



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 995 458**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 31/7068** (2006.01)  
**C07H 19/067** (2006.01)  
**C07H 19/10** (2006.01)  
**A61P 31/14** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2018** PCT/US2018/064503  
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2019** WO19113462  
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2018** E 18886104 (1)  
⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024** EP 3706762

⑮ Título: **Derivado de N4-hidroxicitidina y usos antivíricos relacionados con el mismo**

⑯ Prioridad:

**07.12.2017 US 201762595907 P**  
**06.02.2018 US 201862626998 P**  
**13.11.2018 US 201862760434 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.02.2025**

⑯ Titular/es:

**EMORY UNIVERSITY (100.00%)**  
**1599 Clifton Road 4th Floor**  
**Atlanta, Georgia 30322, US**

⑯ Inventor/es:

**PAINTER, GEORGE, R.;**  
**BLUEMLING, GREGORY, R.;**  
**NATCHUS, MICHAEL, G. y**  
**GUTHRIE, DAVID**

⑯ Agente/Representante:

**MORENO NOGALES, Ángeles**

**ES 2 995 458 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

Derivado de N4-hidroxicitidina y usos antivíricos relacionados con el mismo

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a un derivado de nucleósido N4-hidroxicitidina, de acuerdo con las reivindicaciones, así como a composiciones que comprenden dicho derivado de nucleósido N4-hidroxicitidina, y a su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones víricas, en particular, infecciones por el virus de encefalitis equina del Este, del Oeste y venezolana (EEE, EEO y EEV, respectivamente), fiebre chicungunya (CHIK), ébola, gripe, VRS y Zika.

10 **Antecedentes**

15 Los agentes causales de la encefalitis equina del Este, del Oeste y venezolana (EEE, EEO y EEV, respectivamente) y la fiebre chicungunya (CHIK) son virus transmitidos por vectores (familia *Togaviridae*, género *Alphavirus*) que se pueden transmitir a los seres humanos a través de picaduras de mosquitos. Los virus de la encefalitis equina son patógenos de categoría B de los CDC y el virus de CHIK es de categoría C. Existe una preocupación considerable por el uso de cepas virulentas del virus de la EEV, suministradas por medio de aerosol, como arma biológica contra los combatientes. Los estudios en animales han demostrado que la infección por el virus de la EEV por exposición a aerosoles da lugar rápidamente a una infección masiva del cerebro, con una alta mortalidad y morbilidad. Véase Roy *et al.*, *Pathogenesis of aerosolized Eastern equine encephalitis virus infection in guinea pigs*. *Virol J*, 2009, 6:170.

20

25 Stuyver *et al.* informan de que se encontró que la  $\beta$ -D-N(4)-hidroxicitidina (NHC) tiene actividades antipestivirus y antihepacivirus. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(1):244-54. Constantini *et al.* informan de evaluaciones sobre la eficacia de 2'-C-MeC, 2'-F-2'-C-MeC y NHC sobre el virus de Norwalk. Véase también Purohit *et al.*, *J Med Chem*, 2012, 55(22):9988-9997; Ivanov *et al.*, *Collection of Czechoslovak Chem Commun*, 2006, 71(7):1099-1106; y Fox *et al.*, *JACS*, 1959, 81:178-87. El documento WO2016/106050 A1 describe N4-hidroxicitidina y derivados y usos antivíricos relacionados con los mismos.

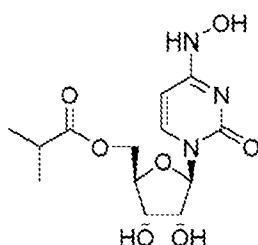
30

Lo que se necesitan son nuevos compuestos y tratamientos para las infecciones víricas. Los compuestos y procedimientos divulgados en el presente documento abordaron estas necesidades.

35 **Sumario**

La presente divulgación se refiere a un derivado de N4-hidroxicitidina, combinaciones, composiciones farmacéuticas y los compuestos y composiciones para su uso en el tratamiento de infecciones víricas, de acuerdo con las reivindicaciones. La divulgación se refiere a un compuesto representado por la fórmula

40



o una sal interna o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 En determinados modos de realización, la divulgación contempla composiciones farmacéuticas que comprenden un excipiente farmacéuticamente aceptable y un compuesto divulgado en el presente documento. En determinados modos de realización, la composición farmacéutica está en forma de comprimido, cápsula, pastilla o tampón acuoso, tal como una solución salina o tampón fosfato.

50 En determinados modos de realización, las composiciones farmacéuticas divulgadas pueden comprender un compuesto divulgado en el presente documento y un propelador. En determinados modos de realización, el propelador es un propelador que forma aerosol, tal como aire comprimido, etanol, nitrógeno, dióxido de carbono, óxido nitroso, hidrofluoroalcanos (HFA), 1,1,1,2-tetrafluoroetano, 1,1,1,2,3,3-heptafluoropropano o combinaciones de los mismos.

55 En determinados modos de realización, la divulgación contempla un recipiente presurizado o no presurizado que comprende un compuesto o composición farmacéutica como se describe en el presente documento. En

determinados modos de realización, el recipiente es un pulverizador de bomba manual, inhalador, inhalador dosificado por medidor, inhalador de polvo seco, nebulizador, nebulizador de malla vibratoria, nebulizador de chorro o nebulizador de ondas ultrasónicas.

5 La divulgación también se refiere a compuestos o sales como se define en el presente documento, o a las composiciones farmacéuticas como se define en el presente documento, para su uso en el tratamiento o prevención de una infección vírica. El uso puede comprender administrar una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica divulgados en el presente documento a un sujeto que lo necesite.

10 En determinados modos de realización, la infección vírica es una infección por el virus de Zika. En otros modos de realización, la infección vírica es encefalitis equina del Este, del Oeste y venezolana (EEE, EEO y EEV, respectivamente), fiebre chicungunya (CHIK), ébola, gripe o VRS.

15 En determinados modos de realización, el compuesto o la composición farmacéutica se administra por vía oral, intravenosa o a través de los pulmones, es decir, administración pulmonar.

20 Se expondrán en parte ventajas adicionales en la descripción que sigue, y en parte serán evidentes a partir de la descripción, o se pueden aprender por la práctica de los aspectos descritos a continuación. Las ventajas descritas a continuación se realizarán y conseguirán por medio de los elementos y combinaciones en particular señalados en las reivindicaciones adjuntas.

#### **Breve descripción de las figuras**

25 Las figuras adjuntas, que se incorporan en y forman parte de esta memoria descriptiva, ilustran varios aspectos descritos a continuación.

30 La figura 1 es un esquema que ilustra la preparación de  $\beta$ -D-N-hidroxicitidina. Las etapas de la síntesis son a.) TBSCI, DMAP, DIPEA, DCM; b.) (2,4,6-iPr) $\text{PhSO}_2\text{Cl}$ , DIPEA, DMAP, DCM; c.)  $\text{NH}_2\text{OH-HCl}$ , DIPEA, DCM; d.) fuente de F-; y e.)  $\text{NH}_2\text{OH}$  acuoso, AcOH, 50 °C.

35 La figura 2 ilustra determinados compuestos ejemplares.

40 La figura 3 ilustra determinados compuestos ejemplares.

45 La figura 4 muestra concentraciones plasmáticas medias y parámetros farmacocinéticos de ratones tratados con un compuesto ejemplar.

50 La figura 5 muestra la acumulación de nucleósidos en órganos de ratón en ratones tratados con un compuesto ejemplar.

55 La figura 6 muestra la acumulación de trifosfato en órganos de ratón en ratones tratados con un compuesto ejemplar.

60 La figura 7 muestra la reducción de la inflamación de las almohadillas plantares en ratones expuestos al VCHIK tratados con un compuesto ejemplar.

65 La figura 8 muestra la reducción de copias de ARN del VCHIK por PCR en ratones expuestos al VCHIK tratados con un compuesto ejemplar.

70 La figura 9 muestra la supervivencia de ratones expuestos al VZIK tratados con un compuesto ejemplar durante 7 días.

75 La figura 10 muestra la supervivencia de ratones expuestos al VZIK tratados con un compuesto ejemplar durante 7 días, con tiempos de inicio de tratamiento variables después de la infección.

80 La figura 11 muestra las concentraciones tisulares de nucleósido N4-hidroxicitidina de un macaco cangrejero al que se le administró por vía oral EIDD-1931 (100 mg/kg).

85 La figura 12 muestra las concentraciones tisulares de nucleósido N4-hidroxicitidina de un macaco cangrejero al que se le administró por vía intravenosa EIDD-1931 (10 mg/kg).

90 La figura 13 muestra la estructura de los compuestos administrados por vía oral a macacos cangrejeros.

95 La figura 14 muestra concentraciones plasmáticas medias de nucleósido N4-hidroxicitidina de macacos cangrejeros a los que se les administró por vía oral un derivado de éster.

La figura 15 muestra la concentración máxima media de nucleósido N4-hidroxicitidina en plasma de macacos cangrejeros a los que se les administró por vía oral un derivado de éster.

5 La figura 16 muestra el valor de virus del lavado nasal y la fiebre en hurones infectados con gripe A/California/07/2009 (H1N1) tratados por vía oral con EIDD-2801 d.v.d. o vehículo.

La figura 17 muestra el valor de virus del lavado nasal, la fiebre y el valor de virus en los cornetes nasales en hurones infectados con gripe A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) tratados por vía oral con EIDD-2801 d.v.d. o vehículo.

10 La figura 18 muestra el efecto del tratamiento con EIDD-2801 sobre la supervivencia de ratones infectados por el VEEV por vía intranasal.

La figura 19 muestra el efecto del tiempo de inicio de tratamiento con EIDD-2801 sobre la supervivencia de ratones infectados con VEEV por vía intranasal.

15 La figura 20 muestra el efecto del tratamiento profiláctico con EIDD-2801 sobre los valores víricos pulmonares de ratones infectados con SARS.

20 La figura 21 muestra el efecto del tiempo de tratamiento con EIDD-2801 en las puntuaciones de hemorragia pulmonar de ratones infectados con SARS.

La figura 22 muestra el efecto del tiempo de tratamiento con EIDD-2801 sobre los valores víricos pulmonares de ratones infectados con SARS.

25 La figura 23 muestra el efecto del tratamiento con EIDD-2801 sobre las puntuaciones de hemorragia pulmonar de ratones infectados con MERS.

#### **Descripción detallada**

30 Como será evidente para los expertos en la técnica tras la lectura la presente divulgación, cada uno de los modos de realización individuales descritos e ilustrados en el presente documento tiene componentes y rasgos característicos discretos, que se pueden separar de o combinar fácilmente con los rasgos característicos de cualquiera de los otros varios modos de realización. Cualquier procedimiento mencionado se puede llevar a cabo en el orden de los acontecimientos mencionados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

35 Los modos de realización de la presente divulgación emplearán, a menos que se indique de otro modo, técnicas de medicina, química orgánica, bioquímica, biología molecular y farmacología, que están dentro del conocimiento de la técnica. Dichas técnicas se exponen completamente en la literatura.

40 En determinados modos de realización, un agente farmacéutico, que puede estar en forma de sal, se administra en procedimientos divulgados en el presente documento que se especifica por un peso (las referencias a procedimientos de prevención o tratamiento se han de considerar en el presente documento como los compuestos o composiciones como se define en el presente documento para su uso en estos procedimientos). Este se refiere al peso del compuesto mencionado. Si está en forma de sal, entonces el peso es el equivalente molar de la sal correspondiente.

45 Se debe tener en cuenta que, como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

50 "Sujeto" se refiere a cualquier animal, preferentemente un paciente humano, ganado o mascota doméstica.

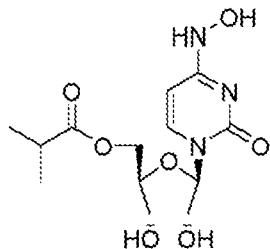
55 Como se usa en el presente documento, los términos "prevenir" y "que previene" incluyen la prevención de la recidiva, propagación o aparición. No se pretende que la presente divulgación se limite a la prevención completa. En algunos modos de realización, se retrasa la aparición o se reduce la gravedad de la enfermedad.

60 Como se usan en el presente documento, los términos "tratar" y "que trata" no se limitan al caso donde se cura al sujeto (por ejemplo, el paciente) y se erradica la enfermedad. Más bien, los modos de realización de la presente divulgación también contemplan un tratamiento que simplemente reduzca los síntomas y/o retrase la progresión de la enfermedad.

65 Como se usa en el presente documento, el término "combinación con", cuando se usa para describir la administración con un tratamiento adicional, quiere decir que el agente se puede administrar antes de, conjuntamente con o después del tratamiento adicional, o una combinación de los mismos.

#### **Compuestos**

La divulgación se refiere a un compuesto representado por la fórmula



5

o una sal interna o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

#### Procedimientos de uso

10 Las referencias a procedimientos de tratamiento o prevención se han de considerar en el presente documento como los compuestos o composiciones como se define en el presente documento para su uso en estos procedimientos.

15 En determinados modos de realización, la divulgación se refiere a los compuestos o la composición farmacéutica como se define en el presente documento para su uso en el tratamiento de una infección vírica. El uso típicamente comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica divulgados en el presente documento a un sujeto que lo necesita. En determinados modos de realización ejemplares, se proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de una infección por el virus de Zika, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica divulgada en el presente documento a un sujeto que lo necesita.

20 En determinados modos de realización, la infección vírica es, o está causada por, un alfavírus, flavivírus o coronavirus ortomixovírus o paramixovírus, o VRS, gripe, virus de Powassan o filovírus o ébola.

25 En determinados modos de realización, la infección vírica es, o está causada por, un virus seleccionado de coronavirus del MERS, virus de la encefalitis equina del Este, virus de la encefalitis equina del Oeste, virus de encefalitis equina venezolana, virus del río Ross, virus del bosque Barmah, virus de Powassan, virus de Zika y virus de chicungunya. En determinados modos de realización ejemplares, la infección vírica es, o está causada por, un virus de Zika.

30 En determinados modos de realización, el compuesto se administra por inhalación a través de los pulmones.

35 En algunos modos de realización, el sujeto está en riesgo de, presenta síntomas de, o se le diagnostica virus de la gripe A, incluyendo los subtipos H1N1, H3N2, H7N9 o H5N1, virus de la gripe B, virus de la gripe C, rotavirus A, rotavirus B, rotavirus C, rotavirus D, rotavirus E, coronavirus humano, coronavirus del SARS, coronavirus del MERS, tipos de adenovirus humanos (HAdV-1 a 55), papilomavirus humano (PVH) de tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, parvovirus B19, virus del molusco contagioso, virus JC (VJC), virus BK, poliomavirus de células de Merkel, virus de Coxsackie A, norovirus, virus de la rubéola, virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML), virus del dengue, virus de Zika, chicungunya, virus de la encefalitis equina del Este (VEEE), virus de la encefalitis equina del oeste (VEEO), virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), virus del río Ross, virus del bosque de Barmah, virus de la fiebre amarilla, virus del sarampión, virus de la parotiditis, virus respiratorio sincicial, virus de la peste bovina, virus de la encefalitis de California, hantavirus, rabdovirus, virus del Ébola, virus de Marburgo, virus del herpes simple-1 (VHS-1), virus del herpes simple-2 (VHS-2), virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), virus linfótropo del herpes, roseolovirus o herpesvirus 40 asociado al sarcoma de Kaposi, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E o virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus linfótropo T humano de tipo I (VLTH-1), virus formador de focos esplénicos de Friend (SFFV) o virus xenotípico relacionado con MuLV (XMRV). En algunos modos de realización, el sujeto está en riesgo de, presenta síntomas de o se le diagnostica una infección por el virus de Zika.

50 En determinados modos de realización, al sujeto se le diagnostica virus de la gripe A, incluyendo los subtipos H1N1, H3N2, H7N9, H5N1 (vía baja) y H5N1 (vía alta), virus de la gripe B, virus de la gripe C, rotavirus A, rotavirus B, rotavirus C, rotavirus D, rotavirus E, coronavirus del SARS, MERS-CoV, tipos de adenovirus humanos (HAdV-1 a 55), papilomavirus humano (PVH) de tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, parvovirus B19, virus del molusco contagioso, virus JC (VJC), virus BK, poliomavirus de células de Merkel, virus de Coxsackie A, norovirus, virus de la rubéola, virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML), virus de la fiebre amarilla, virus del sarampión, virus de la parotiditis, virus respiratorio sincicial, virus paragripal 1 y 3, virus de la peste bovina, chicungunya, virus de la encefalitis equina del Este (VEEE), virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), virus de la encefalitis

equina del Oeste (VEEO), virus de la encefalitis de California, virus de la encefalitis japonesa, virus de la fiebre del Valle del Rift (VFVR), hantavirus, virus del dengue, serotipos 1, 2, 3 y 4, virus de Zika, virus del Nilo Occidental, virus Tacaribe, Junín, rabdovirus, virus del Ébola, virus de Marburgo, adenovirus, virus del herpes simple-1 (VHS-1), virus del herpes simple-2 (VHS-2), virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr (VEB), 5 citomegalovirus (CMV), virus linfótropo del herpes, roseolovirus o herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E o virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En determinados modos de realización, al sujeto se le diagnostica una infección por el virus de Zika.

10 En determinados modos de realización, al sujeto se le diagnostica gastroenteritis, enfermedad respiratoria aguda, síndrome respiratorio agudo grave, síndrome de fatiga posvírica, fiebres hemorrágicas víricas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida o hepatitis.

### Formulaciones

15 En modos de realización ejemplares, una composición farmacéutica comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto ejemplar descrito en el presente documento.

20 En determinados modos de realización ejemplares, la composición farmacéutica comprende, o está en forma de, una sal farmacéuticamente aceptable, como se describe en general a continuación. Algunos ejemplos preferentes, pero no limitantes, de ácidos orgánicos y/o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados son ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido acético y ácido cítrico, así como otros ácidos 25 farmacéuticamente aceptables conocidos *per se* (para los que se hace referencia a las referencias referidas a continuación).

25 Cuando los compuestos ejemplares contienen un grupo ácido así como un grupo básico, los compuestos pueden formar sales internas, que también se pueden usar en las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento. Cuando un compuesto ejemplar contiene un heteroátomo donante de hidrógeno (por ejemplo, NH), se contempla que las sales cubran los isómeros formados por transferencia de dicho átomo de hidrógeno a un grupo 30 o átomo básico dentro de la molécula.

35 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos ejemplares incluyen las sales de adición de ácido y básicas de los mismos. Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas. Los ejemplos incluyen las sales de acetato, adipato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, borato, camsilato, citrato, ciclamato, edisilato, esilato, formiato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hexafluorofosfato, hibenzato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato/bromuro, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, malato, maleato, malonato, mesilato, metilsulfato, naftilato, 2-napsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrogenofosfato/dihidrogenofosfato, piroglutamato, sacarato, estearato, succinato, 40 tanato, tartrato, tosilato, trifluoroacetato y xinofoato. Las sales básicas adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Los ejemplos incluyen las sales de aluminio, arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnesio, meglumina, olamina, potasio, sodio, trometamina y cinc. También 45 se pueden formar hemisales de ácidos y bases, por ejemplo, sales hemisulfato y de hemicalcio. Para una revisión sobre las sales adecuadas, véase *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use* de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, 2002).

45 Las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos ejemplares son aquellas que se forman internamente en un compuesto administrado al sujeto para el tratamiento o prevención de una enfermedad. Las sales adecuadas incluyen las de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, manganeso y sales biliares.

50 En modos de realización ejemplares, la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de un compuesto ejemplar y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En general, para uso farmacéutico, se pueden formular los compuestos como una preparación farmacéutica que comprende al menos un compuesto y al menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Se pueden preparar las preparaciones de una manera 55 conocida *per se*, que normalmente implica mezclar el al menos un compuesto de acuerdo con la divulgación con el uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, si se desea, en combinación con otros compuestos activos farmacéuticos, cuando sea necesario en condiciones asépticas. De nuevo, se hace referencia a la pat. de EE. UU. n.º 6.372.778, la pat. de EE. UU. n.º 6.369.086, la pat. de EE. UU. n.º 6.369.087 y la pat. de EE. UU. n.º 6.372.733 y las referencias adicionales mencionadas anteriormente, así como a los manuales estándar, tales como la última 60 edición de *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Las composiciones farmacéuticas divulgadas pueden estar en una forma de dosificación unitaria y se pueden envasar adecuadamente, por ejemplo, en una caja, envase alveolado, vial, frasco, sobre, ampolla o en cualquier otro envase o recipiente monodosis o multidosis adecuado (que se puede etiquetar apropiadamente); opcionalmente con uno o más prospectos que contienen información de producto y/o instrucciones para su uso. En general, dichas dosificaciones unitarias contendrán de entre 1 y 1000 mg, y normalmente de entre 5 y 500 mg, del al menos un compuesto de la divulgación, por ejemplo, 65 aproximadamente 10, 25, 50, 100, 200, 300 o 400 mg por dosificación unitaria.

Se pueden administrar los compuestos por una variedad de vías, incluyendo las vías oral, ocular, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intranasal, dependiendo principalmente de la preparación específica usada. En general, se administrará el compuesto en una "cantidad eficaz", lo que quiere decir cualquier cantidad de un compuesto que, tras una administración adecuada, sea suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado en el sujeto al que se le administra. Normalmente, dependiendo de la afección que se va a prevenir o tratar y de la vía de administración, una cantidad eficaz de este tipo será normalmente de 0,01 a 1000 mg por kilogramo de peso corporal del paciente por día, más a menudo de entre 0,1 y 500 mg, tal como de entre 1 y 250 mg, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 o 250 mg, por kilogramo de peso corporal del paciente por día, que se pueden administrar como una dosis diaria única, dividida en una o más dosis diarias. La(s) cantidad(es) que se va(n) a administrar, la vía de administración y la pauta de tratamiento adicional se pueden determinar por el médico tratante, dependiendo de factores tales como la edad, el sexo y el estado general del paciente y la naturaleza y gravedad de la enfermedad/los síntomas que se va(n) a tratar. De nuevo, se hace referencia a la pat. de EE. UU. n.º 6.372.778, la pat. de EE. UU. n.º 6.369.086, la pat. de EE. UU. n.º 6.369.087 y la pat. de EE. UU. n.º 6.372.733 y las referencias adicionales mencionadas anteriormente, así como a los manuales estándar, tales como la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences.

Dependiendo del modo de introducción, los compuestos descritos en el presente documento se pueden formular de una variedad de maneras. Se pueden preparar formulaciones que contienen uno o más compuestos en diversas formas farmacéuticas, tales como gránulos, comprimidos, cápsulas, supositorios, polvos, formulaciones de liberación controlada, suspensiones, emulsiones, cremas, geles, pomadas, bálsamos, lociones o aerosoles. En determinados modos de realización, las formulaciones se emplean en formas farmacéuticas sólidas adecuadas para la administración simple, y preferentemente oral, de dosificaciones precisas. Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas blandas o duras de gelatina o sin gelatina y comprimidos oblongos. Sin embargo, también se pueden utilizar formas farmacéuticas líquidas, tales como soluciones, jarabes, suspensión, batidos, etc. En otro modo de realización, la formulación se administra por vía tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, lociones, pomadas, cremas y geles. En un modo de realización preferente, la formulación tópica es un gel. En otro modo de realización, la formulación se administra por vía intranasal.

Se pueden preparar formulaciones que contienen uno o más de los compuestos descritos en el presente documento usando un vehículo farmacéuticamente aceptable compuesto por materiales que se consideran seguros y eficaces y se pueden administrar a un individuo sin provocar efectos secundarios biológicos indeseables o interacciones no deseadas. El vehículo son todos los componentes presentes en la formulación farmacéutica distintos del ingrediente o ingredientes activos. Como se usa en general en el presente documento, "vehículo" incluye, pero no se limita a, diluyentes, aglutinantes, lubricantes, dispersantes, cargas, agentes modificadores del pH, conservantes, antioxidantes, potenciadores de la solubilidad y composiciones de recubrimiento.

El vehículo también incluye todos los componentes de la composición de recubrimiento que pueden incluir plastificantes, pigmentos, colorantes, agentes estabilizantes y fluidificantes. Se pueden preparar formulaciones de dosificación de liberación retardada, liberación prolongada y/o liberación pulsátil como se describe en referencias estándar, tales como "Pharmaceutical dosage form tablets", eds. Liberman *et al.* (Nueva York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington - The science and practice of pharmacy", 20.<sup>a</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, y "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6.<sup>a</sup> edición, Ansel *et al.*, (Media, PA: Williams y Wilkins, 1995). Estas referencias proporcionan información sobre vehículos, materiales, equipos y procedimientos para preparar comprimidos y cápsulas y formas farmacéuticas de liberación retardada de comprimidos, cápsulas y gránulos.

Los ejemplos de materiales de recubrimiento adecuados incluyen, pero no se limitan a, polímeros de celulosa, tales como ftalato-acetato de celulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetylcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetylcelulosa y acetato-succinato de hidroxipropilmetylcelulosa; poli(ftalato-acetato de vinilo), polímeros y copolímeros de ácido acrílico y resinas metacrílicas que están disponibles comercialmente bajo el nombre comercial EUDRAGIT™ (Roth Pharma, Westerstadt, Alemania), zeína, goma laca y polisacáridos.

Adicionalmente, el material de recubrimiento puede contener vehículos convencionales, tales como plastificantes, pigmentos, colorantes, fluidificantes, agentes de estabilización, formadores de poros y tensioactivos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales presentes en los comprimidos, microesferas, gránulos o partículas que contienen el fármaco incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, aglutinantes, lubricantes, dispersantes, colorantes, estabilizantes y tensioactivos. Los diluyentes, también denominados "cargas", son típicamente necesarios para incrementar el volumen de una forma farmacéutica sólida de modo que se proporcione un tamaño práctico para la compresión de comprimidos o la formación de microesferas y gránulos. Los diluyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfato dicálcico dihidrato, sulfato cálcico, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, cloruro sódico, almidón seco, almidones hidrolizados, almidón pregelatinizado, dióxido de silicona, óxido de titanio, silicato de aluminio y magnesio y azúcar en polvo.

- Se usan aglutinantes para impartir cualidades cohesivas a una formulación de dosificación sólida y asegurar, por tanto, que un comprimido o microesfera o gránulo permanezca intacto después de la formación de las formas farmacéuticas. Los materiales aglutinantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, almidón, almidón pregelatinizado, gelatina, azúcares (incluyendo sacarosa, glucosa, dextrosa, lactosa y sorbitol), polietilenglicol, ceras, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, tragacanto, alginato sódico, celulosa, incluyendo hidroxipropilmetylcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa y Veegum, y polímeros sintéticos, tales como copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, copolímeros de metacrilato de aminoalquilo, ácido poliacrílico/ácido polimetacrílico y polivinilpirrolidona.
- 5 Se usan lubricantes para facilitar la fabricación de comprimidos. Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, behenato de glicerol, polietilenglicol, talco y aceite de vaselina.
- 10 Los desintegrantes se usan para facilitar la desintegración o "ruptura" de la forma farmacéutica después de la administración, y en general incluyen, pero no se limitan a, almidón, glicolato de almidón sódico, carboximetilalmidón sódico, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, almidón pregelatinizado, arcillas, celulosa, alginina, gomas o polímeros reticulados, tales como PVP reticulado (Polyplasdone XL de GAF Chemical Corp).
- 15 20 Se usan estabilizantes para inhibir o retardar reacciones de descomposición de fármacos que incluyen, a modo de ejemplo, reacciones oxidativas.
- 25 Los tensioactivos pueden ser agentes tensioactivos aniónicos, catiónicos, anfóteros o no iónicos. Los tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos que contienen iones carboxilato, sulfonato y sulfato.
- 30 35 Los ejemplos de tensioactivos aniónicos incluyen sodio, potasio, amonio o alquilsulfonatos y alquilarilsulfonatos de cadena larga, tales como dodecilbencenosulfonato sódico; dialquilsulfosuccinatos sódico, tales como dodecilbencenosulfonato sódico; dialquilsulfosuccinatos sódico, tales como bis-(2-étiltioxil)-sulfosuccinato sódico; y alquilsulfatos, tales como laurilsulfato sódico. Los tensioactivos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, compuestos de amonio cuaternario, tales como cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, bromuro de cetrimonio, cloruro de estearildimetilbencilamonio, polioxietileno y amina de coco. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen monoestearato de etilenglicol, miristato de propilenglicol, monoestearato de glicerilo, estearato de glicerilo, 4-oleato de poliglicerilo, acilato de sorbitán, acilato de sacarosa, laurato de PEG-150, monolaurato de PEG-400, monolaurato de polioxietileno, polisorbatos, éter octilfenílico de polioxietileno, éter cetílico de PEG-1000, éter tridecílico de polioxietileno, éter butílico de polipropilenglicol, POLOXAMER™ 401, monoisopropanolamida de estearoilo y amida de sebo hidrogenada de polioxietileno. Los ejemplos de tensioactivos anfóteros incluyen N-dodecil-β-alanina sódica, N-lauril-β-iminodipropionato sódico, miristoanfoacetato, laurilbetaína y laurilsulfobetaína.
- 40 45 Si se desea, los comprimidos, microesferas, gránulos o partículas también pueden contener una cantidad menor de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tintes, agente de tamponación del pH o conservantes.
- 50 Las concentraciones del compuesto ejemplar con respecto al vehículo, excipiente y/u otras sustancias farmacéuticamente aceptables puede variar de aproximadamente un 0,5 a aproximadamente un 100 % en peso (porcentaje en peso). Para uso oral, la composición farmacéutica puede contener en general de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 100 % en peso del material activo. Para otros usos, la composición farmacéutica puede tener en general de aproximadamente un 0,5 a aproximadamente un 50 % en peso del material activo.
- 55 60 65 Las composiciones descritas en el presente documento se pueden formular para liberación modificada o controlada. Los ejemplos de formas farmacéuticas de liberación controlada incluyen formas farmacéuticas de liberación prolongada, formas farmacéuticas de liberación retardada, formas farmacéuticas de liberación pulsátil y combinaciones de las mismas.
- Las formulaciones de liberación prolongada se preparan en general como sistemas de difusión u osmóticos, por ejemplo, como se describe en "Remington - The science and practice of pharmacy" (20.<sup>a</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000). Un sistema de difusión típicamente consiste en dos tipos de dispositivos, un depósito y una matriz, y es bien conocido y se describe en la técnica. Los dispositivos de matriz se preparan en general comprimiendo el fármaco con un vehículo de polímero de disolución lenta en forma de comprimido. Los tres tipos principales de materiales usados en la preparación de dispositivos de matriz son plásticos insolubles, polímeros hidrófilos y compuestos grasos. Las matrices plásticas incluyen, pero no se limitan a, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, poli(cloruro de vinilo) y polietileno. Los polímeros hidrófilos incluyen, pero no se limitan a, polímeros celulósicos, tales como metil y etilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetylcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y CARBOPOL™ 934, óxidos de polietileno y mezclas de los mismos. Los compuestos grasos incluyen, pero no se limitan a, diversas ceras, tales como cera de carnauba y triestearato de glicerilo y sustancias de tipo cera que incluyen aceite de ricino hidrogenado o grasa vegetal hidrogenada, o mezclas de los mismos.

- En determinados modos de realización preferentes, el material plástico es un polímero acrílico farmacéuticamente aceptable, que incluye, pero sin limitarse a, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, metacrilato de metilo, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de alquilamina y ácido metacrílico, poli(metacrilato de metilo), poli(ácido metacrílico) (anhídrido), polimetacrilato, poliacrilamida, polí(anhídrido de ácido metacrílico) y copolímeros de metacrilato de glicidilo.
- En determinados modos de realización preferentes, el polímero acrílico está compuesto por uno o más copolímeros de metacrilato de amonio. Los copolímeros de metacrilato de amonio son bien conocidos en la técnica y se describen en NF XVII como copolímeros completamente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos amonio cuaternario.
- En un modo de realización preferente, el polímero acrílico es una laca de resina acrílica, tal como la que está disponible comercialmente en Rohm Pharma bajo el nombre comercial EUDRAGIT. En otros modos de realización preferentes, el polímero acrílico comprende una mezcla de dos lacas de resina acrílica disponibles comercialmente en Rohm Pharma bajo los nombres comerciales EUDRAGIT RL30D y EUDRAGIT RS30D, respectivamente. EUDRAGIT RL30D y EUDRAGIT RS30D son copolímeros de ésteres acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos amonio cuaternario, siendo la proporción molar de los grupos amonio con respecto a los ésteres (met)acrílicos neutros restantes de 1:20 en EUDRAGIT RL30D y de 1:40 en EUDRAGIT RS30D. El peso molecular medio es de aproximadamente 150.000. También son preferentes EUDRAGIT S-100 y EUDRAGIT L-100. Las designaciones de código RL (alta permeabilidad) y RS (baja permeabilidad) se refieren a las propiedades de permeabilidad de estos agentes. Las mezclas de EUDRAGIT RL/RS son insolubles en agua y en los líquidos digestivos. Sin embargo, los sistemas multiparticulados formados para incluir los mismos son hinchables y permeables en soluciones acuosas y líquidos digestivos.
- Los polímeros descritos anteriormente, tales como EUDRAGIT RL/RS, se pueden mezclar entre sí en cualquier proporción deseada para obtener finalmente una formulación de liberación mantenida que tenga un perfil de disolución deseable. Se pueden obtener sistemas multiparticulados de liberación mantenida deseables, por ejemplo, a partir de EUDRAGIT RL al 100 %, EUDRAGIT RL al 50 % y EUDRAGIT RS al 50 %, y EUDRAGIT RL al 10 % y EUDRAGIT RS al 90 %. Un experto en la técnica reconocerá que también se pueden usar otros polímeros acrílicos, tales como, por ejemplo, EUDRAGIT L.
- De forma alternativa, se pueden preparar formulaciones de liberación prolongada usando sistemas osmóticos o aplicando un recubrimiento semipermeable a la forma farmacéutica. En el último caso, se puede lograr el perfil de liberación de fármaco deseado combinando materiales de recubrimiento de baja permeabilidad y alta permeabilidad en una proporción adecuada.
- Se pueden combinar los dispositivos con diferentes mecanismos de liberación de fármaco descritos anteriormente en una forma farmacéutica final que comprende unidades únicas o múltiples. Los ejemplos de unidades múltiples incluyen, pero no se limitan a, comprimidos multicapa y cápsulas que contienen comprimidos, microesferas o gránulos. Se puede añadir una porción de liberación inmediata al sistema de liberación prolongada por medio de la aplicación de una capa de liberación inmediata sobre el núcleo de liberación prolongada usando un procedimiento de recubrimiento o compresión o bien en un sistema de unidades múltiples, tal como una cápsula que contiene microesferas de liberación prolongada e inmediata.
- Los comprimidos de liberación prolongada que contienen polímeros hidrófilos se preparan por técnicas comúnmente conocidas en la técnica, tales como compresión directa, granulación húmeda o granulación en seco. Sus formulaciones normalmente incorporan polímeros, diluyentes, aglutinantes y lubricantes, así como el ingrediente farmacéutico activo. Los diluyentes normales incluyen sustancias en polvo inertes, tales como almidones, celulosa en polvo, especialmente celulosa cristalina y microcristalina, glúcidios, tales como fructosa, manitol y sacarosa, harinas de cereales y polvos comestibles similares. Los diluyentes típicos incluyen, por ejemplo, diversos tipos de almidón, lactosa, manitol, caolín, fosfato o sulfato cálcico, sales inorgánicas, tales como cloruro sódico y azúcar en polvo. También son útiles los derivados de celulosa en polvo. Los aglutinantes de comprimidos típicos incluyen sustancias tales como almidón, gelatina y glúcidios, tales como lactosa, fructosa y glucosa. También se pueden usar gomas naturales y sintéticas, que incluyen goma arábiga, alginatos, metilcelulosa y polivinilpirrolidona. También pueden servir como aglutinantes el polietilenglicol, polímeros hidrófilos, etilcelulosa y ceras. En una formulación de comprimido es necesario un lubricante para evitar que el comprimido y los punzones se peguen al troquel. Se elige el lubricante de sólidos resbaladizos, tales como talco, estearato de magnesio y calcio, ácido esteárico y grasas vegetales hidrogenadas.
- Los comprimidos de liberación prolongada que contienen materiales de cera se preparan en general usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como un procedimiento de combinación directa, un procedimiento de solidificación y un procedimiento de dispersión acuosa. En el procedimiento de solidificación, se mezcla el fármaco con un material de cera y se solidifica por pulverización o bien se solidifica y se criba o procesa.

Las formulaciones de liberación retardada se crean recubriendo una forma farmacéutica sólida con una película de polímero, que es insoluble en el entorno ácido del estómago y soluble en el entorno neutro del intestino delgado.

