rotura detectable de enlace de glicosido.

10 De manera similar, se determinó que la vida media de hidrocloreto de éster L-dC-3',5'-divalina en pH de 4.51 fue 44 horas en un búfer de fosfato de 20 mM. En estas condiciones, hidrocloreto de éster L-dC-3',5'-divalina se hidroliza parcialmente en el 3'- y 5'-valinil-L-dC, que más tarde se transforman en L-dC. No se detectó citosina, por lo tanto, no hubo ninguna rotura detectable de enlace de glicosido (Esquema 5, Figuras 11 a y 11 b).

Ejemplo 18

Estudio de Estabilidad en pH 1.2

20 Se determinó que la vida media de hidrocloreto de éster L-dC-3'-valina en pH de 1.2 fue superior a 48 horas en una solución de 135 mM de búfer KCl-HCl. No se detectó citosina, por lo tanto, no hubo ninguna rotura detectable de enlace de glicosido.

25 De manera similar, se realizaron estudios sobre hidrocloreto de éster L-dC-5'-divalina. Este compuesto es totalmente estable en un pH de 1.2, y no se detectaron ningún otro metabolito o producto de descomposición durante un periodo de hasta 23 horas. No se detectó ninguna rotura de enlace de glicosido en 2 días en la solución.

Se descubrió que el éster 3',5'-diacetil de L-dC tenía una vida media de 11.2 horas en un pH de 1.2. Bajos estas condiciones, el compuesto se hidrolizó parcialmente en los derivados 3'- o 5', que más tarde se transformaron en L-dC. No se detectó ninguna rotura de enlace de glicosido en 2 días en la solución.

30 El éster 3'-5'-divanil de L-dC resultó ser totalmente estable a un pH de 1.23 ya que no se detectaron otros compuesto durante un periodo de hasta 48 horas en estas condiciones. No se detectó ninguna rotura de enlace de glicosido en 2 días en la solución. (Figura 12).

35 De manera alternativa, cuando la posición N⁴ de L-dC está tapada por dimetilamino-metileno o acetil, la vida media del compuesto en un pH de 1.2 es solamente 26 minutos o 50 minutos, respectivamente.

Ejemplo de Referencia 19

40 *Biodisponibilidad de Única Dosis de L-dC en el Mono Cynomolgus*

Se determinó la farmacocinética de L-dC tras la administración oral de L-dC a monos cynomolgus. Es este estudio, se administraron 10 mg/kg de L-dC etiquetado con tritio ([3H]) a tres monos cynomolgus como una única dosis IV. Tras un periodo de lavado de seis semanas, los mismos tres monos recibieron una dosis oral idéntica de L-dC. Se recogieron muestras sanguíneas para análisis de farmacocinética antes de la administrar la dosis y a las 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 8 y 24 horas tras la dosis. Se recogieron muestras de orina para análisis de farmacocinética por medio de una bandeja antes de la dosis y durante los siguientes intervalos tras la dosis: 0-2, 2-4, 4-8, y 8-12 horas, y después en intervalos de 12 horas durante 336 horas tras la dosis. El fármaco fue detectado y se determinó la concentración usando una técnica de cromatografía líquida en fase inversa y de elevada actuación. Los datos relativos al nivel en sangre y orina fueron analizados por medio de un método matemático no modelado y se derivaron AUCs por medio de una regla lineal trapezoidal.

55 Administración intravenosa de L-dC. La media C_{max} de L-dC tras la administración IV fue 95.7 µM y se dio en el tiempo más temprano en la muestra (15 minutos tras la dosis) para todos los animales. Las concentraciones de plasma L-dC descendieron durante el periodo de tiempo tras el bolo alimenticio IV con una media t_{1/2} de 1.59 horas. La evacuación total (CL) y evacuación renal (CLR) de L-dC tras la administración IV tuvieron un promedio de 0.53 L/h/kg y 0.46 L/h/kg, respectivamente. El volumen medio aparente de distribución (V_d) de 1.22 L/kg indicó que L-dC tenía una significativa distribución en el tejido extravascular.

60 La excreción urinaria fue rápida, con el 71% de dosis administrada recuperado en 2 horas. L-dC representó la mayor parte (94%) de la dosis recuperada en la orina. La evacuación renal (0.46 L/h/kg) representó el 87% de evacuación total de L-dC y sugirió que la excreción renal fue la principal ruta de eliminación.

65 L-dU fue detectado en el plasma y en la orina, indicando que la eliminación metabólica de L-dC también ocurrió tras la administración IV. Se detectaron bajos niveles de L-dU en el plasma en el límite de la detección (límite inferior a la detección (LLOD) = 0.1 µM). La excreción renal de L-dU fue 4.0% de la dosis total recuperada en la orina. Con la excreción de L-dU, no se detectaron otros metabolitos en el plasma o la orina.

ES 2 317 912 T3

La administración oral de L-dC. El C_{max} fue 3.38 μ M y ocurrió en T_{max} de 2.33 horas. La concentración de plasma de L-dC disminuyó de una manera bifásica con un terminal medio t_{1/2} de 2.95 horas y estuvo bajo el límite de detección antes de 24 horas en todos los monos. L-dC se absorbió desde el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad oral media (F) de 16.4%.

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

Se recuperó aproximadamente el 8.5% de la dosis oral administrada en la orina después de 12 horas. Tras 72 horas, se recuperó 15.5% $\pm$ 8%. L-dC representó la mayor parte (~69%) del fármaco segregado en la orina. La excreción renal de L-dU fue el 29% de la dosis total recuperada. Las heces no se recogieron.

Tabla 16 presenta un resumen de resultados farmacocinéticas para la administración IV y oral de L-dC en monos cynomolgus.

TABLA 16

Análisis de Farmacocinética tras Administración Intravenosa y Oral de L-dC (10 mg) en el Mono Cynomologus

Ruta (h)	AUC _{last} (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 (3)	81.1 ($\pm$ 5.7)	1.59 ($\pm$ 0.09)	95.7 ($\pm$ 13)	0	0.53 ($\pm$ 0.04)	0.46	1.22 ($\pm$ 0.11)	-
Oral (3)	13.7 ($\pm$ 4.3)	2.95 ($\pm$ 1.3)	3.38 ($\pm$ 1.3)	2.33 ($\pm$ 1.5)	-	-	-	16.4 ($\pm$ 5.0)
Valor Medio ($\pm$ SD).								

Ejemplo de Referencia 20

Biodisponibilidad de Dosis Única de L-dC en el Mono Rhesus

Se determinó la farmacocinética de L-dC tras la administración oral en el mono rhesus. En este estudio, se administraron 10 mg/kg [3H] de L-dC radioetiquetado a tres monos rhesus como una única dosis oral. Se recogieron muestras sanguíneas para análisis de farmacocinética antes de la dosis a las 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 8 y 24 horas tras la dosis. Se recogieron muestras de orina para análisis de farmacocinética por medio de una bandeja antes de la dosis y durante los siguientes intervalos tras la dosis: 0-2, 2-4, 4-8, y 8-12 horas, y después en intervalos de 12 horas durante 336 horas tras la dosis. El fármaco fue detectado y se determinó la concentración usando una técnica de HPLC en fase inversa. Los datos relativos al nivel en sangre y orina fueron analizados por medio de un método matemático no modelado y se derivaron AUCs por medio de una regla lineal trapezoidal.

El promedio de AUC_{0.25-8} y los valores C_{max} fueron 12.2 mgM.h y 3.23 mgM, respectivamente. El t_{1/2} medio fue 3.34 horas y la concentración en plasma de L-dC estuvo por debajo de los niveles de detección antes de 24 horas en todos los monos. La evacuación medio ranal de L-dC fue 0.273 L/h/kg. No se observaron metabolitos en el plasma de los monos que recibieron L-dC.

Se recuperó aproximadamente el 8.5% de la dosis oral administrada (biodisponibilidad de L-dC ~16%) en la orina en un intervalo de 8 horas. Tras 48 horas se recuperó el 15%. L-dC representó la mayor parte (~77%) del fármaco segregado en la orina. La excreción renal de L-dU fue el 23% de la dosis total recuperada. Con la excepción de L-dU, no se detectaron otros metabolitos.

El AUC y C_{max} para L-dC tras la administración oral a los monos rhesus fueron similares a los observados en los monos cynomolgus.

Ejemplo de Referencia 21

Biodisponibilidad de Dosis Única de L-dC en la Rata

Se determinó la farmacocinética y la biodisponibilidad de L-dC en ratas. En este estudio, se administraron 10 mg/kg [3H] de L-dC radioetiquetado a tres ratas hembra Sprague-Dawley como una única dosis VI. Un segundo grupo de tres animales recibieron una dosis oral idéntica de L-dC. Se recogieron muestras sanguíneas para análisis de farmacocinética a las 0.17, 0.33, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 horas tras la dosis. La orina también se recogió a las 8

y 24 horas tras la dosis. El fármaco fue detectado y se determinó la concentración usando una técnica de HPLC en fase inversa. Los datos relativos al nivel en sangre y orina fueron analizados por medio de un método matemático no modelado y se derivaron AUCs por medio de una regla lineal trapezoidal.

Administración Intravenosa de L-dC. El promedio de $AUC_{0.25 \rightarrow 8}$ fue 30.1 mM.h. El C_{max} de L-dC fue 91.1 mgM y ocurrió en el primer tiempo de muestra (10 minutos después de la dosis) para todos los animales. Las concentraciones en plasma de L-dC descendieron de un modo bifásico tras el bolo alimenticio IV con una media $t_{1/2}$ de 1.21 horas. El V_d medio de 2.53 L/kg indicó que L-dC tuvo una significativa distribución en el tejido. No se observaron metabolitos en el plasma de las ratas que recibieron L-dC.

L-dC representó la mayor parte de la radioactividad recuperada en la orina. L-dU fue detectado en la orina, lo que sugirió que la eliminación metabólica de L-dC ocurrió tras la administración IV.

Administración Oral de L-dC. El promedio de $AUC_{0.25 \rightarrow 8}$ fue 4.77 mM.h. El C_{max} medio fue 1.50 mgM y ocurrió en un T_{max} de 1.0 horas. La concentración en plasma de L-dC descendió con un $t_{1/2}$ de 2.52 horas. L-dC había limitado la toma desde el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad oral media (F) de 15.4%. No se observaron metabolitos en el plasma de ratas tras la administración oral de L-dC.

L-dC representó la mayor parte de radioactividad recuperada en la orina. L-dU fue detectado en el plasma y en la orina, lo que sugirió que la eliminación metabólica de L-dC ocurre tras la administración oral.

La Tabla 17 representa un resumen de los resultados de farmacocinética para L-dC IV y oral.

TABLA 17

Análisis de Farmacocinética tras Administración Intravenosa y Oral de L-dC (10 mg) en la Rata

Ruta (h)	$AUC_{0.25-28}$ (mM.h)	$t_{1/2}$ (h)	C_{max} (mM)	T_{max} (h)	CL (L/b/kg)	V_d (L/kg)	F (%)
IV (3)	30.1 (± 4.7)	1.21 (± 0.06)	91.1 (± 6.6)	0	1.44 (± 0.29)	2.53 (± 0.60)	-
Oral (3)	4.77 (± 2.1)	2.52 (± 1.3)	1.50 (± 0.68)	1.0	-	-	15.4 (± 4.6)
Valor Medio ($\pm$ SD).							

Ejemplo de Referencia 22

Biodisponibilidad de Dosis Única de L-dC en la Marmota

Se determinó la farmacocinética y la biodisponibilidad de L-dC en marmotas. En este estudio, se administraron 10 mg/kg [3H] de L-dC radioetiquetado a tres marmotas como una única dosis VI. Se recogieron muestras sanguíneas para análisis de farmacocinética a los 2, 5, 15, y 30 minutos y a las 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 y 24 horas tras la dosis. Tras un periodo de lavado de siete días, los mismos animales recibieron una única dosis oral de 10 mg/kg L-dC. Se recogieron muestras sanguíneas para análisis de farmacocinética a los 15 y 30 minutos y a las 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 8.0 y 24 horas tras la dosis. La orina se recogió tras un periodo de 24 horas tras la dosis. Se determinaron los niveles de fármaco en plasma, CL, $t_{1/2}$ y F. Los niveles de fármaco se determinaron empleando un método HPLC con una detección de radioactividad en línea y un contador de destellos.

Administración Intravenosa de L-dC. El promedio de C_{max} de L-dC fue 112 μ M y ocurrió en el primer tiempo de muestra (2 minutos después de la dosis) para todos los animales. Las concentraciones en plasma de L-dC descendieron de un modo bifásico tras el bolo alimenticio IV con una media $t_{1/2}$ de 2.85 horas. El CL de L-dC tuvo una media de 0.39 L/h/kg. El V_d medio fue 1.17 L/kg. L-dC representó la mayor parte de la radioactividad recuperada en la orina. L-dU fue detectado en la orina, indicando que la eliminación metabólica de L-dC ocurrió tras la administración IV. Los niveles de L-dU detectados de manera intermitente en plasma estuvieron en o por debajo del límite de la cuantificación de ensayo con un C_{max} de 0.75 μ M.

Administración Oral de L-dC. El C_{max} medio fue 1.37 μ M y ocurrió en un T_{max} de 3 horas. Las concentraciones en plasma de L-dC descendieron con un $t_{1/2}$ de 5.22 horas. L-dC fue absorbido desde el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad oral que osciló entre 5.60 y 16.9% con un promedio de 9.57%. L-dC representó la mayor parte de la radioactividad recuperada en la orina. L-dU fue detectado en el plasma y en la orina, indicando que la eliminación metabólica de L-dC ocurrió tras la administración oral. L-dU en plasma estuvo cerca del límite de cuantificación con una media C_{max} de 0.19 μ M.

La Tabla 18 presenta un resumen de resultados de farmacocinética para L-dC IV y oral.

TABLA 18

Análisis de Farmacocinética de L-dC (10 mg/kg) tras Administración Intravenosa y Oral en la Marmota

Ruta (n)	AUC _{t→24^a} (PM _h)	t _{1/2} (h)	C _{max} (PM)	T _{max} (h)	CL (L/h/kg)	V _d (L/kg)	F (%)
IV (3)	174 (±120) ^b	2.85 (±130)	112 (±33)	0	0.39 (±0.3)	1.17 (±0.36)	-
PO (3)	11.3 (±4.7)	5.22 (±2.7)	1.37 (±0.22)	3.0 (±1)	-	-	9.57 (±6.4)

^a t = 0.033 horas para administración IV y 0.25 horas para administración PO
^b Valor medio (± SD)

Ejemplo 23

Biodisponibilidad de los Profármacos de L-dC

La biodisponibilidad de L-dC, el monoéster 5' de L-dC, el éster divalina de L-dC, y el éster diacetil de L-dC fue evaluada en monos cynomolgus, con y sin L-dT. Cuando el éster divalina de L-dC fue administrado oralmente a los monos, aproximadamente el 73% de la dosis fue absorbida. Del éster divalina absorbido de L-dC, más del 99% se convirtió rápidamente en L-dC para dar una elevada concentración de L-dC en el plasma y no hubo éster divalina de L-dC detectable. Una baja concentración en plasma del éster monovalina de L-dC fue detectada al poco tiempo después de la administración oral de éster divalina de L-dC. Se detectó de manera intermitente una baja concentración en plasma de β-L-2'-deoxiuridina (L-dU). No se detectaron otros metabolitos. Los resultados se presentan en la Tabla 19. Tal y como se indica, la combinación del éster 3'-5'-divalil de L-dC con L-dT proporcionó la mayor biodisponibilidad de L-dC.

TABLA 19

	L-dC matriz (mw=227.22)		L-dC ³ 5'-valina (mw=399.27)		L-dC 3'-valina (mw=399.27)		L-dC di-valina (mw=534.87)		L-dC di-acetil (mw=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 w/ L-dT ²	11.9	1.7	ND		ND		74.6	9.9	24.9	4.0

¹ estimado relativo a AUC de L-dC (dosis oral)
² coadministrado con 10 mg/kg L-dT
³ Actividad específica 5'-mono-valina estudio basado en dosis radioactiva total
 ND, no determinado
 Pureza = 87% L-dC-mono-valina, 12% L-dC

Ejemplo de Referencia 24

Biodisponibilidad de Única Dosis de Dival-L-Dc en Mono Cynomolgus

Tres monos cynomolgus (macaca fascicularis) que no había sido sometidos a ningún tratamiento previamente recibieron 10 mg/kg de dival-L-dC a través de vía intravenosa con una cantidad de trazado de fármaco etiquetado con tritio ([3H]) (250 μCi) disuelto en salina 9.0% estéril. Tras un periodo de descanso de 6 semanas, los mismos tres animales recibieron una dosis oral idéntica de dival-L-dC. Se recogieron muestras sanguíneas en tubos con heparina en un momento antes de la dosis (~18 horas) y a las 0.25, 0.50, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 horas después de la dosis. La orina también se recogió desde 0-2, 2-4, 4-8, 8-12 y después en intervalos de 12 horas hasta 336 horas después de la dosis. El fármaco fue cuantificado en plasma y orina con una técnica de cromatografía líquida- espectrometría de masa (LC-MS). Tras la administración de dival-L-dC, el curso en el tiempo de concentración de L-dC fue analizado por medio de un método matemático no modelado y el área bajo las curvas tiempo-concentración (AUC) se derivó a través de una regla lineal trapezoidal. La biodisponibilidad (F) de L-dC tras la administración IV y PO de dival-L-dC se calculó a partir de L-dC AUCs, donde $F = AUC_{po}/AUC_{iv} \times \text{dosis}_{iv}/\text{dosis}_{po}$.

Dival-L-dC administrado por vía intravenosa se convirtió rápidamente en L-dC tras la administración intravenosa. Dival-L-dC se detectó en el plasma a los 15 minutos ($1.39 \mu\text{M}$) y a los 30 minutos ($0.36 \mu\text{M}$, 1 de 3 animales) [límite inferior de cuantificación (LLOQ) = $0.23 \mu\text{M}$ o 100 ng/mL]. Dival-L-dC no se detectó en el plasma tras 30 minutos después de la dosis. La forma parcialmente esterificada de dival-L-dC, éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina, fue detectado en plasma a los 15 minutos ($3.23 \mu\text{M}$) y descendió en concentración con $0.8 \mu\text{M}$ antes de 2 horas (LLOQ = $0.031 \mu\text{M}$ o 10 ng/mL). L-dC representó la mayor parte del fármaco presente en el plasma tras la administración intravenosa. El valor medio de $\text{AUC}_{0.25 \rightarrow 8}$ para L-dC fue $19.8 \mu\text{M}\cdot\text{h}$. La concentración media en pico de plasma (C_{max}) de L-dC fue $26.4 \mu\text{M}$ (LLOQ = $0.088 \mu\text{M}$ o 20 ng/mL) y ocurrió en el primer tiempo de muestra (15 minutos después de la dosis) en todos los animales. La concentración en plasma de L-dC descendió de un modo bifásico con una media $t_{1/2}$ de 1.73 horas. La evacuación corporal total (CL) y el volumen aparente de distribución (V_d) de L-dC tuvieron una media de 1.01 L/h/kg y 2.46 L/kg , respectivamente, indicando que L-dC tuvo una significativa distribución en el tejido. El enlace de dival-L-dC y L-dC con proteínas de plasma humano *ex vivo* fue $13.3\% \pm 2.6\%$ y $19.7\% \pm 5.9\%$, respectivamente. El impacto del enlace de proteína de plasma humano sobre los niveles libres de fármaco de dival-L-dC y L-dC fue mínimo, sugiriendo que las interacciones del fármaco que implican desplazamiento de puntos de enlace no se anticipan.

