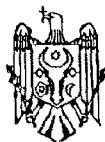




MD 4589 C1 2019.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4589** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A61K 31/513* (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/381 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2014 0035 (22) Data depozit: 2012.09.14 (31) Nr.: 61/535885; 61/561753 (32) Data: 2011.09.16; 2011.11.18 (33) Țara: US; US (41) Data publicării cererii: 2014.08.31, BOPI nr. 8/2014	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.08.31, BOPI nr. 8/2018 (85) 2014.04.08 (86) PCT/US2012/055621, 2012.09.14 (87) WO 2013/040492 A2, 2013.03.21
(71) Solicitant: GILEAD PHARMASSET LLC, US (72) Inventatori: RAY Adrian S., US; WATKINS William J., US; LINK John O., US; OLDACH David W., US; DELANEY IV William E., US (73) Titular: GILEAD PHARMASSET LLC, US (74) Mandatar autorizat: MARGINE Ion	

(54) Compoziție farmaceutică cu conținut de sofosbuvir și utilizarea acesteia în tratamentul hepatitei virale C

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină, și anume la o compoziție farmaceutică cu conținut de

2
sofosbuvir și la utilizarea acesteia pentru tratamentul hepatitei virale C.
Revendicări: 9

MD 4589 C1 2019.03.31

(54) Pharmaceutical composition comprising sofosbuvir and uses thereof for treating hepatitis C virus

(57) Abstract:

1
The invention relates to medicine,
particularly to a pharmaceutical composition

2
comprising sofosbuvir and uses thereof for
treating hepatitis C virus.
Claims: 9

(54) Фармацевтическая композиция с содержанием софосбувира и ее использование при лечении вирусного гепатита С

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к медицине, а
именно к фармацевтической композиции,

2
содержащей софосбувир и к ее применению
для лечения вирусного гепатита С.
П. формулы: 9

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Această cerere revendică prioritatea Cererii Provizorii din Statele Unite Cererea № 61/535, 885, depusă la 16 septembrie 2011; și la Cererea Provizorie № 61/561,753, depusă la 18 noiembrie 2011. Întregul conținut al fiecăreia dintre aceste cereri provizorii este încorporat aici prin referință.

Prezenta invenție se referă la combinații de molecule terapeutice utile pentru tratarea infecției cu virusul hepatitei C. Prezenta invenție se referă la metode, utilizări, scheme de dozare și compoziții.

10 Hepatita este o boală care apare în întreaga lume. Hepatita este, în general, de natură virală, deși, dacă se consideră că o stare de inflamație cronică a ficatului, există alte cauze cunoscute, neinfecțioase. Hepatita virală este cea mai frecventă formă de hepatită. Centrele pentru Controlul Bolilor din SUA a estimat că cel puțin 1,8% din populația SUA are dovezi serologice de infecție VHC, în majoritatea cazurilor asociate cu infecția cronică activă. VHC este un virus ARN pozitiv catenar din familia Flaviviridae și are cea mai apropiată relație cu pestivirusurile care includ virusul holerei porcine și virusul diareei virale bovine.

15 Genomul VHC este un ARN monocatenar, de sens pozitiv de aproximativ 9,600 bp codificare pentru o poliproteină din 3009-3030 de aminoacizi, care este despicat co- și post-tranlațional de proteinaze celulare și două proteinaze virale în proteinele virale mature (de înveliș, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Proteinele structurale de înveliș E1 și E2 sunt considerate a fi 20 incorporate într-un înveliș lipidic viral și formează heterodimeri stabili. Proteina structurală de înveliș se crede că interacționează cu genomul ARN viral pentru a forma nucleocapsida. Proteinele nestructurale desemnate de la NS2 până la NS5 includ proteine cu funcții enzimatic implicate în replicarea virusului și procesarea proteinei incluzând o polimerază, protează și helicază. VHC se replică prin producerea unei matrice complementare a ARN cu polaritate negativă.

25 HCV este un virus genetic divers. La un singur pacient infectat, pot fi identificate multe variante de virusuri, ceea ce duce la descrierea „roiului viral” sau pseudotipurilor virale. În cadrul populației umane globale, VHC este de asemenea genetic divers, cu cel puțin 6 „genotipuri” majore identificate (genotipurile 1-6) și numeroase subtipuri (de exemplu, genotipul VHC 1a și 1b). Genotipurile VHC sunt definite prin analiză filogenetică genomică și diagnosticate (într-un anumit pacient) de analiza 30 de diagnostic pe baza secvenței ARN VHC.

Principala cale de infectare cu VHC este transfuzia de sânge. Amploarea infecției HCV ca o problemă de sănătate este ilustrată de prevalența în rândul grupurilor de risc. De exemplu, în țările occidentale, conform unor sondaje, au avut infecție cronică cu VHC de la 60% la 90% din hemofilici și mai mult de 80% din narcomanii care-și administrează drogurile intravenos. Pentru 35 narcomanii care-și administrează drogurile intravenos, prevalența variază de la aproximativ 28% până la 80% în funcție de populația studiată. Proporția noilor infecții cu VHC asociate transfuziei de sânge sau produselor din sânge a fost redusă semnificativ datorită progreselor farmaceutice și utilizării pe scară largă a analizelor serologice sensibile și de detectare a ARN-ului utilizate pentru a examina donatorii de sânge, cu toate acestea, este deja stabilită o mare cohortă de persoane în vârstă 40 infectate cronic.

Un tratament disponibil pentru infecția cu VHC este interferonul- α (PEG-IFN α 1a sau PEG-IFN α 1b), care, în conformitate cu directivele actuale de tratament, în funcție de genotipul viral VHC tratat, este administrat săptămânal prin injecție subcutanată timp de 24 până la 48 de săptămâni. Cu toate că la mai mult de 50% dintre pacienții infectați cu VHC genotipul 1 la finalizarea terapiei de 48 45 săptămâni se poate aștepta supresiunea viremiei VHC, un procent semnificativ din acești pacienți vor avea recidivă virală. În consecință, un Răspuns Virusologic Susținut (RVS, definit ca ARN VHC nedetectabil la 24 săptămâni după încetarea tratamentului și considerat echivalent cu o „cură”) este atins doar în 30-40% din infecțiile cu VHC genotipul 1 tratate doar cu PEG-IFN. În plus, tratamentul cu PEG IFN + RBV nu este bine tolerat, cu un profil de eveniment advers care include simptome 50 asemănătoare gripei, trombocitopenie, anemie și efecte psihiatrice grave secundare. În timp ce tratamentul cu standardul actual de asistență medicală este suboptimal, mulți pacienți sunt preîntâmpinați să înceapă cândva terapia din cauza comorbidității comune în randul populației infectate cu VHC, inclusiv cu tulburări psihice, boli hepatice avansate și abuzul de substanțe.