- 5 Se pueden preparar las unidades de dosificación de liberación retardada, por ejemplo, recubriendo un fármaco o una composición que contiene fármaco con un material de recubrimiento seleccionado. La composición que contiene fármaco puede ser, por ejemplo, un comprimido para incorporar en una cápsula, un comprimido para su uso como núcleo interno en una forma farmacéutica de "núcleo recubierto" o una pluralidad de microesferas, partículas o gránulos que contienen fármaco, para su incorporación en un comprimido o bien una cápsula. Los materiales de recubrimiento preferentes incluyen polímeros bioerosionables, gradualmente hidrolizables, gradualmente hidrosolubles y/o enzimáticamente degradables, y pueden ser polímeros "entéricos" convencionales. Los polímeros entéricos, como se apreciará por los expertos en la técnica, se vuelven solubles en el entorno de mayor pH del tubo gastrointestinal inferior o se erosionan lentamente a medida que la forma farmacéutica pasa a través del tubo gastrointestinal, mientras que los polímeros enzimáticamente degradables se degradan por las enzimas bacterianas presentes en el tubo gastrointestinal inferior, en particular en el colon. Los materiales de recubrimiento adecuados para efectuar una liberación retardada incluyen, pero no se limitan a, polímeros celulósicos, tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmelcelulosa, ftalato de hidroxipropilmelcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, acetato de celulosa, ftalato-acetato de celulosa, trimelitato-acetato de celulosa y carboximetilcelulosa sódica; polímeros y copolímeros de ácido acrílico, preferentemente formados a partir de ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilato de metilo, acrilato de etilo, metacrilato de metilo y/o metacrilato de etilo y otras resinas metacrílicas que están disponibles comercialmente bajo el nombre comercial EUDRAGIT™ (Rohm Pharma; Westerstadt, Alemania), incluyendo EUDRAGIT™ L30D-55 y L100-55 (soluble a pH 5,5 y superior), EUDRAGIT™ L-100 (soluble a pH 6,0 y superior), EUDRAGIT™ S (soluble a pH 7,0 y superior, como resultado de un mayor grado de esterificación) y EUDRAGIT™ NE, RL y RS (polímeros insolubles en agua que tienen diferentes grados de permeabilidad y capacidad de expansión); polímeros y copolímeros de vinilo, tales como polivinilpirrolidona, acetato de vinilo, ftalato de vinilacetato, copolímero de vinilacetato-ácido crotónico y copolímero de etileno-vinilacetato; polímeros enzimáticamente degradables, tales como polímeros azo, pectina, quitosano, amilosa y goma guar; zeína y goma laca. También se pueden usar combinaciones de diferentes materiales de recubrimiento. También se pueden aplicar recubrimientos multicapa usando diferentes polímeros.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Se pueden determinar fácilmente los pesos de recubrimiento preferentes para materiales de recubrimiento particulares por los expertos en la técnica evaluando perfiles de liberación individuales para comprimidos, microesferas y gránulos preparados con diferentes cantidades de diversos materiales de recubrimiento. Es la combinación de materiales, procedimiento y forma de aplicación lo que produce las características de liberación deseadas, que solo se pueden determinar a partir de los estudios clínicos.
- La composición del recubrimiento puede incluir aditivos convencionales, tales como plastificantes, pigmentos, colorantes, agentes estabilizantes, fluidificantes, etc. Normalmente está presente un plastificante para reducir la fragilidad del recubrimiento y, en general, representará aproximadamente de un 10 % en peso a un 50 % en peso en relación con el peso seco del polímero. Los ejemplos de plastificantes típicos incluyen polietilenglicol, propilenglicol, triacetina, ftalato de dimetilo, ftalato de dietilo, ftalato de dibutilo, sebacato de dibutilo, citrato de trietilo, citrato de tributilo, citrato de trietilacetilo, aceite de ricino y monoglicéridos acetilados. Se usa preferentemente un agente estabilizante para estabilizar las partículas en la dispersión. Los agentes estabilizantes típicos son emulsionantes no iónicos, tales como ésteres de sorbitano, polisorbatos y polivinilpirrolidona. Se recomiendan fluidificantes para reducir los efectos de adherencia durante la formación y el secado de la película y, en general, representarán aproximadamente de un 25 % en peso a un 100 % en peso del peso de polímero en la solución de recubrimiento. Un fluidificante eficaz es el talco. También se pueden usar otros fluidificantes, tales como estearato de magnesio y monoestearatos de glicerol. También se pueden usar pigmentos, tales como dióxido de titanio. También se pueden añadir a la composición de recubrimiento pequeñas cantidades de un agente antiespumante, tal como una silicona (por ejemplo, simeticona).
- La formulación puede proporcionar un suministro pulsátil del uno o más compuestos. Por "pulsátil" se quiere decir que una pluralidad de dosis de fármaco se liberan a intervalos de tiempo espaciados. En general, tras la ingestión de la forma farmacéutica, la liberación de la dosis inicial es sustancialmente inmediata, es decir, el primer "pulso" de liberación de fármaco se produce en un plazo de aproximadamente una hora después de la ingestión. Este pulso inicial va seguido de un primer intervalo de tiempo (tiempo de retraso) durante el que se libera muy poco o ningún fármaco de la forma farmacéutica, después del que se libera a continuación una segunda dosis. De forma similar, se puede diseñar un segundo intervalo casi libre de liberación de fármaco entre los segundo y tercer pulsos de liberación de fármaco. La duración del intervalo de tiempo casi libre de liberación de fármaco variará dependiendo del diseño de la forma farmacéutica, por ejemplo, un perfil de dosificación dos veces al día, un perfil de dosificación tres veces al día, etc. Para las formas farmacéuticas que proporcionan un perfil de dosificación dos veces al día, el intervalo casi libre de liberación de fármaco tiene una duración de aproximadamente 3 horas a 14 horas entre la primera y la segunda dosis. Para las formas farmacéuticas que proporcionan un perfil de tres veces al día, el intervalo casi libre de liberación de fármaco tiene una duración de aproximadamente 2 horas a 8 horas entre cada una de las tres dosis.

En un modo de realización, el perfil de liberación pulsátil se logra con formas farmacéuticas que son cápsulas cerradas y preferentemente selladas que alojan al menos dos "unidades de dosificación" que contienen fármaco, en las que cada unidad de dosificación dentro de la cápsula proporciona un perfil de liberación de fármaco diferente. El control de la(s) unidad(es) de dosificación de liberación retardada se logra por un recubrimiento de 5 polímero de liberación controlada en la unidad de dosificación, o por la incorporación del agente activo en una matriz de polímero de liberación controlada. Cada unidad de dosificación puede comprender un comprimido compactado o moldeado, en la que cada comprimido dentro de la cápsula proporciona un perfil de liberación de fármaco diferente. Para las formas farmacéuticas que imitan un perfil de dosificación dos veces al día, un primer 10 comprimido libera el fármaco sustancialmente de inmediato tras la ingestión de la forma farmacéutica, mientras que un segundo comprimido libera el fármaco aproximadamente de 3 horas a menos de 14 horas tras la ingestión de la forma farmacéutica. Para las formas farmacéuticas que imitan un perfil de dosificación de tres veces al día, un primer comprimido libera el fármaco sustancialmente de inmediato tras la ingestión de la forma farmacéutica, un segundo comprimido libera el fármaco aproximadamente de 3 horas a menos de 10 horas tras la ingestión de la forma farmacéutica, y el tercer comprimido libera el fármaco de al menos 5 horas a aproximadamente 18 horas tras la ingestión de la forma farmacéutica. Es posible que la forma farmacéutica incluya más de tres comprimidos. 15 Aunque la forma farmacéutica no incluirá en general más de un tercer comprimido, se pueden utilizar formas farmacéuticas que alojen más de tres comprimidos.

De forma alternativa, cada unidad de dosificación en la cápsula puede comprender una pluralidad de microesferas, 20 gránulos o partículas que contienen fármaco. Como es conocido en la técnica, "microesferas" que contienen fármaco se refiere a microesferas preparadas con fármaco y uno o más excipientes o polímeros. Se pueden producir microesferas que contienen fármaco aplicando fármaco a un soporte inerte, por ejemplo, microesferas de glucido inerte recubiertas con fármaco o creando un "núcleo" que comprende tanto el fármaco como uno o más excipientes. Como también es conocido, "gránulos" y "partículas" que contienen fármaco comprenden partículas 25 de fármaco que pueden o no incluir uno o más excipientes o polímeros adicionales. A diferencia de las microesferas que contienen fármaco, los gránulos y las partículas no contienen un soporte inerte. En general, los gránulos comprenden partículas de fármaco y requieren un procesamiento adicional. En general, las partículas son 30 más pequeñas que los gránulos y no se procesan adicionalmente. Aunque se pueden formular microesferas, gránulos y partículas para proporcionar liberación inmediata, en general se emplean microesferas y gránulos para proporcionar liberación retardada.

En un modo de realización, se formula el compuesto para administración tópica. Las formas farmacéuticas tópicas adecuadas incluyen lociones, cremas, pomadas y geles. Un "gel" es un sistema semisólido que contiene una dispersión del agente activo, es decir, un compuesto, en un vehículo líquido que se vuelve semisólido por la acción 35 de un agente espesante o material polimérico disuelto o suspendido en el vehículo líquido. El líquido puede incluir un componente lipófilo, un componente acuoso o ambos. Algunas emulsiones pueden ser geles o incluir de otro modo un componente de gel. Sin embargo, algunos geles no son emulsiones porque no contienen una combinación homogeneizada de componentes inmiscibles. Los procedimientos para preparar lociones, cremas, pomadas y geles son bien conocidos en la técnica.

#### 40 Politerapias

El compuesto descrito en el presente documento se puede administrar de forma complementaria con otros compuestos activos. Estos compuestos incluyen, pero no se limitan a, analgésicos, fármacos antiinflamatorios, 45 antitérmicos, antidepresivos, antiepilépticos, antihistamínicos, fármacos antijaquecosos, antimuscarínicos, ansiolíticos, sedantes, hipnóticos, neurolépticos, broncodilatadores, fármacos antiasmáticos, fármacos cardiovasculares, corticoesteroides, dopamínicos, electrólitos, fármacos gastrointestinales, miorrelajantes, agentes nutricionales, vitaminas, parasimpaticomiméticos, estimulantes, anorexígenos, antinarcóticos y agentes antiviricos. En un modo de realización particular, el agente antivírico es un compuesto antivírico que no se 50 dirige al SNC. "Administración complementaria", como se usa en el presente documento, quiere decir que el compuesto se puede administrar en la misma forma farmacéutica o en formas farmacéuticas separadas con uno o más de otros agentes activos. El agente(s) activo(s) adicional(es) se puede(n) formular para liberación inmediata, liberación controlada o combinaciones de las mismas.

55 Los ejemplos específicos de compuestos que se pueden administrar de forma complementaria con los compuestos incluyen, pero no se limitan a, aceclofenaco, paracetamol, adometetina, almotriptán, alprazolam, amantadina, amcinónida, aminociclopropano, amitriptilina, amlodipino, amoxapina, anfetamina, aripiprazol, aspirina, atomoxetina, azasetrón, azatadina, beclometasona, benacticina, benoxaprofeno, bermoprofeno, betametasona, bicipifadina, bromocriptina, budesónida, buprenorfina, bupropión, buspirona, butorfanol, butriptilina, cafeína, carbamazepina, carbidopa, carisoprodol, celecoxib, clordiazepóxido, clorpromazina, salicilato de colina, citalopram, clomipramina, clonazepam, clonidina, clonitaceno, clorazepato, clotiazepam, cloxazolam, clozapina, codeína, corticosterona, cortisona, ciclobenzaprina, ciproheptadina, demexiptilina, desipramina, desomorfina, dexametasona, dexanabinol, sulfato de dextroanfetamina, dextromoramida, dextropropoxifeno, dezocina, diazepam, dibenzepina, diclofenaco sódico, diflunisal, dihidrocodeína, dihidroergotamina, dihidromorfina, 60 dimetacrina, divalproex, dizatRIPTán, dolasetrón, donepezilo, doxepina, duloxetina, ergotamina, escitalopram, estazolam, ethosuximida, etodolaco, fenoxyetina, fenamatos, fenoprofeno, fentanilo, fludiazepam,

fluoxetina, flufenazina, flurazepam, flurbiprofeno, flutazolam, fluvoxamina, frovatriptán, gabapentina, galantamina, gepirona, *Ginkgo biloba*, granisetrón, haloperidol, huperzina A, hidrocodona, hidrocortisona, hidromorfona, hidroxizina, ibuprofeno, imipramina, indiplon, indometacina, indoprofeno, iprindol, ipsapirona, ketanserina, ketoprofeno, ketorolaco, lesopitrón, levodopa, lipasa, lofepramina, lorazepam, loxapina, maprotilina, mazindol, 5 ácido mefenámico, melatonina, melitraceno, memantina, meperidina, meprobamato, mesalamina, metapramina, metaxalona, metadona, metanfetamina, metocarbamol, metildopa, metilfenidato, metilsalicilato, metisergida, metoclopramida, mianserina, mifepristona, milnaciprán, minaprina, mirtazapina, moclobemida, modafinilo (un antinarcoléptico), molindona, morfina, clorhidrato de morfina, nabumetona, nadolol, naproxeno, naratriptán, nefazodona, neurontin, nomifensina, nortriptilina, olanzapina, olsalazina, ondansestrón, opipramol, orfenadrina, 10 oxaflozano, oxaprozina, oxazepam, oxitriptán, oxicodona, oximorfona, pancrelipasa, parecoxib, paroxetina, pemolina, pentazocina, pepsina, perfenazina, fenacetina, fendimetracina, fenmetracina, fenilbutazona, fenitoína, fosfatidilserina, pimozida, pirlindol, piroxicam, pizotifeno, pizotilina, pramipexol, prednisolona, prednisona, pregabalina, propanolol, propizepina, propoxifeno, protriptilina, quazepam, quinupramina, reboxetina, reserpina, risperidona, ritanserina, rivastigmina, rizatriptán, rofecoxib, ropinirol, rotigotina, salsalato, sertralina, sibutramina, 15 sildenafile, sulfasalazina, sulindaco, sumatriptán, tacrina, temazepam, tetrabenazina, tiacidas, tioridazina, tiotixeno, tiaprida, tiasipirona, tizanidina, tofenacina, tolmetina, toloxaftona, topiramato, tramadol, trazodona, triazolam, trifluoperazina, trimetobenzamida, trimipramina, tropisetrón, valdecoxib, ácido valproico, venlafaxina, viloxazina, vitamina E, zimeldina, ziprasidona, zolpidem, zopiclona e isómeros, sales y combinaciones de los mismos.

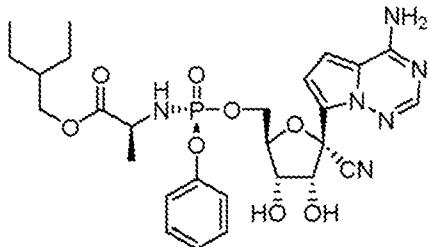
20 En determinados modos de realización, los compuestos ejemplares y las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en combinación con otro(s) agente(s) antivírico(s), tal(es) como abacavir, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, ampligen, arbidol, atazanavir, Atripla, balapiravir, BCX4430, boceprevir, cidofovir, combivir, daclatasvir, darunavir, dasabuvir, delavirdina, didanosina, docosanol, edoxudina, efavirenz, emtricitabina, 25 enfuvirtida, entecavir, famciclovir, favipiravir, fomivirsen, fosamprenavir, foscarnet, fosfonat, ganciclovir, GS-5734, ibacicabina, Imunovir, idoxuridina, imiquimod, indinavir, inosina, interferón de tipo III, interferón de tipo II, interferón de tipo I, lamivudina, ledipasvir, lopinavir, lovirida, maraviroc, moroxidina, metisazona, nelfinavir, nevirapina, nexavir, NITD008, ombitasvir, oseltamivir, paritaprevir, peginterferón alfa-2a, penciclovir, peramivir, pleconaril, podofilotoxina, raltegravir, ribavirina, rimantadina, ritonavir, pirimidina, saquinavir, simeprevir, sofosbuvir, 30 estavudina, telaprevir, telbivudina, tenofovir, tenofovir disoproxilo, tenofovir exalidex, tipranavir, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valaciclovir, valganciclovir, vicriviroc, vidarabina, viramidina, zalcitabina, zanamivir o zidovudina y combinaciones de los mismos.

35 En determinados modos de realización, los compuestos ejemplares y las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento se pueden administrar en combinación con cualquiera de los compuestos divulgados en los documentos:

WO2003090690A2, WO2003090690A3, WO2003090691A2, WO2003090691A3,  
 WO2004005286A2, WO2004005286A3, WO2004006843A2, WO2004006843A3,  
 40 WO2004031224A2, WO2004031224A3, WO2004035576A2, WO2004035576A3,  
 WO2004035577A2, WO2004035577A3, WO2004050613A2, WO2004050613A3,  
 WO2004064845A1, WO2004064846A1, WO2004096286A2, WO2004096286A3,  
 WO2004096287A2, WO2004096287A3, WO2004096818A2, WO2004096818A3,  
 WO2004100960A2, WO2005002626A2, WO2005002626A3, WO2005012324A2,  
 45 WO2005012324A3, WO2005028478A1, WO2005039552A2, WO2005039552A3,  
 WO2005042772A1, WO2005042773A1, WO2005047898A2, WO2005047898A3,  
 WO2005063744A2, WO2005063744A3, WO2005063751A1, WO2005064008A1,  
 WO2005064008A9, WO2005066189A1, WO2005070901A2, WO2005070901A3,  
 WO2005072748A1, WO2005117904A2, WO2005117904A3, WO2006015261A2,  
 50 WO2006015261A3, WO2006017044A2, WO2006017044A3, WO2006020276A2,  
 WO2006020276A3, WO2006033703A1, WO2006047661A2, WO2006047661A3,  
 WO2006069193A2, WO2006069193A3, WO2006091905A1, WO2006110157A2,  
 WO2006110157A3, WO2006110157A9, WO2006125048A2, WO2006125048A3,  
 55 WO2007009109A2, WO2007009109A3, WO2007011658A1, WO2007014174A2,  
 WO2007014174A3, WO2007014352A2, WO2007014352A3, WO2007079260A1,  
 WO2007079260A9, WO2007126812A2, WO2007126812A3, WO2008003149A2,  
 WO2008003149A3, WO2008005519A2, WO2008005519A3, WO2008005542A2,  
 WO2008005542A3, WO2008005555A1, WO2008009076A2, WO2008009076A3,  
 WO2008009077A2, WO2008009077A3, WO2008009078A2, WO2008009078A3,  
 60 WO2008009079A2, WO2008009079A3, WO2008010921A2, WO2008010921A3,  
 WO2008011116A2, WO2008011116A3, WO2008011117A2, WO2008011117A3,  
 WO2008013834A1, WO2008016522A2, WO2008016522A3, WO2008077649A1,  
 WO2008077650A1, WO2008077651A1, WO2008100447A2, WO2008100447A3,  
 WO2008103949A1, WO2008133669A2, WO2008133669A3, WO2009005674A2,  
 65 WO2009005674A3, WO2009005676A2, WO2009005676A3, WO2009005677A2,  
 WO2009005677A3, WO2009005687A1, WO2009005690A2, WO2009005690A3,

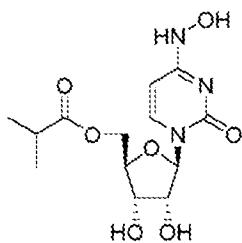
WO2009005693A1, WO2009006199A1, WO2009006203A1, WO2009009001A1,  
 WO2009009001A9, WO2009088719A1, WO2009105513A2, WO2009105513A3,  
 WO2009132123A1, WO2009132135A1, WO2010002998A1, WO2010005986A1,  
 WO2010011959A1, WO2010075127A1, WO2010077613A1, WO2010080389A1,  
 5 WO2010093608A1, WO2010132601A1, WO2010151472A1, WO2010151487A1,  
 WO2010151488A1, WO2011005842A1, WO2011011303A1, WO2011031669A1,  
 WO2011031965A1, WO2011035231A1, WO2011049825A1, WO2011079016A1,  
 WO2011088303A1, WO2011088345A1, WO2011106445A1, WO2011143105A1,  
 10 WO2011143106A1, WO2011146817A1, WO2011150288A1, WO2011156416A1,  
 WO2011156610A2, WO2011156610A3, WO2011156757A1, WO2011163518A1,  
 WO2012003497A1, WO2012003498A1, WO2012012465A1, WO2012012776A1,  
 WO2012037038A1, WO2012039787A1, WO2012039791A1, WO2012068234A2,  
 WO2012068234A3, WO2012068535A1, WO2012078915A1, WO2012087596A1,  
 15 WO2012088153A1, WO2012088156A1, WO2012088178A1, WO2012138669A1,  
 WO2012138670A1, WO2012142523A2, WO2012142523A3, WO2012145728A1,  
 WO2012151165A1, WO2013006721A1, WO2013006722A1, WO2013006738A1,  
 WO2013010112A1, WO2013025788A1, WO2013040492A2, WO2013040492A3,  
 WO2013066748A1, WO2013075029A1, WO2013082003A1, WO2013090840A1,  
 20 WO2013090929A1, WO2013096512A1, WO2013096681A1, WO2013103724A1,  
 WO2013103738A1, WO2013106732A1, WO2013115916A1, WO2013116720A1,  
 WO2013116730A1, WO2013138236A1, WO2013158776A1, WO2013159064A1,  
 WO2013173488A1, WO2013173492A1, WO2013185090A1, WO2013185093A1,  
 25 WO2013185103A1, WO2014008285A1, WO2014028343A1, WO2014055618A1,  
 WO2014070939A1, WO2014074620A1, WO2014100323A1, WO2014100500A1,  
 WO2014110296A1, WO2014110297A1, WO2014110298A1, WO2014134566A2,  
 WO2014134566A3, WO2014145095A1, WO2015023893A1, WO2015069939A1,  
 WO2015084741A2, WO2015084741A3, WO2015099989A1, WO2015100144A1,  
 30 WO2015108780A1, WO2015120057A1, WO2015130964A1, WO2015130966A1,  
 WO2015179448A1, WO2015191526A2, WO2015191526A3, WO2015191726A1,  
 WO2015191743A1, WO2015191745A1, WO2015191752A1, WO2015191754A2,  
 35 WO2015191754A3, WO2015196137A1, WO2016007765A1, WO2016018697A1,  
 WO2016028866A1, WO2016033243A1, WO2016033243A9, WO2016036759A1,  
 WO2016096116A1, WO2016096116A1, WO2016105532A1, WO2016105534A1,  
 WO2016105564A1, WO2016106237A1, WO2016141092A1, WO2016161382A1,  
 40 WO2016168349A1, WO2016186967A1, WO2016205141A1, WO2017004012A1,  
 WO2017004244A1, WO2017035230A1, WO2017048727A1, WO2017049060A1,  
 WO2017059120A1, WO2017059224A2, WO2017059224A3, WO2017083304A1,  
 WO2017106346A2, WO2017106346A3, WO2017106556A1, WO2017184668A1,  
 WO2017184670A2, WO2017184670A3, WO2017205078A1, WO2017205115A1,  
 45 WO2017223268A1, WO9015065A1, WO9209705A1, WO9307157A1, WO9310820A1,  
 WO9403467A2, WO9403467A3, WO9424144A2, WO9424144A3, WO9507919A1,  
 WO9507920A1, WO9626933A1, WO9817647A1.

45 En los modos de realización ejemplificados, los compuestos ejemplares y las composiciones farmacéuticas se  
 pueden administrar en combinación con

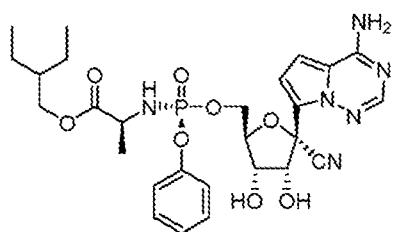


y derivados del mismo.

En los modos de realización ejemplificados,



se puede administrar junto con



5 y derivados del mismo.

### Ejemplos

10 Los siguientes ejemplos se exponen a continuación para ilustrar las composiciones, procedimientos y resultados de acuerdo con la materia objeto divulgada. Estos ejemplos no pretenden incluir todos los aspectos de la materia objeto divulgada en el presente documento, sino más bien ilustrar procedimientos, composiciones y resultados representativos.

15 Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso. Existen numerosas variaciones y combinaciones de condiciones de reacción, por ejemplo, concentraciones de componentes, temperaturas, presiones y otros intervalos y condiciones de reacción que se pueden usar para optimizar la pureza y el rendimiento del producto obtenido del procedimiento descrito. Solo se requerirá una experimentación razonable y rutinaria para optimizar dichas condiciones del procedimiento.

20 Todas las reacciones químicas se realizaron en material de vidrio secado en horno bajo una atmósfera de nitrógeno, excepto donde se indique. Los productos químicos y los disolventes eran de calidad analítica y se adquirieron de proveedores comerciales (típicamente Aldrich, Fisher, Acros, Carbosynth Limited y Oakwood Chemical) y se usaron como se recibieron, excepto donde se indique. En particular, EIDD-1910, EIDD-1993 y EIDD-2003 se adquirieron de Carbosynth Limited. Los disolventes sados para las reacciones (tetrahidrofurano, metanol, acetonitrilo, diclorometano, tolueno, piridina, dimetilformamida) eran ≥99,9 % anhidros en todos los casos. Todas las reacciones fueron seguidas de cromatografía en capa fina (TLC) hasta su finalización, a menos que se establezca de otro modo. El análisis por TLC se realizó sobre gel de sílice, usando iluminación con una lámpara UV (254 nm) o tinción con KMnO<sub>4</sub> y calentamiento. La cromatografía en columna ultrarrápida manual se realizó con gel de sílice RediSep R<sub>f</sub> de 40-60 micrómetros (tamaño de partícula 60 Å), adquirido de Teledyne Isco, como fase estacionaria. La cromatografía en columna ultrarrápida de gradiente automatizado se realizó en un Teledyne Isco CombiFlash Companion; las separaciones en fase normal se realizaron con gel de sílice RediSep R<sub>f</sub> prerrellenado como fase estacionaria, y las separaciones en fase inversa se realizaron con la fase estacionaria RediSep R<sub>f</sub> C<sub>18</sub> High Performance Gold prerrellenada. Las purificaciones de trifosfato se realizaron usando cromatografía de intercambio iónico, con DEAE (dielaminoetil) Sephadex A-25 como fase estacionaria y TEAB (bicarbonato de trietilamonio) acuoso como fase móvil.

35 Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H se midieron en un instrumento Varian a 400 MHz y se procesaron usando el programa informático MestReNova, versión 9.0.1. Los desplazamientos químicos se midieron en relación con el pico de disolvente apropiado: CDCl<sub>3</sub> (δ 7,27), DMSO-d<sub>6</sub>, (δ 2,50), CD<sub>3</sub>OD (δ 3,31), D<sub>2</sub>O (δ 4,79). Las siguientes abreviaturas se usaron para describir el acoplamiento: s = singulete, d = doblete, t = triplete, c = cuadruplete, q = quintuplete, m = multiplete, a = ancho. Los espectros de RMN de <sup>13</sup>C se midieron en un instrumento Varian a 100 MHz con desplazamientos químicos en relación con el pico de disolvente apropiado: CDCl<sub>3</sub> (δ 77,0), DMSO-d<sub>6</sub> (δ 39,5), CD<sub>3</sub>OD (δ 49,0). Los espectros de <sup>19</sup>F se midieron en un instrumento Varian a 376 MHz, y los espectros de <sup>31</sup>P se midieron en un instrumento Varian a 162 MHz. Los desplazamientos químicos para los espectros de <sup>19</sup>F, los espectros de <sup>31</sup>P y los espectros de <sup>13</sup>C (solo en D<sub>2</sub>O) se calibraron por el programa informático MestReNova usando una función de referencia absoluta con el correspondiente espectro de RMN de <sup>1</sup>H en el mismo disolvente.

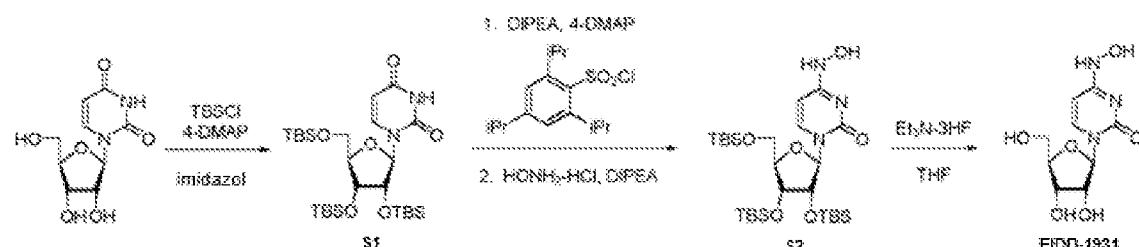
La cromatografía de líquidos/espectrometría de masas nominal (de baja resolución) se realizó usando un CL Agilent serie 1200 (detector de absorción UV a 254 nm), usando una columna Zorbax Eclipse XDB C<sub>18</sub> de 4,6x50 mm, 3,5 micrómetros, eluyendo con una mezcla de MeOH/agua (típicamente 95/5 isocrática) y un instrumento con cuadrapolo de CLEM Agilent 6120. La espectrometría de masas de alta resolución se realizó en el 5 Centro de Espectrometría de Masas de la Universidad de Emory con un Thermo LTQ-FTMS usando IQPA o bien ESI.

**Ejemplo de referencia 1: síntesis de N4-hidroxicitidina o 1-(3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2-il)-4-(hidroxiamino)pirimidin-2-ona (EIDD-1931)**

10 La protección de la uridina por persililación va seguida de la activación de la posición 4 de la nucleobase por un grupo arilsulfonio impedido (véase la figura 1). El desplazamiento de este grupo con hidroxilamina instala el resto N-4-hidroxi. La desprotección global usando una de las numerosas fuentes de fluoruro disponibles da el producto deseado.

15 El compuesto se puede preparar en una etapa a partir de citidina calentando en una solución de hidroxilamina con pH ajustado. A pesar de ser más corta, esta vía tiende a dar rendimientos menores y requiere purificación por cromatografía en columna ultrarrápida en fase inversa, lo que limita su uso a producir cantidades más pequeñas.

20 Otra vía sintética es como se muestra a continuación.



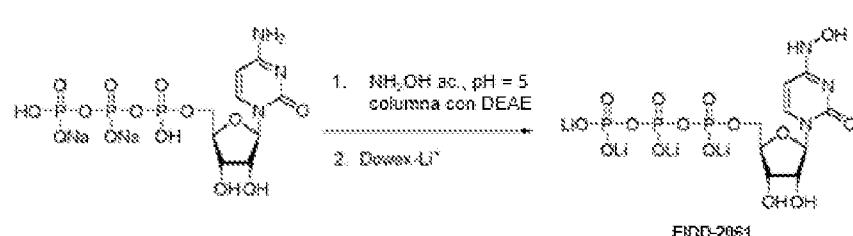
25 Se cargó un matraz de 3 bocas de 2 l equipado con un agitador de hélice y una entrada de nitrógeno con uridina (25 g, 102 mmol) y 1 l de diclorometano. Se enfrió la solución resultante hasta 0 °C y se añadieron secuencialmente 4-DMAP (1,251 g, 10,24 mmol) e imidazol (27,9 g, 409 mmol). Se añadió TBSCl (61,7 g, 409 mmol) durante 10 minutos y se permitió que la mezcla resultante alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante 18 h. Se añadió agua (300 ml) a la mezcla de reacción y se agitó a t.a. durante 2 h, se separaron las capas y se extrajo la capa acuosa con diclorometano adicional. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera (1 x 300 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar 75 g de un aceite incoloro transparente. Purificación por cromatografía ultrarrápida (gradiente del 5 al 20 % de EtOAc en hexanos) para proporcionar **S1** (45 g, 75 %) como un aceite incoloro transparente, que solidificó cuando se secó a vacío: RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,09 (s, 1H), 8,02 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 5,87 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 5,67 (dd, J = 8,1, 2,2 Hz, 1H), 4,07 (c, J = 3,8, 3,3 Hz, 1H), 3,98 (dd, J = 11,7, 1,7 Hz, 1H), 3,75 (dd, J = 11,7, 1,1 Hz, 1H), 0,94 (s, 9H), 0,90 (s, 9H), 0,88 (s, 9H), 0,13 (s, 3H), 0,12 (s, 3H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H), 0,07 (s, 3H), 0,06 (s, 3H).

40 Se cargó un matraz de fondo redondo de 1 l con **S1** (28 g, 47,7 mmol) y diclorometano (700 ml). Se enfrió la solución hasta 0 °C usando un baño de hielo; se añadieron secuencialmente 4-DMAP (0,583 g, 4,77 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (41,7 ml, 239 mmol). Se añadió lentamente cloruro de 2,4,6-triisopropilbenceno-1-sulfonilo (28,9 g, 95 mmol) al matraz y, después de finalizar la adición, se permitió que el matraz alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante 18 h. Se enfrió la solución naranja oscuro hasta 0 °C con un baño de hielo y se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (24,66 g, 191 mmol) por medio de una jeringa, seguido de clorhidrato de hidroxilamina sólido (13,26 g, 191 mmol) de una vez. Se permitió que la mezcla alcanzara la t.a. y se agitó durante 3 h. Se desactivó la reacción con agua (200 ml) y se separaron las capas resultantes. Se extrajo la capa acuosa con diclorometano (200 ml) y se lavaron los extractos orgánicos combinados con salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se concentró bajo presión reducida para proporcionar un aceite naranja oscuro. Purificación por cromatografía ultrarrápida (gradiente del 15 al 50 % de EtOAc en hexanos) para proporcionar **S2** (19,8 g, 69 % en 2 etapas) como un aceite que solidificó a un semisólido tras secarse a vacío: RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,15 (s, 1H), 6,31 (s, 1H), 5,91 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 5,56 (dd, J = 8,2, 2,0 Hz, 1H), 4,07 (m, 2H), 4,02 (m, 1H), 3,91 (dd, J = 11,6, 2,4 Hz, 1H), 3,73 (dd, J = 11,6, 2,4 Hz, 1H), 0,95 (s, 9H), 0,92 (s, 9H), 0,89 (s, 9H), 0,12 (s, 6H), 0,098 (s, 3H), 0,083 (s, 3H), 0,063 (s, 3H), 0,057 (s, 3H); EMBR m/z 602,3 [M+H]<sup>+</sup>.

55 Se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con **S2** (23,3 g, 38,7 mmol) y THF (50 ml). Se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (6,30 ml, 38,7 mmol) de una vez y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas. Se concentró la mezcla bajo presión reducida y se disolvió el residuo en una cantidad mínima de MeOH, y se añadió lentamente esta solución a un matraz Erlenmeyer que contenía diclorometano bajo agitación rápida

(500 ml) para precipitar el producto; se agitó la mezcla a t.a. durante 15 minutos. Se recogió el sólido triturado por filtración a vacío y se lavó con diclorometano, a continuación, con éter. Se secó el sólido a vacío para proporcionar el compuesto del título (7,10 g, 71 %) como un sólido blanco: RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,16 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 1H), 5,86 (d,  $J$  = 5,6 Hz, 1H), 5,59 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 1H), 4,19 - 4,04 (m, 2H), 3,93 (c,  $J$  = 3,3 Hz, 1H), 3,77 (dd,  $J$  = 12,2, 2,9 Hz, 1H), 3,68 (dd,  $J$  = 12,1, 2,9 Hz, 1H); RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9,95 (s, 1H), 9,46 (s, 1H), 7,02 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 1H), 5,71 (d,  $J$  = 6,3 Hz, 1H), 5,54 (d,  $J$  = 7,7 Hz, 1H), 5,23 (d,  $J$  = 6,0 Hz, 1H), 5,02 (d,  $J$  = 4,6 Hz, 1H), 4,98 (t,  $J$  = 5,1 Hz, 1H), 3,95 (c,  $J$  = 5,9 Hz, 1H), 3,89 (td,  $J$  = 4,9 Hz, 3,0 Hz, 1H), 3,75 (c,  $J$  = 3,4 Hz, 1H), 3,50 (cdd,  $J$  = 11,9 Hz, 5,2 Hz, 3,5 Hz, 2H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  150,0, 143,9, 130,5, 98,89, 87,1, 85,0, 72,8, 70,8, 61,8. EMBR  $m/z$  260,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

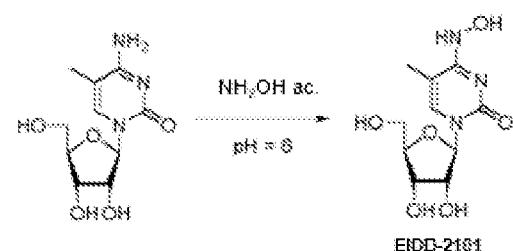
10 Ejemplo de referencia 2: síntesis de EIDD-2061



15 Se cargó un tubo de presión sellable con una barra agitadora, sal disódica de trifosfato de citidina (0,137 g, 0,260 mmol) y una solución de hidroxilamina acuosa 2 N ajustada a  $\text{pH} = 5$  (2,0 ml, 4,0 mmol). Después de mezclar los reactivos, se midió el  $\text{pH}$  de la solución ( $\text{pH} = 3$ ) y se añadieron gotas adicionales de solución de  $\text{NaOH}$  ac. al 10 % p/p para reajustar la solución a  $\text{pH} = 5$ . Se selló el tubo y se calentó con agitación a 55 °C durante 5 h. Se enfrió la mezcla hasta t.a., se abrió el tubo sellado y se añadió una solución de bicarbonato de trietilamonio (TEAB) 100 mM (2 ml). Se transfirió el contenido del tubo a un matraz de fondo redondo y se concentró por evaporación rotatoria. Se recogió el material bruto en TEAB 100 mM y la cromatografía en DEAE seguida de liofilización del producto dio una sal de trietilamonio del producto deseado.