La excreción urinaria fue rápida con $58 \pm 3\%$ de la dosis administrada de dival-L-dC segregada en 2 horas tras la administración intravenosa. L-dC representó la mayor parte ($\sim 93\%$) del fármaco segregado en la orina. L-dU también se detectó en el plasma y en la orina. Esto sugirió que la eliminación metabólica de L-dC también ocurre tras la administración de dival-L-dC. Se detectaron bajos niveles de L-dU en plasma en puntos intermitentes en el tiempo en dos de tres animales en concentraciones que oscilaron entre $0.22 \mu\text{M}$ y $0.88 \mu\text{M}$ (LLOQ = $0.22 \mu\text{M}$ o 50 ng/mL). No hubo niveles detectables de L-dU en ningún punto en el tercer mono. La excreción renal L-dU y la forma esterificada de dival-L-dC, éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina fue menor, representando aproximadamente el 2.5% y 3.7% de la dosis total recuperada, respectivamente. Dival-L-dC fue detectado en la orina de uno de los tres animales a las 2 horas tras la administración IV, lo que representó aproximadamente el 0.15% de la dosis recuperada.

Debido a las bajas concentraciones intermitentes de ésteres de monovalina y L-dU en plasma y orina, no fue posible realizar análisis de farmacocinética de estos metabolitos. La apariencia del éster de monovalina de dival-L-dC no fue inesperada ya que representa e intermedia la conversión de dival-L-dC a L-dC. Además, los estudios de metabolismo celular *in vitro* en hepatocitos primarios de monos, ratas y humanos y en extractos de células HepG2 demostraron que L-dC no retiró directamente el grupo amino de L-dU pero que monofosfato de L-dC (-MP) se convirtió en L-dU-MP, que se activa con difosfato L-dU (-DP), y trifosfato (-TP), o se metaboliza con L-dU, que a continuación se detecta en el compartimiento extracelular (plasma). L-dU fue no-citotóxico ($\text{CC}_{50} > 200 \mu\text{M}$) y L-dU-TP tuvo un IC_{50} *in vitro* contra la polimerasa de ácido desoxirribonucleico (ADN) del virus de hepatitis B de $5.26 \mu\text{M}$ (Ver Microbiología y Virología, Sección 10).

Dival-L-dC administrado oralmente rápidamente se convirtió en L-dC tras la administración oral y no fue detectable en muestras de plasma en ningún momento (LLOQ de dival-L-dC en solución = $0.23 \mu\text{M}$ o 100 ng/mL). El metabolito parcialmente esterificado de dival-L-dC, éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina, fue detectado en plasma a los 30 minutos y una hora en concentraciones que oscilaron entre $0.034 \mu\text{M}$ y $0.107 \mu\text{M}$ (LLOQ de monoéster en solución = $0.031 \mu\text{M}$ o 10 ng/mL). Dival-L-dC no se detectó en el plasma.

L-dC representó la mayor parte ($< 99\%$ en C_{max}) de los niveles de fármaco en plasma tras la administración oral de dival-L-dC. El valor medio de $\text{AUC}_{0.25 \rightarrow 8}$ para L-dC fue $14.0 \mu\text{M}\cdot\text{h}$. C_{max} de L-dC fue $8.26 \mu\text{M}$ (LLOQ de L-dC en solución = $0.088 \mu\text{M}$ o 20 ng/mL) y ocurrió a las 0.67 horas tras la administración de dival-L-dC. La concentración en plasma de L-dC descendió de un modo bifásico con una media $t_{1/2}$ de 2.28 horas. La biodisponibilidad media oral de L-dC tras la administración oral de dival-L-dC fue $72.7\% \pm 22\%$.

L-dU también se detectó en el plasma indicado que la eliminación metabólica de L-dC ocurre tras la administración oral de dival-L-dC. Los niveles bajos de L-dU fueron detectables en el plasma desde los 30 minutos hasta las 4 horas en dos de los tres animales de concentraciones que oscilaron entre $0.24 \mu\text{M}$ y $0.66 \mu\text{M}$ (LLOQ de L-dC en solución = $0.22 \mu\text{M}$ o 50 ng/mL) y en un animal solamente a las 8 horas en una concentración de $0.39 \mu\text{M}$.

Tras la administración oral, dival-L-dC rápidamente fue absorbido desde el tracto gastrointestinal y se convirtió en L-dC por un metabolismo de primer paso intestinal y/o hepático. Ni el metabolismo dival-L-dC ni L-dC se asociaron con enzimas microsomales del hígado. Tras la administración de niveles altos de dosis de dival-L-dC, el éster monovalina de L-dC se detectó de forma pasajera antes de la conversión a L-dC. El dival-L-dC no se detectó tras la administración oral. Los niveles bajos intermitentes en plasma se detectaron en, o por debajo de, el límite inferior de cuantificación en ensayos. L-dU se formó por medio de la retirada del grupo amino de L-dC tras la toma celular de L-dC.

Se recuperó aproximadamente $31 \pm 8\%$ de la dosis oral administrada en la orina en un periodo de 4 horas. Tras 72 horas se recuperó $39 \pm 8\%$. L-dC representó la mayor parte ($\sim 95\%$) del fármaco segregado en la orina. La excreción renal de L-dU y la forma parcialmente esterificada de dival-L-dC, éster β -L-2'-deoxicitidina-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 resultados de farmacocinética para L-dC tras dosis IV y oral y L-dC.

TABLA DE REFERENCIA 20

*Análisis de Farmacocinética tras Administración Intravenosa y Oral de Dival-L-dC
(10 mg/kg) en Monos Cynomolgus*

Ruta	Parámetro de Farmacocinética ²						
	AUC _{0-25→} 8	t _{1/2}	C _{max}	T _{max}	CL	V _d	F
(n)	(PM h)	(h)	(PM)	(h)	(L/h/kg)	(L/kg)	(%)
IV	19.8	1.73	24.6	0	1.01	2.46	
(3)	(± 5.2)	(± 0.33)	(± 2.6)		(± 0.32)	(± 0.47)	
Oral	14.0	2.28	8.26	0.67			72.7
(3)	(±2.4)	(±1.4)	(±0.71)	(±0.3)			(±22)

(3) Valor medio [± desviación estándar (SD)].

La Tabla 21 presenta un esquema de formación de metabolito de forma dival-L-dC, el derivado de monovalina de L-dC, L-dC, y L-dU tras la administración IV y oral de dival-L-dC. El C_{max} de cada metabolito también se señala.

TABLA DE REFERENCIA 21

Formación de Metabolito para 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 PM	3.23 PM	24.6 PM	0.88 PM
Oral (10 mg/kg dival-L-dC)				
	val-L-dC→	mono-val-L-dC→	L-dC→→	L-dU
C _{max}	No detectada	0.11 PM	8.26 PM	0.66 PM

Ejemplo de Referencia 25

Biodisponibilidad Oral de L-dC por medio de Dival-L-dC en Mono Cynomolgus

Tres monos cynomolgus macho que no habían recibido tratamiento previamente (macaca fascicularis) recibieron 10 mg/kg de dival-L-dC oralmente con una cantidad de trazado de fármaco etiquetado con tritio ([3H]) (250 μ Ciu) disuelto en salina 9.0% estéril. Se recogieron muestras sanguíneas en tubos con heparina en un momento antes de la dosis (~18 horas) y a las 0.25, 0.50, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 horas después de la dosis. La orina se recogió desde 0-2, 2-4, 4-8, 8-12 y después en intervalos de 12 horas hasta 336 horas después de la dosis. El fármaco fue cuantificado en plasma y orina empleando un análisis HPLC. Tras la administración de dival-L-dC, el curso en el tiempo de concentración de L-dC fue analizado por medio de un método matemático no modelado y el área bajo las curvas tiempo-concentración (AUC) se derivó a través de una regla lineal trapezoidal. Dival-L-dC fue rápidamente absorbido y convertido a L-dC tras la administración oral. El análisis de cromatografía líquida con elevada presión radiocromatográfica (HPLC) de muestras de plasma confirmó que la mayor parte de la radioactividad recuperada fue L-dC. Dival-L-dC fue solamente detectado en un animal a los 15 minutos tras la dosis en una concentración de 0.35 μ M. La forma parcialmente esterificada de dival-L-dC, éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina, no fue detectada ni en plasma ni en orina. Aproximadamente el 26% de la dosis oral administrada se recuperó en la orina después de 8 horas. Después de 72 horas, se recuperó el 31%. L-dC representó la mayor parte (μ 89%) del fármaco segregado en la orina. La excreción renal de L-dU fue menor, representando aproximadamente el 10% de la dosis recuperada. No se detectaron dival-L-dC o su forma parcialmente desesterificada y ningún otro metabolito.

El perfil general de farmacocinética se comparó con el determinado en el estudio de farmacocinética tal y como se demuestra por el C_{max} similar para radios AUC. Se detectaron bajos niveles de L-dU en el plasma del tercer animal con un C_{max} medio de 0.33 μ M. No se detectó L-dU en el plasma del tercer animal. El nivel de L-dU estuvo en o por debajo del límite de cuantificación, excluyendo el análisis de farmacocinética.

Ejemplo de Referencia 26

Metabolismo in vitro de Dival-L-dC

Se llevaron a cabo estudios para determinar la estabilidad y el enlace proteico de dival-L-dC y sus metabolitos des-
 esterificados en plasma humano. Se incubó dival-L-dC en plasma humano a 37° y las muestras se analizaron en varios
 momentos en el tiempo hasta 24 horas (Figura 13). No se detectó dival-L-dC en 24 horas con una completa conversión
 a L-dC. También se observaron dos metabolitos adicionales (éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina y éster β -L-2'-deoxi-
 citidina-valina). La naturaleza pasajera de estos metabolitos indicó que son intermediarios 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 minutos.

El impacto de enlace proteico en plasma humano en niveles libres de dival-L-dC y L-dC también se investigó
 usando un método de ultrafiltración. En enlace proteico en plasma de dival-L-dC fue $13.3\% \pm 2.6\%$. El enlace de L-
 dC con proteínas en plasma fue $19.7\% \pm 5.9\%$. Este estudio muestra que el impacto de enlace proteico en plasma
 humano en dival-L-dC y L-dC es mínimo y sugiere que las interacciones del fármaco que implican desplazamiento de
 punto de enlace no se anticipan.

Ejemplo de Referencia 27

Activación Metabólica y Perfil Intracelular de L-dC

Se examinó el metabolismo celular de L-dC usando células HepG2 y hepatocitos primarios humanos. El análisis
 de cromatografía líquida de elevada presión (HPLC) demostró que L-dC se fosforilizó de manera extensiva en hepa-
 tocitos. El metabolito predominante en células HepG2 expuestas a $10 \mu\text{M}$ L-dC durante 24 horas fue L-dC-TP que
 alcanzó $72.4 \pm 1.8 \mu\text{M}$ (ver Tabla 23). En hepatocitos humanos primarios, la concentración de L-dC-TP en 24 horas
 fue $90.1 \pm 37 \mu\text{M}$, similar al nivel de fosforilización en células HepG2. La exposición de hepatocitos a L-dC llevó a la
 activación de un segundo derivado 5'-trifosfato, L-dU-TP. En células HepG2 expuestas a $10 \mu\text{M}$ L-dC, el nivel de L-
 dC-TP alcanzó $18.2 \mu\text{M}$ (43.5 pM en hepatocitos humanos primarios) en 24 horas. En hepatocitos primarios de rata y
 mono la extensión de fosforilización de L-dC fue ligeramente inferior.

TABLA 23

Activación de L-dC(10 PM) en Hepatocitos

Células ^a	n	Metabolito (10 PM)						
		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±0.86	6.73±0.41	10.2±1.9	25.6±0.08	2.69±0.45	72.4±1.8	18.2±1.0
Humana								
Primaria	3	27.6±15	5.74±2.4	7.19±2.3	15.8±1.8	3.93±1.6	90.1±37	43.5±27
Hepatocitos								
Mono								
Primario	1	11.2	2.54	7.66	10.4	3.11	39.3	21.9
Hepatocitos								
Ratas Primario	3	5.09±2.1	3.53±0.97	1.52±0.38	8.82±3.1	7.90±1.4	14.2±3.1	46.9±5.2
Hepatocitos								

(a) Las células se incubaron durante 24 horas con [³H]-L-dC, actividad específica: ensayo HepG2 = 0.5 Ci/mmol; ensayo de hepatocitos en humano, mono y rata = 1.0 Ci/mmol.

Además de los derivados fosforilizados de L-dC y L-dU, se observó la formación de un metabolito β -L-2'-deoxi-
 nucleótido. En células HepG2 y en cultivos de hepatocitos primarios expuestos a $10 \mu\text{M}$ L-dC durante 24 horas,
 se detectó β -L-2'-deoxicitidina-5'-difosfocolina (L-dC-DP-colina) en una concentración de $25.6 \mu\text{M}$ (rango 25.6-25.7
 μM) y $12.3 \mu\text{M}$ (rango 8.82-15.8 μM), respectivamente.

El perfil metabólico obtenido tras una exposición de 24 horas de células HepG2 a $10 \mu\text{M}$ [³H]-L-dC se muestra
 en la Figura 14. La vida media intracelular aparente de L-dC-TP fue 15.5 ± 0.34 horas, que se correlaciona con la
 prolongada actividad antiviral tras la retirada del fármaco en los experimentos de reaparición del virus. El patrón
 de fosforilización detectado en hepatocitos humanos primarios fue cualitativamente y cuantitativamente similar al
 obtenido usando células HepG2 (Figura 15).

Ejemplo de Referencia 28

Quinasas Celulares Asociadas con Activación Metabólica

D-Deoxicitidina (dCyd) es un sustrato natural de quinasa citosólica dCyd (dCK) y timidina quinasa mitocondrial (TK2) para conversión a dCyd-5'-monofosfato (dCMP). 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 fosforilización inicial de L-dC fue identificada en estudios de competición usando L-dC y los endógenos naturales THd y dCyd. La fosforilización intracelular de L-dC disminuyó en un modo dependiente de dosis por dCyd pero no por Thd. Por lo tanto, dCyd actuó como un inhibidor de fosforilización de L-dC. El cambio en la fosforilización intracelular de L-dC fue similar cuando las células HepG2 se expusieron a Thd y dCyd o solamente a dCyd. La inhibición de la fosforilización de L-dC por solamente la deoxipirimidina natural, dCyd, sugirió que dCK estuvo implicada en la fosforilización de L-dC.

El papel de estas actividades de pirimidina nucleósido quinasa en la fosforilización de L-dC se investigó además en las líneas celulares deficientes. No hubo una disminución significativa en la cantidad de metabolitos fosforilizados de L-dC en células deficientes de dCK. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la fosforilización de L-dC en células deficientes de TK1. Estos datos fueron consistentes con los estudios de competición descritos anteriormente e indicaron que dCK juega un papel crucial en la fosforilización de L-dC a L-dC-MP.

Usando extractos citosólicos de células HepG2 como una fuente de enzima, las cinéticas de estado estable para la fosforilización de L-dC, Thd, y dCyd fueron similares tal y como se ha indicado por la constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) y los valores de velocidad inicial máxima (V_{max}) (L-dC: K_m de 5.75 mM y V_{max} de 1.12 proteína mmol/min/mg; Thd: K_m de 4.06 mM y V_{max} de 1.26 proteína nmol/min/mg; dCyd: K_m de 4.85 mM y V_{max} de 2.15 de proteína mmol/min/mg). Además, la eficiencia de fosforilización de L-dC, Thd, y dCyd fueron similares tal y como se ha definido por sus correspondientes V_{max}/K_m en valores (0.19, 0.31, y 0.44, respectivamente).

Además, la extensión de fosforilización intracelular de L-dC se comparó con la de los sustratos naturales endógenos, Thd y dCyd en extractos de hígado en marmotas. Esto se realizó para soportar las pruebas antivirales en el modelo de marmota de infección de virus de hepatitis B. La fosforilización de L-dC fue similar a la de los sustratos endógenos. Además, el nivel de L-dC se comparó con el de L-dC y al de los sustratos endógenos en extractos de hígado humano.

Ejemplo de Referencia 29

Actividad Antiviral Contra Hepadnavirus de L-dC

La actividad antiviral de L-dC contra virus humano de hepatitis B se midió a través de la reducción en VHB ADN extracelular y intermediarios de réplica comparados células de control no tratadas en la línea células de hepatoma que expresa VHB 2.2.15 (ver Tabla 24). Las pruebas confirmatorias de la actividad antiviral de L-dC usando un panel de virus de ácido ribonucleico (ARN) y de ADN se llevaron a cabo con el Programa NIH de Investigación Antiviral y Química Antimicrobial.

L-dC no inhibió la réplica de ningún virus diferente al hepadnavirus (VHB, DVHB). L-dC tuvo una potente actividad antiviral contra la réplica de VHB *in vitro*, reduciendo la producción de VHB ADN extracelular con un EC_{50} de 0.24 μ M (EC_{90} 1.06 μ M). L-dC también redujo los intermediarios de réplica VHB ADN extracelular (RI) con un EC_{50} de 0.5 μ M. Además, L-dC produjo una inhibición dependiente de dosis de virus de síntesis de ADN hepatitis B de pato (DVHB) en cultivos de hepatocito de pato primario (PHD) con un EC_{50} de 0.87 μ M.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 24

Actividad, Selectividad y Citotoxicidad Antiviral in vitro de L-dC

Virus (Linea Celular)	EC ₅₀ ^b (PM)		CC ₅₀ ^c (PM)
HBV (2.2.15)	0.24	0.08	>2000
DHBV (PDH)	0.87		nd ^d
HIV-1 (PBMC)	>200		>200
HSV-1 (HFF) ^e	>100		>100
HSV-2 (HFF) ^e	>100		>100
VZV (HFF) ^e	18.6		>100
EBV (Daudi) ^e	>50		>50
HCMV (HFF) ^e	>100		>100
Influenza A/H1N1 (MDCK)	>100		>100
Influenza A/H3N2 (MDCK)	>100		>100
Influenza B (MDCK)	>100		>100
Sarampión (CV-1)	>100		>100
Parainfluenza tipo 3 (MA-104)	>100		>100
Rinovirus tipo 5 (KB)	>100		>100
RSV tipo A (MA-104)	>100		>100

a. PDH, hepatocitos primarios de pato; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; HFF, fibroblasto de prepucio humano; Daudi, B-célula linfoma de Burkitt; MDCK, células epiteliales de hígado canino; CV-1, células de fibroblasto de hígado de mono verde africano; KB, carcinoma humano nasofaríngeo; MA-104, células epiteliales de hígado de mono Rhesus.
 b. EC₅₀ = 50% concentración efectiva.
 c. CC₅₀ = 50% concentración citotóxica.
 d. nd = no determinado.
 e. Resultado presentado en Pg/mL en lugar de PM.