Ribavirina este un preparat antiviral analog nucleozidic. Ribavirina este de obicei administrată pe 55 cale orală (prin gură) de două ori pe zi. Mecanismul acțiunii exacte pentru ribavirină este necunoscut. Cu toate acestea, se crede că, atunci când ribavirina intră într-o celulă ea este fosforilată; apoi ea acționează ca un inhibitor al inozin 5'-monofosfat dehidrogenazei (IMFDH). Inhibitorii IMFDH, cum ar fi ribavirina reduc sinteza intracelulară și depozitarea guaninei, unui „bloc de construire” a nucleotidelor necesare pentru producerea ADN și ARN, astfel inhibând replicarea

virală. Inhibitorii IMFDH interferează, de asemenea, cu reproducerea celulelor cu proliferare rapidă și celulelor cu o intensitate mare de reînnoire a proteinelor. Tratamentul cu ribavirinomonoterapie are un efect redus asupra nivelelor de ARN VHC, dar este asociat cu o scădere a alanintransferazei serice (ALT). Această observație sugerează că ribavirina nu poate acționa ca un agent antiviral, ci mai degrabă ca un modulator al funcției sistemului imun. Ribavirina este aprobată doar pentru utilizare, pentru infecția cu VHC în combinație cu IFN.

Tratamentul cu o combinație de PEG-IFN plus ribavirină îmbunătățește ratele RVS peste cele observate cu numai PEG-IFN, în mare parte datorită reducerii frecvenței recidivei virale la încetarea tratamentului. Indicii majori ai RVS, conform studiului clinic pentru pacienții cu infecție VHC genotipul 1 tratați cu PEG-IFN/ribavirină, au variat de la 40-55%. La momentul actual, drept terapie PEG-IFN/ribavirină este considerat tratamentul „standard-de-asistență medicală” pentru infecția cronică cu VHC. Cu toate acestea, este de așteptat, ca standardul de asistență medicală să se schimbe rapid în viitorul apropiat, odată cu aprobarea agenților antivirali cu acțiune directă, care inițial, vor fi utilizați în combinație cu PEG-IFN/ribavirina.

Din păcate, diferite genotipuri ale VHC răspund diferit la terapia PEG-IFN/ribavirină; de exemplu, genotipul 1 VHC este mai rezistent la terapie decât tipurile 2 și 3. În plus, multe tratamente actuale pentru VHC produc efecte secundare nedorite. Astfel, în prezent există o necesitate de noi terapii antivirale. În special, există o necesitate de noi terapii antivirale care ar produce mai puține efecte secundare nedorite, care ar fi mai eficiente împotriva unei game de genotipuri VHC, sau care vor avea scheme de administrare mai puțin complicate, adică ar necesita administrarea agenților de mai rar pe durata unei zile.

Esența invenției

Prezenta invenție se referă la compoziții și metode terapeutice care sunt utile pentru tratarea infecțiilor virale (de exemplu, VHC). Anumite compoziții și metode ale invenției produc mai puține efecte secundare nedorite, sunt mai eficiente împotriva unei game de genotipuri ale VHC, reduc posibilitatea recăderii virale datorită selecției rezistenței și au scheme de administrare scurtate mai puțin complicate decât terapiile disponibile în prezent.

Prin urmare, într-un exemplu de realizare invenția se referă la o compoziție care conține doi sau mai mulți compuși selectați dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora.

Intr-un alt exemplu de realizare, invenția se referă la o metodă pentru tratarea unei infecții VHC la om, care include administrarea a doi sau mai mulți compuși selectați dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora pentru om.

Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la o metodă pentru ameliorarea uneia sau a mai multor simptome ale unei infecții cu VHC la om, care include administrarea a doi sau mai mulți compuși selectați dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora la om.

Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la om cu VHC, care include administrarea a doi sau mai mulți compuși selectați din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora la om.

Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor de VHC cu rezistență la agenții antivirali coadministrați oral la om, care include administrarea a doi sau mai mulți compuși selectați dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora la om.

Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la utilizarea a doi sau mai mulți compuși selectați dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora în terapie medicală.

Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la utilizarea a doi sau mai mulți compuși selectați dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14,

Compusul 15 și Compusul 16 și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora pentru tratamentul profilactic sau terapeutic al unei infecții virale (de exemplu, VHC).

Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la utilizarea unei compoziții a invenției pentru tratamentul profilactic sau terapeutic al unei infecții virale (de exemplu, VHC).

5 Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la utilizarea a doi sau mai mulți compuși selectați dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora pentru a prepara un medicament pentru tratarea unei infecții virale (de exemplu, VHC) la om.

10 Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la utilizarea unei compoziții a invenției pentru a prepara un medicament pentru tratarea unei infecții virale (de exemplu, VHC) la om.

Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la utilizarea a doi sau mai mulți compuși selectați dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, 15 Compusul 15 și Compusul 16 și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora pentru a prepara un medicament pentru ameliorarea uneia sau a mai multor simptome ale unei infecții virale (de exemplu, VHC) la om.

Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la utilizarea unei compoziții a invenției pentru prepararea unui medicament pentru ameliorarea uneia sau a mai multor simptome ale unei infecții virale (VHC) la om.

20 Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la utilizarea a doi sau mai mulți compuși selectați dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora pentru a prepara un medicament pentru reducerea încărcăturii virale la om.

25 Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la utilizarea unei compoziții a invenției pentru prepararea unui medicament pentru reducerea încărcăturii virale la om.

Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la utilizarea a doi sau mai mulți compuși selectați dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, 30 Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora pentru a prepara un medicament pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenții antivirali coadministrați oral la om.

35 Intr-un alt exemplu de realizare invenția se referă la utilizarea unei compoziții a invenției pentru prepararea unui medicament pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenții antivirali coadministrați oral la om.

40 Compozițiile și metodele invenției pot furniza „sinergie” și „efecte sinergice”, adică efectul obținut atunci când ingredientele active (inclusiv doi sau mai mulți Compuși Combinați) sunt utilizate împreună este mai mare decât suma efectelor care rezultă din utilizarea separată a compușilor.

45 Compozițiile și metodele invenției sunt benefice, deoarece acestea oferă tratamente pentru o gama largă de genotipuri ale VHC și pentru că acestea provoacă efecte secundare mai puține sau mai puțin grave decât terapiile VHC curente (de exemplu, tratamente care includ administrarea interferonului). În plus, anumite combinații de compuși (de exemplu, Compușii 10 și 5, Compușii 10 și 6 și Compușii 10, 5 și 6) pot oferi un Raspuns Virusologic Sustinut (RVS), care este semnificativ mai mare decât cel realizat de terapiile curente (ex. terapiile VHC). De exemplu, unele combinații de compuși pot oferi un RVS, care este cel puțin de aproximativ 70% sau cel puțin aproximativ 80%.