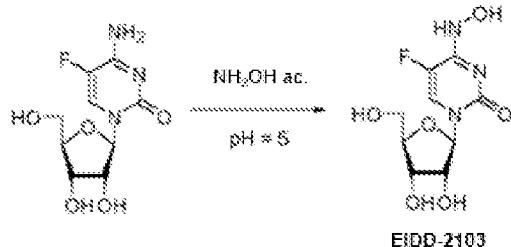
25 Se enjuagó una columna de intercambio iónico (VC de 17 ml) de Dowex recién preparado (forma de  $\text{Li}^+$ ) con 5 VC de agua. Se recogió la sal de trietilamonio preparada en agua y se eluyó a través de la columna de intercambio iónico. Se combinaron las fracciones que contenían el producto y se liofilizó para dar el compuesto del título (0,030 g, 22 %) como un sólido tostado esponjoso: RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,19 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 1H), 5,95 (d,  $J$  = 6,3 Hz, 1H), 5,82 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 1H), 4,42-4,34 (m, 2H), 4,24-4,10 (m, 3H); RMN de  $^{31}\text{P}$  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  -8,5 (s.a.), -11,2 (d,  $J$  = 19,6 Hz), -22,0 (t,  $J$  = 19,3 Hz); EMBR  $m/z$  498,0  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

30 Ejemplo de referencia 3: síntesis de EIDD-2101



35 Se calentó una solución de 5-metilcitidina (0,257 g, 1,00 mmol) en una solución de hidroxilamina ac. 2 N con  $\text{pH} 6$  (8 ml, 16,0 mmol) hasta 55 °C en un tubo sellado con agitación durante 5 h. Se enfrió la solución hasta t.a., se transfirió a un matraz de fondo redondo, se concentró por evaporación rotatoria y se coevaporó con  $\text{MeOH}$  (2 x 20 ml). Se recogió el residuo bruto en  $\text{MeOH}$  y se inmovilizó sobre gel de sílice. La cromatografía ultrarrápida (gradiente del 2 al 10 % de  $\text{MeOH}$  en DCM) proporcionó el compuesto del título (140 mg, 51 %) como un sólido violeta claro: RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  6,99 (s, 1H), 5,86 (d,  $J$  = 5,7 Hz, 1H), 4,23 - 4,06 (m, 2H), 3,93 (c,  $J$  = 3,2 Hz, 1H), 3,78 (dd,  $J$  = 12,1 Hz, 2,8 Hz, 1H), 3,70 (dd,  $J$  = 12,1 Hz, 3,4 Hz, 1H), 1,79 (s, 3H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  152,0, 146,6, 128,4, 108,4, 89,4, 86,1, 74,4, 71,8, 62,8, 12,9; EMAR calc. para  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_6\text{N}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 274,10336, hallado: 274,10350.

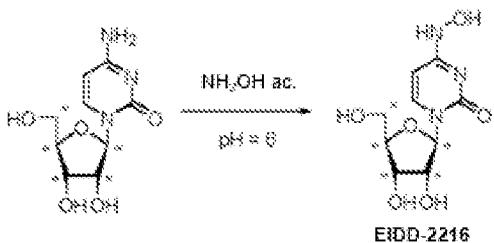
45 Ejemplo de referencia 4: síntesis de EIDD-2103



Se preparó una solución 2 N de clorhidrato de hidroxilamina (1,11 g, 16,0 mmol) en agua (8 ml) y se ajustó a pH = 5 con una pequeña cantidad de NaOH ac. (10 % p/p). Se cargó un tubo de presión sellable con esta solución y

5 5-fluorocitidina (0,261 g, 1,00 mmol), se selló el matraz y se calentó con agitación a 55 °C durante 16 h. Se enfrió la mezcla hasta t.a., se transfirió a un matraz de fondo redondo y se concentró por evaporación rotatoria. Se suspendió el material bruto en MeOH y se inmovilizó sobre Celite. La cromatografía ultrarrápida automatizada (columna de 40 g, gradiente del 0 al 20 % de MeOH en DCM) dio 600 mg de un sólido rosa semipuro. Se disolvió este sólido en 2 ml de agua y la cromatografía de fase inversa automatizada (columna de 43 g, gradiente del 5 al 10 100 % de MeOH en agua) dio el producto deseado libre de impurezas orgánicas e inorgánicas. Se disolvió el sólido en agua, se congeló en un baño de hielo seco/acetona y se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (0,066 g, 0,238 mmol, rendimiento de un 24 %) como un sólido blanco floculante. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) δ 7,31 (d,  $J$  = 7,6 Hz, 1H), 5,87 (dd,  $J$  = 5,5 Hz, 1,8 Hz, 1H), 4,26 (t,  $J$  = 5,5 Hz, 1H), 4,19 (t,  $J$  = 4,8 Hz, 1H), 4,07 (c,  $J$  = 3,8 Hz, 1H), 3,85 (dd,  $J$  = 12,8 Hz, 3,1 Hz, 1H), 3,77 (dd,  $J$  = 12,7 Hz, 4,2 Hz, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) δ 150,0, 139,7, 137,4, 115,6 (d,  $J$  = 36,1 Hz), 88,0, 84,2, 72,8, 69,8, 61,0; RMN de  $^{19}\text{F}$  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) δ -164,70 (d,  $J$  = 7,6 Hz); EMAR calc. para  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{FN}_3\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 278,07829, hallado: 278,07848.

#### Ejemplo de referencia 5: síntesis de EIDD-2216

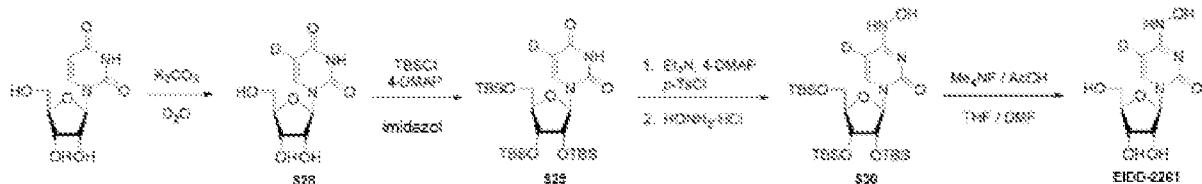


20

Se preparó una solución 5 N de clorhidrato de hidroxilamina (4,71 g, 67,8 mmol) en agua (13,5 ml) y se ajustó a pH = 6 con una pequeña cantidad de NaOH ac. (10 % p/p). Se cargó un tubo de presión sellable con esta solución y

25  $[1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}_5]$ cytidina (0,661 g, 2,26 mmol), se selló el matraz y se calentó con agitación a 37 °C durante 16 h. Se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente (t.a.), se transfirió a un matraz de fondo redondo y se concentró por evaporación rotatoria. Se recogió el material bruto en agua y la cromatografía ultrarrápida de fase inversa automatizada (columna  $\text{C}_{18}$  de 240 g, gradiente del 0 al 100 % de acetonitrilo en agua) retiró la mayor parte de las impurezas para dar 1,4 g de un sólido húmedo. Se disolvió este sólido en agua y una segunda cromatografía de fase inversa automatizada (columna  $\text{C}_{18}$  de 240 g, gradiente del 0 al 100 % de acetonitrilo en agua) retiró más impurezas para dar 400 mg de material semipuro. Se disolvió el material en MeOH y se inmovilizó sobre Celite. La cromatografía ultrarrápida automatizada (columna de 24 g, gradiente del 5 al 25 % de MeOH en diclorometano) dio 200 mg de producto casi puro. Se disolvió el sólido en agua y una cromatografía de fase inversa automatizada final (columna  $\text{C}_{18}$  de 48 g, gradiente del 0 al 100 % de acetonitrilo en agua) dio el producto deseado libre de impurezas orgánicas e inorgánicas. Se disolvió el sólido en agua, se congeló en un baño de hielo seco/acetona y se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (0,119 g, 20 %) como un sólido floculante violeta pálido, aproximadamente un 95 % puro por análisis de RMN/CELM: RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) δ 7,03 (dd,  $J$  = 8,2 Hz, 2,2 Hz, 1H), 5,82 (ddd,  $J$  = 167,5 Hz, 5,3 Hz, 2,9 Hz, 1H), 5,70 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 1H), 4,47-4,30 (m.a., 1H), 4,23-4,03 (m.a., 1H), 4,00-3,80 (m.a., 2H), 3,65-3,50 (m.a., 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) δ 151,3, 146,6, 131,3, 98,7, 87,9 (dd,  $J$  = 43,1 Hz, 4,0 Hz), 84,0 (dd,  $J$  = 41,5 Hz, 38,0 Hz), 72,5 (dd,  $J$  = 43,3 Hz, 37,8 Hz), 69,8 (td,  $J$  = 37,9 Hz, 3,9 Hz), 61,1 (d,  $J$  = 41,5 Hz); EMBR  $m/z$  265,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### Ejemplo de referencia 6: síntesis de EIDD-2261



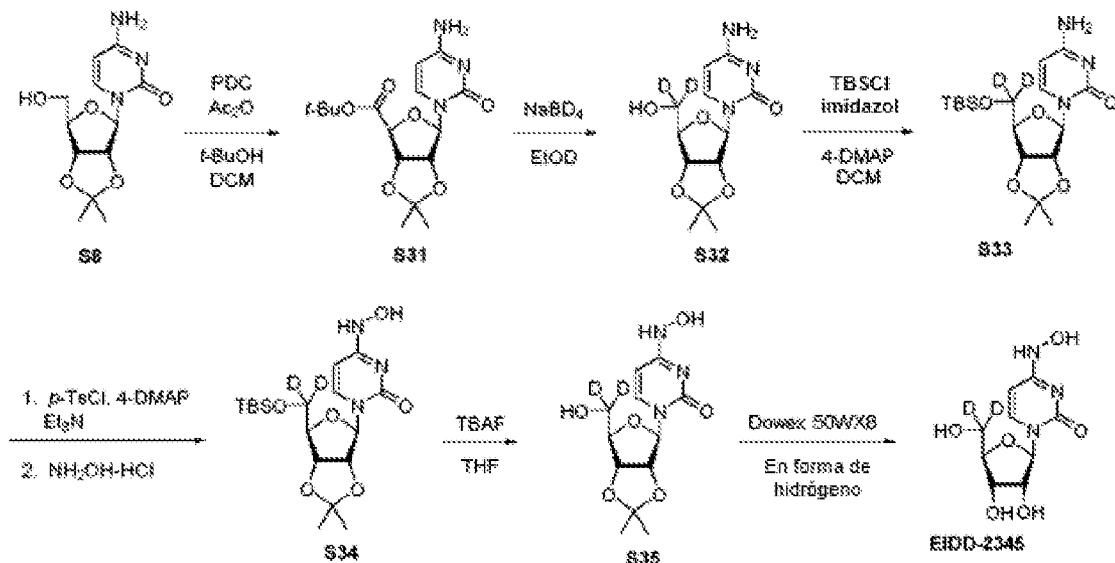
Se cargó un tubo de presión sellable con uridina (1,00 g, 4,09 mmol),  $K_2CO_3$  (0,679 g, 4,91 mmol) y óxido de deuterio (8,2 ml). Se purgó la mezcla con nitrógeno durante 15 minutos, se selló el tubo y se calentó el contenido con agitación a 95 °C durante 16 h. Se enfrió la mezcla hasta t.a., se abrió el tubo y se transfirió la mezcla a un matraz de fondo redondo y se concentró por evaporación rotatoria. Se coevaporó el producto bruto resultante con MeOH (x 3) para retirar el agua. El análisis por RMN mostró >95 % de incorporación de deuterio en la posición 5 de la nucleobase. Se usó el sólido marrón claro **S28** (1,00 g, 100 %) en la siguiente etapa sin purificación adicional: RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7,76 (s, 1H), 5,88 (d,  $J$  = 4,2 Hz, 1H), 4,17-4,12 (m, 2H), 4,00-3,96 (m, 1H), 3,84 (dd,  $J$  = 12,3 Hz, 2,8 Hz, 1H), 3,72 (dd,  $J$  = 12,3 Hz, 3,5 Hz, 1H); RMN de  $^{13}C$  (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  185,6, 177,4, 160,4, 141,1, 91,8, 85,8, 75,9, 71,2, 62,4.

Se cargó un matraz de fondo redondo con **S28** (1,00 g, 4,09 mmol) y diclorometano (8 ml) bajo nitrógeno. Se enfrió la mezcla resultante hasta 0 °C y se añadieron 4-DMAP (0,050 g, 0,408 mmol) e imidazol (1,11 g, 16,3 mmol) de una vez. Se añadió TBSCl (2,15 g, 14,3 mmol) de una vez como un sólido, se permitió que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. Se añadió agua (25 ml) a la mezcla de reacción, se separaron las capas y se extrajo la capa acuosa con diclorometano (2 x 25 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera (1 x 25 ml), se secó sobre  $Na_2SO_4$ , se filtró y se concentró por evaporación rotatoria. La cromatografía ultrarrápida automatizada (columna de 40 g, gradiente del 0 al 35 % de EtOAc en hexanos) dio **S29** (2,52 g, 84 %) como una espuma blanquecina: RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,08 (s.a., 1H), 8,03 (s, 1H), 5,89 (d,  $J$  = 3,6 Hz, 1H), 4,12-4,06 (m, 3H), 3,99 (dd,  $J$  = 11,5 Hz, 1,8 Hz, 1H), 3,76 (d,  $J$  = 12,0 Hz, 1H), 0,96 (s, 9H), 0,92 (s, 9H), 0,90 (s, 9H), 0,14 (s, 3H), 0,13 (s, 3H), 0,10 (s, 3H), 0,09 (s, 3H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H); RMN de  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  163,7, 150,3, 140,3, 89,0, 84,3, 76,1, 70,5, 61,6, 26,0 (3C), 25,8 (3C), 25,7 (3C), 18,4, 18,3, 17,9, -4,2, -4,6, -4,8, -4,9, -5,4, -5,6; EMAR calc. para  $C_{27}H_{54}DN_2NaO_6Si$   $[M+Na]^+$ : 610,32446, hallado: 610,32482.

A una solución en agitación de **S29** (0,840 g, 1,43 mmol) en acetonitrilo (14,3 ml) a 0 °C bajo nitrógeno se le añadieron secuencialmente cloruro de *p*-toluenosulfónico (0,545 g, 2,86 mmol), 4-DMAP (0,175 g, 1,43 mmol) y trietilamina (0,80 ml, 5,71 mmol). Se agitó la mezcla a 0 °C durante 2,5 h, momento en el que se añadió clorhidrato de hidroxilamina (0,993 g, 14,3 mmol) de una vez como un sólido. Se calentó la mezcla a 50 °C durante 3 días, a continuación, se enfrió hasta t.a. Se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc (100 ml), a continuación, se lavó con agua (2 x 100 ml) y salmuera (1 x 100 ml), se secó sobre  $Na_2SO_4$ , se filtró y se concentró por evaporación rotatoria. La cromatografía ultrarrápida automatizada (columna de 40 g, gradiente del 5 al 35 % de EtOAc en hexanos) produjo una mezcla del material de partida y el producto deseado. Una segunda cromatografía ultrarrápida automatizada (columna de 24 g, gradiente del 10 al 40 % de EtOAc en hexanos) dio **S30** (0,332 g, 39 %) como una espuma blanquecina: RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,37 (s.a., 1H), 5,92 (d,  $J$  = 4,6 Hz, 1H), 4,10-4,05 (m, 2H), 4,04-4,00 (m, 1H), 3,91 (dd,  $J$  = 11,6 Hz, 2,4 Hz, 1H), 3,73 (dd,  $J$  = 11,6 Hz, 1,8 Hz, 1H), 0,95 (s, 9H), 0,92 (s, 9H), 0,89 (s, 9H), 0,12 (s, 6H), 0,10 (s, 3H), 0,08 (s, 3H), 0,06 (s, 3H), 0,05 (s, 3H).

Se cargó un matraz de fondo redondo con **S30** (0,332 g, 0,551 mmol), fluoruro de tetrametilamonio (0,196 g, 2,64 mmol), THF (8,25 ml) y DMF (2,75 ml) bajo nitrógeno a 0 °C. Se añadió ácido acético (0,157 ml, 2,75 mmol) de una vez por medio de una jeringa. Se permitió que la mezcla alcanzara 45 °C y se calentó con agitación durante 4 días, a continuación, se concentró por evaporación rotatoria. La cromatografía ultrarrápida automatizada (columna de 40 g, gradiente del 0 al 20 % de MeOH en DCM) dio el compuesto del título (0,106 g, 74 %) como un sólido blanco. El análisis final de RMN mostró >95 % de incorporación de deuterio en la posición 5 de la nucleobase: RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7,16 (s, 1H), 5,85 (d,  $J$  = 5,6 Hz, 1H), 4,14 (t,  $J$  = 5,5 Hz, 1H), 4,10 (dd,  $J$  = 5,6 Hz, 3,8 Hz, 1H), 3,93 (c,  $J$  = 3,4 Hz, 1H), 3,77 (dd,  $J$  = 12,2 Hz, 2,9 Hz, 1H), 3,68 (dd,  $J$  = 12,2 Hz, 3,4 Hz, 1H); RMN de  $^{13}C$  (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  151,8, 146,3, 132,1, 89,7, 86,1, 74,6, 71,8, 62,8; EMAR calc. para  $C_9H_{13}DN_3O_6$   $[M+H]^+$ : 261,09399, hallado: 261,09371.

50 Ejemplo de referencia 7: síntesis de EIDD-2345



Se cargó un matraz de fondo redondo con **S8** (3,13 g, 11,0 mmol) y diclorometano (75 ml) bajo nitrógeno a t.a. A esta mezcla en agitación se le añadió secuencialmente dicromato de piridinio (8,28 g, 22,0 mmol), anhídrido acético (10,4 ml, 110 mmol) y *t*-butanol (21,1 ml, 220 mmol) a t.a. Se agitó la mezcla durante 22 horas a t.a., a continuación se lavó con agua (1 x 75 ml). Se extrajo la capa acuosa con diclorometano (2 x 75 ml) y se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera (1 x 100 ml), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró por evaporación rotatoria. Se recogió el residuo obtenido en EtOAc y se filtró a través de un tapón de Celite, seguido de lavado con EtOAc. Se concentró el filtrado por evaporación rotatoria y la cromatografía ultrarrápida automatizada (columna de 120 g, gradiente del 40 al 80 % de EtOAc en hexanos) dio **S31** (3,10 g, 72 %) como una espuma blanquecina: RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,36 (s.a., 1H), 7,42 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H), 5,76 (dd,  $J$  = 8,0 Hz, 2,3 Hz, 1H), 5,59 (s, 1H), 5,27 (dd,  $J$  = 6,0 Hz, 1,8 Hz, 1H), 5,19 (d,  $J$  = 6,0 Hz, 1H), 4,62 (d,  $J$  = 1,8 Hz, 1H), 1,56 (s, 3H), 1,48 (s, 9H), 1,39 (s, 3H).

5 A una solución en agitación de **S31** (2,61 g, 7,37 mmol) en EtOD (75 ml) a t.a. bajo nitrógeno se le añadió  $\text{NaBD}_4$  (1,234 g, 29,5 mmol) en una porción. Se agitó la mezcla a t.a. durante 1 hora, se calentó hasta 55 °C durante 6 horas, a continuación durante la noche a t.a. Se enfrió la mezcla hasta 0 °C y se desactivó el exceso de reactivo con AcOD. Se concentró la mezcla por evaporación rotatoria para dar **S32** bruto (2,57 g) que se llevó directamente a la siguiente etapa sin purificación adicional.

10 20 A una suspensión en agitación de **S32** bruto (2,00 g de material impuro, 5,74 mmol) en diclorometano (70 ml) a 0 °C se le añadió imidazol sólido (1,90 g, 27,9 mmol) y 4-DMAP (0,171 g, 1,40 mmol). Se añadió cloruro de *t*-butildimetsilsilo sólido (2,11 g, 14,0 mmol), y se permitió que la mezcla alcanzara la t.a. y se agitó durante 4 días. Se lavó la mezcla secuencialmente con agua y salmuera (1 x 70 ml cada una), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró por evaporación rotatoria. La cromatografía ultrarrápida automatizada (columna de 120 g, gradiente del 0 al 35 % de EtOAc en hexanos) dio **S33** (1,42 g, 66 % en 2 etapas) como un sólido blanco: RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,30 (s.a., 1H), 7,72 (m, 1H), 5,99 (d,  $J$  = 2,8 Hz, 1H), 5,69 (dd,  $J$  = 8,2 Hz, 2,3 Hz, 1H), 4,77 (dd,  $J$  = 6,1 Hz, 2,9 Hz, 1H), 4,69 (dd,  $J$  = 6,2 Hz, 2,8 Hz, 1H), 4,33 (d,  $J$  = 3,0 Hz, 1H), 1,60 (s, 3H), 1,37 (s, 3H), 0,91 (s, 9H), 0,11 (s, 3), 0,10 (s, 3H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  162,7, 149,9, 140,5, 114,1, 102,1, 91,9, 86,5, 85,4, 80,3, 27,4, 25,9 (3C), 25,4, 18,4, -5,4, -5,5; EMAR calc. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{D}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 401,20714, hallado: 401,20663.

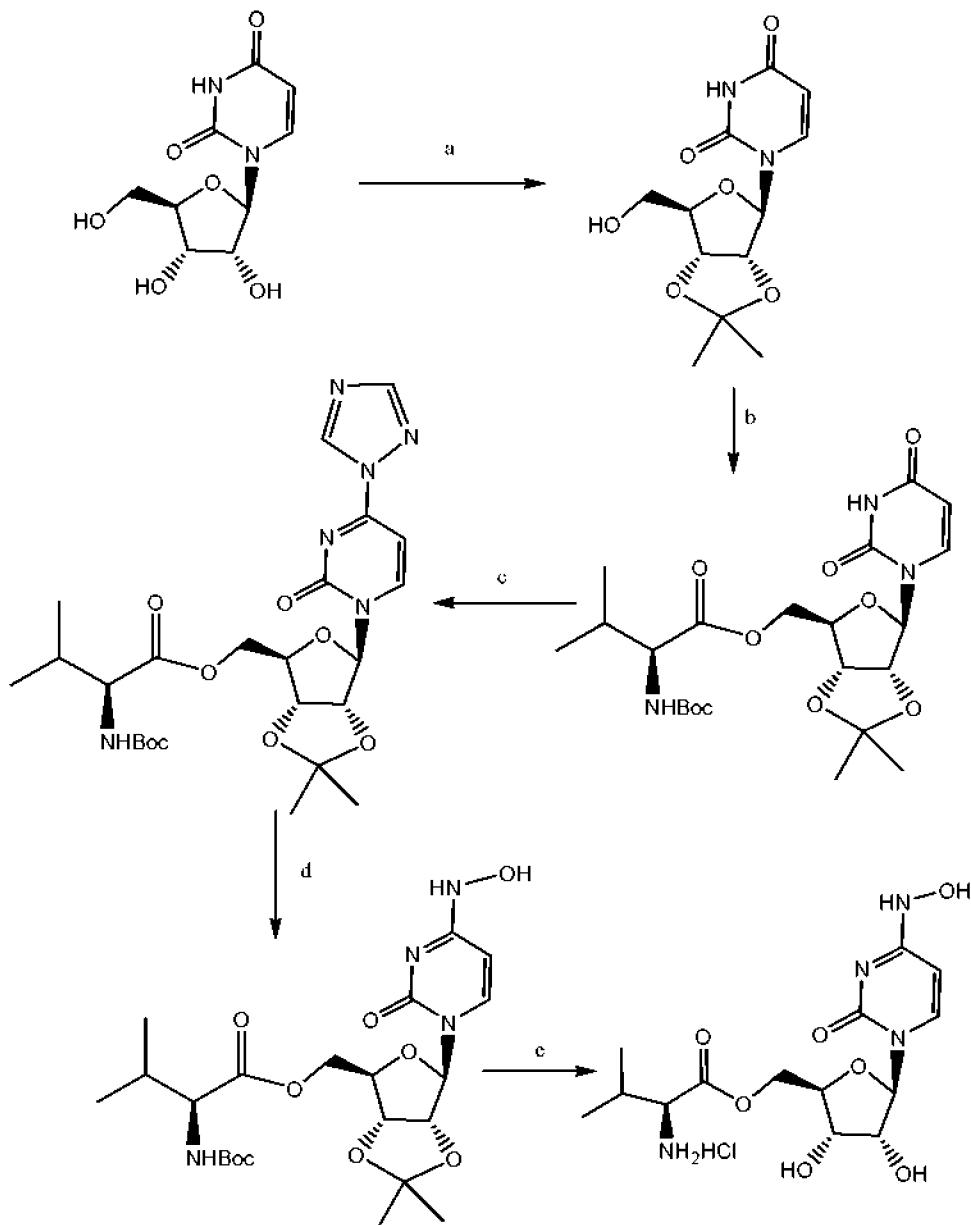
15 30 A una solución en agitación de **S33** (1,42 g, 3,55 mmol) en acetonitrilo (35 ml) a 0 °C bajo nitrógeno se le añadió secuencialmente cloruro de *p*-toluenosulfonilo (1,35 g, 7,09 mmol), 4-DMAP (0,433 g, 3,55 mmol) y trietilamina (9,88 ml, 70,9 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 0 °C durante 2,5 horas. Se añadió clorhidrato de hidroxilamina (2,46 g, 35,5 mmol) y se calentó la mezcla con agitación a 50 °C durante 2 días. Se volvió a enfriar la mezcla a t.a. y se diluyó con EtOAc (100 ml); a continuación, se lavó con agua (2 x 50 ml) y salmuera (1 x 50 ml), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró por evaporación rotatoria. La cromatografía ultrarrápida automatizada (columna de 120 g, gradiente del 1 al 3,5 % de metanol en diclorometano) dio **S34** (0,416 g, 28 %) como un sólido blanquecino: RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,36 (s.a., 1H), 7,00 (m, 1H), 5,97 (d,  $J$  = 3,1 Hz, 1H), 5,58 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 1H), 4,77 (dd,  $J$  = 6,2 Hz, 3,2 Hz, 1H), 4,68 (dd,  $J$  = 6,3 Hz, 3,2 Hz, 1H), 4,22 (d,  $J$  = 3,2 Hz, 1H), 1,59 (s, 3H), 1,36 (s, 3H), 0,92 (s, 9H), 0,11 (s, 3H), 0,10 (s, 3H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  149,0, 145,4, 131,4, 114,1, 98,3, 90,8, 85,5, 84,5, 80,2, 27,4, 25,9 (3C), 25,5, 18,4, -5,4, -5,5; EMAR calc. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{D}_2\text{N}_3\text{O}_6\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 416,21804, hallado: 416,21827.

35 45 A una solución en agitación de **S34** (0,416 g, 1,00 mmol) en THF (5 ml) a 0 °C bajo nitrógeno se le añadió una

solución 1,0 M de TBAF en THF (1,50 ml, 1,5 mmol) y se mantuvo la mezcla resultante a 0 °C durante 24 horas. Se concentró la mezcla de reacción por evaporación rotatoria y la cromatografía ultrarrápida automatizada (columna de 40 g, gradiente del 0 al 8 % de metanol en diclorometano) dio **S35** (0,257 g, 85 %) como un sólido blanco: RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,02 (m, 1H), 5,81 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 5,58 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 4,86 (dd, *J* = 6,4 Hz, 3,2 Hz, 1H), 4,79 (dd, *J* = 6,5 Hz, 3,6 Hz, 1H), 4,09 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H), 1,54 (s, 3H), 1,34 (s, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 151,3, 146,2, 133,4, 115,2, 99,4, 92,9, 87,2, 84,9, 82,1, 27,6, 25,6; EMAR calc. para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>D<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 302,13157, hallado: 302,13130.

- 5 A una solución en agitación de **S35** (0,140 g, 0,465 mmol) en metanol (8,4 ml) y agua (0,93 ml) a t.a., se le añadió Dowex 50WX8 en forma de hidrógeno (0,30 g) y se agitó la mezcla a t.a. durante 24 horas. Se filtró la mezcla de reacción y se concentró el filtrado por evaporación rotatoria. La cromatografía ultrarrápida automatizada (columna de 40 g, gradiente del 5 al 20 % de metanol en diclorometano) dio el compuesto del título (0,050 g, 41 %) como un sólido blanquecino: RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,17 (m, 1H), 5,86 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 5,60 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 4,15 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 4,11 (dd, *J* = 5,6 Hz, 3,5 Hz, 1H), 3,94 (d, *J* = 3,8 Hz, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 151,8, 146,3, 132,2, 99,3, 89,7, 86,0, 74,6,71,7, EMAR calc. para C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>D<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 260,08571, hallado: 260,08578.
- 10
- 15

## Ejemplo de referencia 8: síntesis de EIDD-2898



5 Reactivos y condiciones; a) Acetona,  $H_2SO_4$ , 2,2-DMP, TA, 12 h, 80-85 %; b) Boc-L-Val-OH, DCC, DMAP, DCM, TA 5-6 h; c) 1,2,4-triazol,  $POCl_3$ , trietilamina, MeCN; d)  $NH_2OH$  al 50 % en agua, MeCN; e) HCl conc., MeOH, TA, 24 h

10 Se cargó un MFR de 3 bocas de 2 l con 1-[(3R,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2-il]pirimidina-2,4-diona (61,4 g, 251,43 mmol) y acetona (1400 ml). Se agitó la suspensión resultante a TA y se añadió ácido sulfúrico (2 ml). Se continuó agitando durante la noche. Se desactivó la solución incolora transparente y se ajustó a pH básico con 100 ml de trimetilamina. Se concentró la solución bruta bajo presión reducida para proporcionar un aceite amarillo pálido. Se disolvió el residuo en 600 ml de EtOAc y se lavó con agua x 2, bicarb. x 2, agua, salmuera x 2 y se secó sobre sulfato sódico. Se concentró la solución incolora bajo presión reducida para proporcionar 1-[(3aR,6R,6aR)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetyl-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-il]pirimidin-2,4-diona (45 g) como un sólido blanco.

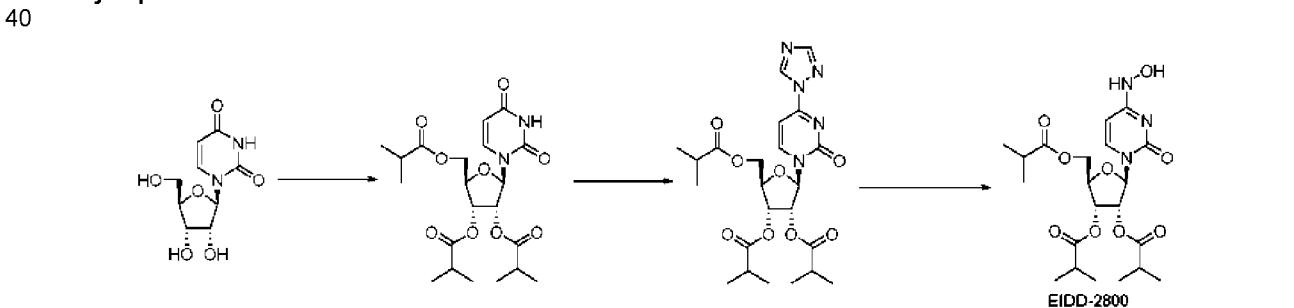
20 Se cargó un MFR de 200 ml con 1-[(3aR,6R,6aR)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetyl-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-il]pirimidin-2,4-diona (2,36 g, 8,3 mmol) y DCM (50 ml). Se agitó la reacción hasta que se formó una solución. Seguidamente, se añadieron ácido (2S)-2-(terc-butoxicarbonilamino)-3-metil-butanoico (2,16 g, 9,96 mmol) y

N,N-dimetilpiridin-4-amina (0,1 g, 0,8300 mmol). Se enfrió la reacción hasta 0 °C con un baño de hielo. Se añadió lentamente una solución en DCM de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (2,06 g, 9,96 mmol). Se permitió que la mezcla de reacción alcanzara la t.a. Seguimiento por TLC (EtOAc).

- 5 Se formó un precipitado (DCU) después de aproximadamente 1 h y no se detectó material de partida después de 3 h. Se separaron los sólidos por filtración y se enjuagó con EtOAc. Se lavó el filtrado con agua, salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se concentró bajo presión reducida para proporcionar un sólido blanco pegajoso. Se trituró el sólido gomoso con éter y se filtró para retirar el sólido. Se concentró el filtrado bajo presión reducida para proporcionar aproximadamente 8 g de un aceite espeso viscoso. Se purificó el producto por SGC, se agruparon las fracciones 6-25 y se concentró bajo presión reducida para proporcionar (2S)-2-(terc-butoxicarbonilamino)-3-metil-butanato de [(3aR,6R,6aR)-4-(2,4-dioxopirimidin-1-il)-2,2-dimetil-3a,4,6,6a-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-6-il]metilo (3,8 g, 7,8592 mmol, rendimiento de un 94,667 %) como un sólido blanco espumoso después de secarse a vacío.
- 10 15 Se tomó 1,2,4-triazol en acetonitrilo anhídrico y se agitó a TA después de 30 min, se enfrió la mezcla de reacción hasta 0 °C y se añadió POCl<sub>3</sub> gota a gota y se continuó agitando durante 2 h. Después de 2 h, se añadió trietilamina gota a gota y se continuó agitando durante 1 h, se llevó lentamente la mezcla de reacción hasta TA y se añadió el sustrato derivado de uridina de la reacción anterior como solución en acetonitrilo. Se agitó la mezcla de reacción a TA durante la noche. Después de que finalizara la reacción, se retiró el disolvente bajo presión reducida y se tomó en DCM y se extrajo con agua. Se secó la capa orgánica sobre sulfato sódico anhídrico y se concentró bajo presión reducida. Se purificó el producto bruto por cromatografía en columna ultrarrápida.
- 20 25 Se tomó 1,2,4-triazol en acetonitrilo (10 ml/g) se le añadió gota a gota hidroxilamina al 50 % en agua y se agitó a t.a. durante 2-3 h. Después de que finalizara la reacción, se retiró el disolvente bajo presión reducida y se purificó el producto bruto por cromatografía en columna ultrarrápida usando hexano y EtOAc como eluyente.

- 30 35 Se tomó 1 g de sustrato en 20 ml de metanol y se trató con 2 ml de HCl conc. (al 36 %) y después de 3-4 h se observó un 30 % de finalización. Se añadieron otros 5 ml de HCl conc. y se agitó durante la noche. Después de que finalizara la reacción, se retiró el disolvente y se tomó el producto bruto en lo mínimo de metanol y se añadió gota a gota a un exceso de éter dietílico con agitación, el producto se sacó de la solución y se dejó sedimentar, se decantó el éter y se añadió éter nuevo, se agitó, se sedimentó y se decantó, se repitió el mismo procedimiento dos veces. Después de decantar el éter, se secó el sólido en un evaporador rotatorio y alto vacío para obtener un sólido blanco suelto. El éter quedó atrapado en el sólido y fue difícil de retirar. Se disolvió el sólido en metanol, se evaporó y se secó para obtener una espuma incolora, que todavía contiene metanol. Se tomó la espuma en agua y se observó una solución violeta. Se purificó la solución violeta por cromatografía en columna ISCO de fase inversa usando agua y acetonitrilo. Se evaporaron las fracciones que contienen el producto bajo presión reducida y se liofilizó para obtener un sólido incoloro.