No se detectó citotoxicidad en las concentraciones máximas de L-dC testadas en cualquiera de las líneas celulares o en tipos de células primarias empleadas para ayudar en la réplica de los diferentes virus de ADN y ARN. No se observó toxicidad en PBMCs humanos, HFF, u otros tipos celulares de origen mamífero.

Ejemplo de Referencia 30

Actividad Antiviral de L-dC en Marmotas - 28 días

Las marmotas crónicamente infectadas con VHM son ampliamente aceptadas como un modelo de infección de VHB y han demostrado ser útiles en la evaluación de agentes anti-VHB. Ha demostrado ser un pronosticador positivo de actividad antiviral de terapias para infección de VHB crónico y ha servido como un sistema sensible para la evaluación de seguridad de nucleósidos y sus análogos.

Se administró oralmente L-dC a marmotas una vez al día en 0.01 a 10 mg/kg/día durante 28 días. Los niveles de suero de VHM ADN durante 28 días de tratamiento con fármaco y 56 días de seguimiento después del tratamiento fueron determinados por hibridación dot-plot (límite de detección de aproximadamente 107 equivalentes de genoma (geg)/mL suero) y por PCR (límite de detección de 300 geg/mL suero) (1). La réplica de VHM ADN se inhibió de manera significativa en los primeros pocos días del tratamiento y se mantuvo a lo largo de la fase de tratamiento. El envío diario una vez al día de L-dC produjo un fuerte efecto antiviral, que fue dependiente de dosis tal y como se determinó empleando el ensayo de hibridación dot-blot de ADN (Figura 16).

La Figura 17 presenta la actividad antiviral de L-dC para animales individuales tratados con 10 mg/kg/día durante 28 días en el modelo de marmota de infección crónica de hepatitis B. Notablemente, en el grupo de tratamiento con 10 mg/kg/día, para el día 14 a 28, la carga viral había caído por 2-6 logaritmos desde la línea base tal y como se midió por el ensayo cuantitativo PCR. Tras la retirada del fármaco, la reaparición del fármaco alcanzó niveles cercanos al pre-tratamiento entre las Semanas 1 y 2.

ES 2 317 912 T3

En el grupo tratado con lamivudina (10 mg/kg/día oralmente), la carga viral de VHB disminuyó aproximadamente 0.5 logaritmos a 1.0 logaritmos (geq/mL; datos no mostrados) que es consistente con estudios previos usando similares concentraciones de lamivudina, que es un análogo de nucleósido de citidina (30).

Ejemplo de Referencia 31

Reaparición Viral en Células Tratadas con L-dC

La reaparición viral en L-dC en 2.2.15 células tratadas con L-dC ocurrió tras la retirada del fármaco. La réplica de VHB volvió al 50% de los niveles de pre-tratamiento antes para el día 18 del post-tratamiento. La cinética de la reaparición viral tras el tratamiento con L-dC sugirió que un significativo efecto antiviral continuó tras la retirada del fármaco, que fue consistente con la vida media intracelular de L-dC-TP (15.5 horas en células HepG2).

Ejemplo de Referencia 32

Actividad Antiviral Contra VHB Resistente al Fármaco de L-dC

En estudios clínicos controlados de lamivudina (100 mg una vez al día), que se administró a pacientes infectados con VHB, la prevalencia de VHB mutante de YMDD fue 14 a 32% después de un año de tratamiento y tanto como 58% después de dos a tres años de tratamiento (18-20). El virus mutante se asoció con la evidencia de respuesta disminuida al tratamiento en relación con los pacientes tratados con lamivudina sin mutaciones de YMDD.

El análisis genotípico de elementos virales aislados obtenidos de pacientes que mostraron evidencia de réplica renovada de VHB mientras recibían lamivudina sugiere que una reducción en la sensibilidad a VHB a lamivudina se asocia con mutaciones que dan como resultado una sustitución de metionina a valina o isoleucina en el motivo YMDD del dominio catalítico de polimerasa VHB (posición 552) y una sustitución de leucina a metionina en la posición 528.

Los recombinantes de VHB que contienen la mutación YMDD son resistentes a lamivudina y ligeramente menos competentes con la réplica que VHB de tipo salvaje *in vitro* (21). El derivado trifosfato de L-dC se examinará contra tipo salvaje y polimerasa mutante VHB ADN para comparar los valores IC₅₀. Además, se llevará a cabo el examen antiviral de L-dC contra aislados de VHB resistentes a lamivudina y virus recombinantes con mutaciones en posiciones 552 y 528.

Adicionalmente, también se está considerando la selección de mutantes *in vivo* de VHB resistentes al fármaco L-dC durante el tratamiento crónico de marmotas infectadas por VHB. La relevancia de la selección de mutantes resistentes al fármaco en el modelo *in vivo* de marmota resulta incierto porque el espectro de mutantes resistentes a lamivudina en la marmota no coincide con el identificado en pacientes infectados por VHB (20-22). Un subgrupo de este estudio a largo plazo (12 a 24 meses) podía proporcionar información relevante para la eliminación relacionada con el tratamiento de ADN circular (ccc) covalentemente cercano a VHB de hepatocitos infectados. En este momento, no es posible usar el modelo *in vitro* DVHB para seleccionar mutaciones resistentes al fármaco porque los hepatocitos primarios de pato empleados en este modelo no pueden mantenerse en cultivo celular durante periodos extendidos de tiempo para seleccionar virus resistentes al fármaco.

Ejemplo de Referencia 33

Actividad Antiviral de Combinación y Citotoxicidad de L-dT + L-dC

Se examinaron la actividad anti-VHB y citotoxicidad de una combinación de L-dT y L-dC en radios de concentraciones molares similares en células 2.2.15 y se encontraron, por medio de sinérgica, en radios de 1:1, 1:3 y 3:1 (ver Tabla 25).

TABLA 25

Actividad de Combinación Antiviral de L-dT + L-dC en células 2.2.15 infectadas VHB

Tratamiento	CC ₅₀ ^a (PM)	EC ₉₀ ^b (PM)	S.I. ^c (CC ₅₀ /EC ₉₀)	CalcuSyn Análisis ^d (at EC ₉₀)
3TC	>1000	0.180±0.007	> 5,000	
L-dT	3022	1.2±0.1	2,518	-
L-dC	3000±96	1.1±0.1	2,727	-
L-dT + L-dC (1:1)	> 1500	0.297±0.016	> 5,051	Sinergístico
L-dT + L-dC (1:3)	1331± 67	0.333± 0.023	3,997	Sinergístico
L-dT + L-dC (3:1)	2957± 88	0.409±0.079	7,230	Sinergístico
L-dT + 3TC (1:1)	>1000	0.089±0.004	> 11,000	Sinergístico
L-dT + 3TC (3:1)	1000	0.068±0.004	14,706	Sinergístico
L-dT + 3TC (10:1)	> 1000	0.191±0.017	> 5,000	Sinergístico
L-dC + 3TC (1:1)	>1000	0.200±0.013	> 5,000	Sinergístico (Aditivo en altas concentraciones)
L-dC + 3TC (3:1)	>1000	0.216±0.013	> 5,000	Sinergístico
L-dC + 3TC (10:1)	> 1000	0.084±0.006	> 11,000	Sinergístico

a CC₅₀ = concentración de fármaco en la cual se observó una inhibición del 50% de toma de tinte rojo (en comparación con los cultivos no tratados)

b EC₉₀ = concentración de fármaco en la cual se observó una reducción de 10 veces de niveles de ADN en virión de VHB (en comparación con los cultivos no tratados).

c EC₉₀ valores usados para cálculo del Índice de Selectividad (S.I) ya que las reducciones de los valores de ADN VHB que son menos que tres veces generalmente no son importantes en este sistema de ensayos.

d Análisis de eficacia de los tratamientos de combinación de fármaco por el programa de evaluación de combinación CalcuSyn (Biosoft, Inc.).

Ejemplo de Referencia 34

Ensayo de Toxicidad en Células Progenitoras de Médula Ósea Humana para L-dC

Los efectos mielosupresivos de ciertos análogos de nucleósido han subrayado la necesidad de examinar los efectos potenciales en el crecimiento de células progenitoras de médula ósea humana en ensayos clonogénicos. En particular, anemia y neutropenia son las toxicidades clínicas relacionadas con el fármaco más comunes asociadas con el fármaco zidovudina (ZDV) anti-VIH. Esta toxicidad ha sido modelada en un ensayo *in vitro* que emplea células de médula ósea obtenidas de voluntarios sanos (Sommadossi J-P, Carlisle R. "Toxicidad de 3'-azido-3'-doxitimidina y 9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil) guanina para células progenitoras hematopoyéticas humanas normales *in vitro*" Antimicrob Agents Chemother 1987, 31(3), 452-454). ZDV ha demostrado inhibir directamente la actividad de formación de colonia humana granulocito-macrófago (CFU-CM) y la de formación en estallido de eritroide (BFU-E) en concentraciones clínicamente relevantes de 1-2 μ M. Usando ensayos clonogénicos de médula ósea humana con ZDV como control positivo y lamivudina como un control negativo, L-dC tuvo un IC₅₀ en CFU-CM y BFU-E de > 10 μ M (ver Tabla 26).

TABLA 26

Toxicidad en Médula Ósea de L-dC en células de Progenitor Granulocito Macrófago y Precursor de Eritrocito

Compuesto	CFU.GM ^a	BFU-E ^a
	IC ₅₀ (PM)	IC ₅₀ (PM)
L-dC	>10	>10
Lamivudina	>10	>10

Compuesto	CFU.GM ^a	BFU-E ^a
	IC ₅₀ (PM)	IC ₅₀ (PM)
ZDV	1.8	0.7

a. Valores representan los resultados de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Ejemplo de Referencia 35

Ensayo de Toxicidad Mitocondrial para L-dC

Los análogos de nucleósido antiviral aprobados para la terapia de VIH, tales como ZDV, estaduvina (d4T), didanosina (ddl), y zalcitabina (ddC) también se han asociado con toxicidades tardías clínicamente limitadoras como neuropatía periférica, miopatía, y pancreatitis (8-11). Estos hechos clínicos adversos han sido atribuidos a la inhibición de función mitocondrial debido a la reducción en el contenido de ADN mitocondrial (mtADN) y a la incorporación de análogo de nucleósido en mtADN. Además, un análogo particular de nucleósido, fialuridina (FIAU), provocó fallo hepático, pancreatitis, neuropatía, miopatía y acidosis láctica debido a la toxicidad mitocondrial directa. Los incrementos asociados con el fármaco en la producción de ácido láctico pueden considerarse como un marcador de función mitocondrial dañada o de fosforilización oxidativa.

Para evaluar el potencial de L-dC para producir toxicidad mitocondrial, se llevaron a cabo varios estudios *in vitro* usando la línea celular de heparoma humano HepG2. Estos estudios incluyeron el análisis de producción de ácido láctico, contenido de mtADN y determinación de cambios en morfología (por ejemplo, falta de pliegues internos de la membrana interna de una mitocondria, disolución o crecimiento de matriz, formación de gotitas líquidas) de la estructura mitocondrial. Los efectos de L-dC sobre la mitocondria se presentan en la Tabla 27.

No se observaron diferencia en los niveles de ácido láctico producidos en células crónicamente tratadas con L-dC y células no tratadas. La producción de ácido láctico en las células tratadas con ZDV y FIAU aumentó en un 100% en comparación con el control vehículo. La exposición de células HepG2 durante 14 días a L-dC en concentraciones de hasta 10 μ M no tuvo efecto en el contenido mitocondrial de ADN en comparación con el 87% de reducción en las células tratadas con ddC. Después de 14 días de exposición a 10 μ M L-dC, la ultraestructura de células HepG2, y en particular mitocondria, se examinaron a través de microscopio de transmisión de electrón. No se detectaron cambios discernibles en la arquitectura celular o en la morfología mitocondrial. El tamaño y la organización de los pliegues internos mitocondriales fueron normales. Las células tratadas con ZDV mostraron una mitocondria típica hinchada con pérdida de pliegues. La morfología mitocondrial también fue anormal en las células tratadas con ddC y FIAU.

TABLA 27

Efecto de L-dC en Proliferación de Hepatocito, Función Mitocondrial y Morfología en células Hep G2

Compuesto	CC ₅₀ ^a (PM)	Conc. (PM)	% de Control		Formación Gota Lipida	Morfología Mitocondrial
			L-Lactato	mtDNA		
Control	-	-	100	100	negativo	normal
L-dC	>2000	10	101± 2	107±8	negativo	normal
FIAU	4	10	203	86	positivo	anormal
ZDV	14	50	239± 34	119	negativo	anormal
ddC	20	1	95± 4.4	13	negativo	anormal

a. CC₅₀ tras 14 días de tratamiento.

Ejemplo de Referencia 36

Ensayo de Toxicidad de Polimerasas β , α e γ de ADN Humano para L-dC

Los nucleósidos y análogos de nucleósidos normalmente se metabolizan en el interior de sus derivados TP. Las polimerasas celulares de ADN son automáticamente responsables de la síntesis y reparación normal nuclear y mitocondrial de ADN. Debido a que los metabolitos TP son sustratos potenciales para polimerasas ADN, se realizaron estudios para determinar si L-dC-TP inhibió polimerasas humanas ADN.

El análogo nucleósido 3'-amino-3'-deoxitimidina (AMT) TP inhibió polimerasa α de ADN humano por un 30% en una concentración de 10 μ M. Las polimerasas β y γ de ADN humano fueron inhibidas por ddC-TP por el 50% (5 μ M) y 35% (2.5 μ M), respectivamente. L-dC-TP y L-dU-TP no fueron inhibidoras de las polimerasas α , β y γ de ADN humano hasta concentraciones de 100 μ M (Tabla 28). Estos resultados sugieren que el TP de L-dC y L-dU tiene una baja afinidad para estas polimerasas nucleares y mitocondriales de ADN humano, que es consistente con el perfil de seguridad favorable de L-dC observado *in vitro* e *in vivo*.

TABLA 28

Efecto de L-dC-TP en Polimerasa AND de Virus de Hepatitis Polimerasas α , β y γ ADN Humano

Sustrato ^a	IC ₅₀ (PM)			
	ADN Viral pol ^b	ADN Humano pol α^c	ADN Humano pol β^c	ADN Humano pol γ^c
L-dC-TP	1.82±0.23	>100	>100	>100
L-dU-TP	5.26±2.4	>100	>100	>100
Lamivudina-TP ^d	0.50±0.1	>5	1.2	0.01
L-FMAU-TP ^d	0.15± 0.05	>50	>50	>50
L-ddA-TP	2.0±0.3	>100	>100	>100

a. Cada conjunto de datos representa el valor medio aritmético y, cuando se presenta, la desviación estándar de los tres experimentos independientes.
b. Polimerasa AND VHM
c. 3'-Amino-3'-deoxitimidina TP inhibió pol α 30% a 10 PM; ddC-TP inhibió pol β 50% a 5 mM y pol γ 35% a 3.5 PM.
d. Datos de polimerasa Humana AND para lamivudina-TP y L-FMAU-TP de Chang, et al. (13), and Yao, et al. (14), respectivamente.

Ejemplo de Referencia 37

Ensayo de Toxicidad en Ratas para Dival- L-dC

Se determinó la toxicidad asociada con una única dosis oral de dival-L-dC en ratas. Se estudiaron un total de 40 animales (ratas Sprague-Dawley, de entre seis y ocho semanas de edad); se eligieron diez animales (cinco machos y cinco hembras) al azar para recibir una única dosis oral de dival-L-dC en una de tres dosis seleccionadas de la parte de encuentro de rango de dosis del estudio (500, 100, o 2000 mg/kg) o el artículo de control. Los animales fueron observados durante 15 días. Las observaciones secundarias sobre agonía y mortalidad fueron documentadas dos veces al día. Las observaciones clínicas y el peso corporal se documentaron una vez al día en los Días 1, 8, 14, y 15. También el Día 15 se recogieron muestras sanguíneas para analizar hematología y propiedades de suero. Tras la finalización de las evaluaciones del Día 15, todos los animales fueron sometidos a eutanasia y a una exhaustiva necropsia macroscópica, que incluyó examen macroscópico de la superficie externa corporal, todos los orificios, las cavidades craneales, torácicas, abdominales y sus contenidos. El peso del cuerpo y de los órganos seleccionados y de los radios de peso órgano-a-cuerpo y órgano-a-cerebro fueron documentados.

No se observaron signos manifiestos de toxicidad durante el estudio, y no se vieron efectos relacionados con el tratamiento en el peso corporal, peso de los órganos, o parámetros de patología clínica. No se observaron anomalías relacionadas con el tratamiento en perfiles de hematología y química del suero. Además, no se observaron lesiones macroscópicas relacionadas con el tratamiento en la necropsia. En base a los resultados de este estudio, el NOAEL para dival-L-dC tras una única dosis oral en la rata fue 2000 mg/kg.

Ejemplo de Referencia 38

Ensayo de Toxicidad en Monos para Dival-L-dC

5 Se determinó la toxicidad potencial de cinco dosis escalonadas de dival-L-dC en monos cynomolgus. Cuatro animales (dos machos y dos hembras) recibieron individualmente un total de cinco dosis orales de dival-L-dC, una en cada nivel de dosis (20, 100, 500, 1000, y 2000 mg/kg), en los Días 1, 4, 7, 10, y 14, respectivamente.

10 Las observaciones realizadas junto a las jaulas sobre agonía y mortalidad se documentaron dos veces al día. Las observaciones clínicas se documentaron dos veces. Se recogieron muestras sanguíneas para hematología y propiedades químicas del suero y el peso corporal se midió antes del tratamiento en los Días 1, 4, 7, 10, y 14, y antes de la necropsia el Día 17. Tras la finalización de las evaluaciones del Día 17, todos los animales fueron sometidos a eutanasia y se realizó una necropsia completa, incluyendo examen macroscópico y recogida exhaustiva de tejido.

15 No se observaron anomalías clínicas relacionadas con el tratamiento. Tras la dosis inicial del Día 1, cada animal demostró una pérdida de peso corporal de aproximadamente 0.6 kg. Desde el Día 4 y a lo largo del resto del estudio todos los animales mantuvieron su peso corporal.

20 Se apuntaron las siguientes observaciones en los perfiles individuales de hematología. En el Día 17, los cálculos de eritrocito (RBC), hemoglobina (HGB), y hematocrito (HCT) fueron inferiores (por aproximadamente 15% a 27%) de manera acumulativa en los cuatro animales cuando se compararon con los valores obtenidos el Día 1. Exclusivo del Animal N° 1001 (Macho), en cada punto en el tiempo los cambios en estos parámetros fueron < 10% desde el valor previo recogido. Para el Animal N° 1001, el Día 4, los valores RBC, HGB y HCT disminuyeron en aproximadamente 18% desde los valores del Día 1; como consecuencia, los cambios para este animal fueron <± 9% en total. La causa de este cambio inicial es desconocida y el significado toxicológico es incierto. El Día 1, el cómputo celular de sangre blanca (WBC) fue notablemente elevado en el Animal N° 1101 (hembra, 36.3×10^3 células/ μ l), pero disminuyó en aproximadamente 55% para el Día 4. Los leucocitos polimorfonucleares absolutos (APLY) y los leucocitos polimorfonucleares porcentuales (PLY) también disminuyeron (73% y 40%, respectivamente) para el Día 4 desde los niveles elevados del Día 1. Los cambios fueron variables para el resto del estudio. La relevancia toxicológica es incierta.