Descrierea detaliată a invenției

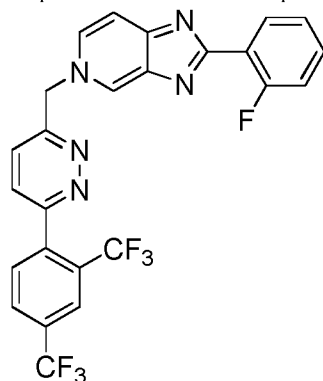
Definiții

50 Dacă nu se prevede altfel, următorii termeni și expresii utilizate în prezenta descriere sunt destinate a avea următoarele semnificații. Faptul că un anumit termen sau o expresie nu este definită în mod specific nu trebuie să fie corelat cu imprecizia sau să fie lipsit de claritate, ci mai degrabă termenii din prezenta descriere sunt utilizați în sensul lor obișnuit. Când denumiri comerciale se utilizează în prezenta descriere, solicitanții intenționează să includă în mod independent produsul cu denumirea comercială și ingredientul(e) farmaceutic(e) activ(e) al(e) produsului cu denumirea comercială.

Astfel cum este utilizat în prezenta descriere, termenul „Compuși combinați” se referă la Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7,

Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16.

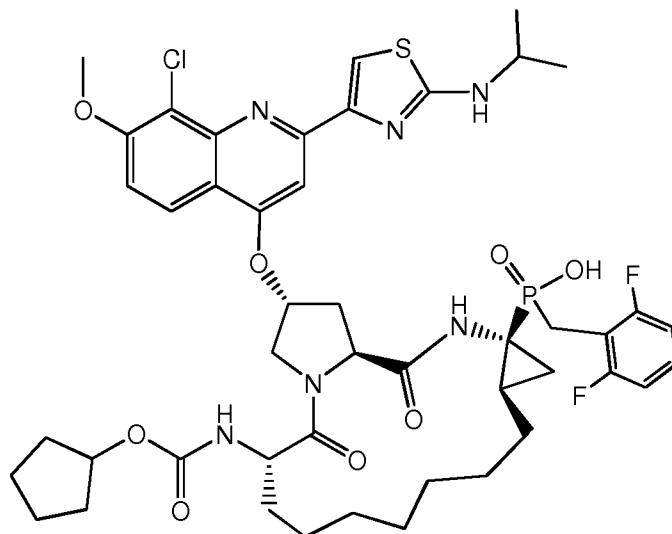
După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 1 este:



1.

- 5 Compusul 1 poate fi, de asemenea, menționat ca 5-((6-(2,4-bis(trifluorometil)fenil)piridazin-3-il)metil)-2-(2-fluorofenil)-5H-imidazo[4,5-c]piridină sau 5H-imidazo[4,5-c]piridină, 5-[[6-[2,4-bis(trifluorometil)fenil]piridazin-3-il]metil]-2-(2-fluorofenil).

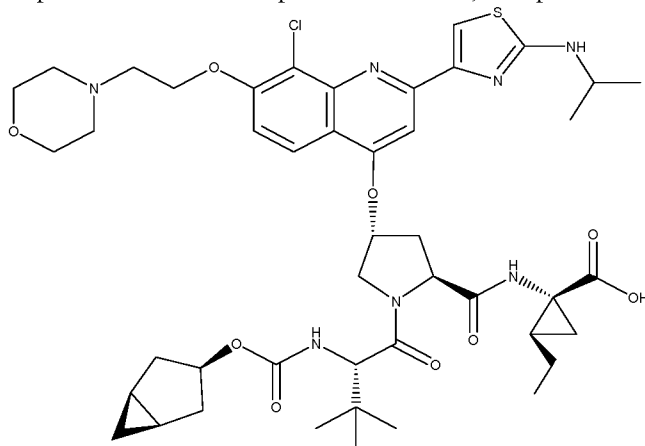
După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 2 este:



2.

- 10 Compusul 2 poate fi, de asemenea, menționat ca acid (2R,6S,13aR,14aS,16aS)-2-(8-cloro-2-(2-(izopropilamino)tiazol-4-il)-7-metoxichinolin-4-iloksi)-6-(ciclopentiloxicarbonilamino)-5,16-dioxooctadecahidrociclopropa[e]pirolo[1,2-a][1,4]diazaciclopentadecin-14a-il(2,6-difluorobenzil)fosfinic.

După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 3 este:

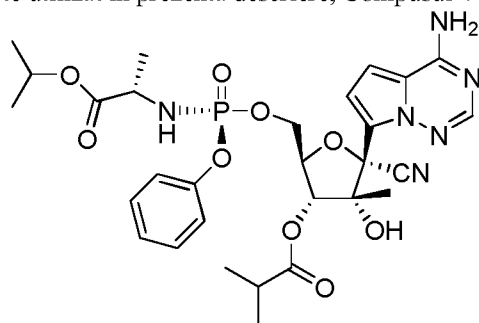


3.

15

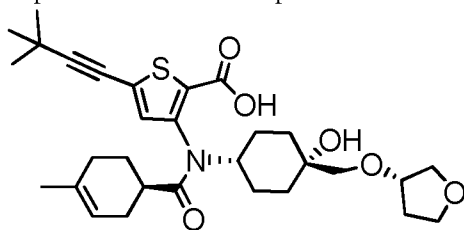
7

După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 4 este:



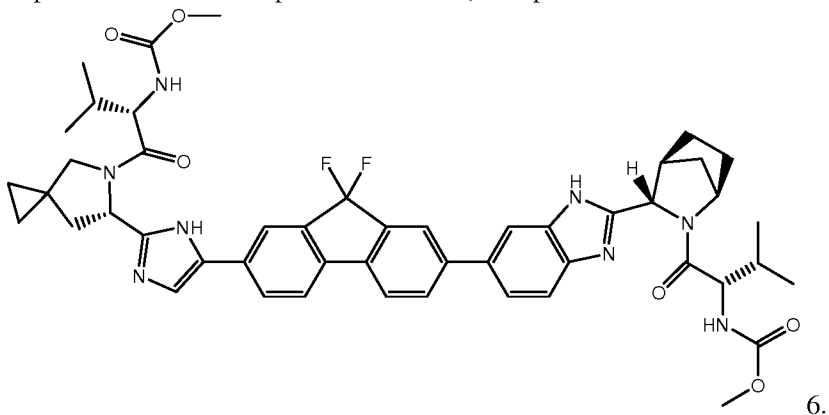
4.

După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 5 este:



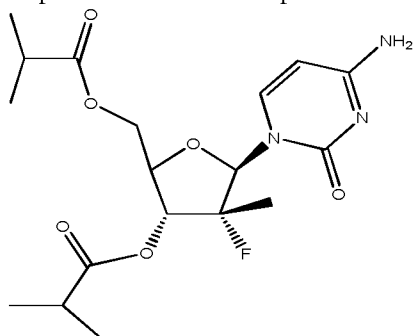
5.

5 După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 6 este:



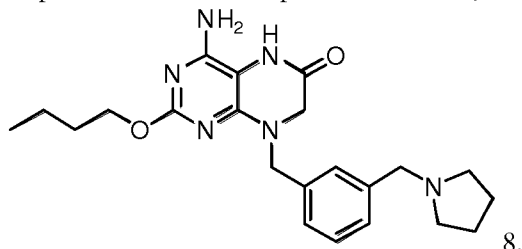
6.