#### Ejemplo de referencia 9: síntesis de EIDD-2800

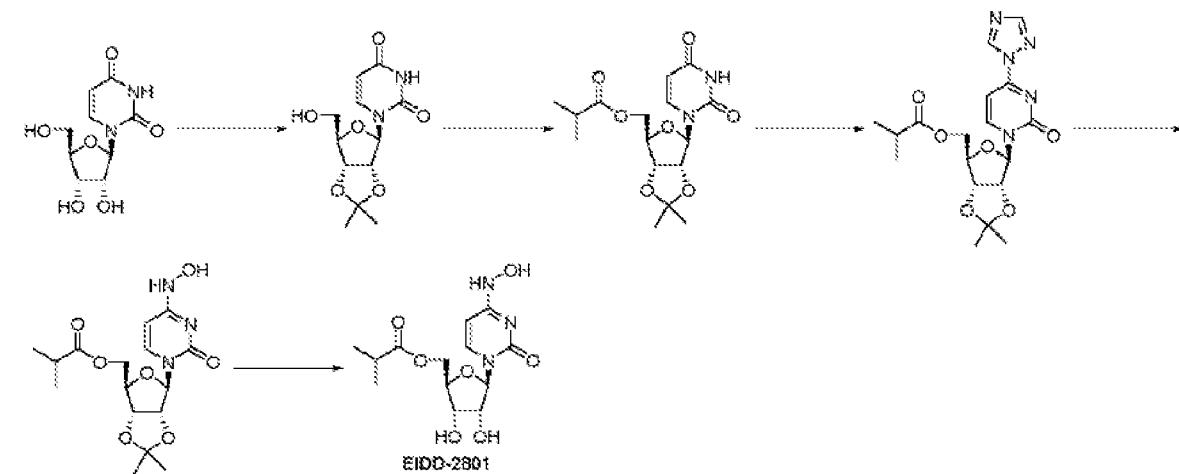


- 45 50 Se cargó un matraz de fondo redondo de 1 l de 3 bocas equipado con un agitador de hélice, una sonda de temperatura y un embudo de adición con uridina (25 g, 102,38 mmol) y acetato de etilo (500 ml). Se agitó la suspensión blanca a temperatura ambiente mientras se añadían trietilamina (71,39 ml, 511,88 mmol) y DMAP (0,63 g, 5,12 mmol) a la mezcla. Se enfrió la suspensión en un baño de hielo y se añadió lentamente anhídrido isobutírico (56,02 ml, 337,84 mmol) a la mezcla de reacción durante un período de 5 minutos. La temperatura aumentó 25 °C durante la adición. Se agitó la suspensión resultante a temperatura ambiente y se realizó seguimiento por TLC. Después de 1 hora, se había formado una solución incolora transparente y la TLC no mostró ningún material de partida. Se desactivó la reacción con 200 ml de agua y se agitó a t.a. durante 20 minutos. Se separaron las capas y se lavaron los extractos orgánicos con agua (2 x 100 ml), solución de bicarbonato acuosa saturada (100 ml x 2), 100 ml de agua, salmuera (100 ml x 2) y a continuación se secaron sobre sulfato sódico. Se filtraron los extractos orgánicos y se concentró el filtrado bajo presión reducida a 45 °C para proporcionar un aceite amarillo. Se usó el aceite en la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.
- 55 60 Se cargó un matraz de 3 bocas de 2 l equipado con una entrada de argón, un agitador de hélice y una sonda de

temperatura con 1H-1,2,4-triazol (50,88 g, 736,68 mmol), trietilamina (114,17 ml, 818,54 mmol) y MeCN (350 ml). Se agitó la mezcla de reacción a t.a. durante 20 minutos. Se añadió una solución de acetato de etilo (350 ml) de 2-metilpropanoato de [(2R,3R,4R)-5-(2,4-dioxopirimidin-1-il)-3,4-bis(2-metilpropanoiloxy)tetrahidrofuran-2-il]metilo (46,5 g, 102,32 mmol) y se enfrió la mezcla hasta <5 °C usando un baño de hielo. Se continuó agitando durante 20 minutos. Seguidamente, se añadió lentamente oxicloruro de fósforo(V) (14,35 ml, 153,48 mmol) bajo argón a menos de 20 °C durante 15 minutos. Se realizó seguimiento a la reacción por TLC (EtOAc al 100 %), se consumió el material de partida ( $R_f = 0,89$ ) en menos de 2 horas y un nuevo punto debido al producto ( $R_f = 0,78$ ) estaba presente. Se desactivó la reacción con 500 ml de agua y 400 ml de EtOAc. Se dejó agitar la reacción desactivada a t.a. durante 15 minutos. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con agua (2 x 100 ml), 200 ml de HCl 0,5 N y salmuera (2 x 100 ml). Se secaron los extractos orgánicos sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar 2-metilpropanoato de [(2R,3R,4R)-3,4-bis(2-metilpropanoiloxy)-5-[2-oxo-4-(1,2,4-triazol-1-il)pirimidin-1-il]tetrahidrofuran-2-il]metilo (49 g, 96,93 mmol, rendimiento de un 94,735 %) como un aceite amarillo. Se usó el material bruto en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Se cargó un matraz de fondo redondo de 500 ml con 2-metilpropanoato de [(2R,3R,4R)-3,4-bis(2-metilpropanoiloxy)-5-[2-oxo-4-(1,2,4-triazol-1-il)pirimidin-1-il]tetrahidrofuran-2-il]metilo (48,9 g, 96,73 mmol), acetato de etilo (400 ml) y alcohol isopropílico (100 ml). Se agitó la mezcla de reacción a t.a. hasta que se disolvió todo el material de partida. Se trató la solución naranja con hidroxilamina (6,52 ml, 106,41 mmol) y se agitó la solución amarillo pálido resultante a t.a. y se realizó seguimiento por TLC (EtOAc). No se observó ningún material de partida después de 1 hora. Se desactivó la reacción con 500 ml de agua y se separaron las capas. Se lavaron los extractos orgánicos con 100 ml de agua, 100 ml x 2 de salmuera y a continuación se secaron sobre sulfato sódico. Se filtraron los extractos orgánicos y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto bruto. Se disolvió el producto bruto en 180 ml de MTBE caliente y se dejó enfriar hasta t.a. Se añadieron los cristales semilla y se colocó el matraz en el congelador. Se recogió el sólido blanco que se formó por filtración, se lavó con una cantidad mínima de MTBE y se secó a vacío para proporcionar el producto deseado.

#### Ejemplo 10: síntesis de EIDD-2801



Se cargó un matraz de fondo redondo de 1 l con uridina (25 g, 102,38 mmol) y acetona (700 ml). Se dejó agitar la mezcla de reacción a t.a. A continuación, se trató la suspensión con ácido sulfúrico (0,27 ml, 5,12 mmol). Se dejó que continuara la agitación a t.a. durante 18 horas. Se desactivó la reacción con 100 ml de trimetilamina y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Se cargó un matraz de fondo redondo de 1 l con la mezcla de reacción de la reacción previa. A continuación, se añadieron trietilamina (71,09 ml, 510,08 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (0,62 g, 5,1 mmol). Se enfrió el matraz usando un baño de hielo y a continuación se añadió lentamente 2-metilpropanoato de 2-metilpropanoilo (17,75 g, 112,22 mmol). Se dejó agitar la mezcla de reacción a t.a. hasta que finalizó la reacción. Se concentró la mezcla de reacción bajo presión reducida y se disolvió el residuo en 600 ml de acetato de etilo y se lavó con solución de bicarbonato acuosa saturada x 2, agua x 2 y salmuera x 2. Se secaron los extractos orgánicos sobre sulfato sódico y se concentró bajo presión reducida para proporcionar un aceite incoloro transparente. Se usó el producto bruto en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Se cargó un matraz de fondo redondo de 1 l con el producto bruto de anteriormente (36 g, 101,59 mmol) y MeCN (406,37 ml). Se dejó agitar la mezcla de reacción hasta que se disolvió todo el material de partida. Seguidamente, se añadió 1,2,4-triazol (50,52 g, 731,46 mmol) seguido de la adición de N,N-dietiletanamina (113,28 ml, 812,73 mmol). Se dejó agitar la mezcla de reacción a t.a. hasta que se disolvieron todos los sólidos. A

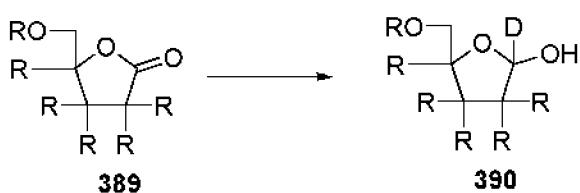
continuación, se enfrió la reacción hasta 0 °C usando un baño de hielo. Se añadió lentamente oxícloruro de fósforo (24,44 ml, 152,39 mmol). Se dejó agitar la suspensión que se formó bajo argón mientras se permitió que alcanzara lentamente la t.a. A continuación, se dejó agitar la reacción hasta que finalizó por TLC (EtOAc). A continuación, se desactivó la reacción por la adición de 100 ml de agua. A continuación, la suspensión se volvió una solución de color oscuro, que a continuación se concentró bajo presión reducida. Se disolvió el residuo en DCM y se lavó con agua y salmuera. A continuación, se secaron los extractos orgánicos sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró bajo presión reducida. Se purificó el producto por cromatografía en gel de sílice (2 columnas de 330 g). Se recogieron todas las fracciones que contenían producto y se concentró bajo presión reducida.

5 10 Se cargó un matraz de fondo redondo de 500 ml con el producto de la etapa previa (11,8 g, 29,11 mmol) y alcohol isopropílico (150 ml). Se dejó agitar la mezcla de reacción a t.a. hasta que se disolvieron todos los sólidos. Seguidamente, se añadió hidroxilamina (1,34 ml, 43,66 mmol) y se continuó agitando a temperatura ambiente. Cuando finalizó la reacción (HPLC), se retiró parte del disolvente a alto vacío a temperatura ambiente. Se retiró el disolvente restante bajo presión reducida a 45 °C. Se disolvió el residuo resultante en EtOAc y se lavó con agua y salmuera. Se secaron los extractos orgánicos sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar un aceite. Cristales formados tras reposar a t.a. Se recogieron los cristales por filtración, se lavó con éter x 3 y se secó a vacío para proporcionar el producto como un sólido blanco.

15 20 Se cargó un matraz de fondo redondo de 200 ml con el producto de la etapa previa (6,5 g, 17,6 mmol) y ácido fórmico (100 ml, 2085,6 mmol). Se dejó agitar la mezcla de reacción a t.a. durante la noche. Se realizó seguimiento del progreso de la reacción por HPLC. Se concentró la mezcla de reacción bajo presión reducida a 42 °C para proporcionar un aceite rosa pálido transparente. Seguidamente, se añadieron 30 ml de etanol. A continuación, se retiró el disolvente bajo presión reducida. Se añadió MTBE (50 ml) al sólido y se calentó. Seguidamente, se añadió alcohol isopropílico y se continuó calentando hasta que todo el material sólido se disolvió (5 ml). A continuación, se dejó enfriar la solución y reposar a t.a. Comenzó a formarse un sólido después de aproximadamente 1 h. Se recogieron los sólidos por filtración, se lavó con MTBE y se secó a vacío para proporcionar el EIDD-2801 como un sólido blanco. Se concentró el filtrado bajo presión reducida para proporcionar un sólido pegajoso, que se disolvió en una pequeña cantidad de alcohol isopropílico con calentamiento. Se dejó reposar la solución a t.a. durante la noche. Se formó un sólido en el matraz, que se recogió por filtración, se enjuagó con alcohol isopropílico y MTBE, y se secó a vacío para obtenerse una tanda adicional del producto deseado.

25 30 Se disolvió EIDD-2801 (25 g) en 250 ml de alcohol isopropílico calentando hasta 70 °C para dar una solución transparente. Se filtró con precisión la solución tibia y se transfirió el filtrado a un matraz de tres bocas de 2 l con agitador de hélice. Se calentó nuevamente hasta 70 °C y se añadió lentamente MTBE (250 ml) al matraz. Se sembró la solución transparente y se dejó enfriar lentamente hasta t.a. con agitación durante 18 h. Se filtró el sólido EIDD-2801 que se formó y se lavó con MTBE y se secó a 50 °C a vacío durante 18 horas. Se concentró el filtrado, se redisolvió en 50 ml de alcohol isopropílico y 40 ml de MTBE calentando para dar una solución transparente y se dejó reposar a t.a. para dar una segunda tanda de EIDD-2801.

35 40 **Ejemplo de referencia 11: síntesis general para la deuteración**



45 50 Se añadió la lactona **389** (0,0325 mol) a un matraz seco bajo atmósfera de argón y, a continuación, se disolvió en THF seco (250 ml). A continuación, se enfrió la solución hasta -78 °C y se añadió gota a gota una solución de DIBAL-D en tolueno (0,065 mol). Se dejó agitar la reacción a -78 °C durante 3-4 horas. A continuación, se desactivó la reacción con la adición lenta de agua (3 ml). A continuación, se dejó agitar la reacción mientras se calentaba a t.a. A continuación, se diluyó la mezcla con dos volúmenes de éter dietílico y, a continuación, se vertió en un volumen igual de solución de tartrato sódico y potásico saturada. Se separó la capa orgánica, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró bajo presión reducida. Se purificó el residuo sobre sílice eluyendo con hexanos/acetato de etilo. A continuación, el lactol **390** resultante se convirtió en un acetato o benzoilato y se sometió a condiciones de acoplamiento de citosina y a continuación se desarrolló adicionalmente hasta N-hidroxicitidina.

55 **Ejemplo 12: protocolos de ensayo**

Ensayos de cribado para VDEN, VJE, VPOW, VNO, VFA, VPT, VFVR, VCHIK, VEEE, VEEV, VEEO, VTCR, CVP, VJUN, VMPRL

60 **Ensayo de reducción del efecto citopático principal (ECP).**

Se realizan ensayos de inhibición de ECP a cuatro concentraciones. Se preparan monocapas de cultivo celular confluentes o casi confluentes en microplacas desechables de 96 pocillos. Se mantienen las células en MEM o DMEM complementado con SFB como se requiera para cada línea celular. Para los ensayos antivíricos, se usa el mismo medio pero con SFB reducido a un 2 % o menos y complementado con 50 µg/ml de gentamicina. El compuesto de prueba se prepara a cuatro concentraciones finales logarítmicas en base 10, normalmente 0,1, 1,0, 10 y 100 µg/ml o µM. Los pocillos de control vírico y control celular están en cada microplaca. Paralelamente, se somete a prueba un fármaco activo conocido como fármaco de control positivo usando el mismo procedimiento que se aplica para los compuestos de prueba. El control positivo se somete a prueba con cada serie de pruebas. El ensayo se establece retirando en primer lugar el medio de crecimiento de las placas de células de 96 pocillos. A continuación, se aplica el compuesto de prueba en un volumen de 0,1 ml a los pocillos a una concentración 2X. El virus, normalmente en una dosis infecciosa en cultivo celular (DICC<sub>50</sub>) al 50 % <100 en un volumen de 0,1 ml, se coloca en los pocillos designados para la infección por virus. Se coloca medio desprovisto de virus en los pocillos de control de toxicidad y en los pocillos de control celular. Los pocillos de control vírico se tratan de forma similar con virus. Se incuban las placas a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % hasta que se observa el ECP máximo en los pocillos de control vírico. A continuación, se tiñen las placas con rojo neutro al 0,011 % durante aproximadamente dos horas a 37 °C en una estufa de incubación con CO<sub>2</sub> al 5 %. Se retira el medio rojo neutro por aspiración completa y se pueden enjuagar las células 1X con solución tamponada con fosfato (PBS) para retirar el tinte residual. Se retira completamente el PBS y se eluye el rojo neutro incorporado con tampón citrato de Sorensen al 50 %/etanol al 50 % (pH 4,2) durante al menos 30 minutos. El tinte rojo neutro penetra en las células vivas, por tanto, cuanto más intenso es el color rojo, mayor es el número de células viables presentes en los pocillos. Se cuantifica el contenido de tinte en cada pocillo usando un espectrofotómetro de 96 pocillos a una longitud de onda de 540 nm. Se convierte el contenido de tinte en cada conjunto de pocillos en un porcentaje de tinte presente en los pocillos de control sin tratar usando una hoja de cálculo basada en ordenador Excel de Microsoft. A continuación, se calculan las concentraciones eficaces al 50 % (CE<sub>50</sub>, inhibidora de virus) y las concentraciones citotóxicas al 50 % (CC<sub>50</sub>, inhibidora de células) por análisis de regresión lineal. El cociente de CC<sub>50</sub> dividido entre CE<sub>50</sub> da el valor del índice de selectividad (IS).

#### Ensayo de reducción de rendimiento de virus (RRV)/ECP secundario.

Este ensayo implica una metodología similar a lo que se describe en los párrafos previos usando microplacas de células de 96 pocillos. En esta sección se indican las diferencias. Se someten a prueba ocho concentraciones semilogarítmicas en base 10 de inhibidor para determinar la actividad antivírica y la citotoxicidad. Después de que se produzca suficiente replicación del virus, se toma una muestra de sobrenadante de cada pocillo infectado (se agrupan tres pocillos replicados) y se guarda para la porción de RRV de esta prueba, si es necesario. De forma alternativa, se puede preparar una placa separada y se puede congelar la placa para el ensayo de RRV. Después de que se observe el ECP máximo, se tiñen las placas viables con tinte rojo neutro. Se cuantifica el contenido de tinte incorporado como se describe anteriormente. Los datos generados a partir de esta porción de la prueba son valores de CE<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> e IS de rojo neutro. Los compuestos que se ha observado anteriormente que son activos se evalúan además por el ensayo de RRV. La prueba de RRV es una determinación directa de cuánto inhibe el compuesto de prueba la replicación del virus. Se valora el virus que se replicó en presencia del compuesto de prueba y se compara con el virus de los controles infectados no tratados. La valoración de muestras víricas agrupadas (recogidas como se describe anteriormente) se realiza por dilución de punto final. Esto se logra valorando diluciones logarítmicas en base 10 de virus usando 3 o 4 micropocillos por dilución en monocapas recién preparadas de células por dilución de punto final. Se puntúan los pocillos en función de la presencia o ausencia de virus después de que se observe un ECP distintivo (medido por la captación de rojo neutro). Trazar el log<sub>10</sub> de la concentración de inhibidor frente al log<sub>10</sub> de virus producido a cada concentración permite el cálculo de la concentración eficaz al 90 % (un log<sub>10</sub>) por regresión lineal. La división de la CE<sub>90</sub> entre la CC<sub>50</sub> obtenida en la parte 1 del ensayo da el valor de IS para esta prueba.

#### Ejemplo 13: ensayos de cribado para el virus de la fiebre de Lassa (LASV)

##### Ensayo principal del virus de la fiebre de Lassa.

Se preparan monocapas de cultivo celular confluentes o casi confluentes en placas de cultivo celular desechables de 12 pocillos. Se mantienen las células en DMEM complementado con SFB al 10 %. Para los ensayos antivíricos se usa el mismo medio, pero con SFB reducido al 2 % o menos y complementado con penicilina/estreptomicina al 1 %. El compuesto de prueba se prepara a cuatro concentraciones finales logarítmicas en base 10, normalmente 0,1, 1,0, 10 y 100 µg/ml o µM. El control vírico y el control celular se realizarán en paralelo con cada compuesto sometido a prueba. Además, se somete a prueba un fármaco activo conocido como fármaco de control positivo usando la misma configuración experimental como se describe para el control vírico y celular. El control positivo se somete a prueba con cada serie de pruebas. El ensayo se establece retirando en primer lugar el medio de crecimiento de las placas de células de 12 pocillos e infectando las células con 0,01 MOI de la cepa Josiah del LASV. Se incubarán las células durante 90 min: 500 µl de inóculo/pocillo M12, a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % con movimiento suave constante. Se retirarán los inóculos y se lavarán las células 2X con el medio. A continuación, se aplica el compuesto de prueba en 1 ml del volumen total del medio. Se recogerá el sobrenadante del cultivo tisular (SCT) en

los puntos temporales apropiados. A continuación, se usará el SCT para determinar el efecto inhibidor de los compuestos sobre la replicación del virus. Se valora el virus que se replicó en presencia del compuesto de prueba y se compara con el virus de los controles infectados no tratados. Para la valoración de SCT, se prepararán diluciones sucesivas 1:10 y se usarán para infectar monocapas recién preparadas de células. Se cubrirán las células con agarosa al 1 % mezclada 1:1 con 2X MEM complementado con SFB al 10 % y penicilina al 1 %, y se determinará el número de calvas. Trazar el  $\log_{10}$  de la concentración de inhibidor frente al  $\log_{10}$  de virus producido a cada concentración permite el cálculo de la concentración eficaz al 90 % (un  $\log_{10}$ ) por regresión lineal.

#### Ensayo secundario del virus de la fiebre de Lassa.

El ensayo secundario implica una metodología similar a lo que se describe en los párrafos previos usando placas de células de 12 pocillos. En esta sección se indican las diferencias. Se infectan las células como se describe anteriormente, pero esta vez se cubren con agarosa al 1 % diluida 1:1 con 2X MEM y complementada con SFB al 2 % y penicilina/estreptomicina al 1 % y complementada con la concentración de fármaco correspondiente. Se incubarán las células a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 6 días. A continuación, se retira la capa superpuesta y se tiñen las placas con violeta de cristal al 0,05 % en formalina tamponada al 10 % durante aproximadamente veinte minutos a t.a. A continuación, se lavan las placas, se secan y se hace un recuento del número de calvas. El número de calvas en cada conjunto de dilución de compuesto se convierte a un porcentaje en relación con el control vírico sin tratar. A continuación, se calculan las concentraciones eficaces al 50 % (CE<sub>50</sub>, inhibidora de virus) por análisis de regresión lineal.

#### Ejemplo 14: ensayos de cribado del virus del Ébola (VEBO) y el virus de Nipah (VNI)

##### Ensayo principal del virus del Ébola/Nipah.

Se realizan ensayos de reducción de calvas a cuatro concentraciones. Se preparan monocapas de cultivo celular confluentes o casi confluentes en placas de cultivo celular desechables de 12 pocillos. Se mantienen las células en DMEM complementado con SFB al 10 %. Para los ensayos antivíricos se usa el mismo medio, pero con SFB reducido al 2 % o menos y complementado con penicilina/estreptomicina al 1 %. El compuesto de prueba se prepara a cuatro concentraciones finales logarítmicas en base 10, normalmente 0,1, 1,0, 10 y 100 µg/ml o µM. El control vírico y el control celular se realizarán en paralelo con cada compuesto sometido a prueba. Además, se somete a prueba un fármaco activo conocido como fármaco de control positivo usando la misma configuración experimental como se describe para el control vírico y celular. El control positivo se somete a prueba con cada serie de pruebas. El ensayo se establece retirando primero el medio de crecimiento de las placas de células de 12 pocillos. A continuación, se aplica el compuesto de prueba en un volumen de 0,1 ml a los pocillos a una concentración 2X. Se coloca el virus, normalmente a aproximadamente 200 unidades formadoras de calvas en un volumen de 0,1 ml, en los pocillos designados para la infección por virus. Se coloca medio desprovisto de virus en los pocillos de control de toxicidad y en los pocillos de control celular. Los pocillos de control vírico se tratan de forma similar con virus. Se incuban las placas a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % durante una hora. Se retirarán los inóculos de compuestos de virus, se lavarán las células y se cubrirán con tragacanto al 1,6 % diluido 1:1 con 2X MEM y complementado con SFB al 2 % y penicilina/estreptomicina al 1 % y complementado con la concentración de fármaco correspondiente. Se incubarán las células a 37 °C con de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 10 días. A continuación, se retira la capa superpuesta y se tiñen las placas con violeta de cristal al 0,05 % en formalina tamponada al 10 % durante aproximadamente veinte minutos a t.a. A continuación, se lavan las placas, se secan y se hace un recuento del número de calvas. El número de calvas en cada conjunto de dilución de compuesto se convierte a un porcentaje en relación con el control vírico sin tratar. A continuación, se calculan las concentraciones eficaces al 50 % (CE<sub>50</sub>, inhibidora de virus) por análisis de regresión lineal.

##### Ensayo secundario del virus del Ébola/Nipah con componente de RRV.

El ensayo secundario implica una metodología similar a lo que se describe en los párrafos previos usando placas de células de 12 pocillos. En esta sección se indican las diferencias. Se someten a prueba ocho concentraciones semilogarítmicas en base 10 de inhibidor para determinar la actividad antivírica. Se somete a prueba un fármaco de control positivo por lote de compuestos evaluados. Para este ensayo, se infectan las células con virus. Se infectan las células como se describe anteriormente, pero esta vez se incuban con DMEM complementado con SFB al 2 % y penicilina/estreptomicina al 1 % y complementada con la concentración de fármaco correspondiente. Se incubarán las células durante 10 días a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %, observando todos los días bajo el microscopio el número de células fluorescentes verdes. Se tomarán diariamente alícuotas de sobrenadante de las células infectadas y se agrupan los tres pocillos replicados. A continuación, se usan los sobrenadantes agrupados para determinar el efecto inhibidor de los compuestos sobre la replicación del virus. Se valora el virus que se replicó en presencia del compuesto de prueba y se compara con el virus de los controles infectados no tratados. Para la valoración de muestras víricas agrupadas, se prepararán diluciones sucesivas 1:10 y se usarán para infectar monocapas recién preparadas de células. Se cubren las células con tragacanto y se determina el número de calvas. Trazar el  $\log_{10}$  de la concentración de inhibidor frente al  $\log_{10}$  de virus producido a cada concentración permite el cálculo de la concentración eficaz al 90 % (un  $\log_{10}$ ) por regresión lineal.

**Ejemplo 15: ensayo de citoprotección contra el virus del dengue**

Preparación de las células: se pasaron células BHK21 (células renales de hámster dorado sirio, n.º de catálogo ATCC CCL-1 0), células Vero (células renales de mono verde africano, n.º de catálogo ATCC CCL-81) o células

5 Huh-7 (carcinoma hepatocelular humano) en DMEM complementado con SFB al 10 %, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina en matraces T-75 antes de su uso en el ensayo antivírico. El día que precedió al ensayo, se dividieron las células 1:2 para garantizar que estaban en una fase de crecimiento exponencial en el momento de la infección. Se realizó la cuantificación de la viabilidad y las células totales usando un hemocitómetro y exclusión con tinte azul tripano. La viabilidad celular fue mayor de un 95 % para las células que

10 se iban a utilizar en el ensayo. Se resuspendieron las células a  $3 \times 10^3$  ( $5 \times 10^5$  para células Vero y células Huh-7) células por pocillo en medio de cultivo tisular y se añadieron a placas de microvaloración de fondo plano en un volumen de 100 µl. Se incubaron las placas a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche para permitir la adherencia celular. Se observó que las monocapas tenían aproximadamente un 70 % de confluencia.

15 Preparación del virus: se obtuvo la cepa C de Nueva Guinea del virus del dengue de tipo 2 del ATCC (n.º de catálogo VR-1584) y se cultivó en células LLC-MK2 (células renales de macaco de la India; n.º de catálogo CCL-7.1) para la producción de reservas de virus madre. Se retiró del congelador (-80 °C) una alícuota de virus previamente valorada en células BHK21 y se dejó descongelar lentamente a t.a. en un armario de seguridad biológica. Se resuspendió el virus y se diluyó en medio de ensayo (DMEM complementado con SFB inactivado por calor al 2 %, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina) de modo que la cantidad de virus añadida a cada pocillo en un volumen de 100 µl fuera la cantidad determinada para proporcionar de un 85 a un 95 % de muerte celular 6 días después de la infección.

25 Formato de placas: cada placa contiene pocillos de control celular (solo células), pocillos de control vírico (células más virus), pocillos de toxicidad de fármaco triplicados por compuesto (células más fármaco solo), así como pocillos experimentales triplicados (fármaco más células más virus).

30 Eficacia y toxicidad con XTT: tras la incubación a 37 °C en una estufa de incubación con CO<sub>2</sub> al 5 %, se tiñeron las placas de prueba con el tinte de tetrazolio XTT (hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio). El tetrazolio-XTT se metabolizó por las enzimas mitocondriales de las células metabólicamente activas para dar un producto de formazán soluble, lo que permitió un análisis cuantitativo rápido de la inhibición de la muerte celular inducida por virus por sustancias de prueba antivíricas. La solución de XTT se preparó diariamente como una solución madre de 1 mg/ml en RPMI 1640. Se preparó una solución de metosulfato de fenacina (PMS) a 0,15 mg/ml en PBS y se almacenó en la oscuridad a -20 °C. Se preparó solución madre de XTT/PMS de inmediato antes de su uso añadiendo 40 µl de PMS por ml de solución de XTT. Se añadieron cincuenta microlitros de XTT/PMS a cada pocillo de la placa y se volvió a incubar la placa durante 4 horas a 37 °C. Se sellaron las placas con selladores de placas adhesivos y se agitaron suavemente o se invirtieron varias veces para mezclar el producto de formazán soluble y se leyó la placa

35 espectrofotométricamente a 450/650 nm con un lector de placas Vmax de Molecular Devices.

40 Análisis de datos: se recogieron datos sin procesar del programa informático Softmax Pro 4.6 y se importaron a una hoja de cálculo Excel de Microsoft para su análisis. Se calculó el porcentaje de reducción en el efecto citopático vírico en comparación con los controles víricos no tratados para cada compuesto. Se calculó el porcentaje del valor de control celular para cada compuesto comparando las células no infectadas tratadas con fármaco con las células no infectadas en medio solo.

**Ejemplo 16: ensayo de citoprotección contra el VRS:**

50 Preparación de las células: se pasaron células HEp2 (células epiteliales humanas, n.º de catálogo ATCC CCL-23) en DMEM complementado con SFB al 10 %, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, piruvato sódico 1 mM y NEAA 0,1 mM en matraces T-75 antes de su uso en el ensayo antivírico. El día que precedió al ensayo, se dividieron las células 1:2 para garantizar que estaban en una fase de crecimiento exponencial en el momento de la infección. Se realizó la cuantificación de la viabilidad y las células totales usando un hemocitómetro y exclusión con tinte azul tripano. La viabilidad celular fue mayor de un 95 % para las células que

55 se iban a utilizar en el ensayo. Se resuspendieron las células a  $1 \times 10^4$  células por pocillo en medio de cultivo tisular y se añadieron a placas de microvaloración de fondo plano en un volumen de 100 µl. Se incubaron las placas a

37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche para permitir la adherencia celular. Preparación del virus: se obtuvo la cepa Long del VRS y la cepa 9320 del VRS de ATCC (n.º de catálogo VR-26 y n.º de catálogo VR-955, respectivamente) y se cultivaron en células HEp2 para la producción de reservas de virus madre. Se retiró del congelador (-80 °C)

60 una alícuota de virus previamente valorada y se dejó descongelar lentamente hasta t.a. en un armario de seguridad biológica. Se resuspendió el virus y se diluyó en medio de ensayo (DMEM complementado con SFB inactivado por calor al 2 %, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, piruvato sódico 1 mM y MNEAA 0,1 mM) de modo que la cantidad de virus añadida a cada pocillo en un volumen de 100 µl fuera la cantidad determinada para proporcionar de un 85 a un 95 % de muerte celular 6 días después de la infección.

65 Eficacia y toxicidad con XTT: se tiñeron las placas y se analizaron como se describe previamente para el ensayo de citoprotección contra el virus del dengue.

**Ejemplo 17: ensayo de citoprotección contra el virus de la gripe**

5 Preparación de las células: se pasaron células MOCK (células renales caninas, n.º de catálogo ATCC CCL-34) en  
 10 DMEM complementado con SFB al 10 %, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, piruvato sódico 1 mM y NEAA 0,1 mM en matraces T-75 antes de su uso en el ensayo antivírico. El día que precedió al ensayo, se dividieron las células 1:2 para garantizar que estaban en una fase de crecimiento exponencial en el momento de la infección. Se realizó la cuantificación de la viabilidad y las células totales usando un hemocitómetro y exclusión con tinte azul tripano. La viabilidad celular fue mayor de un 95 % para las células que  
 15 se iban a utilizar en el ensayo. Se resuspendieron las células a  $1 \times 10^4$  células por pocillo en medio de cultivo tisular y se añadieron a placas de microvaloración de fondo plano en un volumen de 100 µl. Se incubaron las placas a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche para permitir la adherencia celular.

15 Preparación del virus: se obtuvieron cepas de gripe A/PR/8/34 (ATCC n.º VR-95), A/CA/05/09 (CDC), A/NY/18/09 (CDC) y A/NWS/33 (ATCC n.º VR-219) de ATCC o del Centro de Control de Enfermedades de EE. UU. y se  
 20 cultivaron en células MDCK para la producción de reservas de virus madre. Se retiró del congelador (-80 °C) una alícuota de virus previamente valorada y se dejó descongelar lentamente hasta t.a. en un armario de seguridad biológica. Se resuspendió el virus y se diluyó en medio de ensayo (DMEM complementado con BSA al 0,5 %, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, piruvato sódico 1 mM, NEAA 0,1 mM y 1 µg/ml de tripsina tratada con TPCK) de modo que la cantidad de virus añadida a cada pocillo en un volumen de 100 µl fue la cantidad determinada para proporcionar de un 85 a un 95 % de muerte celular 4 días después de la infección. Eficacia y toxicidad con XTT: se tiñeron las placas y se analizaron como se describe previamente para el ensayo de citoprotección contra el virus del dengue.

**Ejemplo 18: ensayo contra el virus de la hepatitis C**

25 Cultivo celular: se obtuvo la línea celular indicadora Huh-luc/neo-ET del Dr. Ralf Bartenschlager (Departamento de Virología Molecular, Instituto de Higiene, Universidad de Heidelberg, Alemania) por ImQuest BioSciences a través de un acuerdo de licencia específico. Esta línea celular alberga el replicón I<sub>389</sub>luc-ubi-neo/NS3-3'/ET de replicación persistente que contiene la proteína de fusión del gen luciferasa de luciérnaga-ubiquitina-neomicina fosfotransferasa y secuencias codificantes del VHC NS3-5B impulsadas por el IRES del VEMC que contienen las mutaciones adaptativas de cultivo tisular ET (E1202G, T1208I y K1846T). Se expandió un cultivo madre de Huh-luc/neo-ET por cultivo en DMEM complementado con FCS al 10 %, glutamina 2 mM, penicilina (100 µU/ml)/estreptomicina (100 µg/ml) y 1 X aminoácidos no esenciales más 1 mg/ml de G418. Se dividieron las células 1:4 y se cultivaron durante dos pasos en el mismo medio más 250 µg/ml de G418. Se trataron las células con tripsina y se enumeraron por tinción con azul tripano y se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de cultivo celular de  $7,5 \times 10^3$  células por pocillo y se incubaron a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas. Tras las 24 horas de incubación, se retiró el medio y se reemplazó por el mismo medio menos el G418 más los compuestos de prueba por triplicado. Seis pocillos en cada placa recibieron medio solo como control sin  
 30 tratamiento. Se incubaron las células 72 horas adicionales a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %, a continuación se midió la actividad anti-VHC por criterio de valoración de la luciferasa. Se trataron placas duplicadas y se incubaron en paralelo para evaluar la toxicidad celular por tinción con XTT.

35 Viabilidad celular: se tiñeron las monocapas de cultivo celular de las células tratadas con el tinte de tetrazolio XTT para evaluar la viabilidad celular de la línea celular indicadora Huh-luc/neo-ET en presencia de los compuestos.

40 Medición de la replicación del virus: se midió la replicación del VHC a partir del sistema de ensayo de replicón por la actividad luciferasa usando el kit del gen indicador de luminiscencia Britelite plus de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Perkin Elmer, Shelton, CT). En resumen, se solubilizó un vial de sustrato liofilizado Britelite plus en 10 ml de tampón de reconstitución Britelite y se mezcló suavemente por inversión. Despues de una incubación de 5 minutos a t.a., se añadió el reactivo Britelite plus a las placas de 96 pocillos a 100 µl por pocillo. Se sellaron las placas con película adhesiva y se incubaron a t.a. durante aproximadamente 10 minutos para lisar las células. Se transfirió el contenido de los pocillos a una placa blanca de 96 pocillos y se midió la luminiscencia en un plazo de 15 minutos usando el contador de centelleo líquido Wallac 1450 Microbeta Trilux. Se importaron los datos a una hoja de cálculo Excel 2007 de Microsoft personalizada para la determinación de la concentración de inhibición del virus al 50 % (CE<sub>50</sub>).

**Ejemplo 19: ensayo de citoprotección contra el virus paragripal 3**

45 Preparación de las células: se pasaron células HEp2 (células epiteliales humanas, n.º de catálogo ATCC CCL-23) en DMEM complementado con SFB al 10 %, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, piruvato sódico 1 mM y NEAA 0,1 mM en matraces T-75 antes de su uso en el ensayo antivírico. El día que precedió al ensayo, se dividieron las células 1:2 para garantizar que estaban en una fase de crecimiento exponencial en el momento de la infección. Se realizó la cuantificación de la viabilidad y las células totales usando un hemocitómetro y exclusión con tinte azul tripano. La viabilidad celular fue mayor de un 95 % para las células que se iban a utilizar en el ensayo. Se resuspendieron las células a  $1 \times 10^4$  células por pocillo en medio de cultivo tisular

5 y se añadieron a placas de microvaloración de fondo plano en un volumen de 100  $\mu$ l. Se incubaron las placas a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche para permitir la adherencia celular.

10 Preparación del virus: se obtuvo la cepa SF4 del virus paragripal de tipo 3 de ATCC (n.º de catálogo VR-281) y se cultivó en células HEp2 para la producción de reservas de virus madre. Se retiró del congelador (-80 °C) una alícuota de virus previamente valorada y se dejó descongelar lentamente hasta t.a. en un armario de seguridad biológica. Se resuspendió el virus y se diluyó en medio de ensayo (DMEM complementado con SFB inactivado por calor al 2 %, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina) de modo que la cantidad de virus añadida a cada pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l fuera la cantidad determinada para proporcionar de un 85 a un 95 % de muerte celular 6 días después de la infección.

15 Formato de placas: cada placa contiene pocillos de control celular (solo células), pocillos de control vírico (células más virus), pocillos de toxicidad de fármaco triplicados por compuesto (células más fármaco solo), así como pocillos experimentales triplicados (fármaco más células más virus). Eficacia y toxicidad con XTT: tras la incubación a 37 °C en una estufa de incubación con CO<sub>2</sub> al 5 %, se tiñeron las placas de prueba con el tinte de tetrazolio XTT (hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfifenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazol). El tetrazolio-XTT se metabolizó por las enzimas mitocondriales de las células metabólicamente activas para dar un producto de formazán soluble, lo que permitió un análisis cuantitativo rápido de la inhibición de la muerte celular inducida por virus por sustancias de prueba antivíricas. Se preparó la solución de XTT diariamente como una solución madre de 1 mg/ml en RPMI 1640. Se preparó una solución de metosulfato de fenacina (PMS) a 0,15 mg/ml en PBS y se almacenó en la oscuridad a -20 °C. Se preparó solución madre de XTT/PMS de inmediato antes de su uso añadiendo 40  $\mu$ l de PMS por ml de solución de XTT. Se añadieron cincuenta microlitros de XTT/PMS a cada pocillo de la placa y se volvió a incubar la placa durante 4 horas a 37 °C. Se sellaron las placas con selladores de placas adhesivos y se agitaron suavemente o se invirtieron varias veces para mezclar el producto de formazán soluble y se leyó la placa espectrofotométricamente a 450/650 nm con un lector de placas Vmax de Molecular Devices.