30 Se anotaron las siguientes observaciones en los perfiles individuales de hematología. En el Día 17, los valores de nitrógeno de urea en sangre (BUN) disminuyeron (en ~43%, de manera acumulativa) en los cuatro monos cuando se compararon con los valores del Día 1. Estos cambios acumulativos resultan de las variaciones intermedias de -39% a +46%. Estos cambios fueron consistentes en todos los monos en el estudio; sin embargo, la relevancia toxicológica fue incierta.

35 En base a los resultados de este estudio, el NOAEL para dival-L-dC tras una única dosis oral por sonda en el mono fue 2000 mg/kg.

40 Ejemplo de Referencia 39

Ensayo de Toxicidad de 28 Días en Marmotas para L-dC

45 El modelo de marmota de infección crónica de hepatitis B ha sido valioso para la evaluación preclínica toxicológica de análogos de nucleósido. Este modelo identificó la toxicidad hepatocelular tardía y severa provocada por FIAU en humanos no vista en evaluaciones preclínicas en roedores o primates. La toxicidad inducida por FIAU observada en marmotas, incluyendo significativa pérdida de peso, y daño hepatocelular observado en biopsia de hígado, se identificó al inicio de seis a ocho semanas desde el comienzo del tratamiento y fue similar a la observada en los pacientes infectados de VHB tratados con FIAU.

50 Se determinó la actividad antiviral y la seguridad de L-dC así como la reaparición viral tras el tratamiento en marmotas infectadas con el virus de hepatitis de marmota (VHM). Las marmotas machos y hembras fueron infectadas recién nacidas por medio de inoculación subcutánea de suero diluido de portadores de VHM y todas fueron portadoras crónicas de VHM. Los animales (de 16 a 18 meses de edad) fueron elegidos al azar para formar grupos comparables en base al peso corporal, niveles de g-glutamyl transferasa, sexo, y concentración en suero de ADN VHM ($<10^{11}$ equivalentes de genoma/mL suero) medido por análisis cuantitativo de dot blot.

60 Tres animales recibieron individualmente L-dC en dosis de 0.01, 0.1, 1.0 o 10.0 mg/kg/día oralmente durante 28 días. Además, tres animales recibieron lamiduvina en 10 mg/kg/día oralmente durante 28 días. Todos los animales fueron controlados para una reaparición de VHM durante un post-tratamiento de 56 días adicionales. Se obtuvieron muestras de sangre para niveles de ADN VHM en los Días -7, 0, 1, 3, 7, 14, 21 y 28, y también se obtuvieron niveles de ADN VHM tras el tratamiento en los Días 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 56. Los niveles de ADN VHM fueron detectados por medio de técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Simultáneamente, se obtuvieron los pesos corporales y la dosis del fármaco se ajustó de manera acorde. Si se observó evidencia de toxicidad, se llevaron a cabo pruebas clínicas bioquímicas y hematológicas. El examen *post-mortem*, incluyendo evaluación histológica de tejidos, se llevó a cabo sobre un animal que murió durante el estudio.

No se observó toxicidad durante el periodo de tratamiento de cuatro semanas ni durante el periodo de seguimiento de ocho semanas tras el tratamiento. Además, no hubo pérdida de peso en ningún grupo del tratamiento con L-dC en comparación con los animales de control (Figura 18). Todos los animales ganaron peso de un modo similar a los animales de control durante el periodo de protocolo de 84 días. Un animal (#98051) en el grupo de 0.1 mg/kg/día murió el octavo día después de que finalizara el tratamiento. El examen *post-mortem* reveló un gran carcinoma hepático (8x5x2 cm) en el lóbulo lateral izquierdo del hígado y la muerte se atribuyó al tumor maligno hepático. Se ven neoplasmas hepatocelulares en este modelo tan temprano como a los nueve meses de edad y han sido una causa de muerte tan pronto como a los 15 meses de edad. La muerte de este animal fue atribuida al carcinoma hepatocelular, que es una parte esperada de la historia natural de la infección de VHM, y no se consideró relacionado con el tratamiento con L-dC ya que no existe ninguna indicación de que la toxicidad del fármaco fuera un factor en la muerte del animal.

Ejemplo de Referencia 40

15 *Ensayo de Toxicidad de Doce Semanas en Marmotas para L-dC*

Se determinó la actividad y seguridad antiviral de L-dC en marmotas. En este estudio, cuatro animales recibieron individualmente L-dC 1.0 mg/kg/día o control vehículo por vía oral durante 12 semanas. Cuatro animales adicionales recibieron L-dC junto con otro análogo nucleósido, L-dT. Los animales fueron elegidos al azar para formar grupos comparables, divididos por sexo, peso, y niveles de ADN VHM y GGT en suero antes del tratamiento.

ADN VHM y el peso corporal se midieron los Días 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56, y 84 así como los Días tras el tratamiento 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70, y 84. Los niveles cuantitativos de ADN VHM fueron determinados a través de PCR cuantitativo. Antes del tratamiento y el Día 84, se recogieron muestras apropiadas para hematología, propiedades químicas del suero, serología de VHM, y biopsia del hígado. Los niveles de fármaco en plasma se determinaron a partir de las muestras recogidas 2.5 horas tras la dosis los Días 0, 14 y 84.

L-dC (1 mg/kg/día, oralmente) fue bien tolerado y no mostró toxicidad relacionada con el fármaco a lo largo de las 12 semanas del tratamiento o durante las 12 semanas posteriores. La viremia de VHM en marmotas infectadas crónicamente tratadas durante 12 semanas con L-dC (1 mg/kg/día, oralmente) descendió en 0.5 a 1 logaritmos para el final de las 12 semanas de tratamiento, de manera similar a la respuesta en el estudio de 28 días con esta dosis. Este estudio incluyó grupos adicionales tratados con L-dT 1 mg/kg/día, y L-dC (1 mg/kg/día) más L-dT (1 mg/kg/día) administrados en combinación. Esta combinación de L-dC y L-dT redujo la carga viral hasta el límite de la detección, similar a lo observado durante el tratamiento con L-dC o L-dT en 10 mg/kg/día en el estudio de 28 días. No hubo diferencia de peso entre los animales en los grupos tratados con L-dC y el grupo de control (ver Figura 19). Un animal en el grupo de control murió en la Semana 8; la necropsia reveló que la causa de la muerte fue degeneración ruptura aórtica. A pesar de que es inusual, se ha observado históricamente ruptura espontánea de la aorta ascendente en marmotas no infectadas y en marmotas afectadas con VHM. El peso de todos los animales disminuyó ligeramente durante el periodo de estudio de 24 semanas. La experiencia previa ha determinado que esta ligera disminución en el peso se debió al acercamiento de un ciclo de hibernación (B. Tennant, DVM; Marmotech, Inc.). Las propiedades químicas del suero y la hematología de todos los animales se encontraron en el rango normal antes y después del tratamiento de 12 semanas. La histomorfología del tejido de hígado tal y como se evaluó con el microscopio fue normal para todos los grupos. No hubo evidencias de cambios adiposos (esteatosis microvesicular).

45 Ejemplo de Referencia 41

Toxicinética de Dosis Repetidas de Dival-L-dC en los Monos Cynomolgus

Se examinó la toxicidad potencial y la farmacocinética de L-dC tras administración oral durante 25 días a monos Cynomolgus. Ocho animales (cuatro machos y cuatro hembras) fueron elegidos al azar para recibir dival-L-dC a través de sonda en una de tres dosis (500, 1000, 2000 mg/kg/ o control de vehículo una vez al día durante 25 días (N total = 32). Las observaciones que se realizaron junto a las jaulas sobre agonía y mortalidad se documentaron dos veces al día, y las observaciones clínicas se documentaron una vez al día. Los pesos corporales se documentaron antes del tratamiento, los Días 1, 8, 15 y 25 y antes de la necropsia el Día 26. El consumo de comida se documentó diariamente y se informó durante intervalos semanales como un promedio diario. Los exámenes físicos y oftalmológicos y los exámenes urinarios se llevaron a cabo antes del tratamiento y en la necropsia. Tras la finalización de las evaluaciones del Día 26, todos los animales fueron sometidos a eutanasia y a una exhaustiva necropsia macroscópica, que incluyó examen macroscópico de la superficie externa corporal, todos los orificios, las cavidades craneales, torácicas, abdominales y sus contenidos. El peso del cuerpo y de los órganos seleccionados y de lo radios de peso órgano-a-cuerpo y órgano-a-cerebro también fueron documentados. El tejido obtenido por exhaustiva necropsia macroscópica fue histomorfológicamente evaluado por un patólogo veterinario ampliamente certificado.

65 *A. Pesos Corporales*

Todos los animales mantuvieron o ganaron peso corporal durante el curso del estudio, excepto los Animales Nos. 2002 (grupo 500 mg/kg), y 4001 y 4003 (grupo 2000 mg/kg), que demostraron una pérdida de peso de 0.1 kg el Día 25 (en comparación con el Día 1). Las diferencias estadísticamente significativas entre los machos del grupo de control y

los machos de los grupos tratados con dival-L-dC no se consideran toxicológicamente relevantes ya que el peso medio corporal antes del estudio para los animales del grupo de control fue superior al peso medio corporal para los grupo de tratamiento en 0.13-0.25 kg.

5 B. Consumo de Comida

Durante el curso del estudio, todos los animales mantuvieron un adecuado consumo de comida con esperada variabilidad. El consumo medio de galletas fue inferior que los machos de control para machos del grupo 500 mg/kg los Días 8/9, 15/16, y 16/17; machos del grupo 1000 mg/kg los Días 24/25; y el grupo 2000 mg/kg lo hace los Días 8/9, 15/16, 16/17, 20/21 y 23/24. La única diferencia en las hembras fue una disminución en el consumo de comida en las hembras del grupo de 2000 mg/kg los Días 7/8. Estas diferencias no se consideran toxicológicamente relevantes.

C. Patología Clínica

15 *Hematología.* El Día 1 antes de la iniciación del tratamiento, no hubo diferencias entre los grupos de control y el de tratamiento para ningún parámetro hematológico. El Día 26, se observaron un número de diferencias estadísticamente significativas en los índices de eritrocitos, incluyendo un menor cómputo de células rojas en sangre (RBC (todas las hembras tratadas), menor hemoglobina (HGB) (todos los machos tratados), y menor hematocrito (HCT), (todos los grupos del tratamiento, ambos sexos). Los machos también demostraron un RBC reducido, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La concentración de hemoglobina también fue inferior en las hembras tratadas, pero no estadísticamente significativa. En relación al Día 1, los RBC, HGB y HCT disminuyeron el Día 26 en los machos y hembras de control y los tratados con dial-L-dC. Sin embargo, los descensos relativos observados para los animales de control fueron inferiores a los observados para los animales tratados con dival-L-dC. Estos resultados son indicativos de una anemia clínica relevante no hemolítica; en cambio, cualquier fenómeno en respuesta a la dosis fue mínimo, y la evaluación hispatológica sugiere que la médula ósea permaneció sensible. Por lo tanto, cualquier efecto progresivo o permanente se considera improbable.

En el cómputo celular de sangre blanco, hubo un descenso en leucocitos polimorfonucleares absolutos (APLY) (hembra del grupo 500 MG/KG y 1000 mg/kg y machos y hembras del grupo 2000 mg/kg), descenso en leucocitos polimorfonucleares porcentuales (PLY) (hembras de grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg), y descenso en linfocitos porcentuales (LYM) (machos del grupo 2000 mg/kg y hembras del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg).

35 *Propiedades Químicas del Suero.* Los niveles medios de fosfatasa alcalina (ALK) para todos los machos tratados fueron significativamente menos para hacer el grupo de control ALK el Día 26. Los niveles medios de globulina (GLOB) y calcio (CAL) también se elevaron en los machos del grupo 2000 mg/kg el Día 26. Estos cambios no se consideraron clínicamente relevantes. Los valores medios de potasio (K) fueron mayores en los machos del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg que lo del grupo de control y pudo relacionarse con la anemia no hemolítica presente en aquellos grupos de tratamiento. No hubo cambios en ningún parámetro en la química del suero en las hembras el Día 26.

40 *Urinálisis.* El pH urinario medio descendió ligeramente en los machos del grupo 2000 mg/kg y en las hembras de los grupos 1000 mg/kg y 2000 mg/kg, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Una falta de cristales en la orina de los machos y hembras de elevada dosis fue notable y consistente con acidificación.

45 D. Pesos de Órganos

Se observaron descensos estadísticamente significativos en los pesos corporales de los pulmones (absolutos) de los machos del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg y el timo relativo (timo:cerebro) de los machos de 2000 mg/kg. Sin embargo, estas diferencias no se consideraron toxicológicamente relevantes.

50 E. Patología

55 *Macroscópica.* No hubo hallazgos macroscópicos que pudieran interpretarse como relacionados con la administración de dival-L-dC. Todos los hallazgos macroscópicos fueron normales para aquellos comúnmente presentes como hallazgos incidentales en primates no humanos.

60 *Microscópica.* Atrofia tímica fue el único hallazgo microscópico que se interpretó como relacionado con el tratamiento. La incidencia y severidad de atrofia tímica aumentó en los machos y hembras del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg, pero no afectó a los animales del grupo 500 mg/kg. En cambio, la importancia clínica de la atrofia tímica se interpretó como equívoca. La relación dosis-respuesta fue débil, no todos los machos del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg fueron afectados y la atrofia tímica normalmente se da cuando los primates envejecen. Otros hallazgos microscópicos en este estudio fueron cambios inflamatorios o degenerativos comúnmente menores del tipo e incidencia usual observada en primates de esta edad.

65 *Toxicinética.* Se recogieron muestra de sangre para hematología y propiedades químicas del suero antes del tratamiento el Día 1 y antes de la necropsia el Día 26. Las muestras de sangre se recogieron para análisis de farmacocinética el Día 25 en cada animal y en cada uno de los siguientes momentos tras la dosis: 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, y 24 horas. El plasma se preparó a partir de sangre y se analizó para concentraciones de dival-L-dC y tres metabolitos: L-dC, L-

dU y la forma parcialmente esterificada de dival-L-dC, éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina. Sólo L-dC y éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina fueron cuantificables. Los datos medios de concentración-tiempo en plasma para el grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg se sometieron a análisis no-compartimental de farmacocinética usando WinNonlin 1.5 (Modelo 200). El análisis del grupo 500 mg/kg está en proceso.

Las concentraciones en plasma de éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina el Día 25 alcanzaron valores máximos ($C_{\max}$) en una hora ($T_{\max}$ media) tras la administración oral de dival-L-dC, en comparación con el $T_{\max}$ medio de 2-4 horas para L-dC. Sin embargo, los valores $C_{\max}$ de éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina fueron aproximadamente 2 órdenes de magnitud inferiores para L-dC. Tras alcanzar $C_{\max}$, las concentraciones para L-dC disminuyeron de una manera aparente bi-exponencial para machos y hembras en ambos grupos de dosis. Sin embargo, estas estimaciones de vidas medias deben verse como valores mínimos, debido a que la mayor parte de las estimaciones individuales se basaron en datos de 6 a 12 horas tras la dosis, en cuyo momento las fases terminales pueden no haberse completamente caracterizado. Las concentraciones medias de éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina también disminuyeron tras alcanzar $C_{\max}$, pero las fases terminales no se definió adecuadamente para permitir la estimación de vida media. Los valores medio de $C_{\max}$ para éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina fueron similares para los machos y hembras dentro de cada grupo de dosis, excepto para el grupo de 1000 mg/kg, que fueron inferiores en la mitad de los valores de concentración de los machos del grupo de 2000 mg/kg. Por lo tanto, $C_{\max}$ pareció aumentar con la dosis sólo para los machos del grupo 1000 mg/kg.

La comparación de L-dC AUC_{último} entre machos y hembras mostró tendencias similares a las mostradas para $C_{\max}$ con los machos en el grupo 1000 mg/kg que tienen valores inferiores en aproximadamente la mitad de los valores de AUC_{último} de los machos del grupo 2000 mg/kg. La comparación de AUC_{último} éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina entre machos y hembras mostró una ausencia de diferencias relacionadas con el sexo y AUC_{último} pareció aumentar en una manera directamente proporcional a los incrementos en dosis.

Los datos sugieren que la siguiente administración oral de dival-L-dC es una rápida conversión a la forma de-esterificada de éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina, y por lo tanto L-dC pero en exposición total es 100 veces superior para L-dC que para éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina. La exposición total a metabolito éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina parece aumentar en una manera aproximadamente lineal con incrementos en dosis.

Un resumen de resultados toxicinéticos se presenta en la Tabla 29.

TABLA 29

Análisis de Farmacocinética de Dosis Repetida de Dival-L-dC 1000 mg/kg y 2000 mg/kg Administrado Oralmente a Monos

Dosis (mg/kg/day)	Sexo	(n)	Parámetro de Farmacocinética ¹					
			C _{max} (mg/mL)	T _{max} (h)	T _{last} (h)	AUC _{last} (mg-hr/mL)	AUC (mg-hr/mL)	t. (h)
L-dC								
1000	M	(4)	66.7	2	12	273	295	4.1
			(± 29.1)			(±107)	(± 110)	(±1.8)
1000	F	(4)	106	2	12	429	468	3.7
			(±39)			(±19)	(NA)	(NA)
2000	M	(4)	116	4	12	668	726	3.8
			(±13)			(±127)	(± 14)	(±1.3)
2000	F	(4)	103	2	24±	567	598	5.1
			(±12)			(±208)	(± 220)	(±1.7)
β-L-2'-deoxicitidina-5'-valina éster								
1000	M	(4)	0.624	1	5	1.45	ID	ID
			(±0.273)			(± 0.45)		
1000	F	(4)	1.23	1	4	1.90	ID	ID
			(± 0.25)			(± 0.41)		
2000	M	(4)	1.64	1	10	3.66	ID	ID
			(± 0.42)			(± 0.88)		
2000	F	(4)	.29	1	8	3.67	ID	ID
			(± 0.28)			(± 0.42)		

¹ Valores Medios (+ SD) en el Día 25.

² n = 4 para todos los parámetros para L-dC y β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina éster excepto para las hembras del grupo 2000 mg/kg para las cuales n = 3 y para L-dC AUC y t, hembras del grupo 1000 mg/kg, donde n = 2 debido a la caracterización inadecuada de la fase terminal.

³ Valores medianos (en lugar de medios) se presentan para $T_{\max}$ y T_{last} .

NA No Aplicable

ID Datos Insuficientes para definir la fase terminal para todos los animales.