După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 7 este:



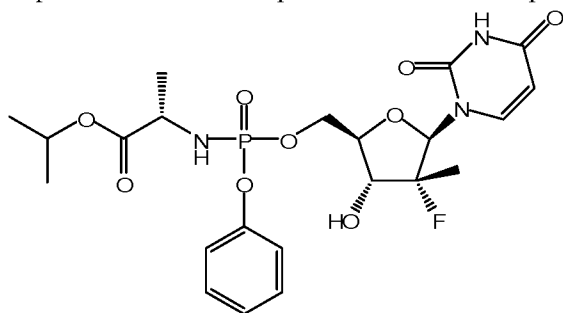
7.

După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 8 este:



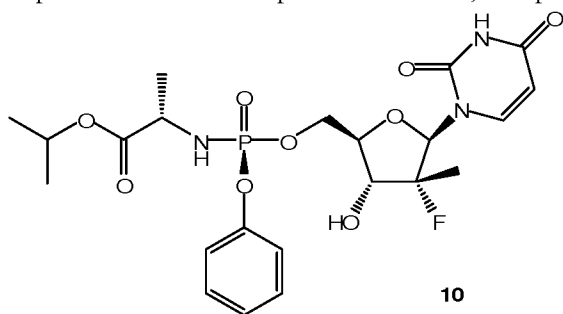
8.

După cum este utilizat în prezenta descriere Compusul 9 (diastereomer la P) este:



9.

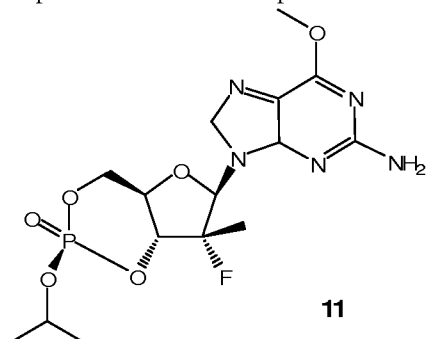
Referitor la Compusul 9, în ce privește fabricarea și purificarea lui, referirea se face la [1] și [2].
După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 10 (S-izomerul Compusului 9) este:



10

10.

Referitor la Compusul 10, în ce privește fabricarea și purificarea lui, referirea se face la [1] și [2].
După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 11 este:

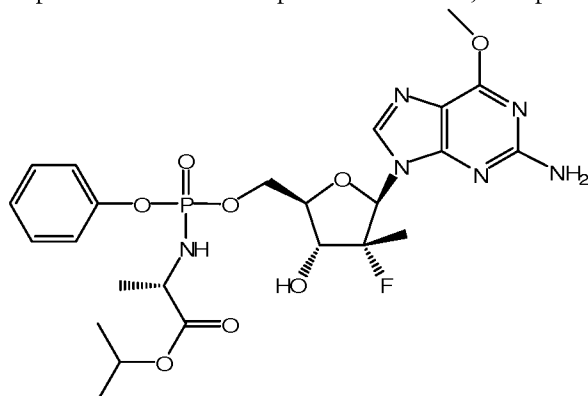


11

11.

Referitor la Compusul 9, în ce privește fabricarea și purificarea lui, referirea se face la US 2010081628 A1 2010.04.01.

După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 12 (diastereomer la P) este:

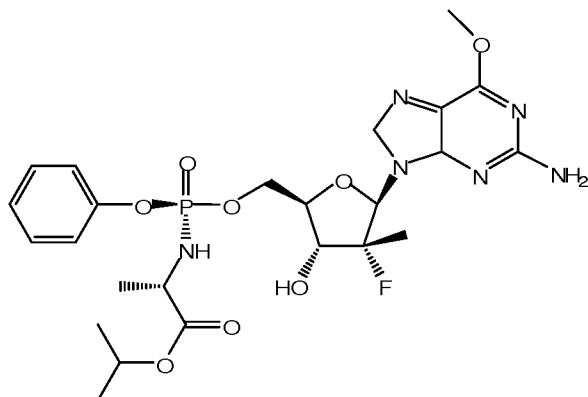


12.

Referitor la Compusul 12, în ce privește fabricarea și purificarea lui, referirea se face la US 2011015146 A1 2011.01.20.

După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 13 (S-diastereomerul Compusului 12 la P) este:

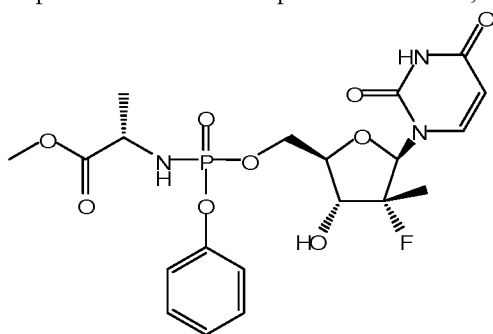
9



13.

Referitor la Compusul 13, în ce privește fabricarea și purificarea lui, referirea se face la US 2011015146 A1 2011.01.20.

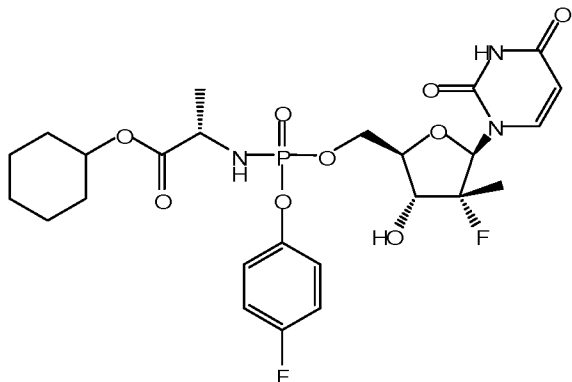
După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 14 este:



14.

Referitor la Compusul 14, în ce privește fabricarea și purificarea lui, referirea se face la [1].

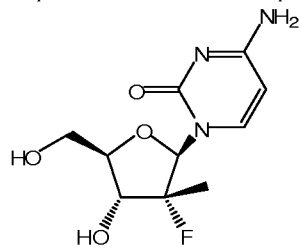
După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 15 este:



15.

Referitor la Compusul 15, în ce privește fabricarea și purificarea lui, referirea se face la [1].

După cum este utilizat în prezenta descriere, Compusul 16 este:

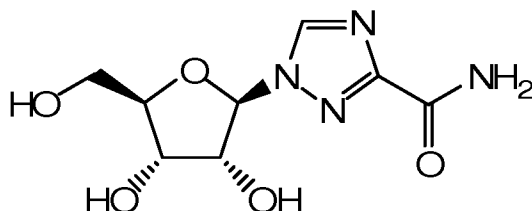


16.

Referitor la Compusul 16, în ce privește fabricarea și purificarea lui, referirea se face la US 7429572 B2 2008.09.30.

Referitor la ribavirină, în legătură cu procedeul de fabricare, precum și privitor la nomenclatura ei, referirea se face la EP 0093401 B1 1986.12.30.

După cum este utilizată în prezenta descriere, ribavirina se referă la:



Ribavirină.