20 30 Análisis de datos: se recogieron datos sin procesar del programa informático Softmax Pro 4.6 y se importaron a una hoja de cálculo Excel de Microsoft para su análisis. Se calculó el porcentaje de reducción en el efecto citopático vírico en comparación con los controles víricos no tratados para cada compuesto. Se calculó el porcentaje del valor de control celular para cada compuesto comparando las células no infectadas tratadas con fármaco con las células no infectadas en medio solo.

#### 35 Ejemplo 20: ensayo de inhibición de la polimerasa de la gripe

40 45 Preparación del virus: se obtuvo el virus de la gripe A/PR/8/34 purificado (1 ml) de Advanced Biotechnologies, Inc. (Columbia, MD), se descongeló y se distribuyó en cinco alícuotas para su almacenamiento a -80 °C hasta su uso. El día del establecimiento del ensayo, se añadieron 20  $\mu$ l de Triton N-101 al 2,5 % a 180  $\mu$ l de virus purificado. Se diluyó 1:2 el virus alterado en una solución que contenía Triton al 0,25 % y PBS. La alteración proporcionó la fuente de ribonucleoproteína (RNP) de la gripe que contiene la ARN polimerasa dependiente del ARN de la gripe y el ARN molde. Se almacenaron las muestras en hielo hasta su uso en el ensayo.

50 55 Reacción de polimerasa: cada reacción de polimerasa de 50  $\mu$ l contenía lo siguiente: 5  $\mu$ l de la RNP alterada, Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ditiotreitol 1 mM, Triton N-101 al 0,25 %, 5  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] GTP, ATP 100  $\mu$ M, (CTP, UTP) 50  $\mu$ M cada uno, GTP 1  $\mu$ M y adenil (3'-5') guanosina 200  $\mu$ M. Para someter a prueba el inhibidor, las reacciones contenían el inhibidor y lo mismo se hizo para las reacciones que contenían el control positivo (2'-desoxi-2'-fluoroguanosina-5'-trifosfato). Otros controles incluían RNP + mezcla de reacción y RNP + DMSO al 1 %. Se incubó la mezcla de reacción sin el cebador ApG y los NTP a 30 °C durante 20 minutos. Una vez que se añadieron el ApG y los NTP a la mezcla de reacción, se incubaron las muestras a 30 °C durante 1 hora, a continuación, de inmediato seguido de la transferencia de la reacción a placas de filtro de fibra de vidrio y la posterior precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10 %. A continuación, se lavó la placa cinco veces con TCA al 5 %, seguido de un lavado con etanol al 95 %. Una vez se había secado el filtro, se midió la incorporación de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] GTP usando un contador de centelleo líquido (Microbeta).

60 65 Formato de placas: cada placa de prueba contenía muestras por triplicado de los tres compuestos (6 concentraciones) además de muestras por triplicado de RNP + mezcla de reacción (RNP sola), RNP + DMSO al 1 % y mezcla de reacción sola (sin RNP).

65 Análisis de datos: se recogieron datos sin procesar del contador de centelleo Microbeta. La incorporación de GTP radioactivo se correlaciona directamente con los niveles de actividad polimerasa. Se obtuvieron los "valores de porcentaje de inhibición" dividiendo el valor medio de cada compuesto de prueba entre el control de RNP + DMSO al 1 %. Se comparó la media obtenida a cada concentración de 2DFGTP con el control de RNP + reacción. A continuación, se importaron los datos a una hoja de cálculo Excel de Microsoft para calcular los valores de Cl<sub>50</sub> por análisis de regresión lineal.

#### Ejemplo 21: ensayo de inhibición de la polimerasa del VHC

Se evaluó la actividad de los compuestos para la inhibición de la polimerasa del VHC usando procedimientos descritos previamente (Lam *et al.* *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54(8):3187-3196). Se realizaron los ensayos de polimerasa de NS5B del VHC en volúmenes de 20  $\mu$ l en placas de reacción de 96 pocillos. Cada reacción contenía 40 ng/ $\mu$ l de polimerasa NS5B $\Delta$ 22 de genotipo-1b recombinante purificada, 20 ng/ $\mu$ l de molde de IRES complementario del genotipo-1b del VHC, 1  $\mu$ M de cada uno de los cuatro ribonucleótidos naturales, 1 U/ml de inhibidor de ARNasa Optizyme (Promega, Madison, WI), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 0,75 mM y ditiotreitol (DTT) 2 mM en tampón HEPES 50 mM (pH 7,5). Se reunieron las mezclas de reacción sobre hielo en dos etapas. La etapa 1 consistió en combinar todos los componentes de reacción excepto los nucleótidos naturales y el UTP marcado en una mezcla de reacción de polimerasa. Se distribuyeron diez microlitros (10  $\mu$ l) de la mezcla de polimerasa en pocillos individuales de la placa de reacción de 96 pocillos sobre hielo. Se incluyeron mezclas de reacción de polimerasa sin polimerasa NS5B como controles sin enzima. Se prepararon diluciones semilogarítmicas sucesivas de los compuestos de prueba y de control, 2'-O-metil-CTP y 2'-O-metil-GTP (Trilink, San Diego, CA) en agua y se añadieron 5  $\mu$ l de los compuestos diluidos de forma sucesiva o agua sola (sin control de compuesto) a los pocillos que contenían la mezcla de polimerasa. A continuación, se añadieron cinco microlitros de mezcla de nucleótidos (nucleótidos naturales y UTP marcado) a los pocillos de la placa de reacción y se incubó la placa a 27 °C durante 30 minutos. Se desactivaron las reacciones con la adición de 80  $\mu$ l de solución de parada (EDTA 12,5 mM, NaCl 2,25 M y citrato sódico 225 mM) y se aplicaron los productos de ARN a una membrana Hybond-N+ (GE Healthcare, Piscataway, NJ) bajo presión de vacío usando un aparato de inmunotransferencia por puntos. Se retiró la membrana del aparato de inmunotransferencia por puntos y se lavó cuatro veces con 4X SSC (NaCl 0,6 M y citrato sódico 60 mM) y, a continuación, se enjuagó una vez con agua y una vez con etanol al 100 %. Se secó la membrana al aire y se expuso a una pantalla de fosfoimagen y se capturó la imagen usando un generador de imágenes Typhoon 8600 Phospho. Tras la captura de la imagen, se colocó la membrana en un casete Microbeta junto con el líquido de centelleo y se contaron los CPM en cada reacción en un Microbeta 1450. Se importaron los datos de CPM a una hoja de cálculo Excel personalizada para la determinación de la Cl<sub>50</sub> de compuesto.

#### Ejemplo 22: condiciones de reacción de la ARN polimerasa dependiente de ARN NS5B

Se sometieron a ensayo los compuestos para determinar la inhibición de NS5B- $\delta$ 21 de GT-1b Con-1 del VHC. Las reacciones incluían enzima recombinante purificada, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de molde de ARN de IRES del VHC de hebra negativa y sustratos NTP 1  $\mu$ M que incluían [<sup>32</sup>P]-CTP o bien [<sup>32</sup>P]-UTP. Se incubaron las placas de ensayo a 27 °C durante 1 hora antes de su desactivación. Se evaluó la incorporación de [<sup>32</sup>P] en el producto macromolecular por la unión al filtro.

#### Ejemplo 23: ensayo de inhibición de ADN polimerasa humana

La ADN polimerasa humana alfa (n.º de catálogo 1075), beta (n.º de catálogo 1077) y gamma (n.º de catálogo 1076) se adquirieron de CHIMERx (Madison, WI). Se sometió a ensayo la inhibición de la actividad ADN polimerasa beta y gamma en placas de microvaloración en una mezcla de reacción de 50  $\mu$ l que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,7), KCl (10 mM para beta y 100 mM para gamma), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,4 mg/ml de BSA, DTT 1 mM, glicerol al 15 %, 0,05 mM de dCTP, dTTP y dATP, 10 uCi de [<sup>32</sup>P]-alfa-dGTP (800 Ci/mmol), 20  $\mu$ g de ADN de timo de ternera activado y el compuesto de prueba a las concentraciones indicadas. La mezcla de reacción de la ADN polimerasa alfa fue como sigue en un volumen de 50  $\mu$ l por muestra: Tris-HCl 20 mM (pH 8), acetato de magnesio 5 mM, 0,3 mg/ml de BSA, DTT 1 mM, espermina 0,1 mM, 0,05 mM de dCTP, dTTP y dATP, 10  $\mu$ Ci de [<sup>32</sup>P]-alfa-dGTP (800 Ci/mmol), 20  $\mu$ g de ADN de timo de ternera activado y el compuesto de prueba a las concentraciones indicadas. Para cada ensayo, se dejó que las reacciones enzimáticas prosiguieran durante 30 minutos a 37 °C seguido de la transferencia a placas de filtro de fibra de vidrio y posterior precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10 %. A continuación, se lavó la placa con TCA al 5 % seguido de un lavado con etanol al 95 %. Una vez se había secado el filtro, se midió la incorporación de radioactividad usando un contador de centelleo líquido (Micro Beta).

#### Ejemplo 24: ensayo de PBMC infectados por VIH

Se obtuvieron leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) humanos frescos de una fuente comercial (Biological Specialty) y se determinó que eran seronegativos para VIH y VHB. Dependiendo del volumen de sangre de donante recibido, se lavaron los glóbulos sanguíneos leucoforetizados varias veces con PBS. Despues del lavado, se diluyó 1:1 la sangre leucoforetizada con solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco y se colocó en capas sobre 15 ml de gradiente de densidad Ficoll-Hyque en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml. Se centrifugaron estos tubos durante 30 minutos a 600 g. Se aspiraron suavemente los PBMC en banda de la interfaz resultante y se lavaron tres veces con PBS. Despues del lavado final, se determinó el número de células por exclusión del tinte azul tripano y se resuspendieron las células a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml en RPMI 1640 con suero fetal bovino (SFB) al 15 %, 2 mmol/l de L-glutamina, 2  $\mu$ g/ml de PHA-P, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomicina y se dejó incubar durante 48-72 horas a 37 °C. Despues de la incubación, se centrifugaron los PBMC y se resuspendieron en medio de cultivo tisular. Se mantuvieron los cultivos hasta su uso por cambios de cultivo de medio volumen con medio de cultivo tisular fresco que contenía IL-2 cada 3 días. Se iniciaron los ensayos con PBMC a las 72 horas despues de la estimulación con PHA-P.

Para minimizar los efectos debidos a la variabilidad del donante, los PBMC empleados en el ensayo eran una mezcla de células derivadas de 3 donantes. De inmediato antes de su uso, se resuspendieron las células diana en medio de cultivo tisular fresco a  $1 \times 10^6$  células/ml y se sembraron en los pocillos interiores de una placa de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos a 50  $\mu\text{l}$ /pocillo. A continuación, se transfirieron 100  $\mu\text{l}$  de concentraciones 2X de medio que contenía el compuesto a la placa de 96 pocillos que contenía las células en 50  $\mu\text{l}$  del medio. Se empleó AZT como estándar de ensayo interno.

Tras la adición del compuesto de prueba a los pocillos, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de una dilución predeterminada de virus VIH (preparada a partir de 4X de la concentración final deseada en el pocillo) y se mezcló bien. Para la infección, se añadieron 50-150 DICT<sub>50</sub> de cada virus por pocillo (MOI final aproximadamente 0,002). Se expusieron los PBMC por triplicado al virus y se cultivaron en presencia o ausencia del material de prueba a concentraciones variables como se describe anteriormente en las placas de microvaloración de 96 pocillos. Después de 7 días en cultivo, se cuantificó la replicación del VIH-1 en el sobrenadante de cultivo tisular midiendo la actividad retrotranscriptasa (RT). Los pocillos solo con células y virus sirvieron como controles víricos. Se prepararon de forma idéntica placas separadas sin virus para los estudios de citotoxicidad de fármaco.

Ensayo de actividad retrotranscriptasa: se midió la actividad retrotranscriptasa en sobrenadantes libres de células usando un ensayo de polimerización por incorporación radioactiva estándar. Se adquirió trifosfato de timidina tritiado (TTP; New England Nuclear) a 1 Ci/ml y se usó 1  $\mu\text{l}$  por reacción enzimática. Se preparó una solución madre de rAdT mezclando 0,5 mg/ml de poli rA y 1,7 U/ml de oligonucleótido dT en agua destilada y se almacenó a -20 °C. Se preparó el tampón de reacción RT fresco diariamente y consiste en 125  $\mu\text{l}$  de 1 mol/l de EGTA, 125  $\mu\text{l}$  de dH<sub>2</sub>O, 125  $\mu\text{l}$  de Triton X-100 al 20 %, 50  $\mu\text{l}$  de 1 mol/l de Tris (pH 7,4), 50  $\mu\text{l}$  de 1 mol/l de DTT y 40  $\mu\text{l}$  de 1 mol/l de MgCl<sub>2</sub>. Para cada reacción, se mezclaron 1  $\mu\text{l}$  de TTP, 4  $\mu\text{l}$  de dH<sub>2</sub>O, 2,5  $\mu\text{l}$  de rAdT y 2,5  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción. Se colocaron diez microlitros de esta mezcla de reacción en una placa de microvaloración de fondo redondo y se añadieron 15  $\mu\text{l}$  de sobrenadante que contenía virus y se mezcló. Se incubó la placa a 37 °C en una estufa de incubación humidificada durante 90 minutos. Después de la incubación, se dispusieron 10  $\mu\text{l}$  del volumen de reacción sobre una estera filtrante de DEAE en el formato de placa apropiado, se lavaron 5 veces (5 minutos cada una) en un tampón fosfato sódico al 5 %, 2 veces (1 minuto cada una) en agua destilada, 2 veces (1 minuto cada una) en etanol al 70 %, y, a continuación, se secaron al aire. Se colocó la estera filtrante seca en una funda de plástico y se añadieron 4 ml de Opti-Fluor O a la funda. Se cuantificó la radioactividad incorporada utilizando un contador de centelleo líquido Wallac 1450 Microbeta Trilux.

#### Ejemplo 25: VHB

Se añadieron células HepG2.2.15 (100  $\mu\text{l}$ ) en medio RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10 % a todos los pocillos de una placa de 96 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células por pocillo y se incubó la placa a 37 °C en un entorno de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas. Tras la incubación, se añadieron a los pocillos individuales de la placa por triplicado seis diluciones sucesivas 1:10 del compuesto de prueba preparadas en medio RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10 %. Seis pocillos de la placa recibieron medio solo como control de virus solo. Se incubó la placa durante 6 días a 37 °C en un entorno de CO<sub>2</sub> al 5 %. El día 3 se cambió el medio de cultivo por un medio que contenía la concentración indicada de cada compuesto. Se recogieron cien microlitros de sobrenadante de cada pocillo para el análisis del ADN vírico por qPCR y se evaluó la citotoxicidad por tinción con XTT de la monocapa de cultivo celular el sexto día.

Se diluyeron diez microlitros de sobrenadante de cultivo celular recogidos el sexto día en tampón de dilución de qPCR (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ADN de esperma de salmón cizallado) y se hirvieron durante 15 minutos. Se realizó una PCR ultrarrápida cuantitativa en placas de 386 pocillos usando un sistema de detección de secuencias 7900HT de Applied Biosystems y el programa informático de SDS 2.4 compatible. Se sometieron a Q-PCR ultrarrápida cinco microlitros (5  $\mu\text{l}$ ) de ADN hervido para cada muestra y diluciones sucesivas 1:10 de un patrón de ADN cuantitativo usando SuperMix-UDG para PCR cuantitativa Platinum (Invitrogen) y cebadores de oligonucleótidos de ADN específicos (IDT, Coralville, ID) HBV-AD38-qF1 (5'-CCG TCT GTG CCT TCT CAT CTG-3') (SEQ ID NO.: 1), HBV-AD38-qR1 (5'-AGT CCA AGA GTY CTC TTA TRY AAG ACC TT-3') (SEQ ID NO.: 2) y HBV-AD38-qP1 (5'-FAM CCG TGT GCA /ZEN/CTT CGC TTC ACC TCT GC-3'BHQ1) (SEQ ID NO.: 3) a una concentración final de 0,2  $\mu\text{M}$  para cada cebador en un volumen de reacción total de 15  $\mu\text{l}$ . Se interpoló el número de copias de ADN del VHB en cada muestra a partir de la curva estándar por el programa informático SDS.24 y se importaron los datos a una hoja de cálculo Excel para su análisis.

La concentración citotóxica del 50 % para los materiales de prueba se deriva midiendo la reducción del tinte de tetrazolio XTT en las placas de cultivo tisular tratadas. El XTT se metaboliza por la enzima mitocondrial NADPH oxidasa para dar un producto de formazán soluble en células metabólicamente activas. Se preparó diariamente la solución de XTT como una solución madre de 1 mg/ml en PBS. Se preparó una solución madre de metosulfato de fenacina (PMS) a 0,15 mg/ml en PBS y se almacenó en la oscuridad a -20 °C. Se preparó la solución de XTT/PMS de inmediato antes de su uso añadiendo 40  $\mu\text{l}$  de PMS por 1 ml de solución de XTT. Se añadieron cincuenta microlitros de XTT/PMS a cada pocillo de la placa y se incubó la placa durante 2-4 horas a 37 °C. Se ha determinado empíricamente que la incubación durante 2-4 horas está dentro del intervalo de respuesta lineal para

la reducción de tinte XTT con los números de células indicados para cada ensayo. Se usaron selladores de placas adhesivos en lugar de las tapas, la placa sellada se invirtió varias veces para mezclar el producto de formazán soluble y se leyó la placa a 450 nm (longitud de onda de referencia de 650 nm) con un espectrofotómetro SpectraMax Plus 384 de Molecular Devices. Se recogieron los datos con el programa informático Softmax 4.6 y se importaron a una hoja de cálculo Excel para su análisis.

**Ejemplo 26: condiciones de reacción de la ARN polimerasa dependiente de ARN del dengue**

Se realizó el ensayo de ARN polimerasa a 30 °C usando 100  $\mu$ l de mezcla de reacción en un tubo de 1,5 ml. Las condiciones de reacción finales fueron Hepes 50 mM (pH 7,0), DTT 2 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, KCl 10 mM, UTR-Poli A 100 nM (cebador autohibridante), UTP 10  $\mu$ M, enzima RdRp 26 nM. Se incubó la mezcla de reacción con diferentes compuestos (inhibidores) a 30 °C durante 1 h. Para evaluar la cantidad de pirofosfato generado durante la reacción de la polimerasa, se mezclaron 30  $\mu$ l de mezcla de reacción de polimerasa con una mezcla de reacción enzimática acoplada a luciferasa (70  $\mu$ l). Las condiciones de reacción finales de la reacción de la luciferasa fueron MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, ATP sulfatasa 200  $\mu$ U, APS 5  $\mu$ M, luciferasa 10 nM, D-luciferina 100  $\mu$ M. Se transfirieron de inmediato las placas blancas que contenían las muestras de reacción (100  $\mu$ l) al luminómetro Veritas (Turner Biosystems, CA) para la detección de la señal luminosa.

**Ejemplo 27: procedimiento para incubación y análisis de las células**

Se sembraron células Huh-7 a 0,5  $\times$  10<sup>6</sup> células/pocillo en 1 ml de medio completo en placas de 12 pocillos tratadas con cultivo tisular. Se permitió la adherencia de las células durante la noche a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5 %. Se preparó una solución madre 40  $\mu$ M del artículo de prueba en DMSO al 100 %. A partir de la solución madre 40  $\mu$ M, se preparó una solución 20  $\mu$ M del artículo de prueba en 25 ml de medio DMEM completo. Para el tratamiento del compuesto, se aspiró el medio de los pocillos y se añadió 1 ml de la solución 20  $\mu$ M en medio DMEM completo a los pocillos apropiados. También se preparó una placa separada de células "sin" adición del compuesto. Se incubaron las placas a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5 % para los siguientes puntos temporales: 1, 3, 6 y 24 horas. Después de la incubación en los puntos temporales deseados, se lavaron las células 2X con 1 ml de DPBS. Se extrajeron las células añadiendo 500  $\mu$ l de metanol al 70 %/agua al 30 % enriquecida con el patrón interno a cada pocillo tratado con el artículo de prueba. Se extrajo la placa de blanco no tratada con 500  $\mu$ l de metanol al 70 %/agua al 30 % por pocillo. Se centrifugaron las muestras a 16.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se analizaron las muestras por CL-EM/EM usando un sistema de CL-EM/EM ABSCIEX 5500 QTRAP con una columna Hypercarb (PGC).

**Ejemplo 28: procedimiento para el experimento farmacocinético en roedores**

Se aclimataron ratones DBA-1J (6-8 semanas de edad, hembras) durante  $\geq$ 2 días después de su recepción. Se pesaron los ratones el día antes de la dosificación para calcular los volúmenes de dosificación. Se les dosificó a los ratones por sonda gástrica oral el fármaco a 30 mg/kg, 100 mg/kg y 300 mg/kg. Se tomaron muestras de los ratones en 8 puntos temporales: 0,5, 1, 2, 3, 4, 8 y 24 h (3 ratones por punto temporal para el fármaco de prueba). Se sacrificó a los ratones y se obtuvieron sus órganos (véase a continuación). Para recoger la sangre, se sacrificó a los ratones con CO<sub>2</sub> en el punto temporal apropiado enumerado anteriormente. Se obtuvo sangre por punción cardíaca (0,3 ml) en cada punto temporal. Tras la recogida de sangre, se extrajeron los órganos de los ratones (véase a continuación). Se procesó la sangre invirtiendo suavemente el tubo de Li-heparina con sangre 2 o 3 veces para mezclar bien. A continuación, se colocaron los tubos en una gradilla en agua helada hasta que se pudieron centrifugar ( $\leq$ 1 hora). Tan pronto como fue posible, se centrifugó la sangre a 2000 x g durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada para obtener plasma. A continuación, usando una pipeta de 200  $\mu$ l, se transfirió el plasma a un tubo Eppendorf de 1,5 ml etiquetado en agua helada. A continuación, se congeló el plasma en un congelador o en hielo seco. Se almacenaron las muestras a -80 °C antes de su análisis. Se obtuvieron los órganos de los ratones sacrificados. Se extrajeron los órganos (pulmones, hígado, riñón, bazo y corazón), se colocaron en un tubo y se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido. A continuación, se transfirieron los tubos a hielo seco. Se guardaron las muestras en viales de tejido criogénicos. Se analizaron las muestras por CL-EM/EM usando un sistema de CL-EM/EM ABSCIEX 5500 QTRAP con una columna Hypercarb (PGC).

**Parámetros farmacocinéticos:**

- La T<sub>máx.</sub> después de la dosificación oral es de 0,25 - 0,5 h
- Las C<sub>máx.</sub> son de 3,0, 7,7 y 11,7 ng/ml después de la dosificación por v.o. de 30, 100 y 300 mg/kg;
- La biodisponibilidad (frente a la administración i.p.) es de un 65 % a 30 mg/kg y de un 39-46 % a las dosificaciones por v.o. de 100 y 300 mg/kg;
- La T<sub>1/2</sub> plasmática de EIDD-1931 es de 2,2 h después de la dosificación i.v. y de 4,1-4,7 h después de la dosificación por v.o.

- Después de una dosis v.o. de 300 mg/kg, los niveles plasmáticos a 24 h son 0,4  $\mu$ M; 0,1  $\mu$ M después de una dosis de 100 mg/kg

**Ejemplo 29: protocolo para el modelo de ratón de la infección por chicungunya**

5 A ratones C57BL-6J se les inyectaron 100 UFC de virus de CHIK en la almohadilla plantar. Los grupos de prueba comprendían un grupo no infectado y no tratado, un grupo infectado y no tratado, un grupo infectado que recibió una dosis alta de 35 mg/kg i.p. de EIDD-01931 y un grupo infectado que recibió una dosis baja de 25 mg/kg i.p. de EIDD-01931. Los dos grupos de prueba que recibieron EIDD-01931 recibieron el compuesto 12 horas antes de la exposición y, a continuación, diariamente durante 7 días. Se evaluó diariamente la inflamación de las almohadillas plantares (grosor de la pata) durante 7 días. Se evaluó la artritis inducida por el virus de CHIK (histología) en las articulaciones del tobillo usando PCR después de 7 días.

10 **Ejemplo 30: N(4)-hidroxicitidina para la profilaxis y el tratamiento de infecciones por alfavirus**

15 Las pruebas de actividad en modelos de infección por efecto citopático (ECP) de células Vero han demostrado que el análogo de ribonucleósido N(4)-hidroxicitidina (EIDD-01931) tiene actividad contra los virus del río Ross, EEE, EEO, EEV y CHIK con valores de  $CE_{50}$  de 2,45  $\mu$ M, 1,08  $\mu$ M, 1,36  $\mu$ M, 1,00  $\mu$ M y 1,28  $\mu$ M, respectivamente. El perfil de citotoxicidad del compuesto es aceptable, con índices de selectividad que varían desde un mínimo de 8 en 20 células CEM hasta un máximo de 232 en células Huh7 (hígado).

20 **Ejemplo 31:**

25 Dado que se pueden desarrollar valores altos de virus de la VEE en el cerebro en un plazo de horas de la exposición al aerosol, es deseable un agente antivírico de acción directa si puede lograr rápidamente niveles terapéuticos de fármaco en el cerebro. Se llevó a cabo un estudio farmacocinético piloto en ratas SD macho a las que se les dosificó por sonda gástrica oral 5 y 50 mg/kg de EIDD-01931, para determinar los parámetros farmacocinéticos y el perfil de distribución tisular del compuesto en sistemas de órganos clave, incluyendo el cerebro. EIDD-01931 está disponible por vía oral y es proporcional a la dosis con una biodisponibilidad calculada (% F) de un 28 %. Se recogieron muestras de órganos (cerebro, pulmón, bazo, riñón e hígado) a las 2,5 y 24 horas después de la dosis del grupo de dosis de 50 mg/kg. EIDD-01931 se distribuyó bien en todos los tejidos sometidos a prueba; cabe destacar que se distribuyó fácilmente al tejido cerebral a niveles terapéuticos del fármaco, en base a las estimaciones de los datos celulares. Una vez en el cerebro, EIDD-01931 se metabolizó rápidamente a su forma 5'-trifosfato activa para dar niveles cerebrales de 526 y 135 ng/g a las 2,5 y 24 horas, respectivamente. 30 Incluso después de 24 horas, los niveles de EIDD-01931 y de su 5'-trifosfato en el cerebro son considerables, lo que sugiere que la dosificación oral una vez al día puede ser adecuada para el tratamiento.

35 De forma alternativa, el suministro de fármaco por administración en aerosol (pulverizador nasal) puede lograr de inmediato niveles terapéuticos del fármaco en la mucosa nasal y el cerebro. EIDD-01931 tiene un perfil toxicológico aceptable después de 6 días de inyecciones intraperitoneales (i.p.) diarias en ratones, con el NSEO (nivel sin efecto observable) de 33 mg/kg; se observó pérdida de peso a la dosis más alta sometida a prueba (100 mg/kg), que revirtió al cesar la dosificación.

40 **Ejemplo 32: actividad en Arenaviridae de N4-hidroxicitidina**

Virus	Línea celular	$CE_{50}$ ( $\mu$ M)	$CE_{90}$ ( $\mu$ M)	$CC_{50}$ ( $\mu$ M)
Virus Tacaribe	Vero	14,4		136
Virus Tacaribe	Vero	18,8		104
Virus Pichindé	Vero	18,4		184
Virus Pichindé	Vero	21,6		128
Virus de Junín	Vero	18,4		136
Virus de Junín	Vero	20,8		124
Virus de la fiebre de Lassa	Vero	4,04		30
Virus de la coriomeningitis linfocítica	Vero		25,2	>400

45 **Ejemplo 33: actividad en Togaviridae de N4-hidroxicitidina**

Virus	Línea celular	$CE_{50}$ ( $\mu$ M)	$CE_{90}$ ( $\mu$ M)	$CC_{50}$ ( $\mu$ M)

VEEV	Vero76	1,28		128
VEEV	Vero76	1		13,6
VEEV	Vero76		0,8	32,8
VEEV	Vero76	1,92		32,8
VEEE	Vero76	0,96		128
VEEE	Vero76	1,08		84
VEEE	Vero76		1,68	132
VEEE	Vero76	8		132
VEEO	Vero76	1,28		>400
VEEO	Vero76	1,36		288
VEEO	Vero76		<1,28	120
VEEO	Vero76	0,76		256
VCHIK	Vero76	1,28		76
VCHIK	Vero76	1,28		22,8
VCHIK	Vero76		0,72	96
VCHIK	Vero76	1,8		96

**Ejemplo 34: actividad en *Flaviviridae* de N4-hidroxicitidina**

Virus	Línea celular	CE <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>90</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
VDEN2	Vero76	12,8		60
VDEN2	Vero76	14		128
VNO	Vero76	>400		>400
VNO	Vero76	>400		>400
VFA	Vero76	1,88		224
VFA	Vero76	20,4		30
VFA	Vero76		26	52
VFA	Vero76	>52		52
VJE	Vero76	112		>400
VJE	Vero76	268		>400
VPOW	BHK	11,2		30
VPOW	BHK	8,8		19,2
VZIK	Vero76	1,44		>400
VZIK	Vero76	6,8		152
VZIK	Vero76		2,36	80
VZIK	Vero76	3,12		80
Virus Usutu	Vero 76	228		>400
Virus Usutu	Vero 76	100		212
VZIK	Vero 76	1,46		400
VZIK	Vero 76	3,04		16,4

**Ejemplo 35: actividad en *Bunyaviridae* de N4-hidroxicitidina**

Virus	Línea celular	CE <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>90</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
VFVR	Vero76	1,48		60
VFVR	Vero76	1,44		48
VFVR	Vero76	6,8		96
VFVR	Vero76	7,6		96
VFVR	Vero		1	20,4
VFVR	Vero	1,68		20,4
Virus Punta Toro	Vero76	20,4		184
Virus Punta Toro	Vero76	20		160
Virus de La Crosse	Vero76	25,2		268
Virus de La Crosse	Vero76	15,2		188
Virus de La Crosse	Vero76		1	112
Virus de La Crosse	Vero76	1,96		112
Virus de Maporal	Vero76	84		140
Virus de Maporal	Vero76	>124		124
Virus Heartland	Vero		7,84	>400
Virus de la coriomeningitis linfocítica	Vero		25,2	>400
Virus del síndrome de trombocitopenia febril grave	Vero		4,96	>400

5 **Ejemplo 36: actividad en *Coronaviridae* de N4-hidroxicitidina**

Virus	Línea celular	CE <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>90</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
MERS	Vero E6	<0,80	<0,80	20
SARS	Vero76	<0,4		252
SARS	Vero76	<0,4		144
SARS	Vero76		0,56	76
SARS	Vero76	2,2		76
SARS	Vero E6	<0,80	<0,80	20
CoVH	HEL	1,28		100
CoVH	HEL	5,6		36
CoVH	HEL		<0,128	192
CoVH	HEL	0,228		192
CoVH	Vero76	<0,4		400
CoVH	Vero E6	<0,4		400
CoVH	HEL	1,28		100
CoVH	HEL	4		60

CoVH	HEL		0,4	232
CoVH	HEL	0,212		232
CoVH	Vero76	12,8		400
CoVH	Vero76		0,32	44
CoVH	Vero76	0,44		44

**Ejemplo 37: actividad en la gripe de N4-hidroxicitidina**

Virus	Línea celular	CE <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>90</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
Gripe A H1N1	MDCK	1,28		168
Gripe A H1N1	MDCK	1,16		136
Gripe A H7N9 (vía alta)	MDCK	>48		48
Gripe A H7N9 (vía alta)	MDCK	>44		44
Gripe A H5N1 (vía alta)	MDCK	>96		96
Gripe A H5N1 (vía alta)	MDCK	>88		88
Gripe A H1N1	MDCK	1,44		76
Gripe A H1N1	MDCK	1,24		68
Gripe A H3N2	MDCK	0,96		60
Gripe A H3N2	MDCK	0,88		52
Gripe A H5N1 (vía baja)	MDCK	1,28		48
Gripe A H5N1 (vía baja)	MDCK	1,28		27,6
Gripe B	MDCK	<0,4		48
Gripe B	MDCK	<0,4		30,4
Gripe B	MDCK	<0,4		48
Gripe B	MDCK	<0,4		76

5 **Ejemplo 38: actividad en el ébola de N4-hidroxicitidina**

Virus	Línea celular	CE <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>90</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
VEBO	Vero	4,7		>100
VEBO	Vero		25	>320

**Ejemplo 39: actividad en norovirus de N4-hidroxicitidina**

Virus	Línea celular	CE <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>90</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
NV	HG23	>100	>100	>100

10

**Ejemplo 40: actividad en *Picornaviridae* de N4-hidroxicitidina**

Virus	Línea celular	CE <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>90</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
Enterovirus-71	Vero76	3,44		>400
Enterovirus-71	Vero76	3,36		256

Enterovirus-68	RD	1,28		>400
Enterovirus-68	RD	1,16		25,6
Virus de la poliomielitis-1	Vero76	12,8		128
Virus de la poliomielitis-1	Vero76	10,4		76
Virus de Coxsackie B3	Vero 76	1,44		184
Virus de Coxsackie B3	Vero 76	1,4		76
HRV-14	HeLa-Ohio	1,28		>40
HRV-14	HeLa-Ohio	1,36		>40
Virus de Coxsackie B3	Vero 76		2,24	56
Virus de Coxsackie B3	Vero 76	2,12		56
Enterovirus-71	Vero76		0,76	48
Enterovirus-71	Vero76	2,32		48
Enterovirus-68	RD		0,92	52
Enterovirus-68	RD	2,28		52

**Ejemplo 41: actividad en el virus paragripal y VRS de N4-hidroxicitidina**

Virus	Línea celular	CE <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>90</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
Virus paragripal 3	MA-104	212		272
Virus paragripal 3	MA-104	248		264
VRS	MA-104	14		>400
VRS	MA-104	27,6		>400

5   **Ejemplo 42: procedimientos para estudios farmacocinéticos en macacos cangrejeros**

10   Se dosificó por sonda gástrica oral a ocho macacos cangrejeros (4 machos/4 hembras) una dosis única de EIDD-1931 o un conjugado de profármaco, como se muestra en la **tabla 1**. Se dejaron períodos de reposo farmacológico de una semana entre dosis. Se recogieron muestras de sangre después de cada acontecimiento de dosificación antes de la dosis y 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18 y 24 h después de la dosis.

**Tabla 1:** diseño de estudio para la evaluación farmacocinética de EIDD-1931 y 4 conjugados de profármacos

N.º de grupo	Compuesto	N.º de animales (M/H)	Nivel de dosis mmol/kg	Nivel de dosis (mg/Kg)	Estado de alimentación
1	EIDD-1931	4/4	0,4	100	En ayunas
2	EIDD-1931	4/4	0,4	100	Alimentado
3	EIDD-2800	4/4	0,4	180	Alimentado
4	EIDD-2801	4/4	0,4	130	Alimentado
5	EIDD-2776	4/4	0,4	175	Alimentado
6	EIDD-2898	4/4	0,4	160	Alimentado

15   Se extrajeron alícuotas de plasma con acetonitrilo que incluían <sup>13</sup>C<sub>5</sub> EIDD-1931 como patrón interno. A continuación, se agitaron las muestras en vórtex y se centrifugaron en una centrífuga Sorvall RT1 (Thermo Fisher, Waltham, MA) a 3500 RPM durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga y se centrifugó de nuevo en una picocentrífuga Biofuge (Heraeus, Hanau, Alemania) durante 10 minutos a 13.000 rpm. A continuación, se transfirió el sobrenadante restante a un vial de HPLC para su análisis.

20   Condiciones de CL-EM/EM para EIDD-02898. Se realizó la separación por HPLC en un sistema Agilent 1200

(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Se usó una columna de sílice Atlantis HILIC, 50 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5  $\mu$ M (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.) para la separación de EIDD-1931, EIDD-2898 y  $^{13}\text{C}_5$  EIDD-1931 (usado como patrón interno) con modo isocrático (70:30) con acetonitrilo en tampón de acetato de amonio 100 mM, pH 5,0 a un caudal de 1,0 ml/min durante 2 minutos. Se realizó el análisis de 5 espectrometría de masas en un espectrómetro de masas QTrap 5500 (AB Sciex, Framingham, MA) usando ionización por electronebulización (ESI) en modo positivo en modo de seguimiento de reacciones múltiples (MRM). Una curva estándar de ocho puntos preparada en plasma de blanco cubrió un intervalo de concentraciones de 10 a 10.000 ng/ml. Se analizaron muestras de control de calidad preparadas por separado de 30, 500 y 5000 ng/ml en 10 plasma de blanco al comienzo de cada conjunto de muestras para garantizar la exactitud y precisión dentro de un 20 %. La calibración en cada matriz mostró linealidad con un valor de  $R_2$  de >0,99. Se realizó el análisis de datos 10 usando el programa informático Analyst (AB Sciex, Framingham).

15 *Condiciones de CL-EM/EM para EIDD-02800 y EIDD-02801.* Se realizó la separación por HPLC en un sistema Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Se usó una columna en modo mixto Acclaim HILIC-1, 150 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5  $\mu$ M (Thermo Fisher, Waltham, MA) para la separación de EIDD-1931, EIDD-2800, EIDD-2801 y  $^{13}\text{C}_5$  EIDD-1931 (usado como patrón interno) con modo isocrático (90:10) con acetonitrilo en tampón de acetato de amonio 100 mM, pH 5,0 a un caudal de 1,0 ml/min durante 5 minutos. Se realizó el análisis de 20 espectrometría de masas en un espectrómetro de masas QTrap 5500 (AB Sciex, Framingham, MA) usando ionización por electronebulización (ESI) en modo negativo en modo de seguimiento de reacciones múltiples (MRM). Una curva estándar de ocho puntos preparada en plasma de blanco cubrió un intervalo de concentraciones de 10 a 10.000 ng/ml. Se analizaron muestras de control de calidad preparadas por separado de 30, 500 y 5000 ng/ml en plasma de blanco al comienzo de cada conjunto de muestras para garantizar la exactitud y precisión dentro de un 20 %. Se realizó el análisis de datos usando el programa informático Analyst (AB Sciex, Framingham).