Ejemplo de Referencia 42

Toxicinética en Dosis Repetidas de Dival-L-dC en Rata

- 5 Se determinó la toxicidad potencial y la farmacocinética de dival-L-dC tras la administración oral durante 28 días. Veinte animales (10 machos y 10 hembras) fueron elegidos al azar para recibir dival-L-dC por medio de sonda en una de tres dosis (500, 1000 o 2000 mg/kg) o el control de vehículo una al día durante 28 días. Las observaciones realizadas junto a las jaulas sobre agonía y mortalidad se documentaron dos veces al día. Las observaciones clínicas se documentaron dos veces al día. Los pesos corporales se documentaron antes de la dosis los Días 1, 8, 15, 22 y 28 y antes de la necropsia el Día 29. El consumo de comida se documentó semanalmente. También se recogieron muestras de sangre para hematología y propiedades químicas del suero antes de la necropsia el Día 29. Tras la finalización de las evaluaciones del Día 29, todos los animales fueron sometidos a eutanasia y a una exhaustiva necropsia macroscópica, que incluyó examen macroscópico de la superficie externa corporal, todos los orificios, las cavidades craneales, torácicas, abdominales y sus contenidos. El peso del cuerpo y de los órganos seleccionados y de los radios de peso órgano-a-cuerpo y órgano-a-cerebro también fueron documentados. El tejido obtenido por exhaustiva necropsia macroscópica fue histomorfológicamente evaluado por un patólogo veterinario ampliamente certificado.

A. Pesos Corporales

- 20 Los valores de peso corporal medio para los machos del grupo 2000 mg/kg los Días 22 y 28 fueron significativamente inferior que el valor medio para el grupo masculino de control. El valor de peso corporal medio para las hembras del grupo 2000 mg/kg el Día 28 fue también significativamente inferior que el valor medio para el grupo femenino de control.

B. Consumo de Comida

- 25 El consumo de comida se redujo en los machos del grupo de 2000 mg/kg a lo largo de la duración del estudio. Así mismo, el consumo de comida para los machos del grupo 1000 mg/kg durante la tercera semana del estudio fue significativamente inferior que el de los machos del grupo de control. El consumo de comida se redujo de manera significativa en las hembras del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg durante la segunda, tercera y cuarta semana del estudio.

C. Patología Clínica

- 35 *Hematología.* El Día 29, se observaron un número de diferencias estadísticamente significativas en los índices de eritrocitos. El cómputo celular de sangre roja (RB) se redujo de manera significativa en machos y hembras en los tres niveles de dosis (500, 1000 y 2000 mg/kg). La concentración de hemoglobina (HGB) disminuyó en los machos del grupo 2000 mg/kg, las hembras del grupo 1000 mg/kg y en las hembras del grupo 2000 mg/kg. El volumen celular medio (MCV) disminuyó de manera significativa en los machos del grupo de 500, 1000 y 2000 mg/kg. La concentración celular media (MCH) aumentó de manera significativa en los machos y hembras del grupo 500, 1000, y 2000 mg/kg. La concentración media de hemoglobina celular (MCHC) aumentó en las hembras de 1000 mg/kg. El cómputo celular de sangre roja con núcleo (NRC; absoluto y relativo) disminuyó en los machos de 1000 mg/kg y 2000 mg/kg y aumentó en las hembras de 2000 mg/kg. Estos cambios indican una anemia sensible leve relacionada con el tratamiento.

- 45 El cómputo celular de sangre blanca (WBC) disminuyó en los machos de 2000 mg/kg. Hubo una reducción en los monocitos (MNO; absoluto y porcentaje) en los machos del grupo 2000 mg/kg. Las plaquetas (PLT) aumentaron en los machos de 2000 mg/kg. Sin embargo, estos cambios fueron cuantitativamente pequeños y la relevancia toxicológica fue ambigua.

- 50 *Química en Suero.* Los niveles medios de globulina (GLOB) disminuyeron en los machos del grupo 2000 mg/kg y en las hembras del grupo 1000 mg/kg el Día 29. Los radios albúmina/globulina aumentaron en los machos del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg y en las hembras del grupo 1000 mg/kg. Los niveles de fosfatasa alcalina (ALK) se elevaron en las hembras del grupo 500 mg/kg. Los niveles de colesterol (CHOL) aumentaron en las hembras del grupo 1000 mg/kg. Estos cambios menores no formaron patrones o tendencias relacionadas con la respuesta a la dosis para sugerir que estos valores fueron toxicológicamente relevantes.

D. Pesos de Órganos

- 60 Se observaron descensos estadísticamente significativos en los pesos corporales absolutos de los pulmones (machos y hembras del grupo 2000 mg/kg) y timo (machos del grupo 2000 mg/kg, hembras de 1000 mg/kg y hembras del grupo 2000 mg/kg). También fue significativo el descenso en el peso medio absoluto del órgano de la próstata y vesículas seminales en los machos del grupo 2000 mg/kg. Los pesos medios absolutos del corazón descendieron en las hembras del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg. El peso medio de las glándulas salivales descendió en las hembras del grupo 2000 mg/kg. El peso medio del bazo descendió en las hembras del grupo 2000 mg/kg.

Los cambios en el peso del órgano relativo (al cuerpo) incluyeron un aumento en el peso del cerebro en los machos y hembras del grupo 2000 mg/kg. También se observó un aumento del peso medio de los testículos en los machos del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg. El peso relativo del timo se reduce en los machos del grupo 2000 mg/kg y en las hembras del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg. El peso medio relativo del bazo aumentó en las hembras del grupo 2000 mg/kg.

Así mismo, los cambios de órgano relativos (para el peso del cerebro) incluyeron un descenso en el peso relativo del pulmón en los machos del grupo 2000 mg/kg. Los pesos relativos del timo disminuyeron en los machos y hembras del grupo 1000 mg/kg o 2000 mg/kg. Los pesos medios relativos de la próstata y de la vesícula seminal también descendieron en los machos del grupo 2000 mg/kg. El peso medio relativo del corazón también descendió en las hembras del grupo 2000 mg/kg así como el peso medio relativo de las glándulas salivales. El peso relativo del bazo también aumentó en las hembras del grupo 2000 mg/kg.

Los descensos en los pesos de los órganos (timo, pulmón, corazón, glándulas salivales, próstata, vesículas seminales, y cerebro) se consideraron como secundarias para la pérdida de peso corporal generalizada presentada en los animales del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg. La atrofia tímica, que se observó microscópicamente en animales del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg, fue consistente con la disminución observada en los pesos del timo. Otro tejidos con pérdida de peso no tuvieron correlatos microscópicos. Los aumentos de peso en el bazo fueron interpretados como una consecuencia de actividad eritropoyética observada microscópicamente.

E. Patología

Microscópica. Las incidencias de atrofia tímica y necrosis linfóide aumentaron en los animales del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg, pero no afectaron en los animales del grupo 500 mg/kg. Sin embargo, la importancia clínica de atrofia tímica y necrosis linfóide se interpretó como equívoca o ambigua porque la relación dosis- respuesta fue débil. También, estos cambios tímicos se presenta a menudo como cambios no específicos en animales enfatizados por una variedad de factores, y se observaron importantes reducciones en el peso corporal en los animales del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg.

Eritropoyesis en bazo aumentó en los machos y hembras del grupo 1000 mg/kg y 2000 mg/kg de manera suficiente como para distinguirlos de los controles, pero los bazos de los animales del grupo 500 mg/kg fueron similares a los de los controles. Hematopoyesis en hígado aumentó en los machos y hembras del grupo 2000 mg/kg lo suficiente como para distinguirlos de los controles, pero los hígados de los animales del grupo 500 mg/kg y 1000 mg/kg fueron similares a los de los controles. Se observó hiperplasia en médula ósea del esternón en los machos y hembras del grupo 200 mg/kg. Eritropoyesis en bazo, mayor hematopoyesis en hígado e hiperplasia en médula ósea se interpretaron como respuestas esperadas y apropiadas para anemia leve observada como una parte de los resultados de hematología. Estos resultados confirman la naturaleza sensible de la anemia durante tratamiento continuado.

Hubo varios cambios microscópicos presentes en este estudio. Estos fueron cambios inflamatorios o degenerativos comúnmente menores del tipo e incidencia usual observada en estudios con sonda a roedores.

Toxicocinética. Se recogieron muestra de otros 54 animales adicionales (27 machos y 27 hembras) para análisis de farmacocinética los Días 1 y 28. En ambos días, se recogieron muestras en cada uno de los seis puntos en el tiempo (alternando dos animales por punto en el tiempo): 0.5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la dosis. Se preparó plasma a partir de sangre y se analizó para concentraciones de dival-L-dC y los tres metabolitos: L-dC, L-dU y la forma parcialmente esterificada de dival-L-dC, éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina. Solamente L-dC y éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina fueron calificables. Los datos medios de concentración en plasma-tiempo para el grupo 1000 y 2000 mg/kg se sometieron a análisis de farmacocinética sin relación con el comportamiento usando WinNonlin 1.5 (Modelo 200). El análisis del grupo 500 mg/kg se encuentra en proceso.

Las concentraciones medias en plasma del metabolito, L-dC, alcanzaron valores máximos (C_{max}) a las 2 horas tras la dosis (T_{max}) para el grupo de 100 mg/kg y a las 1-4 horas tras la dosis para el grupo de 2000 mg/kg. Los valores medios de C_{max} para machos y hembras fueron comparables en cada uno de los grupos con dosis 1000 mg/kg y 2000 mg/kg y fueron similares el Día 28 frente al Día 1 en ambos grupos. C_{max} aumentó con la dosis en la mayoría de los casos pero la extensión del incremento fue variable. Tras alcanzar C_{max} , las concentraciones de L-dC disminuyeron de una manera biexponencial aparente para cada grupo. Las vidas medias estimadas en la fase terminal para el grupo con dosis 1000 mg/kg (9-17 horas) tendieron a ser más largas para el grupo con dosis 2000 mg/kg (6-8 horas), pero los cálculos de vidas medias deberían interpretarse con precaución. La estimación de vida media sólo precisó usar tres puntos de datos y los datos tendieron a ser variables. También, uno de los tres puntos de datos fue a las 4 horas, en cuyo momento la fase terminal no se había establecido. T_{ultimo} para concentraciones de L-dC ocurrió a las 24 horas para todos los conjuntos de datos. AUC_{ultimo} fue comparable para machos y hembras dentro del mismo grupo, y no pareció ser sustancialmente diferente del Día 28 contra Día 1. A pesar de que C_{max} para L-dC no pareció aumentar con la dosis incrementada de dival-L-dC de una manera consistente, tal y como se ha señalado anteriormente, AUC_{ultimo} de L-dC aumentó con dival-L-dC en una relación que pareció ser aproximadamente proporcional a la dosis.

Las concentraciones medias en plasma de éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina alcanzaron valores máximos (C_{max}) a las 1 a 2 horas tras la dosis (T_{max}). Los valores medios de C_{max} para machos y hembras fueron similares dentro de cada grupo de dosis con una tendencia hacia valores más altos para las hembras. Los valores C_{max} fueron aproximadamente

ES 2 317 912 T3

14% a 50% más elevados para las hembras el Día 1 y el Día 28 excepto para las hembras del grupo 2000 mg/kg donde los valores $C_{\max}$ de éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina fueron aproximadamente 164% mayores que los machos del Día 28. Cuando se comparan los valores dentro de cada género, los valores $C_{\max}$ el Día 28 fueron similares a los del Día 1 excepto para las hembras del grupo 2000 mg/kg para las cuales los valores $C_{\max}$ fueron 130% más altos el Día 28 que el Día 1. $C_{\max}$ aumentó con la dosis en cada caso, pero por un factor que fue generalmente menos linealmente proporcional a la dosis.

La fase de eliminación terminal aparente de éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina no estuvo bien caracterizada y por lo tanto, no se informó sobre las vidas medias. $T_{\text{último}}$ para concentraciones de éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina ocurrieron a las 4-8 horas para el grupo de dosis 1000 mg/kg y a las 8-24 horas para el grupo con dosis 2000 mg/kg. Tal y como se ha observado para $C_{\max}$, el AUC último fue 25% a 50% más alto para las hembras que para los machos. AUC último fue consistentemente y ligeramente mayor en el Día 28 que en el Día 1 tanto para machos como para hembras (30% a 62%). AUC último aumentó con la dosis en una relación que pareció ser proporcionalmente lineal a la dosis.

Estos datos sugieren que tanto L-dC como éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina alcanzaron la circulación sistémica relativamente rápido. La exposición general tal y como se ha medido por $C_{\max}$ fue 10 a 40 veces más para L-dC que para éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina y de 35 a 80 veces más tal y como se ha medido por AUC máximo. La exposición pareció aumentar de manera proporcional a la dosis dentro del rango de dosis de 1000-2000 mg/kg/día. La exposición total el Día 29 de L-dC fue comparable a la observada el Día 1 mientras que la exposición de éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina fue generalmente mayor el Día 28, lo que sugiere que la acumulación de éster β -L-2'-deoxicitidina-5'-valina puede ocurrir durante dosis repetidas.

Un resumen de los resultados de toxicocinética se presenta en la Tabla 30.

TABLA 30

Análisis de Farmacocinética de Dosis Única y Reptetida de Dival-L-dC 1000 mg/kg y 2000 mg/kg Administrado oralmente en la Rata

Dosis (mg/kg day)	Día	Sexo	Parámetro de Farmacocinética					
			C _{max}	T _{max}	T _{last}	AUC _{last}	AUC	t.
			(Pg/mL)	(h)	(h)	(Pg.hr/mL)	(Pg.hr/mL)	(h)
L-dC								
1000	1	M	33.6	2	24	255	363	17.3
1000	1	H	48.5	2	24	239	279	9.4
1000	28	M	52.9	2	24	254	334	12.9
1000	28	H	46.6	2	24	239	277	8.8
2000	1	M	70.9	2	24	700	478	5.8
2000	28	H	59.4	2	24	461	487	5.6
2000	28	M	51.1	4	24	500	550	NA
2000	28	H	77.7	1	24	578	561	8.5
β-L-2'-deoxicitidina-5'-valina éster								
1000	1	M	1.31	1	4	2.81	ID	ID
1000	1	H	1.70	2	4	4.07	ID	ID
1000	28	M	1.32	2	8	3.96	ID	ID
1000	28	H	1.97	2	4	5.36	ID	ID
2000	1	M	2.38	2	8	8.09	ID	ID
2000	1	H	2.71	2	8	10.2	ID	ID
2000	28	M	2.36	1	8	11.0	ID	ID
2000	28	H	6.24	2	24	16.5	ID	ID

NA = No Aplicable; no se caracterizó adecuadamente una fase terminal.
ID = Datos Insuficientes para definir la fase terminal para todos los animales.

Ejemplo de Referencia 43

Ensayo de Mutación en Incorporación de Placas de S. Typhimurium y E. coli (Genotoxicidad)

Cuando se administra oralmente dival-L-dC a animales, se convierte rápidamente a L-dC para dar elevadas concentraciones en plasma de L-dC y dival-L-dC no detectable. Por lo tanto, se llevaron a cabo estudios de mutagenicidad realizados *in vitro* usando L-dC. Este estudio se realizó de acuerdo con las regulaciones FDA GLP. L-dC fue analizado para evaluar su potencial para provocar mutación en el operón de histidina de las cepas TA98, TA100, TA1535, y TA1537 de *Salmonella typhimurium* y en el operón de triptófano de la cepa WP2uvrA de *Escherichia coli*. Se analizó

L-dC en concentraciones de 50, 100, 500, 1000, y 5000 mg/placa más controles positivos y negativos. Las cepas de la prueba se expusieron a L-dC o control en ausencia de activación exógena y en presencia de extracto S-9 inducido de hígado de rata más cofactores. Tras la incubación durante aproximadamente 68 horas, L-dC y los controles fueron evaluados para el número de revertientes por placa y la integridad del césped continuo en la microcolonia.

Tanto los controles negativos como los positivos cumplieron los requisitos del test. Los resultados de ambos ensayos definitivos y confirmatorios indicaron que L-dC no provocó ningún aumento significativo en el número de colonias revertientes para ninguna cepa de la prueba en la presencia o ausencia de extracto S-9 inducido de hígado de rata. En base a los hallazgos del estudio, se concluyó que no hubo evidencia de mutagenicidad en el ensayo de mutación con incorporación de placa de *S. Typhimurium* o *E. coli* con concentraciones de L-dC de hasta 5000 mg/placa.

Ejemplo de Referencia 44

Ensayo de Aberración Cromosomal

Quando se administra oralmente dival-L-dC a animales, se convierte rápidamente a L-dC para dar elevadas concentraciones en plasma de L-dC y dival-L-dC no detectable. Por lo tanto, se llevaron a cabo estudios de mutagenicidad realizados *in vitro* usando L-dC. Este estudio se realizó de acuerdo con las regulaciones FDA GLP. L-dC fue analizado para evaluar su potencial para provocar aberraciones cromosomales en células cultivadas CHO. En el ensayo definido, L-dC en concentraciones de 100, 500, 1000 y 5000 mg/mL y controles positivos y negativos fueron analizados con y sin activación metabólica. Tras tratamiento continuo durante 18 horas, se determinó la toxicidad mediante la reducción en crecimiento relativo celular (RCG) e índice relativo mitótico (RMI). En base a los resultados de RCG y RMI, las aberraciones cromosomales se contabilizaron desde las tres concentraciones más altas (500, 1000 y 5000 mg/mL). Se consiguieron cien metafases de cada uno de los cultivos duplicados en cada concentración (incluyendo los controles positivos y negativos).

Se llevó a cabo un ensayo confirmatorio sin activación, sólo con concentraciones de L-dC de 1.0, 10, 100, 500, 1000 y 5000 mg/mL. Tras tratamiento continuo durante 18 horas, se determinó la reducción en RCG y RMI. En base a los resultados de RCG y RMI, las aberraciones cromosomales se contabilizaron desde las tres concentraciones más altas (500, 1000 y 5000 mg/mL). Se consiguieron cien metafases de cada uno de los cultivos duplicados en cada concentración (incluyendo los controles positivos y negativos).

Los resultados de los ensayos definitivos y confirmatorios indicaron que L-dC no provocó un incremento estadísticamente significativo (definido como un valor $p \leq 0.05$ determinado por el test Chi-square) en el porcentaje de células con aberraciones en cualquiera de las concentraciones analizadas, con y sin activación metabólica, en comparación con los controles disolventes. En base a los hallazgos del estudio, se concluyó que no hubo evidencia de aberración cromosomal en el ensayo CHO tras la exposición a L-dC en concentraciones de hasta 500 mg/mL, y L-dC no se considera que sea un agente clastogénico.

Ejemplo de Referencia 45

Ensayo con Micronúcleo de Ratón

Quando se administra oralmente dival-L-dC a animales, se convierte rápidamente a L-dC para dar elevadas concentraciones en plasma de L-dC y dival-L-dC no detectable. Por lo tanto, se llevaron a cabo estudios de mutagenicidad realizados *in vitro* usando L-dC. Este estudio se realizó de acuerdo con las regulaciones FDA GLP. Asumiendo una biodisponibilidad oral de 10-20% en el roedor (ver Farmacología y Toxicología, Sección 8.1.7.3) la exposición a L-dC (2000 mg/kg) alcanzaría o excedería 400 mg/kg. Este nivel de exposición excedería la exposición humana esperada en 20 a 50 veces.