Ribavirina este, de asemenea, menționată ca 1-β-D-ribofuranozil-1H-1,2,4-Triazol-3-carboxamide, 1-β-D-ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-carboxiamidă; 1-β-D-Ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-carboxamidă; COPEGUS (Roche); DRG-0028; HSDB 6513; ICN 1229; MegaRibavirină (de exemplu în formulări de 100 mg de ribavirină/mL); CNVM 163039; RAVANEX (BioPartners); REBETOL (Schering-Plough; Aesca; Bayer Schering Pharma; Essex; Pfizer; Trading Pharma; Zuellig Pharma); Ribamidă; RIBAMIDIL (BioPharma, Rusia); RIBASPHERE (Three Rivers Pharmaceuticals); Ribavarină; Ribavirină; Tribavirină; VILONA (Valeant Pharmaceuticals; ICN Pharmaceuticals); VIRAMID (ICN Pharmaceuticals; Alfa Wassermann); VIRAZOLE (Valeant Pharmaceuticals); și VIRIZADOLE (Uci-farma, Sao Bernardo do Campo, Sao Paulo, Brazilia). In plus, astfel cum este utilizat în prezenta descriere ribavirina include analogi ai ribavirinei, inclusiv taribavirina (viramidina, ICN 3142).

Termenul „interferon” include 1) interferoni, de exemplu, rIFN-alfa 2b pegilat (PEG-Intron, Merck & Co., Inc.), rIFN-alfa 2a pegilat (PEGASYS, Hoffmann-La Roche Inc.), rIFN-alfa 2b (INTRON®A, Merck & Co., Inc.), rIFN-alfa 2a (Roferon®-A, Hoffmann-La Roche Inc.), interferon alfa (Multiferon® Viranative AB Corporation, OPC-18, Alfaferone, Alfanative, subalin), interferon alfacon-1 (Valeant), interferon alfa-n1 (Wellferon™, Glaxo Wellcome), interferon alfa-n3 (ALFERON®-Hemispherx BioPharma, Inc.), interferon-beta-1a (AVONEX® Biogen Idec, DL-8234 Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd), interferon-omega (omega Duros®, Alza Corporation, Intarcia Therapeutics, Inc.; Biomed 510, Intarcia Therapeutics, Inc.), albinterferon alfa-2b (ALBUFERON®, Human Genome Sciences, INC.), IFN alfa-2b XL, BLX-883 (LOSTERON®, Biolexs Therapeutics, INC.), DA-3021, interferon alfa-2b glicozilat (AVI-005), PEG-INFERGEN®, Amgen, Inc., interferon lambda-1 pegilat (tip III) (IL-29 PEGilat) și BELEROFON®, Nautilus Biotech.

Termenul „terapie combinată” înseamnă compoziții sau metode sau utilizări sau altele asemenea care încorporează doi sau mai mulți Compuși Combinați. Terapia combinată poate încorpora și alte ingrediente active pe lângă doi sau mai mulți Compuși Combinați incluzând, dar nelimitându-se la: ribavirină, un interferon, un inhibitor al alfa-glucozidazei 1, un hepatoprotectant, un agonist al receptorului Toll (TLR)-7, un inhibitor al ciclofilinei, un inhibitor al intrării virale a VHC, un inhibitor al maturării VHC și un inhibitor al IRES VHC.

Termenul „ingredient activ” înseamnă o componentă a unei terapii combinate care exercită sau poate exercita un efect farmaceutic incluzând oricare dintre Compușii Combinați, ribavirină, un interferon, un inhibitor al alfa-glucozidazei 1, un hepatoprotectant, un agonist al TLR-7, un inhibitor al ciclofilinei, un inhibitor al intrării virale a VHC, un inhibitor al maturării VHC și un inhibitor al IRES VHC.

Termenul „tratare” și echivalentele gramaticale ale acestuia, atunci când este utilizat în contextul de tratare a unei boli, înseamnă încetinirea sau stoparea evoluției unei boli sau ameliorarea cel puțin a unui simptom al unei boli, mai preferabil ameliorarea a mai mult de un simptom al unei boli. De exemplu, un pacient cu VHC poate experimenta o îmbunătățire în una sau toate dintre următoarele simptome care pot fi asociate cu infecția cu VHC: creșterea nivelurilor alanin-aminotransferazei (ALT), febră, dureri de cap, dureri musculare, icter, oboseală, pierderea poftei de mâncare, greață, vărsături și diaree. Tratamentul unei infecții cu virusul hepatitei C poate include reducerea încărcăturii virale VHC într-o ființă umană infectată cu VHC.

Anumiți compuși descriși în prezenta descriere conțin unul sau mai mulți centri chirali, sau altfel pot fi capabili să existe ca stereoizomeri multipli. Domeniul de aplicare al prezentei invenții include amestecuri de stereoizomeri, precum și enantiomeri purificați sau amestecuri îmbogățite enantiomeric/diastereomeric. De asemenea incluși în domeniul de aplicare al invenției sunt izomerii individuali ai compușilor reprezentați prin formulele prezentate în prezenta descriere, precum și orice amestecuri echilibrate în întregime sau parțial ale acestora. Prezenta invenție include de asemenea izomerii individuali ai compușilor reprezentați prin formula prezentată în prezenta descriere ca amestecuri cu izomeri ai acestora în care unul sau mai mulți centri chirali sunt inversați. Definițiile și convențiile stereochemice utilizate aici urmează, în general, (S. P. Parker. Dictionary of Chemical Terms, 1984, McGraw-Hill Book Company, New York; Eliel E. și Wilen S. Stereochemistry of Organic Compounds, 1994, John Wiley & Sons Inc., New York).

Mulți compuși organici există în forme active optic, adică, aceștia au capacitatea de a roti planul luminii cu polarizare plană. În descrierea unui compus optic activ, prefixele D și L sau R și S sunt utilizate pentru a desemna configurația absolută a moleculei raportată la centrul(ii) său(i) chiral(i). Prefixele d și l sau (+) și (-) sunt utilizate pentru a desemna semnul rotirii luminii cu polarizare plană de către compus, semnul (-) sau l este desemnat compusului levogir. Un compus prefixat cu (+) sau d este dextrogir.

Un stereoizomer specific poate fi, de asemenea, menționat ca un enantiomer, și un amestec de astfel de izomeri este deseori denumit amestec enantiomeric. Un amestec 50:50 de enantiomeri este menționat ca un amestec racemic sau un racemat, care poate avea loc în cazul în care nu a existat nici o stereoselecție sau stereospecificitate într-o reacție chimică sau un proces chimic. Termenii „amestec racemic” și „racemat” se referă la un amestec echimolar de două specii enantiomere, lipsit de activitate optică.

Combinatii

Prezenta invenție cuprinde combinații de doi sau mai mulți dintre Compușii Combinati. Tabelul I prezintă combinațiile posibile bi-componente (Combinatiile 1-21), tri-componente (Combinatiile 22-56), quadri-componente (Combinatiile 57-92) și penta-componente (Combinatiile 93-113) ale Compusului 1, Compusului 2, Compusului 3, Compusului 4, Compusului 5, Compusului 6, Compusului 7, Compusului 9, Compusului 10, Compusului 11, Compusului 12, Compusului 13, Compusului 14, Compusului 15 și Compusului 16 ale invenției prezentate mai jos. Compusul 4, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 sunt inhibitori nucleozidici ai polimerazei VHC NS5B iar combinațiile de Compuși Combinati vor include de cele mai multe ori numai unul dintre Compusul 4, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 (vezi Coloana 6 din Tabelul I).