#### 25 **Ejemplo 43: parámetros farmacocinéticos de los macacos cangrejeros**

Como se puede observar a partir de las figuras 11 a 15, estos datos muestran que después de la administración por 30 sonda gástrica oral a macacos cangrejeros, inesperadamente se secuestra el ribonucleósido original, prácticamente sin cambios, en los enterocitos del intestino. Esto da como resultado la baja biodisponibilidad 35 aparente del compuesto en los macacos cangrejeros. Sin embargo, cuando se administra por medio de inyección i.v., el compuesto se distribuye ampliamente. Como resultado de estos estudios, parece que EIDD-1931 tiene baja biodisponibilidad en macacos cangrejeros como resultado de un tránsito/liberación ineficaz desde la mucosa intestinal y gástrica a la sangre circulante.

35 La baja biodisponibilidad de EIDD-1931 en macacos cangrejeros se puede abordar satisfactoriamente utilizando restos de profármacos escindibles química y/o enzimáticamente que facilitan el movimiento de EIDD-1931 a través de la pared intestinal hacia la sangre circulante. Tres profármacos, EIDD-2800, EIDD-2801 y EIDD-2898, 40 mejoraron significativamente la biodisponibilidad de EIDD-1931 en 4 - 8 veces en macacos cangrejeros, como se puede observar a partir de las figuras 14 y 15.

Resultados adicionales se muestran en las **tablas 2 y 3**.

45 **Tabla 2:** parámetros farmacocinéticos de macacos cangrejeros machos

Compuesto dosificado	$t_{\text{máx.}}$ (h)	$C_{\text{máx.}}$ (nmol/ml)	$ABC_{0-24\text{ h}}$ (h·nmol/ml)	CL (l/h*kg)	$t_{1/2}$ (h)	F* (%)
EIDD-1931	$0,75 \pm 0,28$	$3,31 \pm 1,82$	$5,75 \pm 1,99$	$70,1 \pm 18,7$	$1,2 \pm 1,2$	~ 3
EIDD-2800	$0,37 \pm 0,14$	$16,3 \pm 13,2$	$38,9 \pm 7,58$	$9,1 \pm 1,3$	$5,5 \pm 4,2$	~ 27
EIDD-2801	$2 \pm 0,81$	$8,08 \pm 1,32$	$31,7 \pm 7,82$	$13 \pm 3,7$	$1,8 \pm 0,91$	~ 22
EIDD-2898	$2,3 \pm 0,96$	$9,1 \pm 2,7$	$26,1 \pm 5,2$	$16,4 \pm 3,1$	$0,53 \pm 0,16$	~ 18
EIDD-2776	$5 \pm 1,2$	$0,58 \pm 0,21$	$2,6 \pm 0,65$	$142 \pm 37,3$	$0,97 \pm 0,21$	~ 2

**Tabla 3:** parámetros farmacocinéticos de macacos cangrejeros hembras

Compuesto dosificado	$t_{\text{máx.}}$ (h)	$C_{\text{máx.}}$ (nmol/ml)	$ABC_{0-24\text{ h}}$ (h·nmol/ml)	CL (l/h*kg)	$t_{1/2}$ (h)	F* (%)
EIDD-1931	$0,87 \pm 0,75$	$3,31 \pm 1,99$	$7,21 \pm 4,21$	$65,7 \pm 31,6$	$0,78 \pm 0,2$	~ 3

EIDD-2800	0,31 ± 0,12	8,10 ± 5,06	27,4 ± 11,5	15,9 ± 7,7	4,4 ± 1,2	~ 16
EIDD-2801	1,25 ± 0,5	12,3 ± 2,33	43,8 ± 17,0	10,3 ± 5,6	1,9 ± 1,3	~ 26
EIDD-2898	1,3 ± 0,5	15,9 ± 8,1	26,9 ± 4,8	15,9 ± 3,2	0,55 ± 0,25	~ 15
EIDD-2776	3 ± 2,4	0,69 ± 0,26	3,3 ± 2,7	158 ± 85,5	1,2 ± 0,41	~ 2

#### Ejemplo 44: procedimientos para estudios farmacocinéticos en hurones

Se suministraron EIDD-2801 y control de vehículo por medio de sonda gástrica oral única (v.o.). Se suministraron EIDD-2801 y control de vehículo por medio de sonda gástrica oral (v.o.) dos veces al día (d.v.d.). La primera dosis fue a (-3 h) en relación con la exposición al virus; la segunda dosis a las 0 h y, a continuación, cada 12 h después de esto durante 3,5 días; un total de 8 dosis. El vehículo usado consistió en metilcelulosa al 1 % en agua (p/v). Se usaron hurones hembras de 6-8 meses de edad exógamas (*Mustela putorius furo*), adquiridas de Triple F Farms, con un peso de 0,8 - 1,0 kg para estudios de FC y eficacia:

- Farmacocinética: 8 hurones en total (2 grupos, 4 hurones/grupo)
- Prueba de eficacia: dosificación profiláctica contra NL/09 A/Netherlands/602/2009 (H1N1);  $5 \times 10^4$  DICT<sub>50</sub>/animal por vía intranasal - 12 hurones en total (3 grupos, 4 hurones/grupo)

Estudio farmacocinético: se administró EIDD-2801 como una suspensión por sonda gástrica oral en un volumen total de 3,5 ml, seguido de un lavado del catéter con solución MIRACLEVET. Se recogieron muestras de sangre de la vena cava anterior. A las 72 h previas a la dosis, se recogieron 0,5 ml de sangre de cada animal. Despues de la dosificación, se recogieron muestras de sangre (0,3 ml) a las 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas en tubos de heparina de Li helados para plasma. Se preparó el plasma en un plazo de 1 h después de la recogida de sangre y se almacenó hasta 12 horas en hielo antes de transferirse a un congelador a -80 °C. Se analizaron las muestras por CL/EM/EM.

#### Ejemplo 45: parámetros farmacocinéticos de los hurones

Parámetros farmacocinéticos para EIDD-1931 en hurones después de dosis únicas de EIDD-2801.

Dosis	C <sub>máx.</sub>	ABC <sub>inf.</sub>	t <sub>1/2</sub>
mg/kg	(nmol/ml)	(h-nmol/ml)	(h)
4	3,5 ± 1,5	13,2 ± 4,8	8,2 ± 1,7
20	15,4 ± 1,9	73 ± 32	4,7 ± 1,3
128	100 ± 22	322 ± 43	5,1 ± 0,8
512	209 ± 106	791 ± 391	4,2 ± 0,6

#### Ejemplo 46: procedimientos para el tratamiento con EIDD-2801 en un modelo de infección por gripe en hurones

Se suministró una dosis de  $5 \times 10^4$  DICT<sub>50</sub>/animal de NL/09 por vía intranasal en 0,2 ml (0,1 ml en cada narina). Se diluyeron las reservas de virus en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se anestesió a los hurones con una mezcla de cetamina/dexmedetomidina antes de la infección.

**Criterios de valoración:** Se evaluaron diariamente la fiebre, el peso corporal, los signos clínicos (secreción nasal; niveles de actividad; disnea) y la carga vírica en los lavados nasales. La dosificación comenzó 3 h previas a la infección, seguida de una dosificación 1 h después de la infección y, a continuación, cada 12 h hasta el sacrificio de los animales. Se sacrificaron los hurones 3,5 días después de la infección, 12 horas después de la última dosis de tratamiento, se extrajo por separado el tejido de las vías respiratorias altas y bajas y se tomó una muestra de sangre. Se recogieron muestras de sangre (0,3 ml), se procesaron y se almacenaron como se describe en la sección de FC anteriormente y se analizaron para determinar la concentración de EIDD-1931. Se determinó la carga vírica en los tejidos de las vías respiratorias bajas.

**Dosificación:** Se administró EIDD-2801 por vía oral. El volumen de la sonda gástrica total fue de 3,5 ml, seguido del lavado de los catéteres de la sonda gástrica con 3,5 ml de MIRACLEVET.

Tabla 4. Diseño de estudio de los hallazgos de eficacia de EIDD-2801 con exposición a la gripe.

Exp.	Grupo	Virus	n.º	Sexo	Compuesto	Dosis total/día	Nivel de dosis	Vol. de dosis	Pauta de tratamiento*
1	1	VGA (H1N1)	4	H	EIDD-2801	200 mg/kg/d	100 mg/kg d.v.d.	3,5 ml/kg	v.o. (d.v.d.), -3 h, +1 h y 6 dosis cada 12 h p.d.; un total de 8 dosis
1	2	VGA (H1N1)	4	H	EIDD-2801	1.000 mg/kg/d	500 mg/kg d.v.d.	3,5 ml/kg	v.o. (d.v.d.), -3 h, +1 h y 6 dosis cada 12 h p.d.; un total de 8 dosis
1	3	simulado	4	H	Vehículo	0 mg/kg/d	0 mg/kg d.v.d.	3,5 ml/kg	v.o. (d.v.d.), -3 h, +1 h y 6 dosis cada 12 h p.d.; un total de 8 dosis

**Ejemplo 47: resultados del tratamiento con EIDD-2801 en un modelo de infección por gripe en hurones**

5 Los resultados del tratamiento con EIDD-2801 en un modelo de infección por gripe en hurones (A/California/07/2009 (H1N1)) se pueden encontrar en la figura 16. Los valores víricos en muestras de lavado nasal se redujeron en gran medida con la profilaxis y el tratamiento 12 horas después de la infección con EIDD-2801. Se evitó completamente la fiebre en los hurones con profilaxis y tratamiento 12 horas después de la infección con EIDD-2801. Incluso el tratamiento con EIDD-2801 24 horas después de la infección pudo reducir rápidamente los 10 valores víricos en muestras de lavado nasal, así como la fiebre. Los resultados del tratamiento con EIDD-2801 en un modelo de infección por gripe en hurones (A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)) se pueden encontrar en la figura 17. Los valores víricos en el lavado nasal, la fiebre y los valores víricos en los cornetes se redujeron en gran medida 15 con el tratamiento con EIDD-2801 (100 mg/kg) iniciado 12 y 24 horas después de la infección. Incluso cuando se redujo la dosis de EIDD-2801 de 100 mg/kg a 20 mg/kg y se administró 24 horas después de la infección, los valores víricos en el lavado nasal y los cornetes se redujeron en gran medida.

**Ejemplo 48: procedimientos para estudios farmacocinéticos en ratones**

20 Se aclimataron ratones ICR (CD-1) de 7-8 semanas de edad durante ~1 semana después de su recepción. Se pesaron los ratones con una precisión de  $\pm$  1 gramo el día o la mañana antes de la dosificación para calcular los volúmenes de dosificación. Se disolvió EIDD-2801 completamente en 5 ml de solución A (PEG 400/Tween 80 (al 90 %/al 10 %)) con calentamiento y agitación en vórtex y, a continuación, se diluyó con 5 ml de solución B (Solutol (al 30 %)/DMA al 10 %). Se dosificó a los ratones por v.o. Había 3 ratones/grupo, a los que se les iba a tomar muestras en 8 puntos temporales diferentes: 0,25, 0,50, 1, 2, 3, 4, 8 y 24 h. Se recogió sangre en todos los 7 puntos temporales. Se obtuvo la sangre por venopunción retroorbitaria bajo anestesia con isoflurano. Se tomó una muestra 25 de cada ratón una vez (300  $\mu$ l) y se transfirió la sangre de inmediato a tubos Microtainer con heparina de Li en agua helada. Se invirtieron los tubos de heparina-Li con sangre suavemente 2 o 3 veces para mezclarlos bien; a continuación, se colocaron en una gradilla en agua helada hasta que se pudieron centrifugar ( $\leq$  1 hora). Se centrifugaron los tubos a  $\sim$ 2000 x g durante 10 min en una centrífuga refrigerada para separar el plasma de los eritrocitos. Se transfirió el plasma de inmediato a tubos Eppendorf que, a continuación, se colocaron en agua 30 helada. Se congelaron todas las muestras en hielo seco en un plazo de ~1 hora. Se almacenaron las muestras a -80 °C antes del análisis por CL/EM/EM.

**Ejemplo 49: procedimientos para estudios farmacocinéticos en ratas**

35 Se aclimataron ratas Sprague Dawley (SD) macho, de entre 225-249 g de peso, durante al menos dos días antes del experimento. El día antes del experimento, se pesaron las ratas para determinar el volumen de dosificación promedio de EIDD-2801. Para la dosificación por sonda gástrica oral, se disolvió EIDD-2801 en PEG 400 al 10 %, Cremophor RH40 al 2,5 % en agua a 64 mg/ml y se dosificó a 5 ml/kg. Se sacrificaron tres ratas en cada tiempo por asfixia con dióxido de carbono. Se recogieron tejidos y plasmas 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de la dosis. A una 40 rata se le dosificó el vehículo y se sacrificó por asfixia 6 horas después de la dosis. Se recogió plasma de cada animal cortando la aorta para recoger aproximadamente 0,3 ml de sangre completa en un tubo de heparina de litio. Se centrifugó la sangre a 2000 x g durante 10 min a 5 °C. A continuación, se transfirió el plasma a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Se obtuvieron el cerebro, el bazo, el pulmón, el riñón, el hígado y el corazón de cada rata. Los tejidos se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se 45 almacenaron a -80 °C. Se pesaron cortes de 30-70 mg de tejido animal congelado en tubos reforzados de 2 ml y se registraron los pesos. Se homogeneizaron las muestras en acetonitrilo al 70 % en agua que incluía EIDD-1931 marcado con  $^{13}\text{C}_5$  y EIDD-1931-TP marcado con  $^{13}\text{C}_5$  como patrones internos a 4 °C usando un homogeneizador de bolas Omni bead-ruptor (Omni International, Inc., Kennesaw, GA). Se transfirieron los homogeneizados a tubos de microcentrífuga de 2 ml y se centrifugaron durante 5 minutos a 15.000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5415D 50 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para retirar los sólidos grandes. A continuación, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 ml y se centrifugó de nuevo en una centrífuga Eppendorf 5415D durante 10 minutos a 15.000 rpm para retirar cualquier sólido restante. Se transfirió el sobrenadante restante a un vial de CLEM y se analizó por medio de CLEM-EM. Se extrajeron alícuotas de plasma de rata con acetonitrilo que incluía

EIDD-1931 marcado con  $^{13}\text{C}_5$  como patrón interno. Se aclararon las muestras por centrifugación en una centrífuga Eppendorf 5415D durante 10 minutos a 15.000 rpm. Se transfirieron los sobrenadantes aclarados a viales de HPLC para su análisis usando el procedimiento cualificado BAM-106.

- 5 Se mantuvieron las muestras a 4 °C en un muestreador automático Leap Pal (CTC Analytics AG, Zwingen, Suiza). Se realizó la separación por HPLC en un sistema Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con un horno de columna, una lámpara UV y una bomba binaria. Para muestras de tejido se usó una columna SeQuant ZIC-pHILIC (100 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (Merck Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) para la separación de EIDD-1931, EIDD-2781, EIDD-2061, ATP, EIDD-1931 marcado con  $^{13}\text{C}_5$  y EIDD-1931-TP marcado con  $^{13}\text{C}_5$ . La fase móvil A consistió en un tampón de bicarbonato de amonio 25 mM en agua de calidad HPLC, pH 9,8 y la fase móvil B consistió en acetonitrilo puro. Se realizó un procedimiento de HPLC isocrática de 8,5 minutos al 35 % de fase móvil A para separar los analitos. Se realizó el análisis de espectrometría de masas en un espectrómetro de masas QTRAP 5500 (AB Sciex, Framingham, MA, EE. UU.) usando ionización por electronebulización (ESI) en modo negativo en modo de seguimiento de reacciones múltiples (MRM). Se usó una columna Acclaim Polar Advantage II (3,0 x 50 mm, tamaño de partícula de 3  $\mu\text{m}$ ) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para el análisis de EIDD-2801. La fase móvil A consistió en un tampón de formiato de amonio 100 mM en agua de calidad HPLC y la fase móvil B consistió en acetonitrilo puro. Se empleó un procedimiento de gradiente de un 5-100 % de fase móvil B durante 3 minutos. Se realizó el análisis de espectrometría de masas en un espectrómetro de masas QTRAP 5500 (AB Sciex, Framingham, MA, EE. UU.) usando ionización por electronebulización (ESI) en modo positivo en modo de seguimiento de reacciones múltiples (MRM). Para las muestras de plasma, se usó una columna SeQuant ZIC-pHILIC (100 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (Merck Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) para la separación de EIDD-1931, EIDD-2801 y 1931 marcado con  $^{13}\text{C}_5$ . La fase móvil A consistió en un tampón de bicarbonato de amonio 25 mM en agua de calidad HPLC, pH 9,8 y la fase móvil B consistió en acetonitrilo puro. Se realizó un procedimiento de HPLC isocrática de 4,5 minutos al 35 % de fase móvil A para separar los analitos. Se realizó el análisis de espectrometría de masas en un espectrómetro de masas QTRAP 5500 (AB Sciex, Framingham, MA, EE. UU.) usando ionización por electronebulización (ESI) en modo negativo en modo de seguimiento de reacciones múltiples (MRM). Se realizó el análisis de datos usando el programa informático Analyst (AB Sciex, Framingham, MA, EE. UU.).

### 30 Ejemplo 50: procedimientos para estudios farmacocinéticos en perros

- Se aclimataron perros sometidos previamente a experimentación (de Marshall Biosciences) de entre 6,5 a 6,8 meses de edad, con un peso de entre 7,1 a 7,95 kg a su entorno durante al menos tres días antes del primer acontecimiento de dosificación. Se ejecutaron los acontecimientos de dosificación posteriores después de un período de reposo farmacológico de 7 días. Se pesaron los perros al menos una vez antes de cada acontecimiento de dosis para determinar el volumen de dosis. Se disolvió EIDD-1931 en solución salina estéril a 8 mg/ml para dosificación i.v. Para la dosificación oral, se resuspendió EIDD-2801 en metilcelulosa al 1 % (v/v) en agua a 6,20 y 60 mg/ml. Para la dosificación i.v., se dosificó a los perros un volumen de dosis de 1 ml/kg, y se dosificó a los perros que recibieron la dosis v.o. un volumen de dosis de 5 ml/kg. Se recogieron muestras de sangre recogidas de perros a los que se dosificó por sonda gástrica oral previamente a la dosis, 0,25, 0,50, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 18 y 24 horas después de la dosis. Se recogieron muestras de sangre recogidas de perros a los que se dosificó por vía intravenosa previamente a la dosis, 0,083, 0,25, 0,50, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas después de la dosis. Se recogieron muestras de sangre de la vena yugular y/o cefálica en tubos Microtainer con heparina-litio, se centrifugaron a 2000 x g durante 10 min a 5 °C, y se transfirieron los plasmas a tubos nuevos y se almacenaron a -80 °C antes de procesarse para su cuantificación por CL-EM/EM. Se extrajeron alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  de plasma de perro con 950  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo que incluía EIDD-1931 marcado con  $^{13}\text{C}_5$  como patrón interno. Se aclararon las muestras por centrifugación a 20.000 x g a 4 °C durante 5 min. Se transfirieron los sobrenadantes aclarados a viales de HPLC para su análisis. Se mantuvieron las muestras a 4 °C en un muestreador automático Leap Pal (CTC Analytics AG, Zwingen, Suiza). Se realizó la separación por HPLC en un sistema Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con un horno de columna, una lámpara UV y una bomba binaria. Se usó una columna SeQuant ZIC-pHILIC (100 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (Merck Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) para la separación de EIDD-1931, EIDD-2801 y EIDD-1931 marcado con  $^{13}\text{C}_5$ . La fase móvil A consistió en un tampón de bicarbonato de amonio 25 mM en agua de calidad HPLC, pH 9,8 y la fase móvil B consistió en acetonitrilo puro. Se realizó un procedimiento de HPLC isocrática de 4 minutos al 35 % de fase móvil A para separar los analitos. Se realizó el análisis de espectrometría de masas en un espectrómetro de masas QTRAP 5500 (AB Sciex, Framingham, MA, EE. UU.) usando ionización por electronebulización (ESI) en modo negativo en modo de seguimiento de reacciones múltiples (MRM). Se realizó el análisis de datos usando el programa informático Analyst (AB Sciex, Framingham, MA, EE. UU.). Los parámetros de FC se calculan usando la herramienta de análisis no compartimental Phoenix WinNonLin 6.4 (compilación 6.4.0.768) (Certara, Princeton, NJ, EE. UU.). La biodisponibilidad de EIDD-2801 se calcula comparando la exposición (ABC-inf.) de EIDD-1931 después de la dosificación oral de EIDD-2801 con la exposición de EIDD-1931 después de la dosificación intravenosa de EIDD-1931 usando la fórmula a continuación.

$$\text{Biodisponibilidad oral} = \frac{\text{Dosis}_{i.v.}}{\text{Dosis}_{v.o.}} \times \frac{\text{ABC}_{v.o.}}{\text{ABC}_{i.v.}}$$

**Ejemplo 51: estabilidad de los microsomas plasmáticos y hepáticos para EIDD-2800, 2801 y 2898**

Sustrato	Especie	Plasma t1/2 (min)	Microsomas hepáticos t1/2 (min)
EIDD-2800	Ratón	1	< 1
	Mono	2	2
	Ser humano	1	1
EIDD-2801	Ratón	1	2
	Rata	1	5
	Perro	192	1
	Mono	24	1
	Ser humano	63	73
EIDD-2898	Ratón	144	6
	Mono	138	13
	Ser humano	198	14

**Ejemplo 52: parámetros farmacocinéticos de ratones**

5

Parámetros farmacocinéticos plasmáticos para EIDD-1931 y EIDD-2898 en ratones después de dosis únicas de EIDD-2898.

Dosis de EIDD-2989	Analito	t <sub>máx.</sub>	C <sub>máx.</sub>	ABC <sub>inf.</sub>	t <sub>1/2</sub>
mg/kg		(h)	(nmol/ml)	(h·nmol/ml)	(h)
15	1931	0,25	11	10,2	2,9
	2898	0,08	23,1	8,23	0,34
225	1931	0,5	69,3	83,4	4,2
	2989	0,5	7,61	9,57	3,1
750	1931	0,5	71,3	228,9	5,2
	2989	0,25	7,3	21,9	6,7

**Ejemplo 53: parámetros farmacocinéticos de ratones**

Parámetros farmacocinéticos tisulares para EIDD-1931 y EIDD-2061 (EIDD-1931-5'-trifosfato) en ratones después de dosis únicas de EIDD-2898.

Dosis de EIDD-2898	Analito	Bazo		Cerebro		Pulmón	
		ABC <sub>0→t</sub>	C <sub>máx.</sub>	ABC <sub>0→t</sub>	C <sub>máx.</sub>	ABC <sub>0→t</sub>	C <sub>máx.</sub>
mg/kg		(h·nmol/g)	(nmol/g)	(h·nmol/g)	(nmol/g)	(h·nmol/g)	(nmol/g)
225	1931	536,4	285,1	202,4	12,6	113,4	76,7
	2061	110,8	9,9	63,1	3,5	35,0	2,5
750	1931	1420,8	373,1	107,9	18,8	386,9	82,4
	2061	257,0	24,7	64,1	5,5	120,2	10,9

15

**Ejemplo 54: parámetros farmacocinéticos de ratones**

Parámetros farmacocinéticos plasmáticos para EIDD-1931 en ratones después de una dosis única de EIDD-2800 (180 mg/kg). No se observó EIDD-2800 (original) en ningún punto temporal.

Analito	t <sub>máx.</sub>	C <sub>máx.</sub>	ABC <sub>inf.</sub>	t <sub>1/2</sub>
	(h)	(nmol/ml)	(h·nmol/ml)	(h)
EIDD-1931	0,5	11,4	42,5	1,86

5 **Ejemplo 55: parámetros farmacocinéticos de perros**

Parámetros farmacocinéticos plasmáticos para EIDD-1931 en perros después de una dosis única de EIDD-2800 (140 mg/kg). No se observó EIDD-2800 (original) en ningún punto temporal.

Analito	t <sub>máx.</sub>	C <sub>máx.</sub>	ABC <sub>inf.</sub>	t <sub>1/2</sub>
	(h)	(nmol/ml)	(h·nmol/ml)	(h)
EIDD-1931	1,4 ± 0,5	112,8 ± 21,1	497,7 ± 40,4	4,8 ± 1

10 **Ejemplo 56: protocolo para evaluar EIDD-2801 en un modelo de ratón de infección por VEEV intranasal**

Para este estudio se usaron ratones hembra CD-1 de 7-8 semanas de edad. La cepa de burro Trinidad del VEEV se obtuvo originalmente de los Centros para el Control de Enfermedades y, adicionalmente, se pasó una vez en células Vero para expandir el virus y se valoró por un ensayo de calvas. Se retrovaloró el inóculo residual usado para el experimento después de la exposición para confirmar la dosis suministrada. Se asignaron los ratones aleatoriamente a grupos de 10 animales. La exposición al virus consistió en la aplicación intranasal de ~100 UFC de virus, correspondiente a ~100 LD<sub>50</sub>, en un volumen de 25 µl de PBS dividido en dos narinas y suministrado bajo anestesia con cetamina-xilacina. Se administró EIDD-2801 por v.o. por alimentación por sonda gástrica, dos veces al día durante 6 días. Se administró el primer tratamiento 6 h después de la exposición al virus y, a continuación, se dio un tratamiento de seguimiento cada 12 horas (d.v.d.) comenzando 12 horas después de la infección (un total de 13 dosis, 6 días de tratamiento). Se retrovaloró el virus inoculado después de la exposición para confirmar la dosis.

25 Se dosificó a los animales por sonda gástrica usando una aguja de sonda gástrica esterilizada. Se sometieron a ensayo los valores de virus en suero y cerebro usando un ensayo de placa de doble superposición estándar donde se inocularon volúmenes de 0,1 ml de diluciones sucesivas de homogeneizado de suero o cerebro en células Vero cultivadas en placas de 6 pocillos. Se contaron las calvas ~48 horas después de la inoculación y se calcularon los valores sobre la base de ml de suero o gramo de cerebro. El límite de detección de este ensayo fue de 100 calvas por ml o por gramo. Se analizó la supervivencia de los animales usando una prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox), una prueba del orden logarítmico para tendencias y la prueba de Gehan-Breslow-Wilcox para comparaciones de grupos (todas parte de Prism 6, GraphPad Software, Inc.).

30 **Ejemplo 57: resultados de la dosificación de EIDD-2801 en un modelo de ratón de infección por VEEV intranasal**

35 Se trataron los ratones infectados con VEEV intranasal con cuatro niveles de dosis de EIDD-2801 diferentes. El efecto del tratamiento sobre la supervivencia se puede encontrar en la figura 18.

40 **Ejemplo 58: protocolo para evaluar el tiempo de tratamiento de EIDD-2801 en un modelo de ratón de infección por VEEV intranasal**

45 Para este estudio se usaron ratones hembra ICR de 7-8 semanas de edad. Se pasó la cepa de burro Trinidad del VEEV una vez en células Vero para expandir el virus y se valoró por un ensayo de calvas. Se retrovaloró el inóculo residual usado para el experimento después de la exposición para confirmar la dosis suministrada. Se asignaron los ratones aleatoriamente a grupos de 10 animales. La exposición al virus consistió en la aplicación intranasal de ~100 UFC de virus, correspondiente a ~100 LD<sub>50</sub>, en un volumen de 25 µl de PBS dividido en dos narinas y suministrado bajo anestesia con cetamina-xilacina. Se administró EIDD-2801 por v.o. por alimentación por sonda gástrica. Se iniciaron los tratamientos a las 6, 24, 48 o 72 h después de la infección y se continuaron dos veces al día (cada 12 horas; d.v.d.) durante 6 días independientemente de la hora de inicio. Se trató el grupo de control de vehículo (grupo 6) de la misma manera con el vehículo solo (PEG-400 al 10 %, Cremophor RH 40 al 2,5 % en agua). Se sometieron a ensayo los valores de virus en suero y cerebro usando un ensayo de placa de doble superposición estándar donde se inocularon volúmenes de 0,1 ml de diluciones sucesivas de homogeneizado de suero o cerebro en células Vero cultivadas en placas de 6 pocillos. Se contaron las calvas ~48 horas después de la inoculación y se calcularon los valores sobre la base de ml de suero o gramo de cerebro. El límite de detección de este ensayo fue de 100 calvas por ml o por gramo. Se analizó la supervivencia de los animales usando una prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox) para la comparación de grupos (Prism 6, GraphPad Software, Inc.).

**Ejemplo 59: resultados del tiempo de dosificación de tratamiento con EIDD-2801 en un modelo de ratón de infección por VEEV intranasal**

5 Se trataron los ratones infectados con VEEV intranasal con EIDD-2801 (600 mg/kg). El efecto del retraso en el inicio del tratamiento sobre la supervivencia se puede encontrar en la figura 19.

**Ejemplo 60: protocolo para evaluar el tratamiento profiláctico con EIDD-2801 en un modelo de ratón de infección por SARS**

10 Se usaron ratones C57BL/6J de 20 semanas de edad hembras y machos después de un período de aclimatación de cinco días o mayor en BSL3. Para cada sexo, se asignaron los animales aleatoriamente a grupos de tratamiento y se marcaron individualmente con perforaciones en las orejas. La cepa vírica utilizada para estos estudios se derivó del clon infeccioso de la cepa MA15 (MA15) del SARS-CoV adaptada a ratón. Después de la electroporación de células Vero E6 con ARN genómico vírico de MA15 del SARS, se extrajo el sobrenadante cuando la monocapa presentó >80 % de ECP. La reserva resultante se pasó dos veces por células Vero E6 para generar una reserva de trabajo con un valor de  $6,3 \times 10^7$  UFC/ml.

20 Se extrajo el lóbulo pulmonar izquierdo grande de cada ratón en un tubo con tapa de rosca de 2 ml que contenía microesferas de vidrio y 1 ml de PBS. Se congeló esta muestra a -80 °C hasta que se realizó el ensayo de calvas. 24 h antes de realizar el ensayo de calvas, se sembraron placas de 6 pocillos de células Vero E6 a 500.000 células/pocillo/2 ml. Se incubaron las células a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 h. El día del ensayo, se homogeneizaron los pulmones usando un Magnalyzer de Roche, se aclararon los homogeneizados por medio de centrifugación a >10.000 x g, se diluyeron sucesivamente en PBS, se añadieron a monocapas de células Vero E6 y se incubaron a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 1 h después de lo que se cubrieron las células con medio que contenía agarosa al 0,8 %. Dos días después, se tiñeron las monocapas con tinción de viabilidad rojo neutro para facilitar la visualización de calvas. Se enumeraron los números de calvas por virus diluido para generar las unidades formadoras de calvas por lóbulo pulmonar (UFC/lóbulo).

30 Para estos estudios se usaron números equivalentes de machos y hembras de 20-25 semanas de edad SPF C57BL/6J (Stock 000664 Jackson Labs). Se asignaron los ratones aleatoriamente a cada grupo de tratamiento. Los grupos que se iban a infectar con SARS-CoV estaban compuestos por 10 ratones (5 machos/5 hembras). Para controlar los efectos potenciales asociados con la dosificación oral sobre el peso del animal o la función pulmonar, así como el efecto del compuesto sometido a prueba, también se incluirán dos grupos infectados "de referencia" más pequeños (n = 6, 3 machos y 3 hembras cada uno). Se suministró EIDD-2801 o el control de vehículo por medio de sonda gástrica oral (v.o.) dos veces al día (d.v.d.). Se inició la primera dosis a -2 h en relación con la exposición al virus; la segunda dosis fue a las 12 hpi y, a continuación, cada 12 h después de esto durante 5 días; un total de 10 dosis. Se anestesió a los ratones con una mezcla de cetamina/xilacina antes de la infección intranasal con una dosis de  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de calvas (UFC) de la cepa MA15 del SARS-CoV en 40 0,05 ml diluidas en PBS en el tiempo 0 hpi. Se pesaron todos los ratones diariamente y se sometió a ensayo un subconjunto de ratones por pletismografía de cuerpo entero (4 ratones, 2 machos y 2 hembras por grupo de tratamiento) para determinar la función pulmonar diariamente durante 5 días después de la infección. Tras el sacrificio, el día 5 después de la infección, se evaluaron los pulmones para determinar la puntuación de hemorragia pulmonar. A continuación, se extrajo tejido para determinar el valor pulmonar de virus y la anatopatología. Se extrajo el lóbulo izquierdo grande para determinar el valor pulmonar de virus y se extrajo el lóbulo inferior derecho para determinar la anatopatología. *Pletismografía de cuerpo entero:* Se realizó seguimiento a la función pulmonar una vez al día por medio de pletismografía de cuerpo entero (Buxco Respiratory Solutions, DSI Inc.). Se eligió a los ratones destinados a este análisis antes de la infección. En resumen, después de un tiempo de aclimatación de 30 minutos en el pletismógrafo, se registraron datos para 11 parámetros cada 2 segundos durante 45 5 minutos.

55 *Análisis estadístico:* todo el análisis de datos estadístico se realizó en Graphpad Prism 7. La significación estadística de cada criterio de valoración se determinó con pruebas estadísticas específicas. Para cada prueba se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . Para el porcentaje de peso de partida y la pletismografía de cuerpo entero, se realizó un ANOVA bifactorial y una prueba de comparación múltiple de Dunnet. Para la hemorragia pulmonar y el valor pulmonar de virus, se realizó un ANOVA unifactorial con una prueba de comparación múltiple de Kruskall-Wallace.

60 **Ejemplo 61: resultados de la dosificación profiláctica con EIDD-2801 en un modelo de ratón con infección por SARS**

Se trataron profilácticamente los ratones infectados con SARS con EIDD-2801. El efecto del tratamiento sobre los valores víricos pulmonares se puede encontrar en la figura 20.

65 **Ejemplo 62: protocolo para evaluar el tiempo de tratamiento con EIDD-2801 en un modelo de ratón con infección por SARS**

Se usaron ratones C57BL/6J de 25-29 semanas de edad hembras y machos después de un período de aclimatación de cinco días o mayor en BSL3. Para cada sexo, se asignaron los animales aleatoriamente a grupos de tratamiento y se marcaron individualmente con perforaciones en las orejas. La reserva de virus utilizado para estos estudios se derivó del clon infeccioso de la cepa MA15 (MA15) del SARS-CoV adaptada a ratón que se generó en el laboratorio de Baric. Después de la electroporación de células Vero E6 con ARN genómico vírico de MA15 del SARS, se extrajo el sobrenadante cuando la monocapa presentó >80 % de ECP. La reserva resultante se pasó dos veces por células Vero E6 para generar una reserva de trabajo con un valor de  $6,3 \times 10^7$  UFC/ml. Se extrajo el lóbulo pulmonar inferior derecho de cada ratón en un tubo con tapa de rosca de 2 ml que contenía microesferas de vidrio y 1 ml de PBS. Se congeló esta muestra a -80 °C hasta que se realizó el ensayo de calvas. 24 h antes de realizar el ensayo de calvas, se sembraron placas de 6 pocillos de células Vero E6 a 500.000 células/pocillo/2 ml. Se incubaron las células a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 h. El día del ensayo, se homogeneizaron los pulmones usando un Magnalyzer de Roche, se aclararon los homogeneizados por medio de centrifugación a >10.000 x g, se diluyeron sucesivamente en PBS, se añadieron a monocapas de células Vero E6 y se incubaron a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 1 h después de lo que se cubrieron las células con medio que contenía agarosa al 0,8 %. Dos días después, se tiñeron las monocapas con tinción de viabilidad rojo neutro para facilitar la visualización de calvas. Se enumeraron los números de calvas por virus diluido para generar las unidades formadoras de calvas por lóbulo pulmonar (UFC/lóbulo). Para estos estudios se usaron números equivalentes de machos y hembras de 25-29 semanas de edad SPF C57BL/6J. Se asignaron los ratones aleatoriamente a cada grupo de tratamiento. Los grupos que se iban a infectar con SARS-CoV estaban compuestos por 10 ratones (5 machos/5 hembras). Se suministró EIDD-2801 o el control de vehículo por medio de sonda gástrica oral (v.o.) dos veces al día (d.v.d.). Se inició la dosificación a -2 h, +12 h, +24 h o +48 h en relación con la exposición al virus. Se anestesió a los ratones con una mezcla de cetamina/xilacina antes de la infección intranasal con una dosis de  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de calvas (UFC) de la cepa MA15 del SARS-CoV en 0,05 ml diluidas en PBS en el tiempo 0 hpi. Se pesaron todos los ratones diariamente y se sometió a ensayo un subconjunto de ratones por plethysmografía de cuerpo entero (4 hembras por grupo de tratamiento) diariamente para determinar la función pulmonar. Tras el sacrificio a los 5 dpi, se evaluaron los pulmones para determinar la puntuación de hemorragia pulmonar. A continuación, se extrajo tejido para determinar el valor pulmonar de virus y la anatomopatología. Se extrajo el lóbulo izquierdo grande para anatomopatología y se extrajo el lóbulo izquierdo inferior para determinar el valor de virus. Se realizó seguimiento a la función pulmonar una vez al día por medio de plethysmografía de cuerpo entero (Buxco Respiratory Solutions, DSI Inc.). Se eligió a los ratones destinados a este análisis antes de la infección. En resumen, después de un tiempo de aclimatación de 30 minutos en el plethysmógrafo, se registraron datos para 11 parámetros cada 2 segundos durante 5 minutos. Todo el análisis de datos estadístico se realizó en Graphpad Prism 7. La significación estadística de cada criterio de valoración se determinó con pruebas estadísticas específicas. Para cada prueba se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . Para el porcentaje de peso de partida y la plethysmografía de cuerpo entero, se realizó un ANOVA bifactorial y una prueba de comparación múltiple de Dunnet. Para la hemorragia pulmonar y el valor pulmonar de virus, se realizó un ANOVA unifactorial con una prueba de comparación múltiple de Kruskall-Wallace.