L-dC fue analizado para su potencial para inducir eritrocitos policromáticos micronucleados (MPCE) en las células de médula ósea de ratones machos y hembras. L-dC en concentraciones de 500, 1000 y 2000 mg/kg y los controles positivos y negativos fueron analizados. El fármaco del estudio fue administrado mediante sonda oral como una única dosis. Se llevaron a cabo dos cultivos aproximadamente 24 y 48 horas tras la administración de L-dC o el control negativo, y se llevó a cabo un único cultivo aproximadamente 24 horas después de la administración del control positivo. Se emplearon cinco ratones machos y cinco ratones hembras por grupo de dosis por tiempo de cultivo. Se determinaron el porcentaje de eritrocitos policromáticos (PCE) y la frecuencia MPCE para cada punto en el tiempo.

Los resultados de este estudio indican que no hubo un incremento estadísticamente significativo (definido como un valor $p \leq 0.025$ determinado por el test unilateral de Estudiante) en el número de MPCE en cualquier punto en el tiempo en cualquier grupo de dosis de L-dC en comparación con el control negativo. Se observó una reducción de más del 20% contra el control del vehículo en el porcentaje de PCE, como una indicación de toxicidad, en cada nivel de dosis del artículo de la prueba en el tiempo del cultivo a las 24 horas en ambos sexos (-30.5% a -43.1% para los machos y -26.1% a -32.2% para las hembras). La reducción también indica una exposición apropiada del artículo de la prueba hacia un tejido objetivo. Sin embargo, esta reducción de más de 20% no se observó en ningún nivel de dosis del artículo de la prueba en el tiempo de la cosecha a las 48 horas en ninguno de los sexos.

ES 2 317 912 T3

Este estudio indica que, bajo las condiciones del test y de acuerdo con los criterios establecidos para la evaluación de los resultados del test, L-dC fue negativo en el ensayo de micronúcleo en animales machos y hembras en dosis de hasta 2000 mg/kg.

Ejemplo de Referencia 46

Resumen Integrado de Hallazgos Toxicológicos

Se emplearon ensayos convencionales con base celular para evaluar la citotoxicidad de L-dC y cualquier metabolito celular. L-dC fue no-citotóxico (50% concentración citotóxica, CC_{50} , > 2000 μ M) para la línea celular hepatoma humana 2.2.15, que se emplea de manera rutinaria para determinar la actividad anti-I-IBV de agentes potenciales antivirales. L-dC no fue citotóxico para células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs; CC_{50} > 100 μ M) y para células progenitoras de médula ósea humana (50% concentración inhibitoria, IC_{50} , > 10 μ M en ensayos colonia granulocito-macrófago de unidad de formación (CFU-GM) y unidad de formación por explosión de eritroide (BFU-E)),

TABLA 31

Citotoxicidad *In Vitro* de L-dC

Línea Celular ^a	CC_{50} ^b (mM)
2.2.15 ^c	>2000
PBMC ^d	>200
HFF ^{c,e}	>100
Daudi ^{c,e}	>50
MDCK ^b	>100
CV-1 ^c	>100
MA-104 ^c	>100
a. PBMC, células mononucleares de sangre periférica; HFF, fibroblasto de prepucio humano; Daudi, linfoma B-celular de Burkitt; MDCK, células epiteliales de hígado canino; CV-1, células de fibroblasto de hígado de mono verde africano; MA-104, células epiteliales de hígado de mono rhesus.	
b. CC_{50} = 50% concentración citotóxica; '>' indica que no se alcanzó CC_{50} en la concentración más alta de fármaco testada.	
c. NIH, Programa de Química Antimicrobial e Investigación Antiviral	
d. R. Schinazi, Emory University, Veterans Affairs Medical Center.	
e. Resultado presentado en Pg/mL en lugar de PM.	

Además, L-dC fue no citotóxico en numerosas de otras líneas celulares de origen humano y mamífero. No se observaron cambios discernibles en la función, morfología o contenido de ADN de mitocondria y no hubo acumulación de ácido láctico en los hepatocitos tratados con L-dC (IC_{50} , > 10 μ M). La forma trifosfato de L-dC no fue inhibitoria de la polimerasas de ADN humano α , β y γ , en concentraciones de hasta 100 μ M.

En estudios de toxicología en ratas y monos con única dosis aguda (incluyendo dosis oral única de 500, 1000, y 2000 mg/kg) (escala de dosis en días, 1, 4, 7, 10 y 14 hasta 2000 mg/kg) no hubo signos manifiestos de toxicidad ni hubo efectos relacionados con dival-L-dC en el peso corporal, consumo de comida, o parámetros de patología clínica (hematología y química de suero). Además, no hubo lesiones macroscópicas en necropsia, ni hubo hallazgos microscópicos en análisis histomorfológicos atribuibles a dival-L-dC. En base a los resultados de estos estudios, el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) para dival-L-dC, tras una única dosis oral en la rata Sprague-Dawley y mono cynomolgus fue 2000 mg/kg.

En el estudio de toxicología subcrónica (día 25) en monos, el NOAEL fue menos de 500 mg/kg para dival-L-dC. La atrofia tímica fue el único hallazgo microscópico que estuvo posiblemente relacionado con dival-L-dC, pero la importancia clínica se interpretó como ambigua. Se observaron una anemia leve no-hemolítica (disminución en el cómputo de células de sangre roja, disminución de hemoglobina y hematocrito) y descenso en los cómputos de leucocitos polimorfonucleares absolutos y porcentuales de consecuencia no aparente en el nivel de dosis de 500 mg/kg. Aparte de los cambios hematológicos no se identificaron otras toxicidades en ningún grupo de dosis.

En el estudio de toxicología subcrónico (día 28) en ratas, el NOAEL fue menos que 500 mg/kg para dival-L-dC. La administración oral de dival-L-dC durante 28 días a la rata en una dosis de 2000 mg/kg dio como resultado cambios relacionados con el tratamiento que incluyeron anemia macrocítica leve, reducción en el peso del timo, aumento en el peso del bazo (sólo hembras), reducción en el peso corporal, y hematopoyesis en el bazo, hígado y médula ósea del esternón. La administración oral de dival-L-dC durante 28 días a la rata en una dosis de 1000 mg/kg dio como resultado cambios relacionados con el tratamiento que incluyeron anemia macrocítica leve, atrofia tímica (sólo hembras) y hematopoyesis en el bazo. Los cambios histomorfológicos observados en el hígado, bazo y médula ósea reflejan una respuesta hematológica a la anemia leve. La administración oral de dival-L-dC durante 28 días a la rata en una dosis de 500 mg/kg dio como resultado una anemia macrocítica leve. Aparte de los cambios hematológicos y respuestas hematopoyéticas, no se identificaron otras toxicidades en ningún grupo de dosis.

En marmotas sanas normales y en marmotas crónicamente infectadas por virus de hepatitis B (modelo de eficacia para el tratamiento de infección de VHB), no se observó toxicidad durante estudios profundos (única dosis IV y PO de 10 mg/kg) y subcrónica (28 días en 10 mg/kg/día oralmente y 12 semanas en 1 mg/kg/día oralmente) de animales que reciben L-dC. No hubo pérdida de peso en los grupos de tratamiento con L-dC en comparación con los animales de control, los parámetros de patología clínica (hematología y química de suero) se encontraron en el rango normal y las biopsias de hígado tomadas al final del tratamiento en el estudio de 12 semanas no mostraron ninguna evidencia de cambio adiposo (esteatosis microvesicular).

L-dC no fue mutagénico en el ensayo de mutagenicidad en la incorporación en placa de *S. typhimurium* o *E. coli* en concentraciones de hasta 5000 µg/placa. No hubo evidencia de aberraciones cromosomales en el ensayo con el ovario del hámster chino (CHO) tras la exposición a L-dC en concentraciones de hasta 5000 µg/placa (o 22.0 mM). En el ensayo del micronúcleo del ratón, L-dC no fue clastogénico para animales machos o hembras en dosis de hasta 2000 mg/kg.

La anemia leve observada en el mono no se asoció con ningún correlato clínico incluso en la dosis más alta (2000 mg/kg) y en la rata en 500 mg/kg. Además, se cambiaron los conteos de reticulocitos. Aunque no existió un componente de reversibilidad formal en estos estudios, resulta aparente que un rebote hematológico puede ocurrir tal y como se indica por la hematopoyesis extramedular vista en el bazo e hígado en las dosis más elevadas en la rata.

TABLA 32

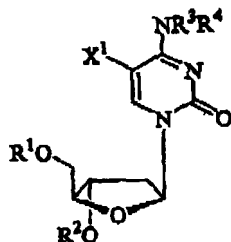
Comparación de Interespecies de Dosis por Peso y Área de Superficie Corporal

Especie	Peso Corporal (kg)	Dosis (mg/kg)	Dosis (mg/animal)	Conversión Factor	Dosis Equivalente Humana (HED) (mg/kg)	Veces Difference
Rata	0.2	500	100	6	16.6	23
Mono	4.0	500	2000	3	666	938
Marmota	3.0	10	30	3	10	14
Humano	70	0.71	50 (propuesta)	1	0.71	-

Se observaron cambios hematológicos similares en dosis comparables o más bajas en estudios de toxicidad pre-clínica de lamiduvina (Epivir-HBVTTM), y valaciclovir (ValtrexTM). Estos dos fármacos aprobados son miembros de la misma clase bien caracterizada (nucleósido o análogo de nucleósido) como dival-L-dC. La elección de lamiduvina para comparación se basa en el hecho de que es un derivado de citosina, como lo es dival-L-dC y en su aprobación para el tratamiento de infección crónica de hepatitis B. La elección de valaciclovir para comparación se basa en el hecho de que es un profármaco de éster de valina del aciclovir de nucleósido.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

R² es un residuo de aminoácido; y

R³ y R⁴ son independientemente H, alquilo de cadena recta, ramificada o cíclica, dialquilaminoalquilenilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo sustituido, alquilosulfonilo, arilsulfonilo, araquilsulfonilo, residuo de aminoácido, mono, di, trifosfato, o un profármaco de fosfato,

donde el aminoácido incluye aminoácidos α , β , γ o δ ; y

alquilo es un hidrocarbano saturado primario, secundario o terciario de C₁ a C₁₀, y es no sustituido, o sustituido por moléculas seleccionadas del grupo consistente en hidroxil, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato.

2. El compuesto de la reivindicación 1, donde R² es un residuo de aminoácido de la fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), donde R⁸ es la cadena lateral de un aminoácido y donde R⁸ puede opcionalmente enlazarse con R¹⁰ para formar una estructura de anillo; o de manera alternativa, R⁸ es un alquilo, arilo, heteroalquilo o heterociclo;

R⁹ es hidrógeno, alquilo o arilo; y

R¹⁰ y R¹¹ son independientemente hidrógeno, acilo o alquilo.

3. El compuesto de la reivindicación 2, donde R² es L-valinil.

4. El compuesto de la reivindicación 1, donde R³ y R⁴ son hidrógeno.

5. El compuesto de la reivindicación 1, donde R³ es hidrógeno y R⁴ es dimetilaminometileno.

6. El compuesto de la reivindicación 1, donde R³ es hidrógeno y R⁴ es CO-metilo.

7. El compuesto de la reivindicación 1, donde R³ es hidrógeno y R⁴ es L-valinil.

8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva anti-VHB de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, donde R² es un residuo de aminoácido de la fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), donde

R⁸ es la cadena lateral de un aminoácido y donde R⁸ puede opcionalmente enlazarse con R¹⁰ para formar una estructura de anillo; o de manera alternativa, R⁸ es un alquilo, arilo, heteroalquilo o heterociclo;

R⁹ es hidrógeno, alquilo o arilo; y

R¹⁰ y R¹¹ son independientemente hidrógeno, acilo o alquilo.

10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, donde R² es L-valinil.

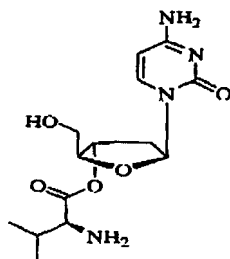
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, donde R³ y R⁴ son hidrógeno.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, donde R³ es hidrógeno y R⁴ es dimetilaminometileno.

13. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, donde R³ es hidrógeno y R⁴ es CO-metilo.

14. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, donde R³ es hidrógeno y R⁴ es L-valinil.

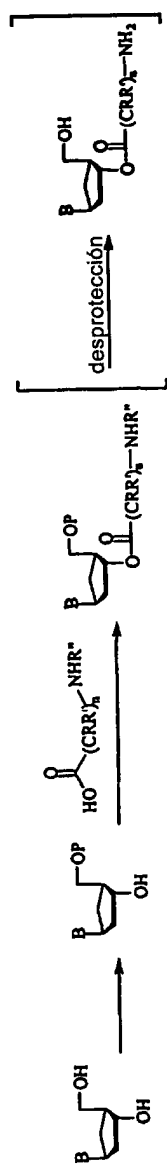
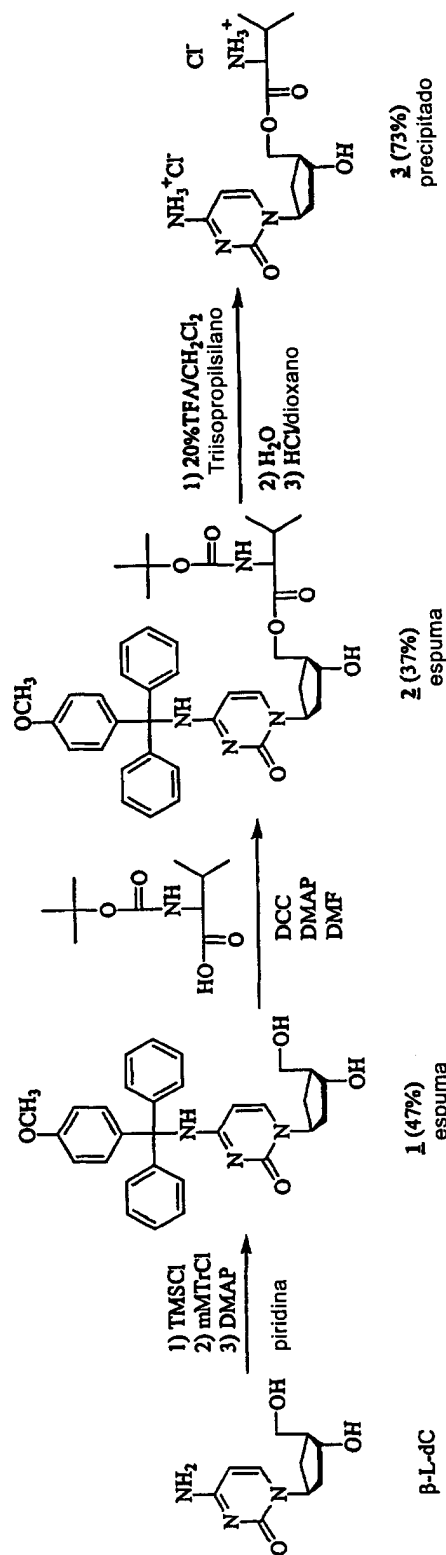
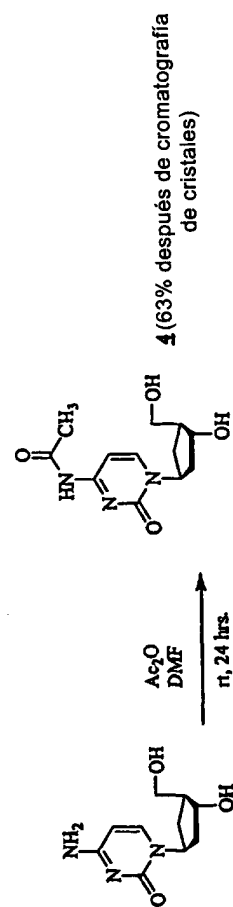
15. El compuesto de la reivindicación 1, donde el compuesto tiene la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

16. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con β -L-deoxiribo-timidina.

17. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1a: Síntesis de ésteres 3'-valinil de 2'-deoxy- β -L-citidinaFigura 1b: Síntesis de ésteres 5'-valinil de 2'-deoxy- β -L-citidinaFigura 2: Síntesis de N-acetil-2'-deoxy- β -L-citidina