Tabelul I

		Compusul 1	Compusul 2	Compusul 3	Compusul 4 sau Compusul 9 sau Compusul 10 sau Compusul 11 sau Compusul 12 sau Compusul 13 sau Compusul 14 sau Compusul 15 sau Compusul 16	Compusul 5	Compusul 6	Compusul 7
Combinația	1	X	X					
Combinația	2	X		X				
Combinația	3	X			X			
Combinația	4	X				X		
Combinația	5	X					X	
Combinația	6	X						X
Combinația	7		X	X				
Combinația	8		X		X			
Combinația	9		X			X		
Combinația	10		X				X	
Combinația	11		X					X
Combinația	12			X	X			
Combinația	13			X		X		
Combinația	14			X			X	
Combinația	15			X				X
Combinația	16				X	X		
Combinația	17				X		X	
Combinația	18				X			X
Combinația	19					X	X	
Combinația	20					X		X
Combinația	21						X	X
Combinația	22	X	X	X				
Combinația	23	X	X		X			
Combinația	24	X	X			X		
Combinația	25	X	X				X	
Combinația	26	X	X					X
Combinația	27	X		X	X			
Combinația	28	X		X		X		
Combinația	29	X		X			X	

MD 4589 C1 2019.03.31

13

Combinația	30	X		X				X
Combinația	31	X			X	X		
Combinația	32	X			X		X	
Combinația	33	X			X			X
Combinația	34	X				X	X	
Combinația	35	X				X		X
Combinația	36	X					X	X
Combinația	37		X	X	X			
Combinația	38		X	X		X		
Combinația	39		X	X			X	
Combinația	40		X	X				X
Combinația	41		X		X	X		
Combinația	42		X		X		X	
Combinația	43		X		X			X
Combinația	44		X			X	X	
Combinația	45		X			X		X
Combinația	46		X				X	X
Combinația	47			X	X	X		
Combinația	48			X	X		X	
Combinația	49			X	X			X
Combinația	50			X		X	X	
Combinația	51			X		X		X
Combinația	52			X			X	X
Combinația	53				X	X	X	
Combinația	54				X	X		X
Combinația	55				X		X	X
Combinația	56					X	X	X
Combinația	57	X	X	X	X			
Combinația	58	X	X	X		X		
Combinația	59	X	X	X			X	
Combinația	60	X	X	X				X
Combinația	61	X	X		X	X		
Combinația	62	X	X		X		X	
Combinația	63	X	X		X			X
Combinația	64	X	X			X	X	
Combinația	65	X	X			X		X
Combinația	66	X	X				X	X
Combinația	67	X		X	X	X		
Combinația	68	X		X	X		X	
Combinația	69	X		X	X			X
Combinația	70	X		X		X	X	
Combinația	71	X		X		X		X
Combinația	72	X		X			X	X
Combinația	73	X			X	X	X	
Combinația	74	X			X	X		X
Combinația	75	X			X		X	X
Combinația	76	X				X	X	X
Combinația	77		X	X	X	X		
Combinația	78		X	X	X		X	
Combinația	79		X	X	X			X

Combinația	80		X	X		X	X	
Combinația	81		X	X		X		X
Combinația	82		X	X			X	X
Combinația	83		X		X	X	X	
Combinația	84		X		X	X		X
Combinația	85		X		X		X	X
Combinația	86		X			X	X	X
Combinația	87			X	X	X	X	
Combinația	88			X	X	X		X
Combinația	89			X	X		X	X
Combinația	90			X		X	X	X
Combinația	91				X	X	X	X
Combinația	92							
Combinația	93	X	X	X	X	X		
Combinația	94	X	X	X	X		X	
Combinația	95	X	X	X	X			X
Combinația	96	X	X	X		X	X	
Combinația	97	X	X	X		X		X
Combinația	98	X	X	X			X	X
Combinația	99	X	X		X	X	X	
Combinația	100	X	X		X	X		X
Combinația	101	X	X		X		X	X
Combinația	102	X	X			X	X	X
Combinația	103	X		X	X	X	X	
Combinația	104	X		X	X	X		X
Combinația	105	X		X	X		X	X
Combinația	106	X		X		X	X	X
Combinația	107	X			X	X	X	X
Combinația	108		X	X	X	X	X	
Combinația	109		X	X	X	X		X
Combinația	110		X	X	X		X	X
Combinația	111		X	X		X	X	X
Combinația	112		X		X	X	X	X
Combinația	113			X	X	X	X	X

Compoziții

Un aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 1 și conținând suplimentar un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5 sau Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 2 și conținând suplimentar un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 4. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 3. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 5.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 3 și conținând suplimentar un al doilea compus

selectat din grupul constand din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 1. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 4. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 5. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând un prim compus selectat din grupul constând din Compusul 4 și conținând suplimentar un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 1 sau Compusul 2 sau Compusul 3 sau Compusul 6. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 1. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 2. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 3. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 5. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 5 și conținând suplimentar un al doilea compus selectat din grupul constand din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 1. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 6 și conținând suplimentar un al doilea compus selectat din grupul constand din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 1. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 2. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 3. Într-un exemplu de realizare specifică a invenției, al doilea compus poate fi Compusul 4.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 7 și conținând suplimentar un al doilea compus selectat din grupul constand din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând un prim compus selectat din grupul constand din Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și compusul 16 și conținând suplimentar un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 1 și conținând suplimentar un al doilea compus și un al treilea compus fiecare selectat din grupul constand din Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 3, sau Compusul 4, sau Compusul 5 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 5. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 5.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 2 și conținând suplimentar un al doilea compus și

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând un prim compus selectat din grupul constând din Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 și conținând suplimentar un al doilea compus și un al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 1 și conținând suplimentar un al doilea compus, un al treilea compus și un al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, 5 Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi compusul 3 și al treilea compus poate fie Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi 10 Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2, al treilea compus poate fi Compusul 4, iar al patrulea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 3, al treilea compus poate fi Compusul 4, iar al patrulea compul poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 2 și conținând suplimentar un al doilea compus, un al treilea compus și un al patrulea compus fiecare selectat din grupul constand din Compusul 1, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, 15 Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 3 conținând suplimentar un al doilea compus, un al treilea compus și un al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, 25 Compusul 2, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi 30 Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4, al treilea compus poate fi Compusul 5, iar al patrulea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând un prim compus selectat din grupul constând din Compusul 4 și conținând suplimentar un al doilea compus, un al treilea compus și un al patrulea compus 35 fiecare selectat din grupul constand din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7. Al doilea compus poate fi Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 2. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi 40 Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 5 și conbținând suplimentar un al doilea compus, un al treilea compus și un al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 45 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 6 și conținând suplimentar un al doilea compus, 50 un al treilea compus și un al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 sau Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 2. Al doilea compus poate fi 55 Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 4.