**40 Ejemplo 63: resultados de la dosificación terapéutica con EIDD-2801 en un modelo de ratón de infección por SARS**

Se trataron los ratones infectados con SARS con EIDD-2801. El efecto del tratamiento sobre las puntuaciones de hemorragia pulmonar y los valores víricos pulmonares se pueden encontrar en las figuras 21 y 22, respectivamente.

**Ejemplo 64: protocolo para evaluar el tratamiento terapéutico con EIDD-2801 en un modelo de ratón de infección por MERS**

50 Se usaron ratones C57BL/6J 288/330 DPP4 hembras y machos de 10-11 semanas de edad creados y criados por el Laboratorio Baric después de un período de aclimatación de cinco días o mayor en BSL3. Para cada sexo, se asignaron los animales aleatoriamente a grupos de tratamiento y se marcaron individualmente con perforaciones en las orejas. La reserva vírica utilizada para estos estudios se derivó de un aislado purificado de calvas de la cepa p35C4 de MERS-CoV (MERS) adaptada a ratón que se generó en el laboratorio de Baric. Después de la purificación de calvas, el virus se pasó dos veces por células Vero CC81. El valor de reserva resultante fue de  $1,1 \times 10^8$  UFC/ml. Se extrajo el lóbulo pulmonar inferior derecho de cada ratón en un tubo con tapa de rosca de 2 ml que contenía microesferas de vidrio y 1 ml de PBS. Se congeló esta muestra a -80 °C hasta que se realizó el ensayo de calvas. 24 h antes de realizar el ensayo de calvas, se sembraron placas de 6 pocillos de células Vero CC81 a 500.000 células/pocillo/2 ml. Se incubaron las células a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 h. El día del ensayo, se homogeneizaron los pulmones usando un Magnalyzer de Roche, se aclararon los homogeneizados por medio de centrifugación a >10.000 x g, se diluyeron sucesivamente en PBS, se añadieron a monocapas de células Vero CC81 y se incubaron a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 1 h después de lo que se cubrieron las células con medio que contenía agarosa al 0,8 %. Tres días después, se tiñeron las monocapas con tinción de viabilidad rojo neutro para facilitar la visualización de calvas. Se enumeró el número de calvas por virus diluido para generar las unidades formadoras de calvas por lóbulo pulmonar (UFC/lóbulo). Se asignaron aleatoriamente números equivalentes de ratones C57BL/6J 288/330 DPP4 de 10-11 semanas de edad a cada grupo de tratamiento para

estos estudios. Cada grupo estaba compuesto por 10 ratones (5 machos/5 hembras). Se suministró EIDD-2801 o el control de vehículo por sonda gástrica oral (v.o.) dos veces al día (d.v.d.) comenzando a -2 h y, a continuación, cada 12 h después de esto. Se anestesió a los ratones con una mezcla de cetamina/xilacina antes de la infección intranasal con una dosis de  $5 \times 10^4$  unidades formadoras de calvas (UFC) de la cepa de MERS en 0,05 ml diluidos en PBS en el tiempo 0 hpi. Se pesaron todos los ratones diariamente y se sometió a ensayo un subconjunto de ratones por pletismografía de cuerpo entero (4 hembras por grupo de tratamiento) diariamente para determinar la función pulmonar. Tras el sacrificio a los 5 dpi, se evaluaron los pulmones para determinar la puntuación de hemorragia pulmonar. A continuación, se extrajo tejido para determinar el valor pulmonar de virus y la anatomopatología. Se extrajo el lóbulo izquierdo grande para anatomopatología y se extrajo el lóbulo izquierdo inferior para determinar el valor de virus. Se realizó seguimiento a la función pulmonar una vez al día por medio de pletismografía de cuerpo entero (Buxco Respiratory Solutions, DSI Inc.). Se eligió a los ratones destinados a este análisis antes de la infección. En resumen, después de un tiempo de aclimatación de 30 minutos en el pletismógrafo, se registraron datos para 11 parámetros cada 2 segundos durante 5 minutos.

15 Todo el análisis de datos estadístico se realizó en Graphpad Prism 7. La significación estadística de cada criterio de valoración se determinó con pruebas estadísticas específicas. Para cada prueba se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . Para el porcentaje de peso de partida y la pletismografía de cuerpo entero, se realizó un ANOVA bifactorial y una prueba de comparación múltiple de Dunnet. Para la hemorragia pulmonar, se realizó un ANOVA unifactorial con una prueba de comparación múltiple de Kruskall-Wallace.

20 **Ejemplo 65: resultados de la dosificación terapéutica con EIDD-2801 en un modelo de ratón de infección por MERS**

25 Se trataron los ratones infectados con MERS con EIDD-2801. El efecto del tratamiento sobre las puntuaciones de hemorragia pulmonar se puede encontrar en la figura 23.

30 **Ejemplo 66: procedimiento para evaluar la captación y el metabolismo celular de EIDD-2801 en células Vero**

35 Se sembraron tres placas de 24 pocillos con células vero primarias a una densidad de siembra de  $0,350 \times 10^6$ /ml de células viables por pocillo. Se incubaron las placas a  $37^\circ/\text{CO}_2$  al 5 % durante la noche para dejar que las células se adhirieran. Se preparó una solución 40 mM de EIDD-2801 en DMSO al 100 %. A partir de la solución madre 40 mM, se preparó una solución 20  $\mu\text{M}$  de EIDD-2801 en 25 ml de medio DMEM completo. Para las placas de tratamiento del compuesto, se aspiró el medio y se añadió 1,0 ml de EIDD-2801 20  $\mu\text{M}$  en medio DMEM completo a los pocillos apropiados. Se preparó una placa separada de células sin ningún compuesto añadido. A continuación, se incubaron las placas a  $37^\circ/\text{CO}_2$  al 5 % para los siguientes puntos temporales: 1, 2, 3, 4, 6, 16 y 24 horas. Se muestreó la placa no tratada a las 0 h. Después de la incubación en los puntos temporales deseados, se lavaron las células 2X con 1,0 ml de DPBS. Se extrajeron las células añadiendo 500  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo al 70 %/agua al 30 % enriquecida con el patrón interno a cada pocillo tratado con EIDD-2801. Se extrajo la placa de blanco no tratada con 500  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo al 70 %/agua al 30 % por pocillo. Se pipetearon las muestras hacia arriba y hacia abajo varias veces. Se transfirieron las muestras a tubos de microcentrifuga etiquetados. Se centrifugaron las muestras a 16.000 x g durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Se transfirieron 300  $\mu\text{l}$  de sobrenadante a viales de HPLC etiquetados y se almacenaron las muestras a  $-80^\circ\text{C}$  o se enviaron al grupo BCDMPK para su análisis por CL-EM/EM.

40 **Ejemplo 67: resultados de la captación y el metabolismo celular de EIDD-2801 en células Vero**

Analito	$C_{\text{máx.}}$	$t_{\text{máx.}}$	$ABC_{0 \rightarrow t}$
Analito	(pmol/M células)	(h)	(pmol·h/M células)
EIDD-1931 (Nuc)	13,5	24	228,6
EIDD-2061 (TP)	872,0	16	13850
EIDD-2801 (original)	121,2	3	1724

50 **Ejemplo 68: procedimiento para evaluar la captación y el metabolismo celular de EIDD-2801 en células Huh-7**

55 Se sembraron cuatro placas de 24 pocillos con células Huh-7 a una densidad de siembra de  $0,35 \times 10^6$ /ml de células viables por pocillo. Se incubaron las placas a  $37^\circ/\text{CO}_2$  al 5 % durante la noche para dejar que las células se adhirieran. Se preparó una solución madre 40 mM de EIDD-2801 en DMSO al 100 %. A partir de la solución 40 mM, se preparó una solución 20  $\mu\text{M}$  de EIDD-2801 en 25 ml de medio DMEM completo pipeteando 12,5  $\mu\text{l}$  de EIDD-2801 en el medio. Para las placas de tratamiento del compuesto, se aspiró el medio y se añadió 1,0 ml de solución de EIDD-2801 20  $\mu\text{M}$  en medio DMEM completo a los pocillos apropiados. A una placa separada de

5 células no se le añadió ningún compuesto y se aspiró y se reemplazó por medio sin compuesto. Se incubaron las placas a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5 % para los siguientes puntos temporales: 1, 2, 3, 4, 6, 16 y 24 horas. Una placa no tratada fue una muestra de 0 h. Despues de la incubación en los puntos temporales deseados, se lavaron las células 2X con 1,0 ml de PBS. Se extrajeron las células añadiendo 500 ul de acetonitrilo al 70 %/agua al 30 % enriquecida con el 10 patrón interno a cada pocillo tratado con EIDD-2801. Se extrajo la placa de blanco no tratada con 500 ul de acetonitrilo al 70 %/agua al 30 % por pocillo sin un patrón interno. Se pipetearon las muestras hacia arriba y hacia abajo varias veces. Se transfirieron las muestras a tubos de microcentrifuga etiquetados. Se centrifugaron las muestras a 16.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se transfirieron 350 ul de sobrenadante a tubos de 5 ml etiquetados o, si las muestras no se secaban, se dispusieron en viales de HPLC etiquetados. Se almacenaron las muestras a -80 °C o se enviaron al grupo BCDMPK para su análisis por CL-EM/EM.

**Ejemplo 69: resultados de la captación y el metabolismo celular de EIDD-2801 en células Huh-7**

Analito	C <sub>máx.</sub>	t <sub>máx.</sub>	ABC <sub>0→t</sub>
Analito	(pmol/M células)	(h)	(pmol·h/M células)
EIDD-1931 (Nuc)	29,0	24	449,2
EIDD-2061 (TP)	1113,3	24	14640
EIDD-2801 (original)	77,5	2	1025

15 **Ejemplo 70: procedimiento para evaluar la captación y el metabolismo celular de EIDD-2801 en células HepG2**

20 Se sembraron tres placas de 24 pocillos con células vero primarias a una densidad de siembra de 0,350 x 10<sup>6</sup>/ml de células viables por pocillo. Se incubaron las placas a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche para dejar que las células se adhirieran. Se preparó una solución madre 40 mM de EIDD-2801 en DMSO al 100 %. A partir de la solución 40 mM, se preparó una solución 20 µM de EIDD-2801 en 25 ml de medio RPMI completo. Para las placas de tratamiento del compuesto, se aspiró el medio y se añadió 1,0 ml de EIDD-2801 20 µM en medio RPMI completo a los pocillos apropiados. Se preparó una placa separada de células sin ningún compuesto añadido. A continuación, se incubaron las placas a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5 % para los siguientes puntos temporales: 1, 2, 3, 4, 6, 16 y 24 horas. Se 25 muestreó La placa no tratada a las 0 h. Despues de la incubación en los puntos temporales deseados, se lavaron las células 2X con 1,0 ml de PBS. Se extrajeron las células añadiendo 500 ul de acetonitrilo al 70 %/agua al 30 % enriquecida con el patrón interno a cada pocillo tratado con EIDD-2801. Se extrajo la placa de blanco no tratada con 500 ul de acetonitrilo al 70 %/agua al 30 % por pocillo. Se pipetearon las muestras hacia arriba y hacia abajo varias veces. Se transfirieron las muestras a tubos de microcentrifuga etiquetados. Se centrifugaron las muestras a 30 16.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se transfirieron 300 ul de sobrenadante a viales de HPLC etiquetados y se almacenaron las muestras a -80 °C o se enviaron al grupo BCDMPK para su análisis por CL-EM/EM.

**Ejemplo 71: resultados de la captación y el metabolismo celular de EIDD-2801 en células HepG2**

Analito	C <sub>máx.</sub>	t <sub>máx.</sub>	ABC <sub>0→t</sub>
	(pmol/M células)	(h)	(pmol·h/M células)
EIDD-1931 (Nuc)	13,4	16	249,8
EIDD-2061 (TP)	470,3	16	299,8
EIDD-2801 (original)	18,9	3	360,3

35 **Ejemplo 72: procedimiento para evaluar la captación y el metabolismo celular de EIDD-2801 en células CEM**

40 Se sembraron tres placas de 24 pocillos con células vero primarias a una densidad de siembra de 2 x 10<sup>6</sup>/ml de células viables por pocillo. Se incubaron las placas a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche para dejar que las células se adhirieran. Se preparó una solución madre 40 mM de EIDD-2801 en DMSO al 100 %. A partir de la solución 40 mM, se preparó una solución 40 µM de EIDD-2801 en 25 ml de medio RPMI completo. Para las placas de tratamiento del compuesto, se aspiró el medio y se añadió 1,0 ml de EIDD-2801 40 µM en medio RPMI completo a los pocillos apropiados. Se preparó una placa separada de células sin ningún compuesto añadido. A continuación, se incubaron las placas a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5 % para los siguientes puntos temporales: 1, 2, 3, 4, 6, 16 y 24 horas. Se 45 muestreó La placa no tratada a las 0 h. Despues de la incubación en los puntos temporales deseados, se lavaron las células 2X con 1,0 ml de PBS. Se extrajeron las células añadiendo 500 ul de acetonitrilo al 70 %/agua al 30 % enriquecida con el patrón interno a cada pocillo tratado con EIDD-2801. Se extrajo la placa de blanco no tratada

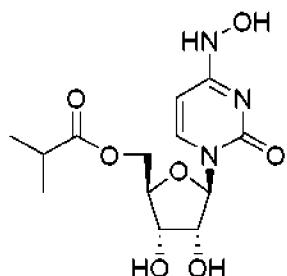
con 500 ul de acetonitrilo al 70 %/agua al 30 % por pocillo. Se pipetearon las muestras hacia arriba y hacia abajo varias veces. Se transfirieron las muestras a tubos de microcentrifuga etiquetados. Se centrifugaron las muestras a 16.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se transfirieron 300 ul de sobrenadante a viales de HPLC etiquetados y se almacenaron las muestras a -80 °C o se enviaron al grupo BCDMPK para su análisis por CL-EM/EM.

**Ejemplo 73: resultados de la captación y el metabolismo celular de EIDD-2801 en células CEM**

Analito	C <sub>máx.</sub> (pmol/M células)	t <sub>máx.</sub> (h)	ABC <sub>0→t</sub> (pmol·h/M células)
EIDD-1931 (Nuc)	0,3	3	5,8
EIDD-2061 (TP)	171,3	24	2355
EIDD-2801 (original)	5,4	4	85,3

## REIVINDICACIONES

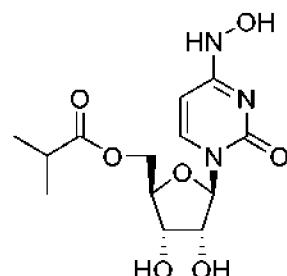
1. Un compuesto representado por la fórmula



o una sal interna o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

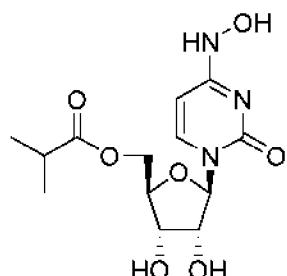
2. El compuesto o sal de la reivindicación 1, que es el compuesto representado por la fórmula:

10



3. El compuesto o sal de la reivindicación 1, que es la sal interna del compuesto representado por la fórmula:

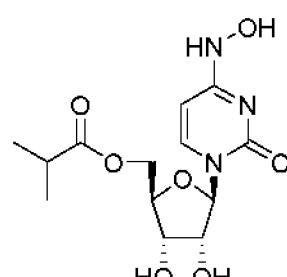
15



4. El compuesto o sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en tratamiento.

20

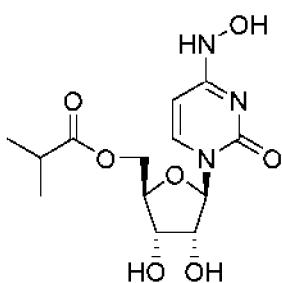
5. Una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y un compuesto representado por la fórmula:



o una sal interna o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

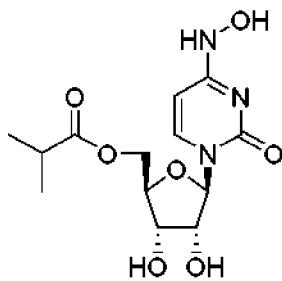
25

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, que comprende el compuesto representado por la fórmula:



7. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, que comprende la sal interna del compuesto representado por la fórmula:

5



8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en la que la composición comprende uno o más agentes antivíricos adicionales.

10

9. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en la que la composición comprende además uno o más agentes antivíricos adicionales seleccionados del grupo que consiste en abacavir, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, ampligen, arbidol, atazanavir, Atripla, balapiravir, BCX4430, boceprevir, cidofovir, combivir, daclatasvir, darunavir, dasabuvir, delavirdina, didanosina, docosanol, edoxudina, efavirenz, emtricitabina, enfuvirtida, entecavir, famciclovir, favipiravir, formivirsen, fosamprenavir, foscarnet, fosfonat, ganciclovir, GS-5734, ibacicabina, Imunovir, idoxuridina, imiquimod, indinavir, inosina, interferón de tipo III, interferón de tipo II, interferón de tipo I, lamivudina, ledipasvir, lopinavir, lovirda, maraviroc, moroxidina, metisazona, nelfinavir, nevirapina, nexavir, NITD008, ombitasvir, oseltamivir, paritaprevir, peginterferón alfa-2a, penciclovir, peramivir, pleconaril, podofilotoxina, raltegravir, ribavirina, rimantadina, ritonavir, pirimidina, saquinavir, simeprevir, sofosbuvir, estavudina, telaprevir, telbivudina, tenofovir, tenofovir disoproxilo, tenofovir exalidex, tipranavir, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valaciclovir, valganciclovir, vicriviroc, vidarabina, viramidina, zalcitabina, zanamivir o zidovudina y combinaciones de los mismos.

15

20

20

25

25

10. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, para su uso en el tratamiento de una infección vírica.

11. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, para su uso en el tratamiento de una infección vírica provocada por un coronavirus.

30

12. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, para su uso en el tratamiento de una infección vírica provocada por un coronavirus humano.

35

13. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, para su uso en el tratamiento de una infección vírica provocada por un coronavirus del SARS.

40

14. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, para su uso en el tratamiento de una infección vírica provocada por un coronavirus del MERS.

45

15. Una combinación que comprende un compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y uno o más agentes activos.

16. La combinación de la reivindicación 15, en la que el uno o más agentes activos se seleccionan de analgésicos, fármacos antiinflamatorios, antitérmicos, antidepresivos, antiepilépticos, antihistamínicos, fármacos

- 5 antiaquecosos, antimuscarínicos, ansiolíticos, sedantes, hipnóticos, neurolépticos, broncodilatadores, fármacos  
antiasmáticos, fármacos cardiovasculares, corticoesteroides, dopaminergicos, electrólitos, fármacos  
gastrointestinales, miorrelajantes, agentes nutricionales, vitaminas, parasimpaticomiméticos, estimulantes,  
anorexígenos, antinarcolépticos y agentes antivíricos.

10 17. La combinación de la reivindicación 15, en la que el uno o más agentes activos se seleccionan de  
analgesicos, antidepresivos, ansiolíticos, sedantes, hipnóticos, neurolépticos y agentes antivíricos,  
broncodilatadores, fármacos antiasmáticos, fármacos cardiovasculares, corticoesteroides, miorrelajantes y  
agentes antivíricos.

15 18. La combinación de la reivindicación 15, en la que el uno o más agentes activos se seleccionan de  
analgesicos, fármacos antiinflamatorios, ansiolíticos, neurolépticos y agentes antivíricos.

20 19. La combinación de la reivindicación 15, en la que el uno o más agentes activos son agentes antivíricos.

25 20. La combinación de la reivindicación 19, en la que el uno o más agentes activos son agentes antivíricos  
seleccionados del grupo que consiste en abacavir, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, ampligen, arbidol,  
atazanavir, Atripla, balapiravir, BCX4430, boceprevir, cidofovir, combivir, daclatasvir, darunavir, dasabuvir,  
delavirdina, didanosina, docosanol, edoxudina, efavirenz, emtricitabina, enfuvirtida, entecavir, famciclovir,  
favipiravir, fomivirsen, fosamprenavir, foscarnet, fosfonat, ganciclovir, GS-5734, ibacicabina, Imunovir, idoxuridina,  
imiquimod, indinavir, inosina, interferón de tipo III, interferón de tipo II, interferón de tipo I, lamivudina, ledipasvir,  
lopinavir, lovirida, maraviroc, moroxidina, metisazona, nelfinavir, nevirapina, nexavir, NITD008, ombitasvir,  
oseltamivir, paritaprevir, peginterferón alfa-2a, penciclovir, peramivir, pleconaril, podofilotoxina, raltegravir,  
ribavirina, rimantadina, ritonavir, pirimidina, saquinavir, simeprevir, sofosbuvir, estavudina, telaprevir, telbivudina,  
tenofovir, tenofovir disoproxilo, tenofovir exalidex, tipranavir, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valaciclovir,  
valganciclovir, vicriviroc, vidarabina, viramidina, zalcitabina, zanamivir o zidovudina y combinaciones de los  
mismos.

30 21. La combinación de la reivindicación 19, en la que el uno o más agentes activos son agentes antivíricos  
seleccionados del grupo que consiste en abacavir, aciclovir, atazanavir, darunavir, efavirenz, emtricitabina,  
entecavir, lamivudina, ledipasvir, lopinavir, maraviroc, ombitasvir, oseltamivir, raltegravir, ribavirina, ritonavir,  
sofosbuvir, tenofovir, tenofovir disoproxilo, tenofovir exalidex, zidovudina y combinaciones de los mismos.

35 22. La combinación de la reivindicación 15, en la que el uno o más agentes activos se seleccionan del grupo que  
consiste en aceclofenaco, paracetamol, adomexetina, almotriptán, alprazolam, amantadina, amcinónida,  
aminociclopropano, amitriptilina, amlodipino, amoxapina, anfetamina, aripiprazol, aspirina, atomoxetina, azasetrón,  
azatadina, beclometasona, benacticina, benoxaprofeno, bermoprofeno, betametasona, bicifadina, bromocriptina,  
budesónida, buprenorfina, buproprión, buspirona, butorfanol, butriptilina, cafeína, carbamazepina, carbidopa,  
carisoprodol, celecoxib, clordiazepóxido, clorpromazina, salicilato de colina, citalopram, clomipramina,  
clonazepam, clonidina, clonitaceno, clorazepato, clotiazepam, clozapina, codeína, corticosterona,  
cortisona, ciclobenzaprina, ciproheptadina, demexiptilina, desipramina, desomorfina, dexametasona, dexanabinol,  
sulfato de dextroanfetamina, dextromoramida, dextropropoxifeno, dezocina, diazepam, dibenzepina, diclofenaco  
sódico, diflunisal, dihidrocodeína, dihidroergotamina, dihidromorfina, dimetacrina, divalproex, dizatryptán,  
dolasetrón, donepezilo, dotiepina, doxepina, duloxetina, ergotamina, escitalopram, estazolam, etosuximida,  
etodolaco, femoxetina, fenamatos, fenoprofeno, fentanilo, fludiazepam, fluoxetina, flufenazina, flurazepam,  
flurbiprofeno, flutazolam, fluvoxamina, frovatriptán, gabapentina, galantamina, gepirona, *Ginkgo biloba*,  
granisetrón, haloperidol, huperzina A, hidrocodona, hidrocortisona, hidromorfona, hidroxizina, ibuprofeno,  
imipramina, indiplon, indometacina, indoprofeno, iprindol, ipsapirona, ketanserina, ketoprofeno, ketorolaco,  
lesopirtrón, levodopa, lipasa, lofepramina, lorazepam, loxapina, maprotilina, mazindol, ácido mefenámico,  
melatonina, melitraceno, memantina, meperidina, meprobamato, mesalamina, metapramina, metaxalona,  
metadona, metanfetamina, metocarbamol, metildopa, metilfenidato, metilsalicilato, metisergida, metoclopramida,  
mianserina, mifepristona, milnaciprán, minaprina, mirtazapina, moclobemida, modafinilo (un antinarcoléptico),  
molindona, morfina, clorhidrato de morfina, nabumetona, nadolol, naproxeno, naratriptán, nefazodona, neurontin,  
nomifensina, nortriptilina, olanzapina, olsalazina, ondansetrón, opipramol, orfenadrina, oxaflozano, oxaprozina,  
oxazepam, oxitriptán, oxicodona, oximorfona, pancrelipasa, parecoxib, paroxetina, pemolina, pentazocina,  
pepsina, perfenazina, fenacetina, fendimetracina, fenmetracina, fenilbutazona, fenoftalina, fosfatidilserina, pimozida,  
pirindol, piroxicam, pizotifeno, pizotilina, pramipexol, prednisolona, prednisona, pregabalina, propanolol,  
propizepina, propoxifeno, protriptilina, quazepam, quinupramina, reboxetina, reserpina, risperidona, ritanserina,  
rivastigmina, rizatriptán, rofecoxib, ropinirol, rotigotina, salsalato, sertralina, sibutramina, sildenafil, sulfasalazina,  
sulindaco, sumatriptán, tacrina, temazepam, tetrabenazina, tiacidas, tioridazina, tiotixeno, tiaprida, tiaspirona,  
tizanidina, tofenacina, tolmetina, toloxaftona, topiramato, tramadol, trazodona, triazolam, trifluoperazina,  
trimetobenzamida, trimipramina, tropisetrón, valdecoxib, ácido valproico, venlafaxina, viloxazina, vitamina E,  
zimeldina, ziprasidona, zolmitriptán, zolpidem, zopiclona e isómeros, sales y combinaciones de los mismos.

65 23. La combinación de la reivindicación 15, en la que el uno o más agentes activos se seleccionan del grupo que  
consiste en paracetamol, alprazolam, amitriptilina, aripiprazol, aspirina, budesónida, buprenorfina, bupropión,

buspirona, carbamazepina, celecoxib, clordiazepóxido, clorpromazina, citalopram, clomipramina, clonazepam, clonidina, clorazepato, clotiazepam, cloxazolam, clozapina, codeína, desipramina, dextropropoxifeno, diazepam, diclofenaco sódico, dihidrocodeína, doxepina, duloxetina, escitalopram, estazolam, etosuximida, fentanilo, fluoxetina, flufenazina, flurazepam, haloperidol, hidrocodona, hidrocortisona, hidromorfona, hidroxizina, ibuprofeno, imipramina, levodopa, lorazepam, maprotilina, ácido mefenámico, melatonina, memantina, metadona, metildopa, mianserina, milnaciprán, mirtazapina, modafinilo (un antinarcoléptico), morfina, clorhidrato de morfina, naproxeno, nefazodona, nortriptilina, olanzapina, oxazepam, oxicodona, paroxetina, perfenazina, fentotina, pimozida, piroxicam, prednisolona, prednisona, pregabalina, propanolol, propizepina, reboxetina, risperidona, sertralina, sildenafil, temazepam, tioridazina, tiaprida, tizanidina, topiramato, tramadol, trazodona, triazolam, trimipramina, venlafaxina, ziprasidona, zolpidem, zopiclona y combinaciones de los mismos.