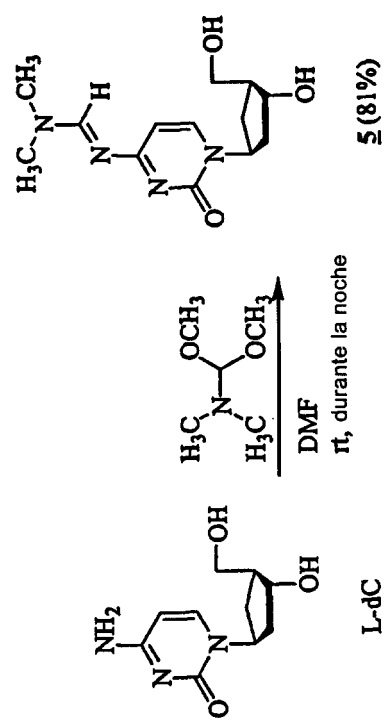


Figura 3: Síntesis de N⁴-[(dimetilamino)metileno]-2'-deoxy- β -L-citidina

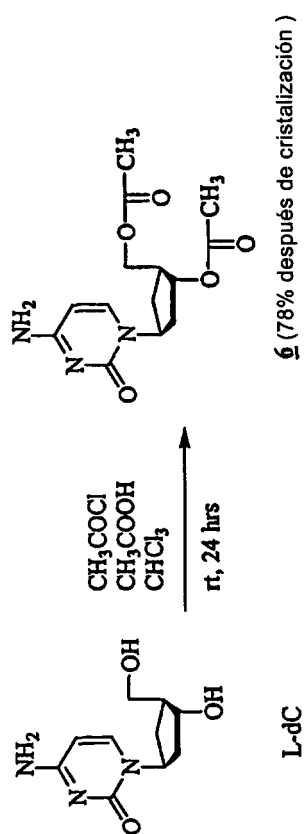


Figura 4: Síntesis de 3', 5'-di-O-acetil-2'-deoxi- β -L-citidina

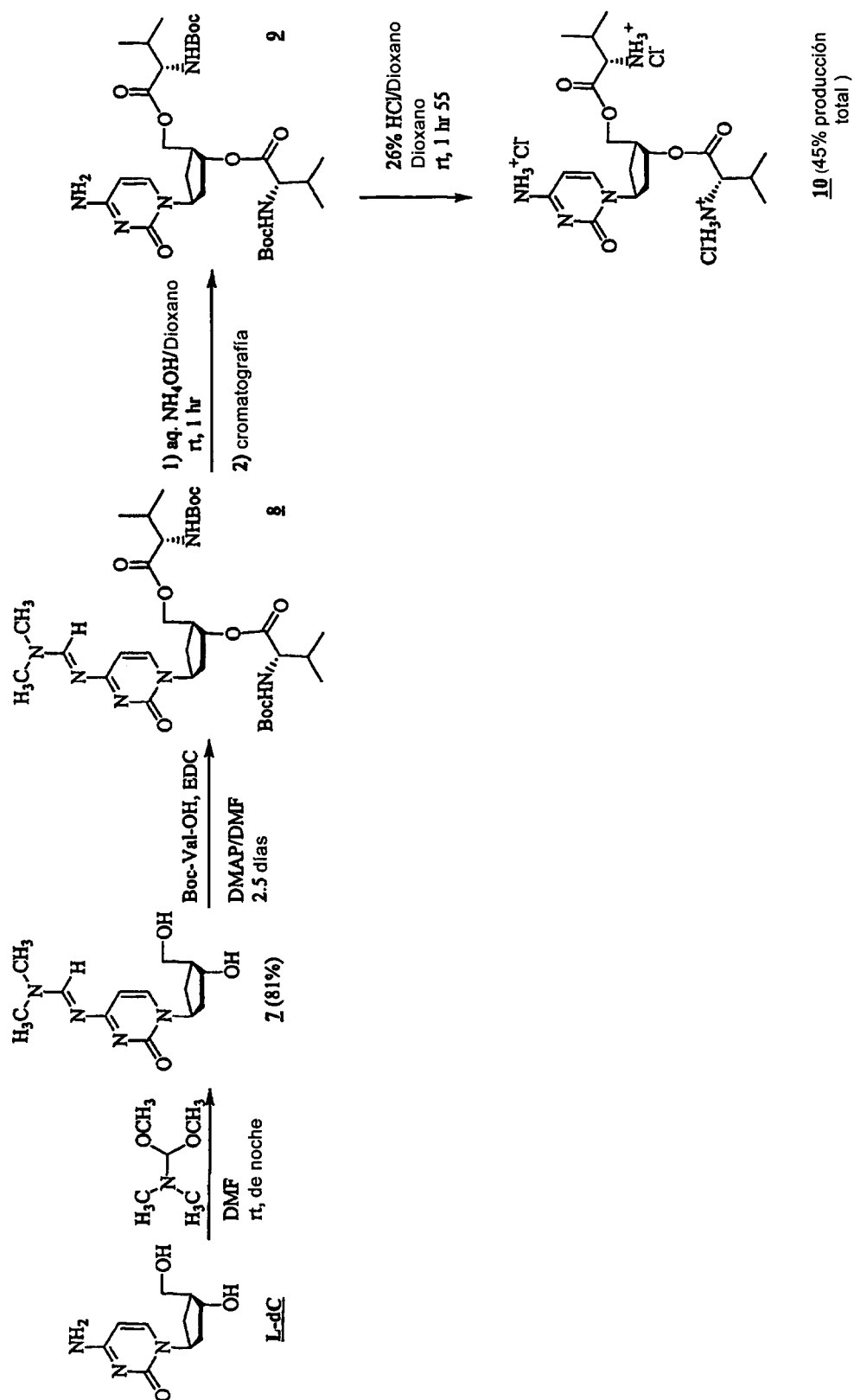


Figura 5: Síntesis de ésteres 3', 5'-di-O-valinil de 2'-deoxiβ-L-citidina

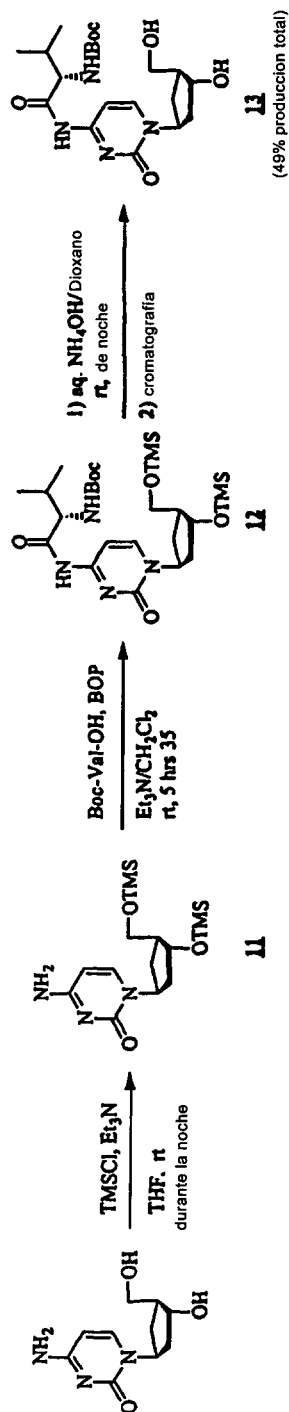


Figura 6: Síntesis de ester N⁴-Boc-valinil de 2'-deoxi- β -L-citidina

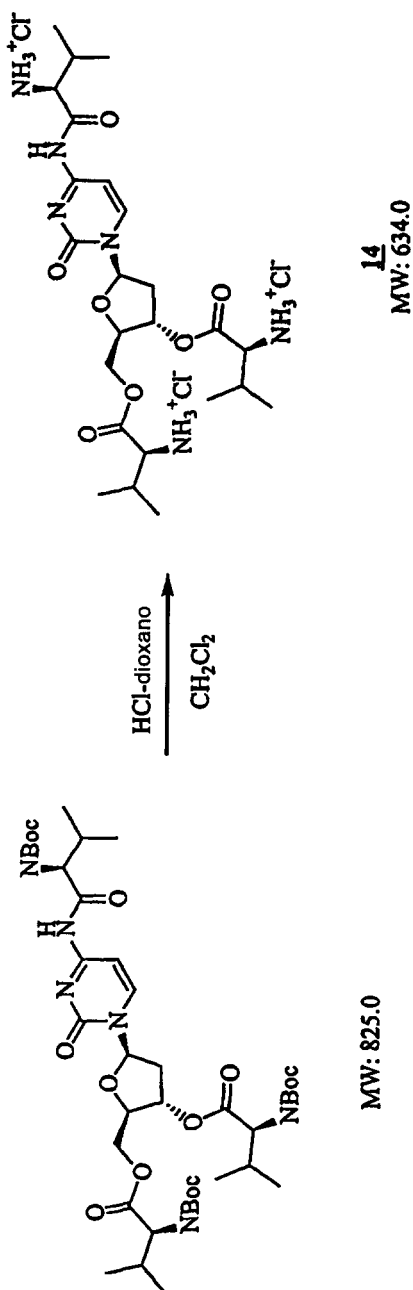


Figura 7: Síntesis de 3', 5', N⁴-tri-(L-valinil)-L-2'-deoxycitidina

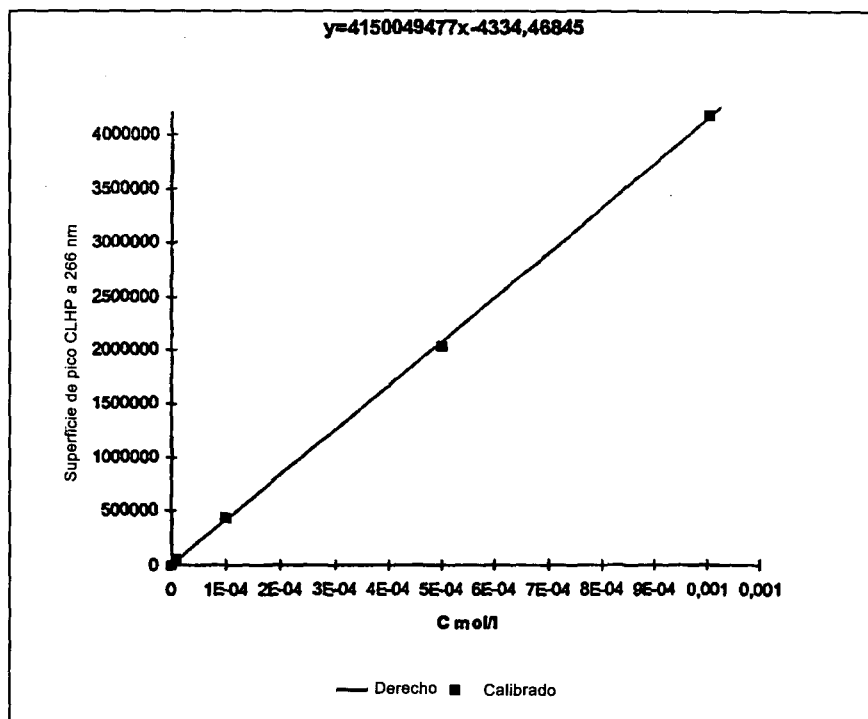


Figura 8a: Curva de calibración de solubilidad para D-dC

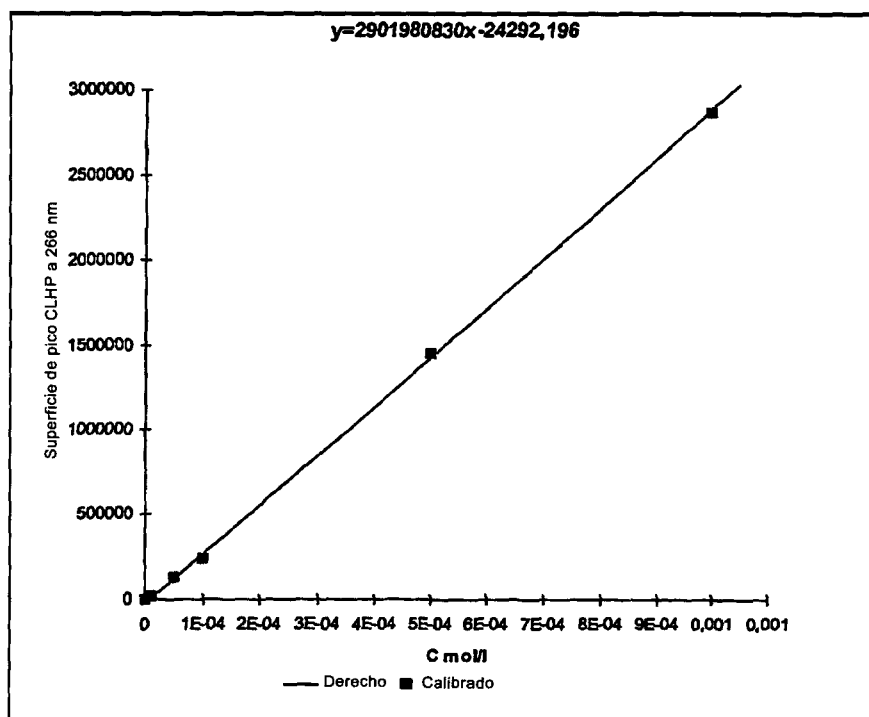


Figura 8b: Curva de calibración de solubilidad para el ester 3',5'divinil de L-dC