5

10

15

25

35

45

55

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 6 și conținând suplimentar un al doilea compus, un al treilea compus, un al patrulea și un al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând

din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 și Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 2. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 4.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând Compusul 7 și conținând suplimentar un al doilea compus, un al treilea compus, un al patrulea și un al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16.

Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, compoziția conținând un prim compus selectat din grupul constând din Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 și conținând suplimentar un al doilea compus, un al treilea compus, un al patrulea compus și un al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Săruri

Compușii Combinați și alte ingrediente active pot fi sub formă de o sare. De obicei, dar nu absolut, sărurile Compușilor Combinați și alte ingrediente active sunt săruri acceptabile farmaceutic. Sărurile cuprinse în termenul „săruri acceptabile farmaceutic” se referă la săruri netoxice ale Compușilor Combinați și/sau alte ingrediente active. Exemplele de săruri acceptabile farmaceutic potrivite includ săruri de adiție de acizi anorganici, cum ar fi clorura, bromura, sulfatul, fosfatul și nitratul; săruri de adiție de acizii organici, cum ar fi acetatul, galactaratul, propionatul, succinatul, lactatul, glicolatul, malatul, tartratul, citratul, maleatul, fumaratul, metansulfonatul, p-toluensulfonatul și ascorbatul; săruri cu aminoacizi acidici, cum ar fi aspartatul și glutamatul; săruri de metale alcaline, cum ar fi sarea de sodiu și sarea de potasiu; săruri de metale alcalino-pământoase, cum ar fi sarea de magneziu și sarea de calciu; sarea de amoniu; săruri bazice organice, cum ar fi sare de trimetilamină, sare de trietilamină, sare de piridină, sarea de picolină, sarea de dicitlohexilamină și sarea de N,N'-dibenziletildiamină; și săruri cu aminoacizi bazici, cum ar fi sarea de lizină și sarea de arginină. Sărurile pot fi în unele cazuri hidrați sau solvați de etanol.

Formulări farmaceutice

Compușii Combinați și/sau alte ingrediente active pot fi formulate cu purtători sau excipienți convenționali, care pot fi selectați în conformitate cu practica obișnuită. Tabletele conțin de obicei excipienți, glidanti, umpluturi, lianți și alte asemănătoare. Formulările apoase pot fi preparate sub formă sterilă, și atunci când sunt destinate livrării altă decât administrarea orală vor fi, în general, izotonice. Toate formulările vor conține opțional excipienți, cum ar fi cei prezentați în Handbook of Pharmaceutical Excipients (Handbook of pharmaceutical excipients. Front Cover. Academy of Pharmaceutical Sciences. American Pharmaceutical Association, 1986 - Medical), încorporat în prezenta descriere în întregime prin referință. Excipienții includ acid ascorbic și alți antioxidanți, agenți de chelatare, cum ar fi EDTA, carbohidrați cum ar fi dextrina, hidroxilchilceluloza, hidroxilchilmetilceluloza, acidul stearic și altele asemănătoare.

PH-ul formulărilor variază de la aproximativ 3 la aproximativ 11, dar este de obicei în jur de la 7 până la 10.

Deoarece este posibil ca un ingredient activ să fie administrat singur, ar fi preferabil ca unul sau mai multe ingrediente active să fie prezentate ca formulări farmaceutice. Formulările invenției, atât pentru uz veterinar, cât și pentru uz uman, cuprind cel puțin un ingredient activ, împreună cu unul sau mai mulți purtători acceptabili și opțional alte ingrediente terapeutice. Purtătorul(ii) trebuie să fie „acceptabil(i)” în sensul de a fi compatibil(i) cu celelalte ingrediente ale formulării și fiziologic inofensiv(i) pentru recipient.

Formulările le includ pe cele potrivite pentru căile de administrare descrise mai jos. Formulările pot fi prezentate comod sub formă medicamentoasă standardizată și pot fi preparate prin oricare dintre metodele bine cunoscute în domeniul farmaceutic. Tehnicile și formulările pot fi găsite, în general, în: Remington's pharmaceutical sciences, 17th ed. Edited by Alfonso R. Gennaro. Mack Publishing Co., 20th and Northampton Streets, Easton, PA 18042. 1985.

Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.), încorporată aici în întregime prin referință. Astfel de metode includ etapa de aducere în asociere a unui ingredient activ cu purtătorul care constituie unul sau mai multe ingrediente suplimentare. În general, formulările pot fi preparate prin aducerea în asociere uniformă și foarte apropiată a unui sau a mai multor ingrediente active cu purtătorii lichizi sau purtătorii solizi divizați fin sau cu ambii, și apoi, dacă este necesar, se formează produsul.

Formulările prezentei invenții indicate pentru administrare orală pot fi prezentate ca unități discrete cum ar fi capsulele, cașetele sau tabletele, fiecare conținând o cantitate predeterminată de un ingredient activ; după cum o pulbere sau granule; după cum o soluție sau o suspensie într-un lichid apos sau neapos; sau ca o emulsie lichidă ulei-in-apă sau o emulsie lichidă apă-in-ulei. Un ingredient activ poate fi, de asemenea, administrat sub formă de bolus, excipient sau pastă.

O tabletă poate fi preparată prin comprimare sau turnare, opțional cu unul sau mai multe ingrediente suplimentare. Tabletele comprimate pot fi preparate prin comprimarea într-o mașină corespunzătoare a unui ingredient activ într-o formă cu curgere liberă, cum ar fi o pulbere sau granule, opțional amestecate cu un liant, lubrifiant, diluant inert, conservant, agent tensoactiv sau dispersant. Tabletele turnate pot fi preparate prin turnarea într-o mașină corespunzătoare a unui amestec de ingredient activ pulverulent umectat cu un diluant lichid inert. Tabletele pot fi opțional acoperite sau marcate și opțional pot fi formulate astfel încât să asigure o eliberare lentă sau controlată a ingredientului activ.

Pentru administrare la ochi sau alte țesuturi externe de exemplu, gură și piele, formulările pot fi aplicate preferabil ca un unguent sau cremă de uz extern care conține un ingredient(e) activ(e) într-o cantitate, de exemplu, de 0,075 la 20% m/m (inclusiv ingredient(e) activ(e) într-un interval cuprins între 0,1% și 20% în incremente de 0,1% m/m, cum ar fi 0,6% m/m, 0,7% m/m, etc.), preferabil 0,2 la 15% m/m și cel mai preferabil 0,5 la 10% m/m. Când formulările sunt un unguent, un ingredient activ poate fi folosit fie cu o bază parafinică sau fie cu unguent miscibil cu apă. Alternativ, un ingredient activ poate fi formulat într-o cremă bazată pe cremă ulei-in-apă.