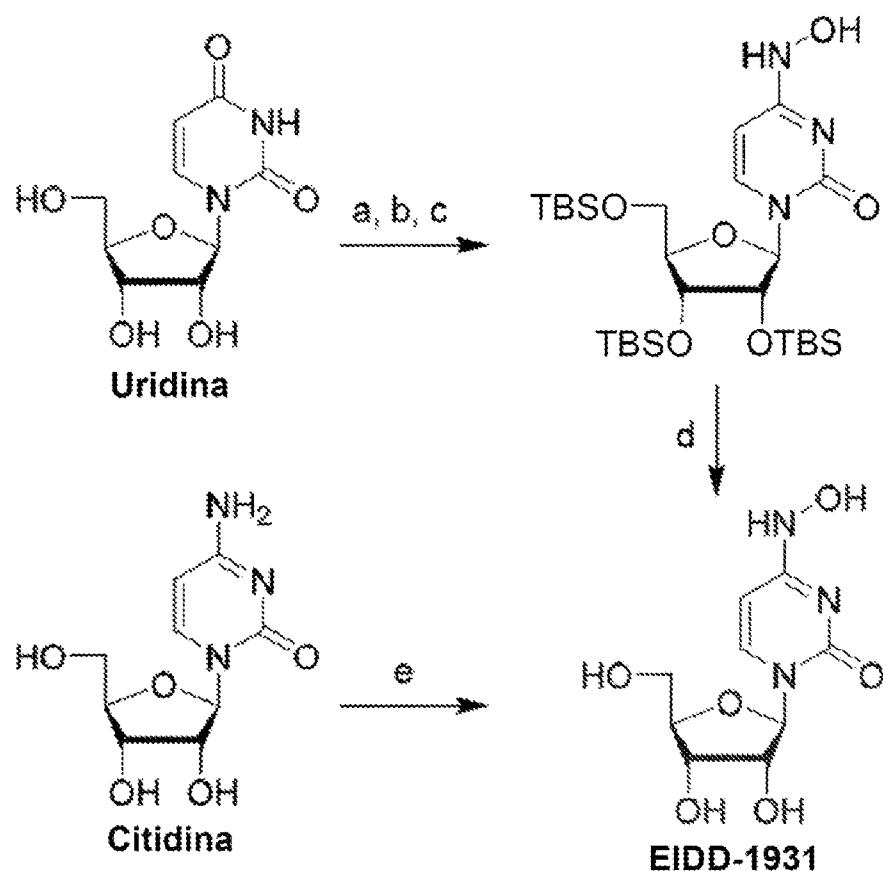


FIG. 1

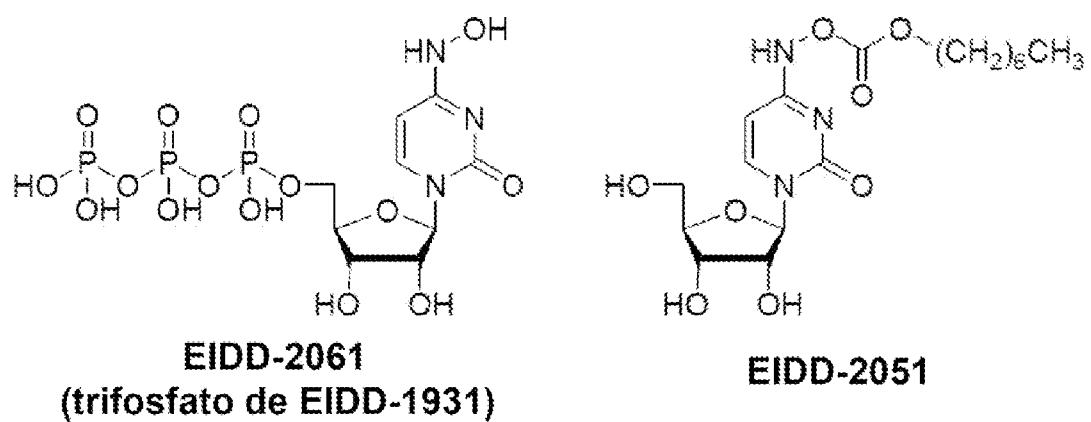


FIG. 2

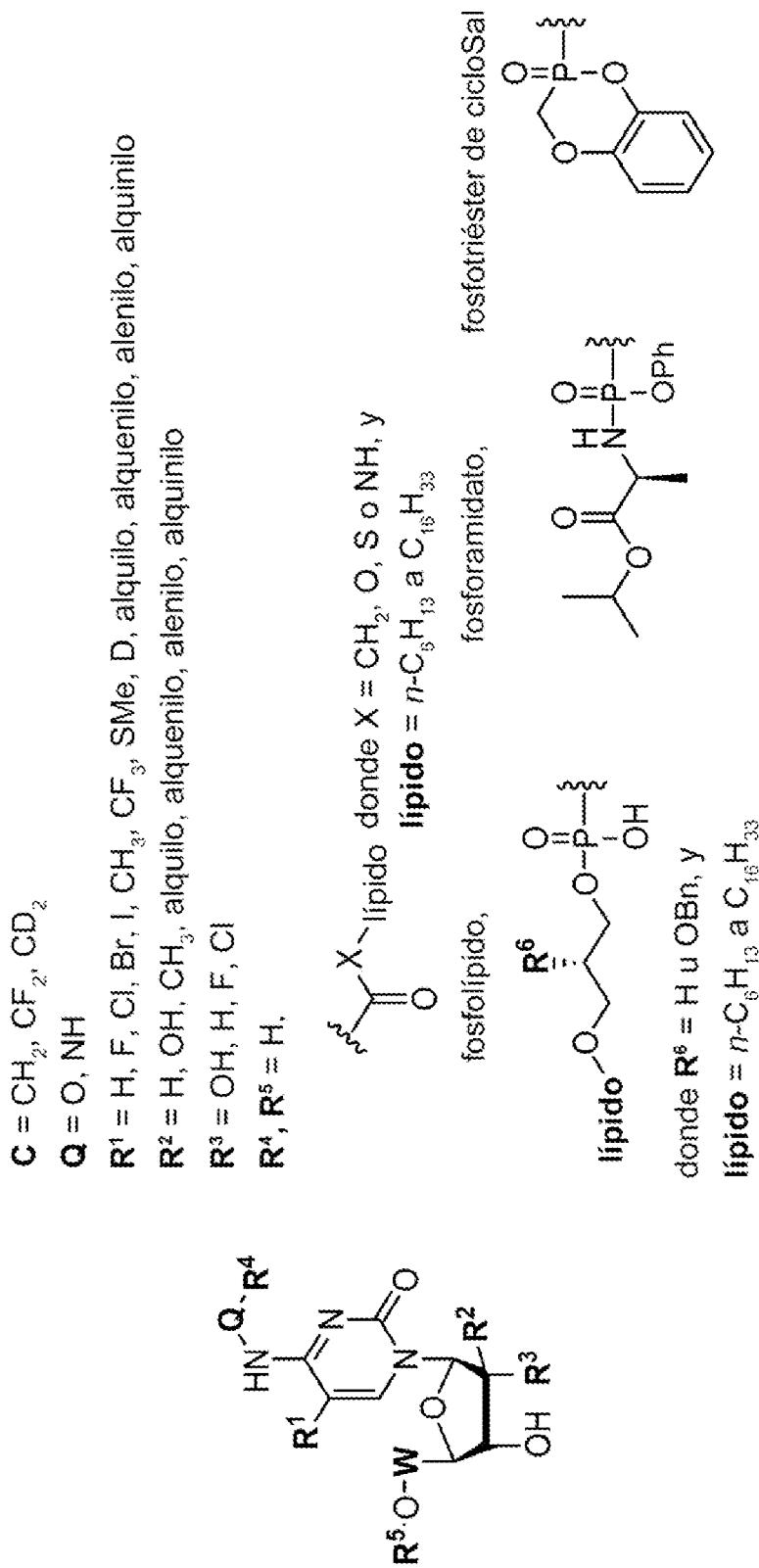


FIG. 3

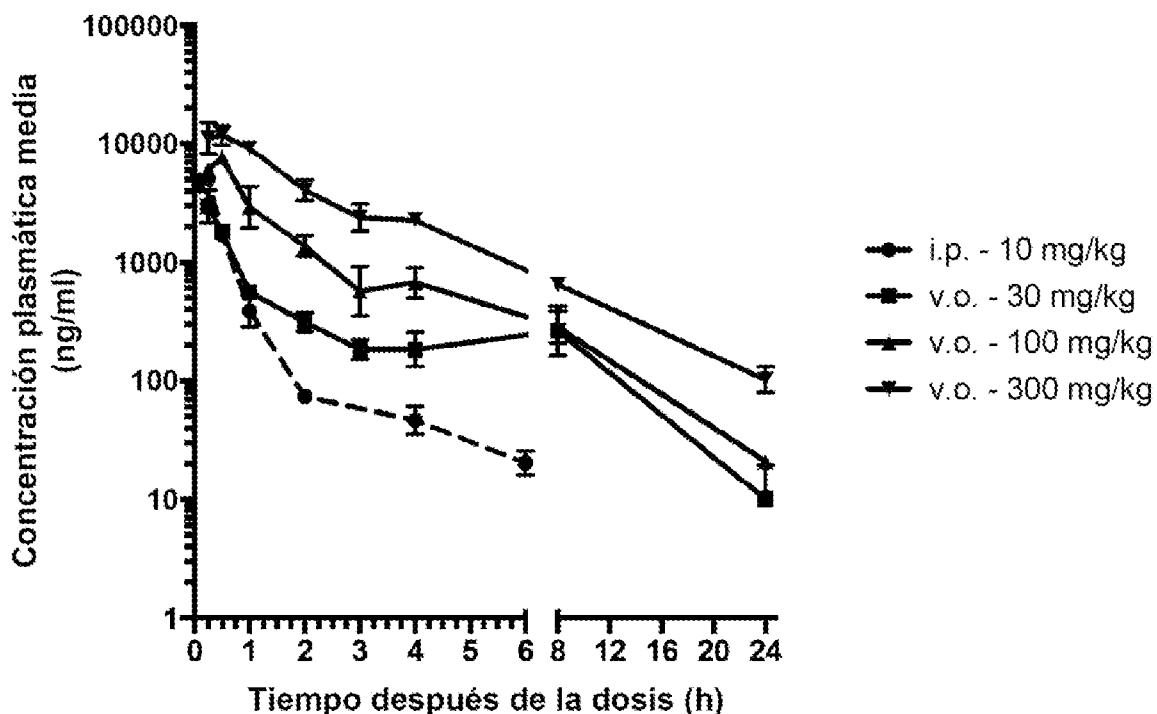


FIG. 4

**Acumulación de nucleósidos en órganos de ratón después de 300 mg/kg v.o. Dosificación con EIDD-01931**

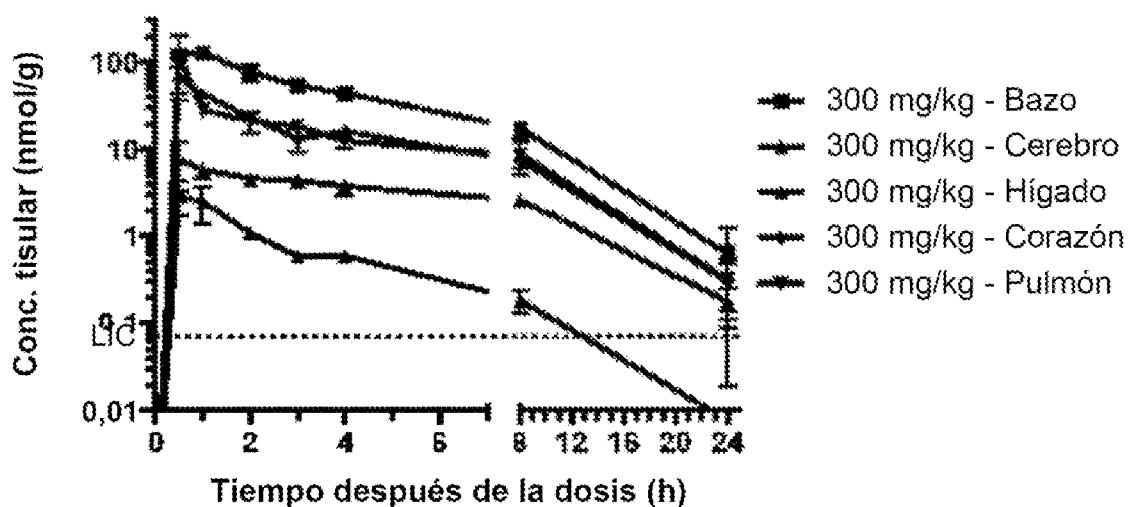


FIG. 5

**Acumulación de trifosfato en órganos de ratón después de 300 mg/kg v.o. Dosificación con EIDD-01931**

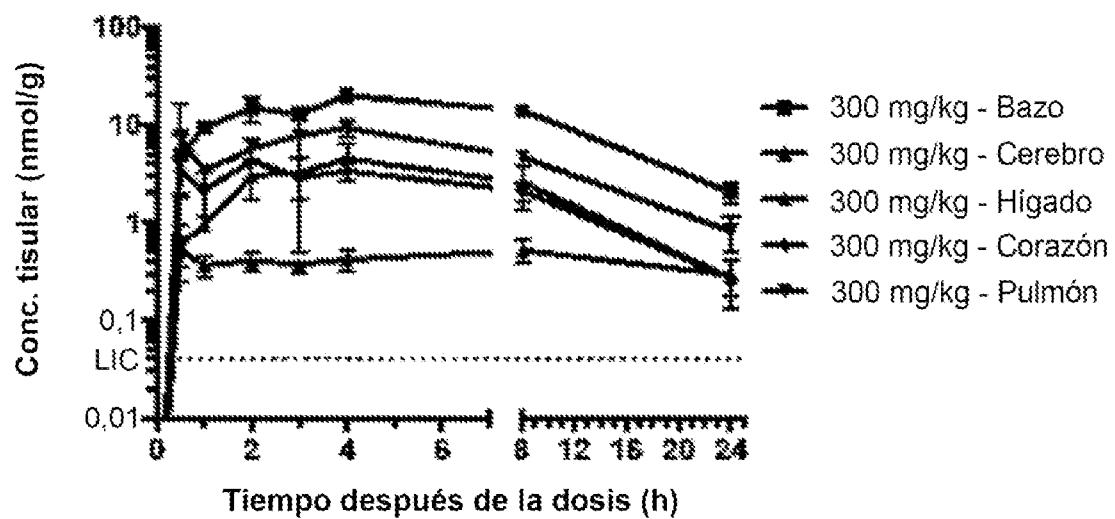


FIG. 6

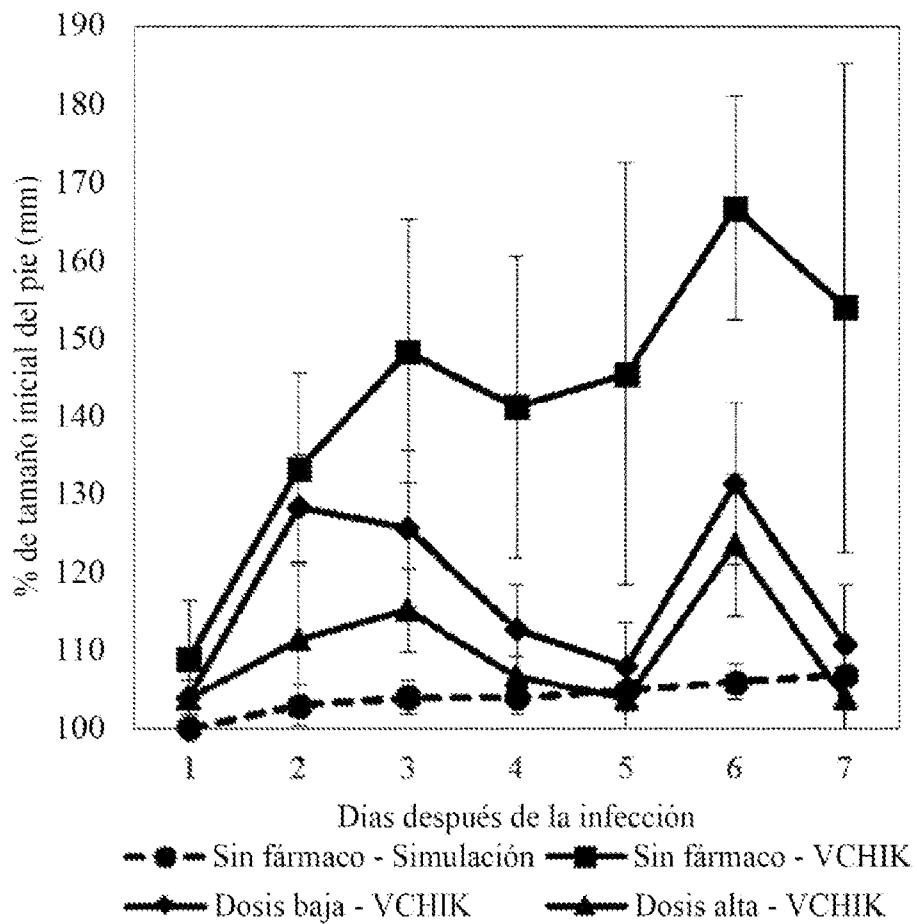


FIG. 7

Copias del VCHIK por PCR ultrarrápida  
después del tratamiento con EIDD-1931

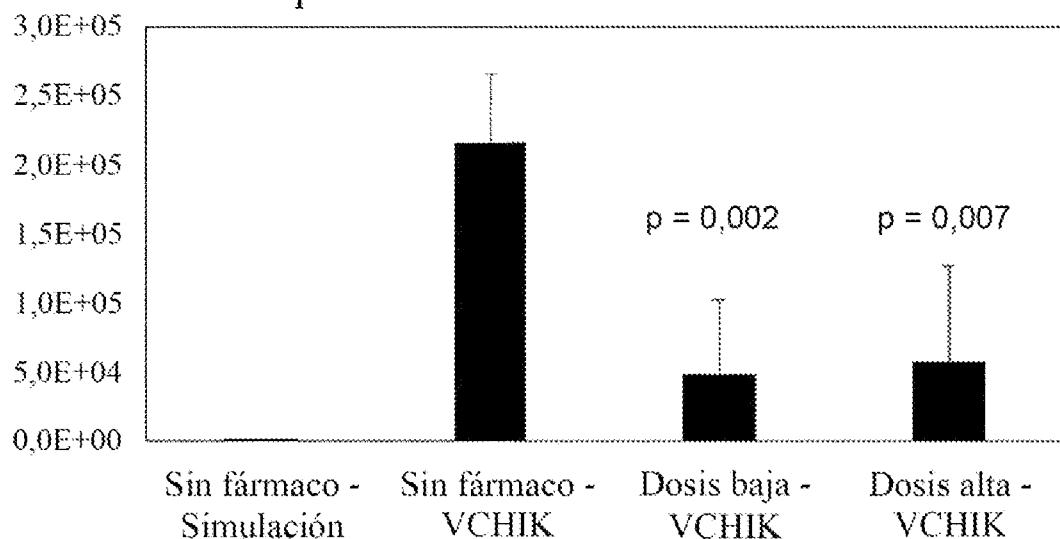


FIG. 8

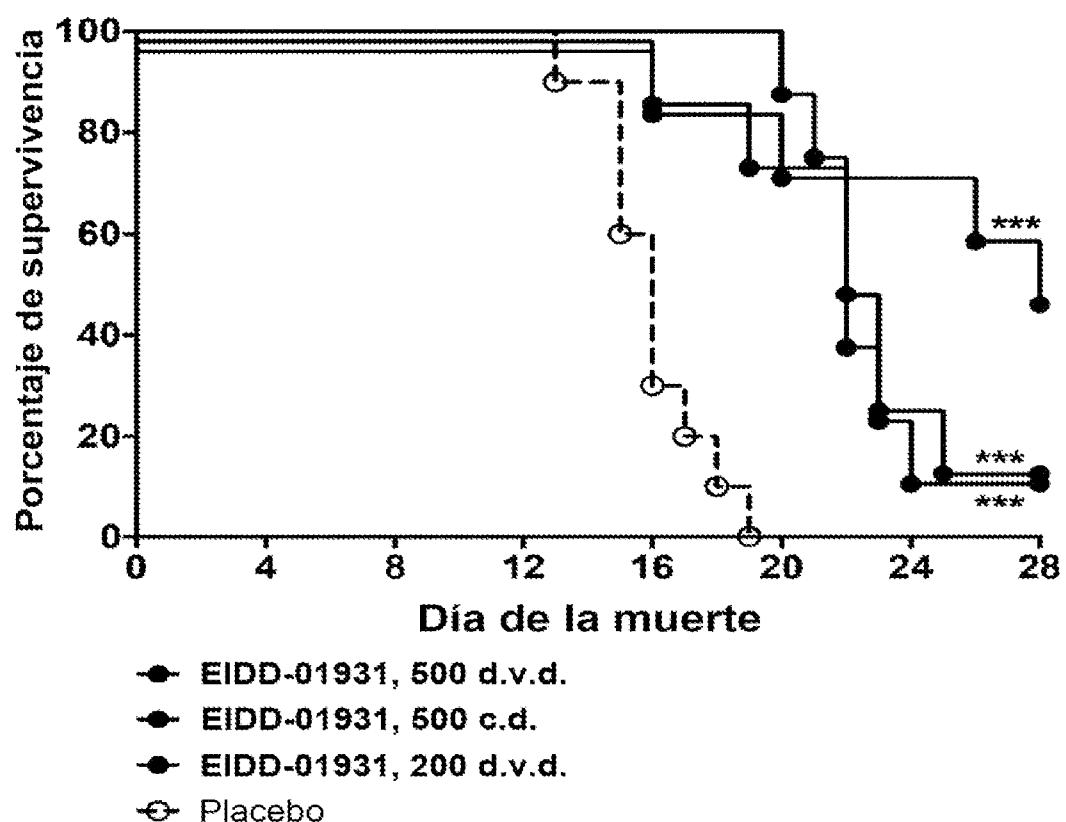


FIG. 9

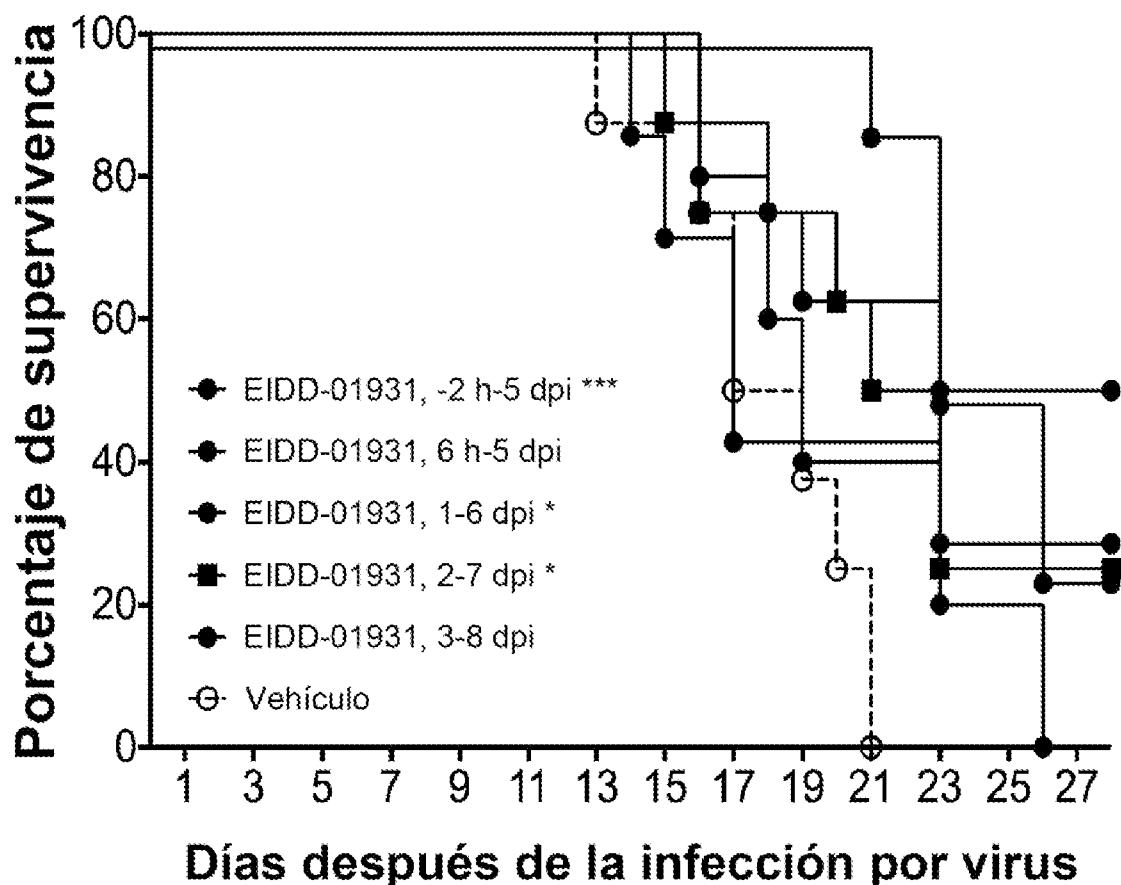


FIG. 10

**Concentraciones tisulares de nucleósidos de un mono  
al que se dosificó 100 mg/kg de EIDD-1931 v.o.**

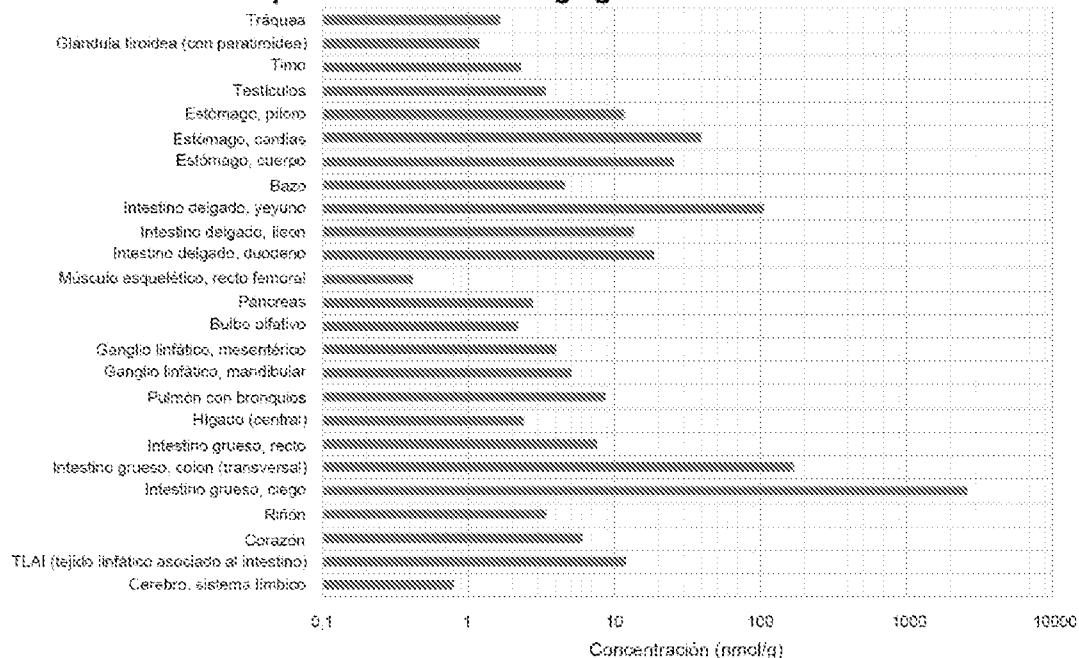


FIG. 11

**Concentraciones tisulares de nucleósidos de un mono  
al que se dosificó 10 mg/kg de EIDD-1931 i.v.**

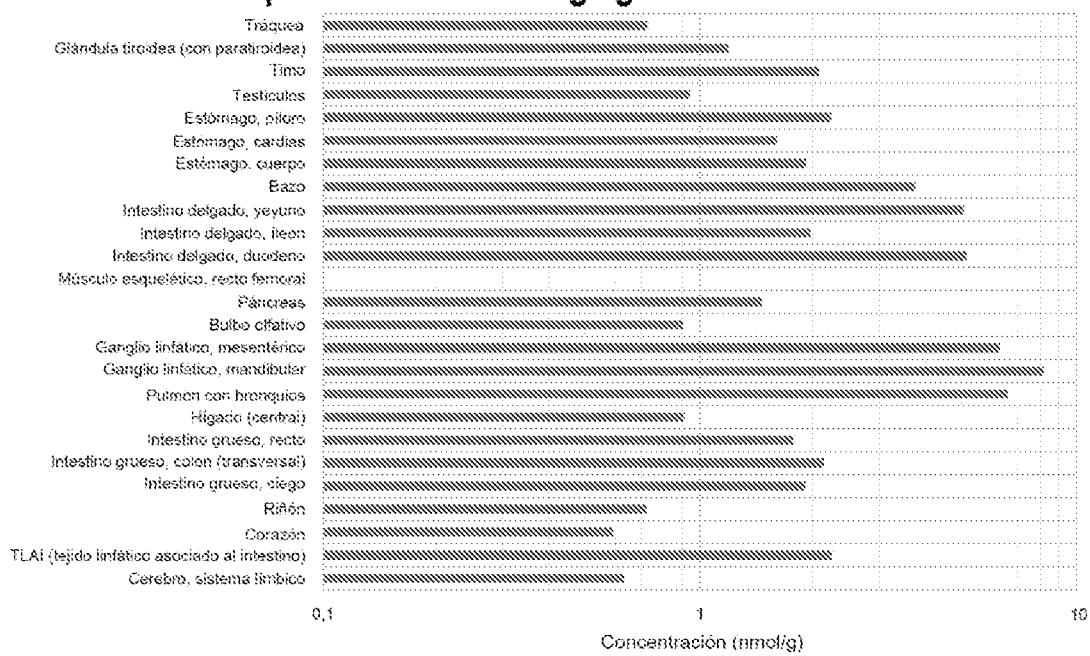


FIG. 12

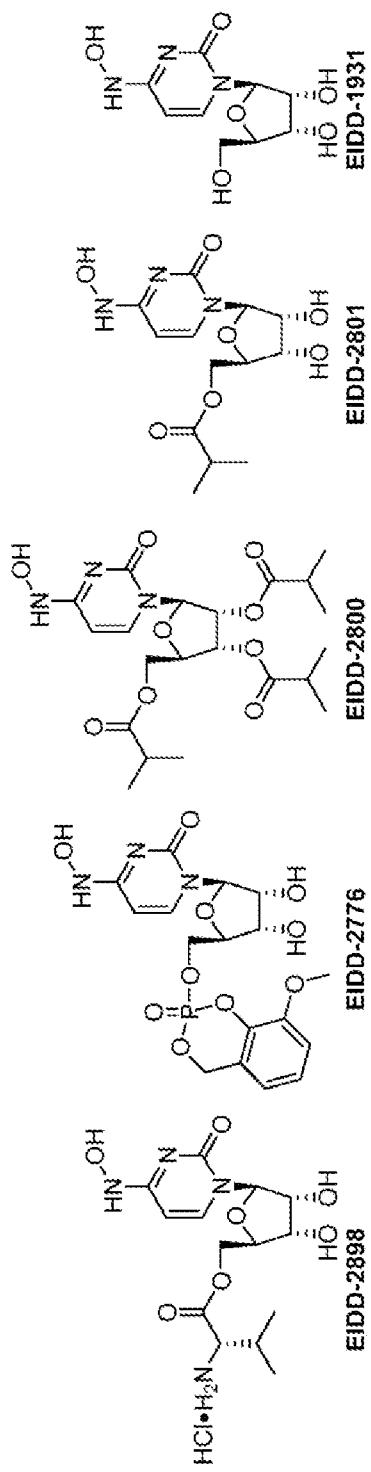
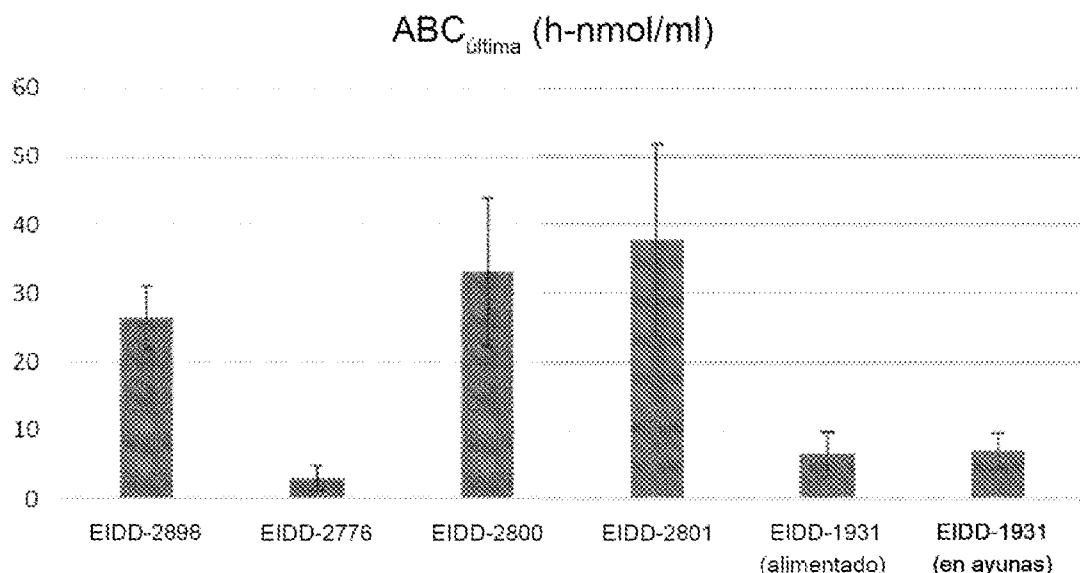
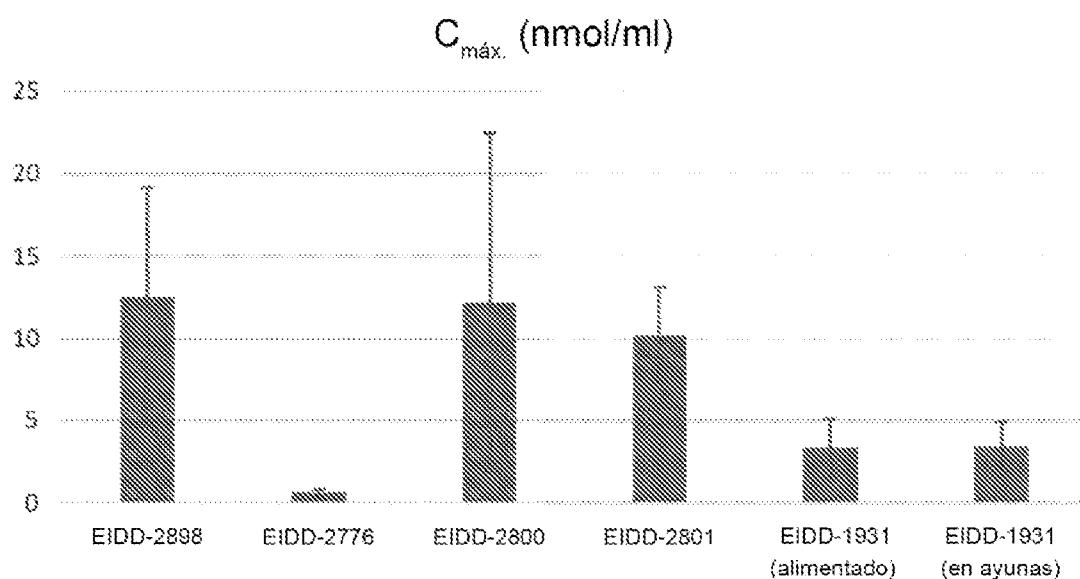


FIG. 13



**FIG. 14**



**FIG. 15**

A/California/07/2009 (H1N1)

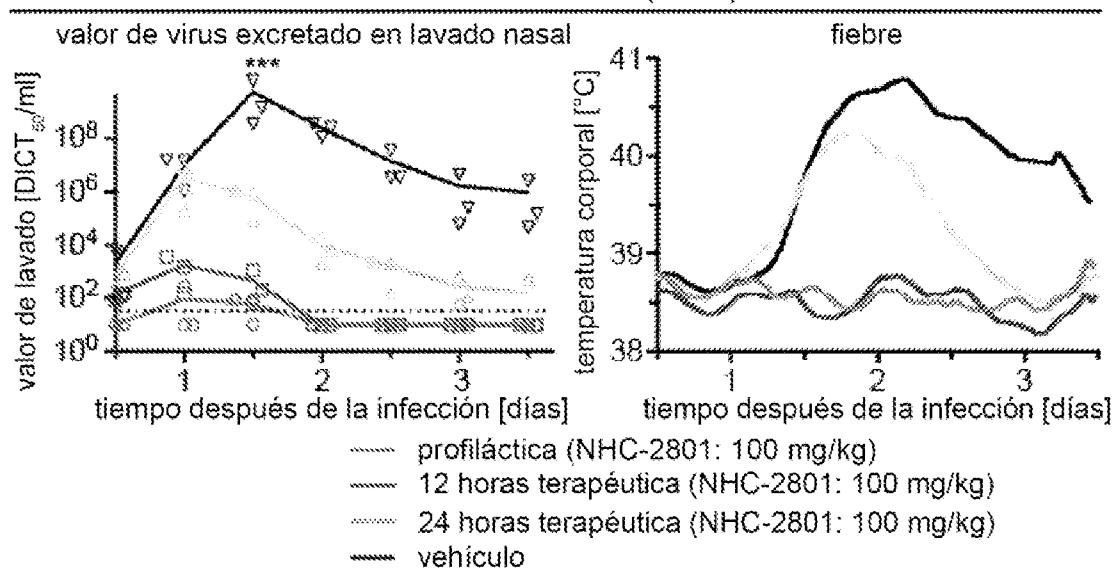


FIG. 16

A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)

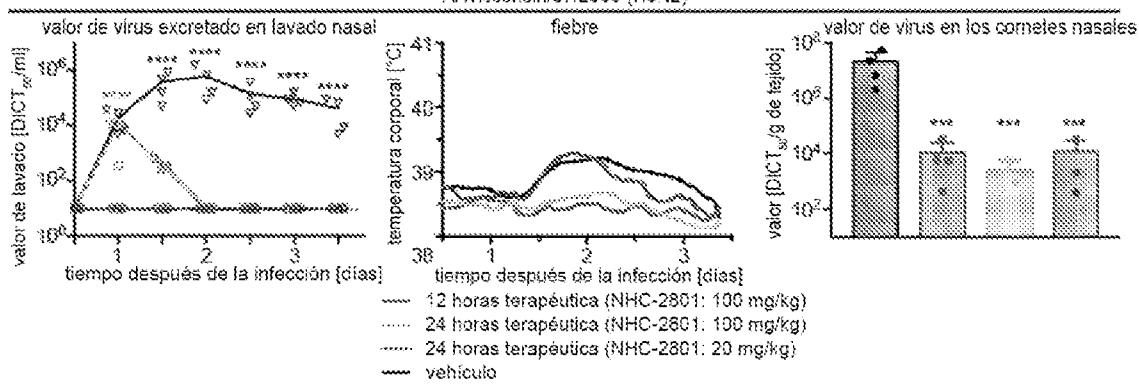


FIG. 17

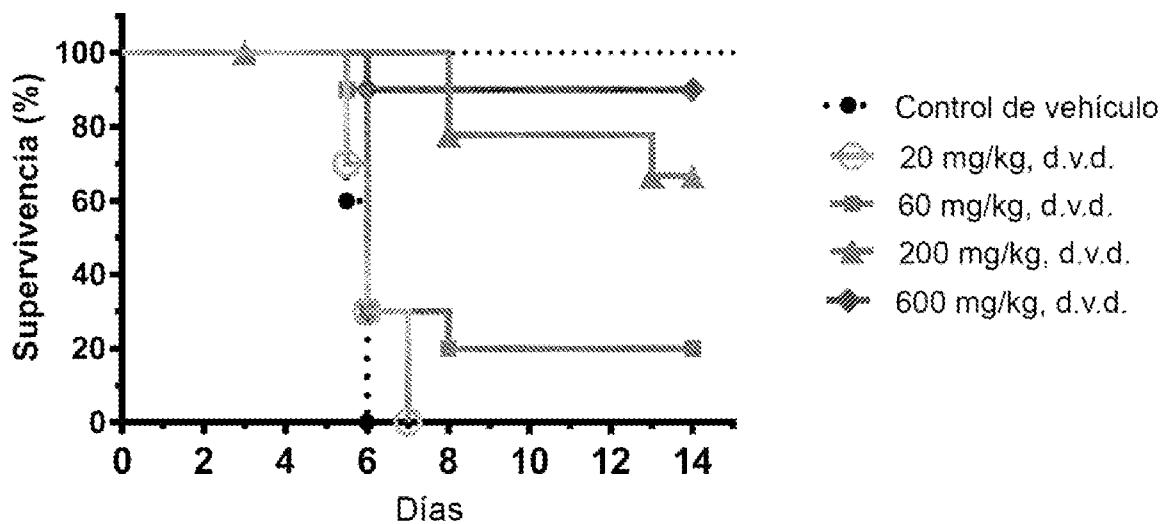


FIG. 18

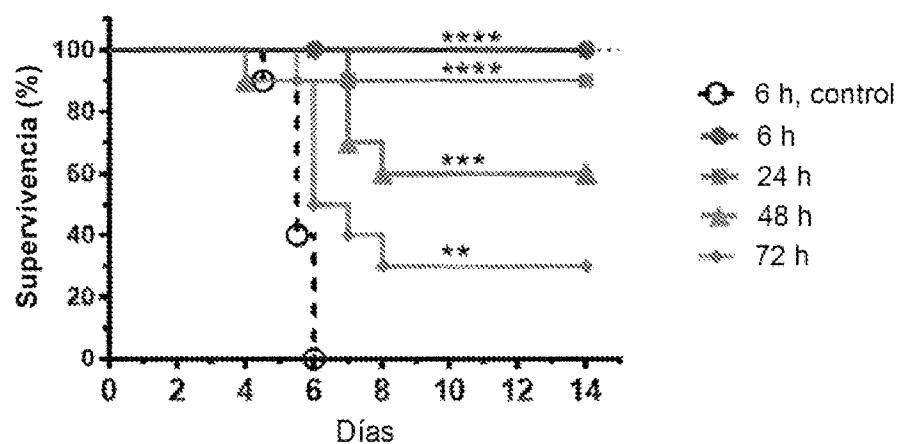


FIG. 19

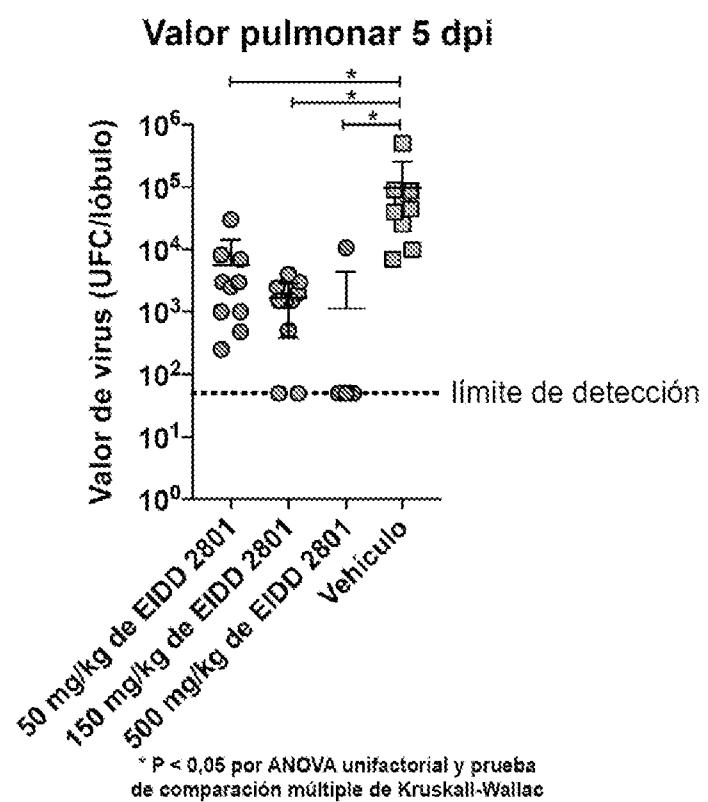


FIG. 20

**EIDD 2801 terapéutico con exposición a SARS-CoV: hemorragia pulmonar**

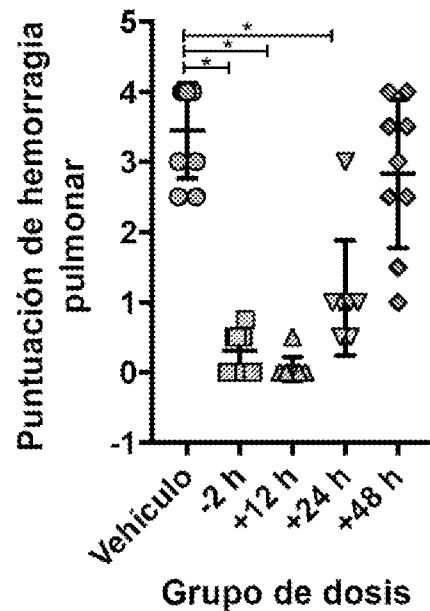


FIG. 21

**Valor pulmonar de virus de MA15 de SARS con tratamiento con EIDD 2801**

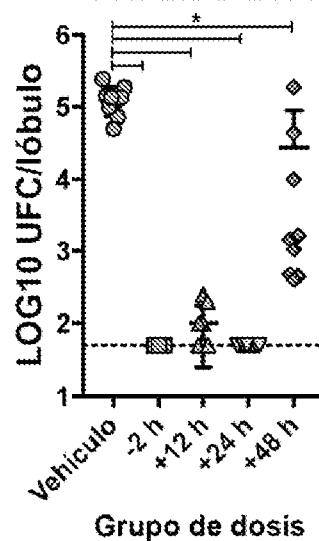


FIG. 22

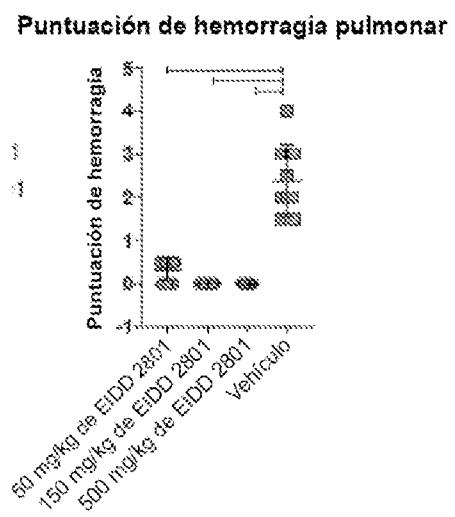


FIG. 23