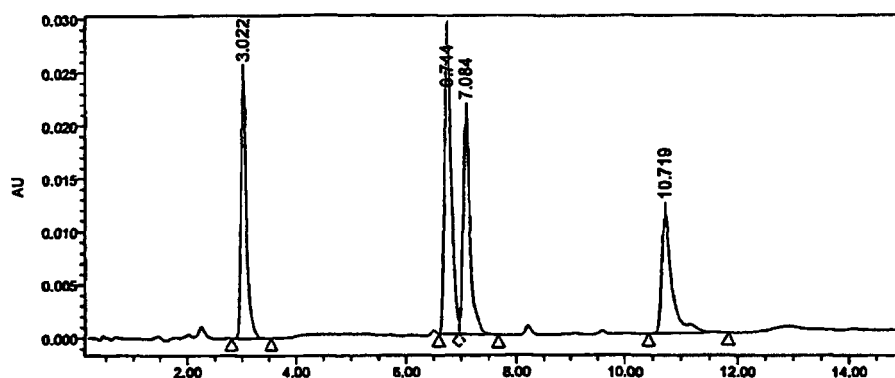


Figura 9a: Perfil HPLC-7.5 horas a pH de 7.42

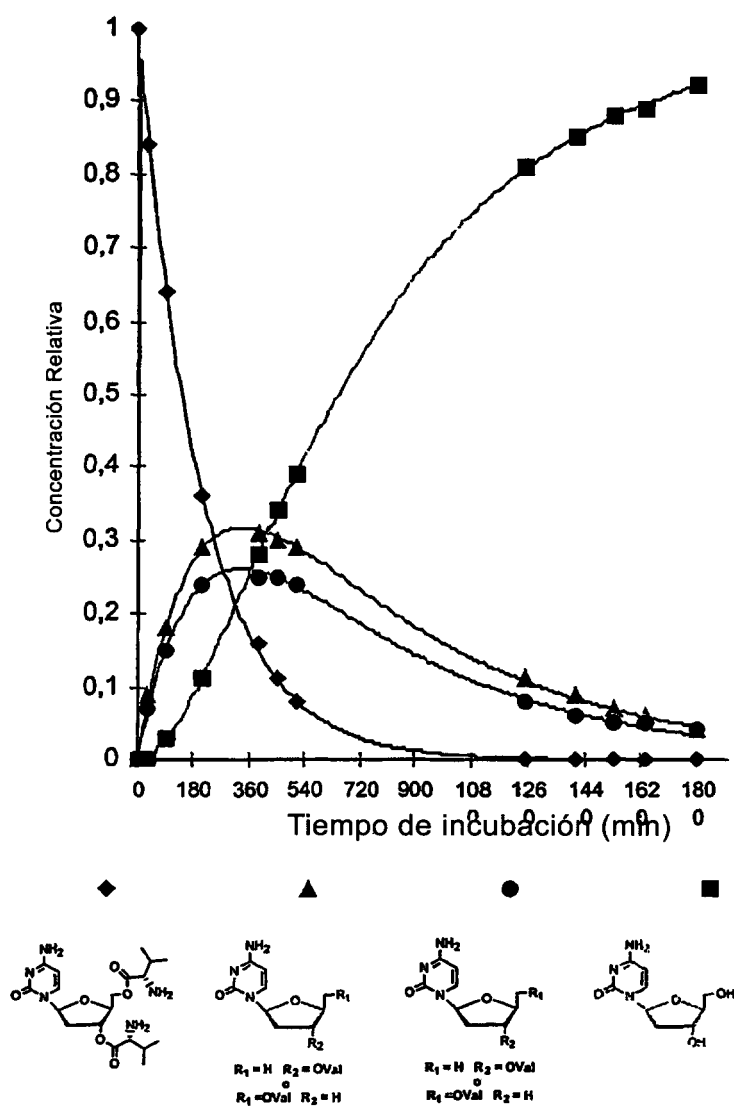


Figura 9b: Curvas cinéticas a pH de 7.42

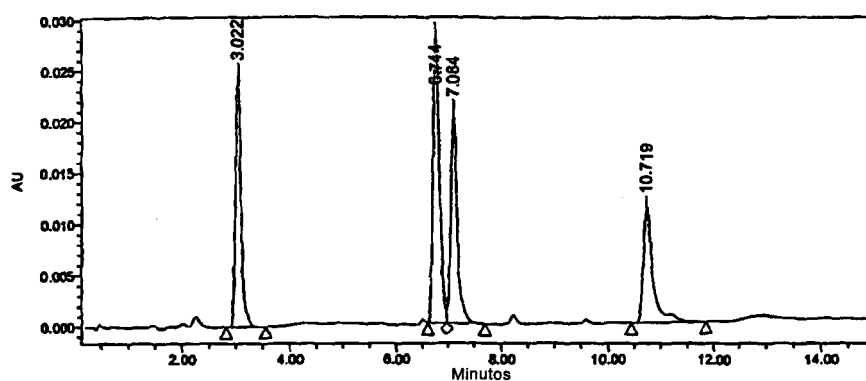


Figura 10a: Perfil HPLC- 5.33 horas a pH de 7.42

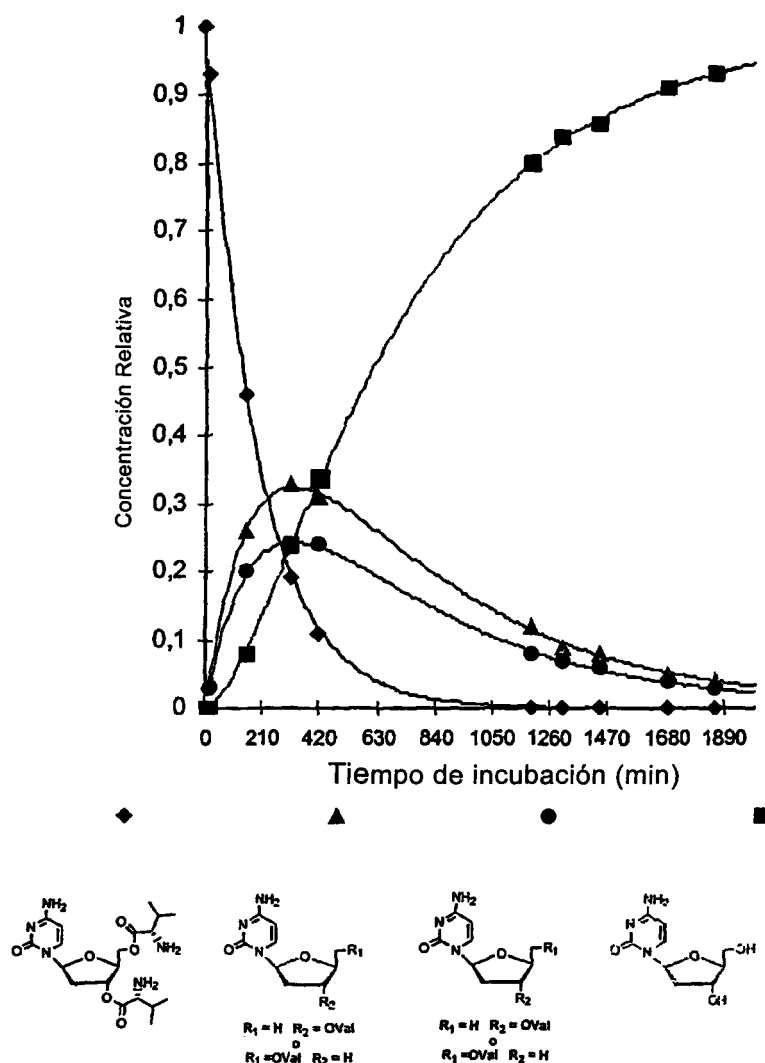


Figura 10b: Curvas cinéticas a pH 7.20

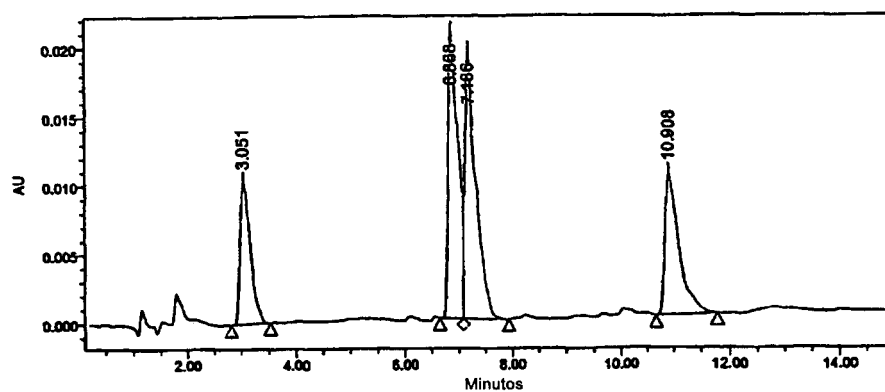


Figura 11a: Perfil HPLC- 95.7 horas a pH de 4.51

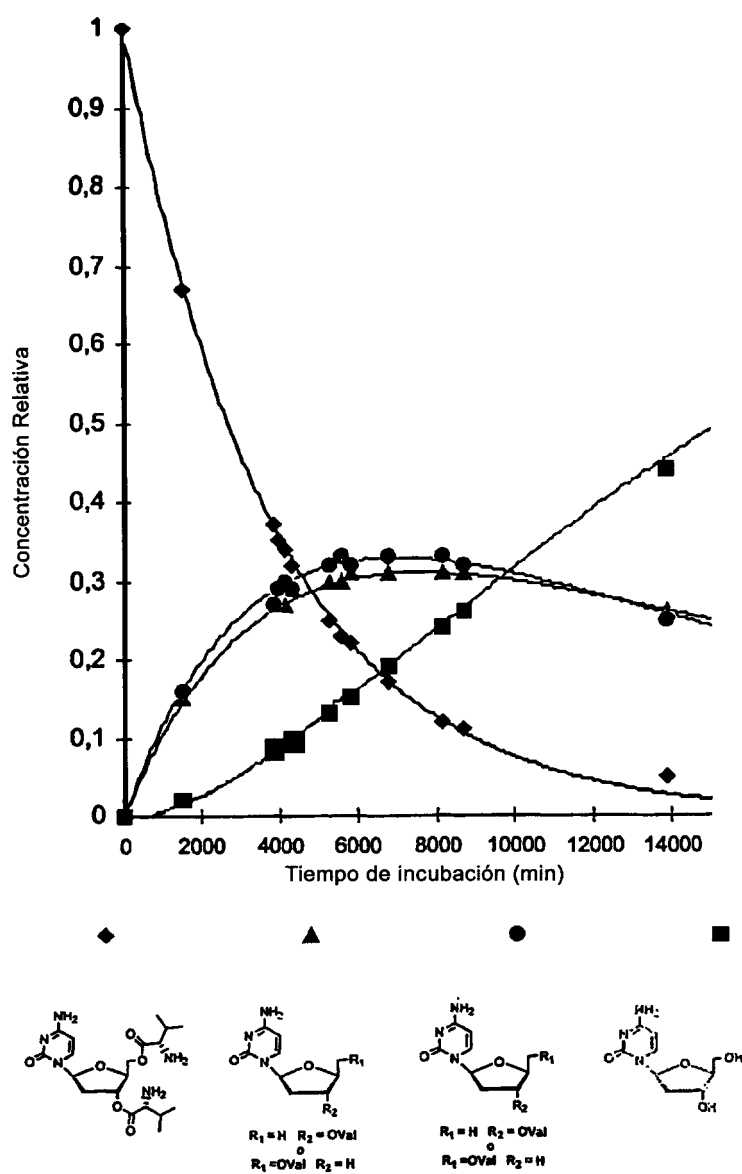


Figura 11b: Curvas cinéticas a pH de 4.51

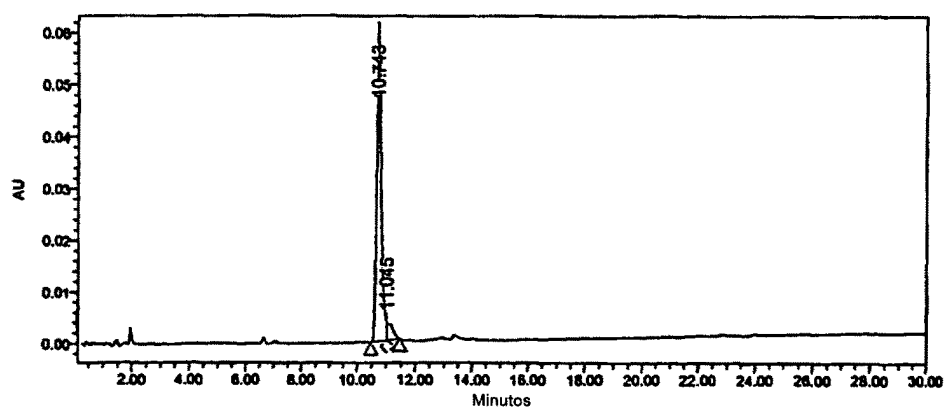


Figura 12: HPLC- 48 horas a pH de 1.23

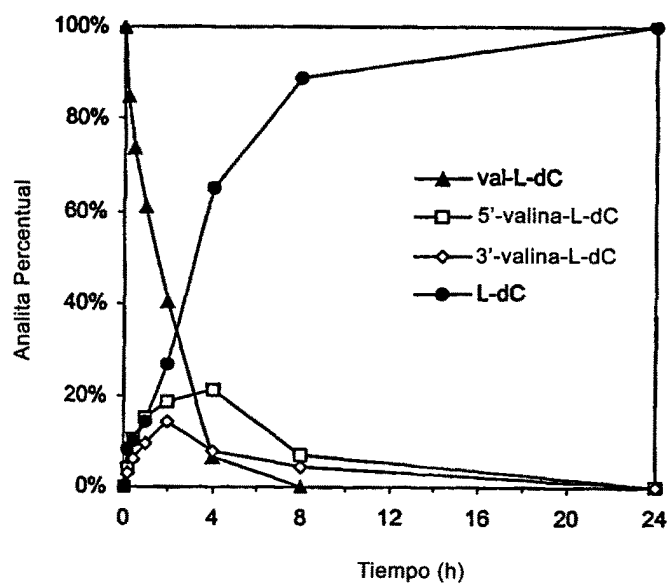


Figura 13: Metabolismo In Vitro de 3', 5'-Dival -L-dC en Plasma Humano

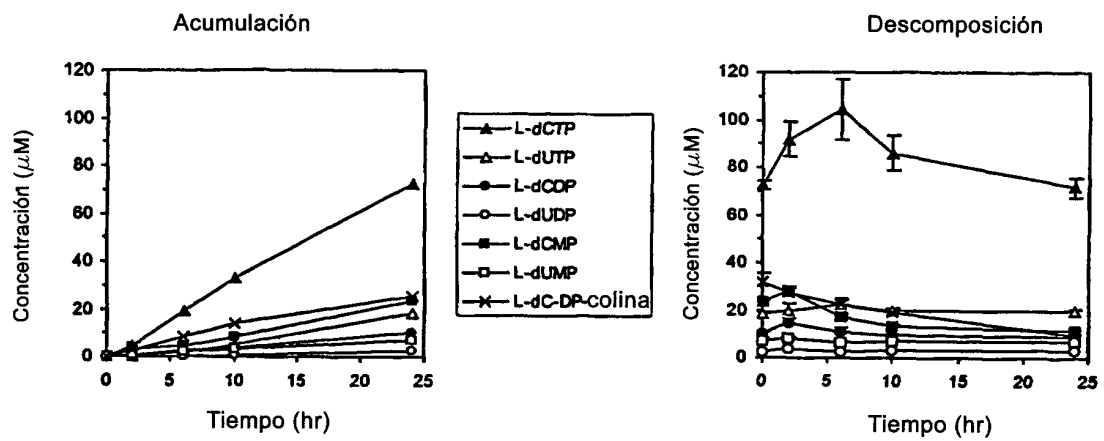


Figura 14: Metabolismo Intracelular de L-dC en células HepG2

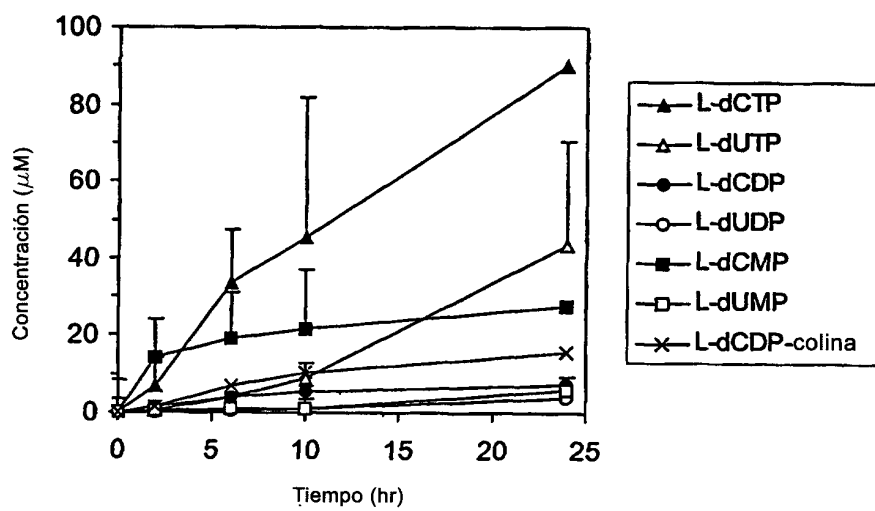


Figura 15: Metabolismo Intracelular de L-dC en Hepatocitos Humanos Primarios

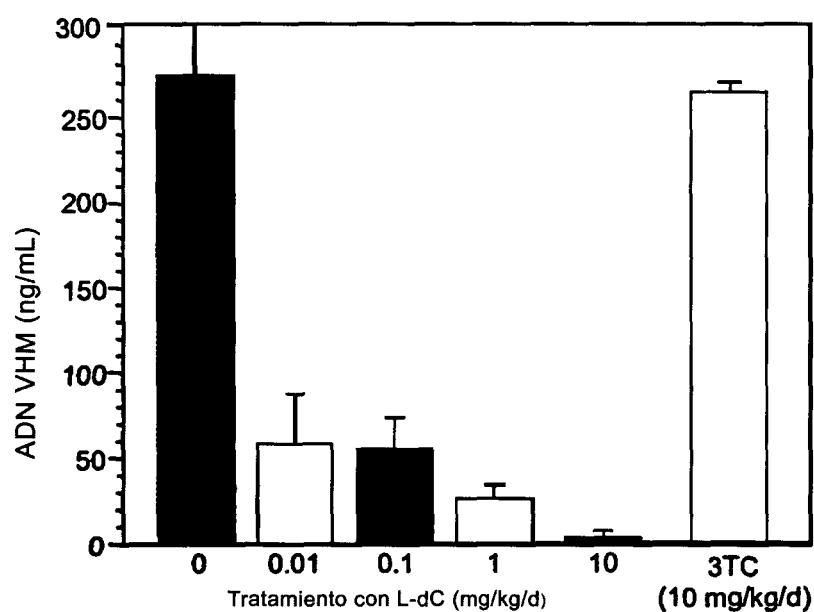


Figura 16: Respuesta Antiviral a la Dosis Antiviral de L-dC en el Modelo de Marmota

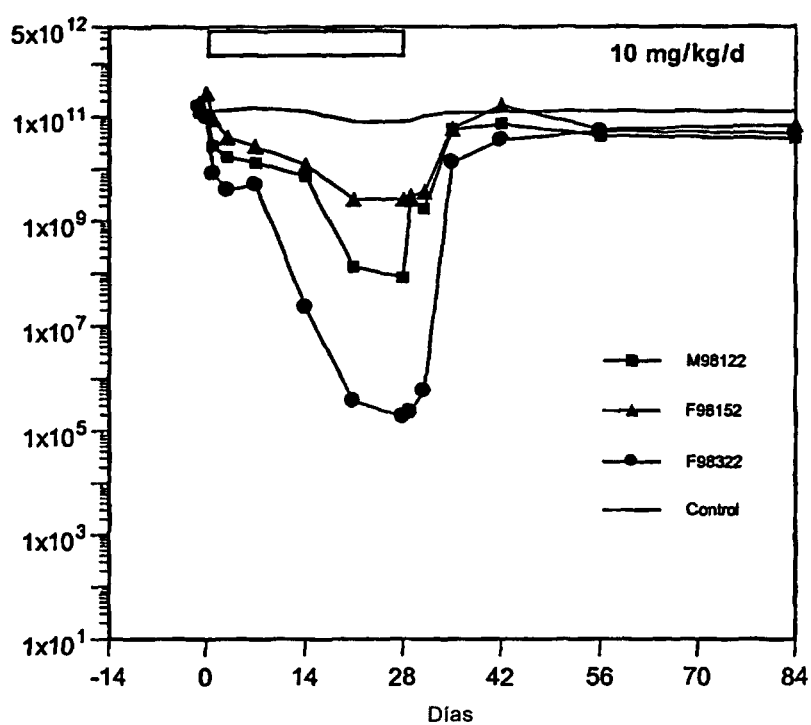


Figura 17: Actividad Antiviral de L-dC en el Modelo de Marmota

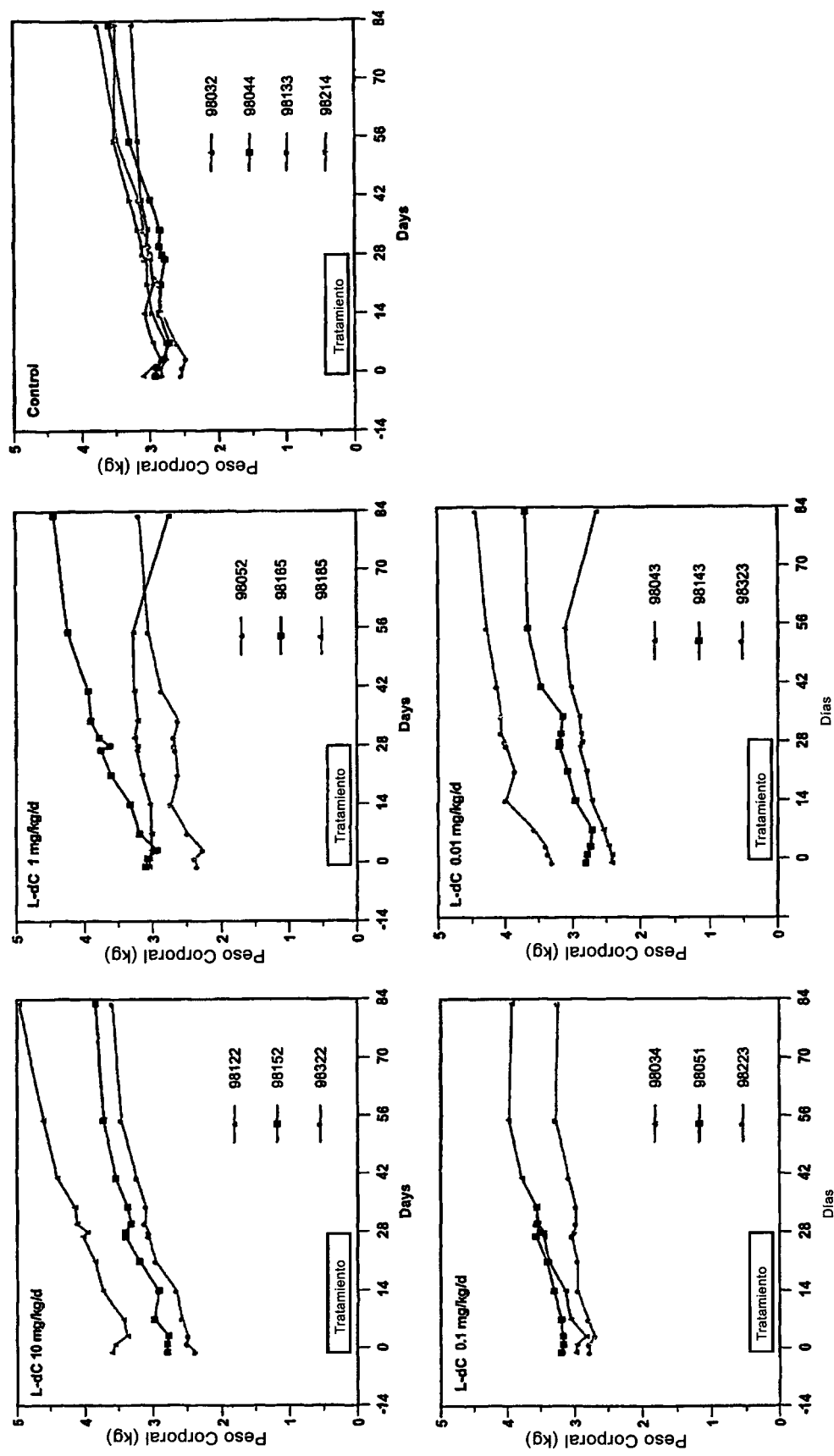


Figura 18: Pesos Corporales de Marmota oralmente tratadas con L-dC-28 días

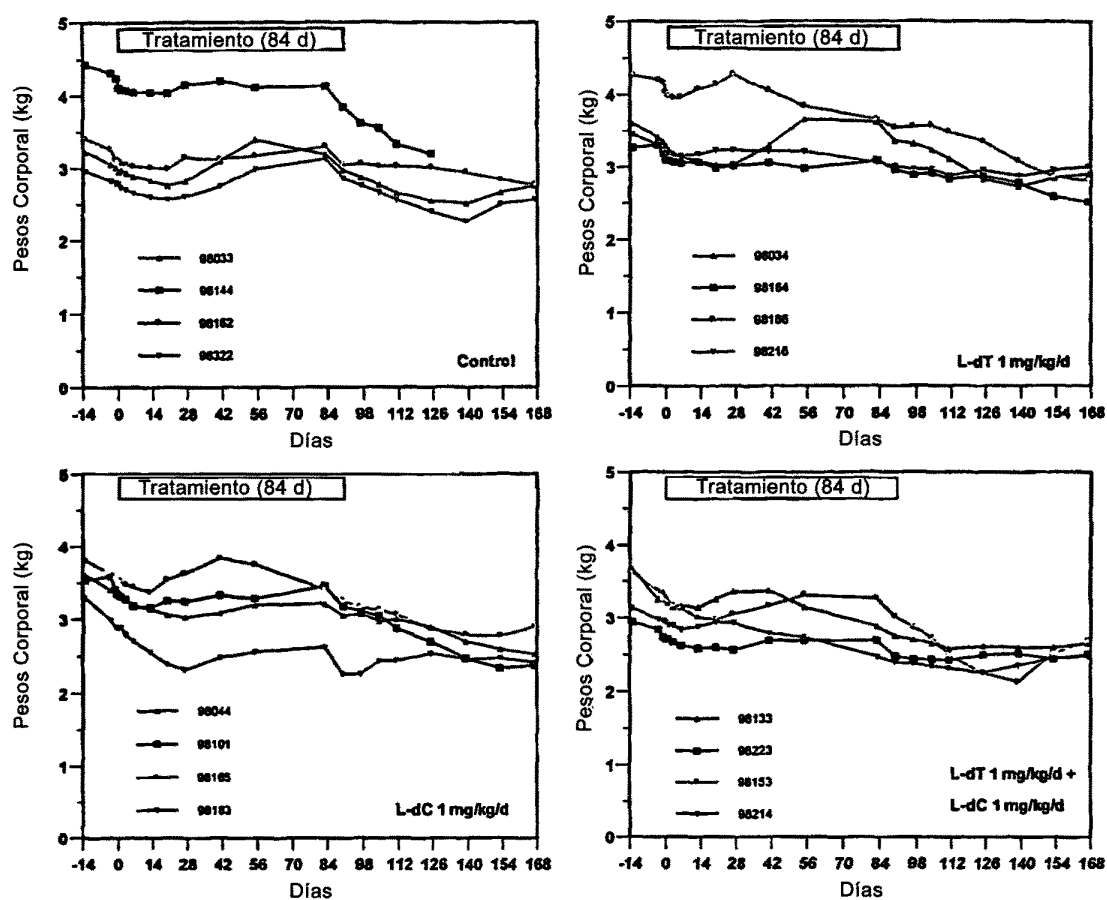


Figura 19: Pesos Corporales de Marmota oralmente tratada con L-dC- 12 semanas