Dacă se dorește, faza apoasă a bazei de cremă poate include, de exemplu, cel puțin 30% m/m de un alcool polihidric, adică un alcool având două sau mai multe grupări hidroxil, cum ar fi propilenglicolul, butan 1,3-diolul, manitolul, sorbitolul, glicerolul și polietilenglicolul (inclusiv PEG 400) și amestecurile acestora. Formulările de uz extern pot include de preferință un compus care intensifică absorbția sau penetrarea ingredientului activ prin piele sau alte zone afectate. Exemplele de astfel de intensificatori ai penetrării dermice includ dimetilsulfoxidul și analogii săi înrudiți.

Faza uleioasă ale emulsiilor de Compuși Combinați și/sau alte ingrediente active poate fi constituită din ingrediente cunoscute și într-un mod cunoscut. În timp ce faza poate cuprinde doar o substanță chimică folosită la obținerea emulsiilor (altfel cunoscut ca un emulgator), aceasta cuprinde, de preferință, un amestec de cel puțin un emulgator cu o grăsime sau un ulei sau atât cu o grăsime, cât și cu un ulei. De preferință, un emulgator hidrofilic este inclus împreună cu un emulgator lipofilic, care acționează ca un stabilizator. De asemenea, este de preferat să se includă atât un ulei, cât și o grăsime. Împreună, emulgatorul(ii) cu sau fără stabilizator(i) constituie așa-zisa ceară emulsionantă, iar ceara împreună cu uleiul și grăsimea constituie așa-zisa bază emulsionantă de unguent, care formează faza uleioasă dispersată a formulărilor cremoase.

Emulgatorii și stabilizatorii de emulsie potriviți pentru utilizare în formularea invenției includ Tween®60 (ICI Americas Inc.), Span 80, alcool cetostearilic, alcool benzilic, alcool miristic, monostearat de gliceril și lauril sulfat de sodiu.

Alegerea uleiurilor sau grăsimilor potrivite pentru formulare se bazează pe atingerea proprietăților cosmetice dorite. Crema trebuie să fie, de preferință, un produs lavabil non-gras și non-colorant cu consistență potrivită pentru a evita scurgerea din tuburi sau alte containere. Catena liniară sau ramificată ale alchil esterilor mono- sau dibazici, cum ar fi di-izoadipatul, stearatul de izocetil, diesterul propilenglicol al acizilor grași de cocos, miristatul de izopropil, oleatul de decil, palmitatul de izopropil, stearatul de butil, palmitatul de 2-etilhexil sau un amestec de esteri cu catenă ramificată cunoscuți ca Crodamol CAP poate fi utilizată, ultimii trei esteri fiind preferați. În funcție de proprietățile necesare aceștia pot fi utilizați aparte sau în combinație. Alternativ pot fi utilizate lipidele cu punct de topire ridicat cum ar fi parafina moale albă și/sau parafina lichidă sau alte uleiuri minerale.

Formulările farmaceutice conform prezentei invenții conțin unul sau mai multe ingrediente active, împreună cu unul sau mai mulți purtători sau excipienți acceptabili farmaceutic și, opțional, alți agenți terapeutici. Formulările farmaceutice care conțin ingrediente active pot fi sub

orice formă potrivită pentru metoda de administrare dorită. Atunci când sunt utilizate pentru uz oral, pot fi preparate, de exemplu, tablete, pastile, comprimate, suspensii apoase sau uleioase, pulberi sau granule dispersabile, emulsii, capsule tari sau moi, siropuri sau elixiruri. Compozițiile destinate utilizării orale pot fi preparate conform oricărei metode cunoscute în domeniul tehnicii pentru fabricarea compozițiilor farmaceutice și aceste compoziții pot conține unul sau mai mulți agenți, inclusiv agenți de îndulcire, agenți de aromatizare, agenți de colorare și agenți de conservare, pentru a oferi un preparat gustos. Tabletele care conțin un ingredient activ în amestec cu un excipient acceptabil farmaceutic netoxic, care sunt potriviți pentru fabricarea tabletelor la fel sunt acceptabile. Acești excipienți pot fi, de exemplu, diluanți inerti, cum ar fi carbonatul de calciu sau de sodiu, lactoză, lactoză monohidrată, croscarmeloza sodică, povidona, fosfatul de calciu sau de sodiu; agenții de granulare și dezintegrare, cum ar fi amidonul de porumb sau acidul alginic; agenții de legare, cum ar fi celuloza, celuloza microcristalină, amidonul, gelatina sau acacia; și agenți lubrifianți, cum ar fi stearatul de magneziu, acidul stearic sau talcul. Tabletele pot fi neacoperite sau pot fi acoperite prin tehnici cunoscute, inclusiv microîncapsulare pentru a întârzia dezintegrarea și adsorbția în tractul gastrointestinal și astfel să asigure o acțiune prelungită pentru o perioadă mai lungă. De exemplu, un material cu acțiune întârziată, cum ar fi glicerilmonostearatul sau glicerildistearatul care pot fi utilizate aparte sau cu o ceară.

Formulările pentru utilizare orală pot fi, de asemenea, prezentate sub formă de capsule gelatinoase tari în care un (unele) ingredient(e) activ(e) este(sunt) amestecat(e) cu un diluant solid inert, de exemplu, fosfatul de calciu sau caolina, sau capsule gelatinoase moi în care un ingredient activ este amestecat cu apă sau un mediu uleios, cum ar fi uleiul de arahide, parafina lichidă sau uleiul de măsline.

Suspensiile apoase conform invenției conțin materialele active în amestec cu excipienți potriviți pentru fabricarea suspensiilor apoase. Astfel de excipienți includ un agent de suspendare, cum ar fi carboximetilceluloza de sodiu, metilceluloza, hidroxipropilmetilceluloza, alginatul de sodiu, polivinilpirolidona, guma tragacantă și guma acacia și agenți de dispersare sau umectare, cum ar fi o fosfatida produsă în mod natural (de exemplu, lecitina), un produs de condensare al unui alchilenoxid cu un acid gras (de exemplu, stearatul de polioxietilen), un produs de condensare al etilenoxidului cu un alcool alifatic cu lanț lung (de exemplu, heptadecaetilenoxicetanolul), un produs de condensare al etilenoxidului cu un ester parțial derivat dintr-un acid gras și o hexitolanhidridă (de exemplu, polioxietilensorbitanmonooleatul). Suspensia apoasă poate conține, de asemenea, unul sau mai mulți agenți de conservare precum etilul sau n-propil p-hidroxi-benzoatul, unul sau mai mulți agenți de colorare, unul sau mai mulți agenți aromatizanți și unul sau mai mulți agenți de îndulcire, precum zaharoza sau zaharina.

Suspensiile uleioase pot fi formulate prin suspensionarea unui ingredient activ într-un ulei vegetal, cum ar fi uleiul de arahide, uleiul de măsline, uleiul de susan sau uleiul de cocos, sau într-un ulei mineral, cum ar fi parafina lichidă. Suspensiile orale pot conține un agent de îngroșare, cum ar fi ceara de albine, parafina tare sau alcoolul cetilic. Pot fi adăugați agenți de îndulcire, cum ar fi cei prezentați în prezenta descriere, și agenți de aromatizare, pentru a pregăti un preparat oral gustos. Aceste compoziții pot fi conservate prin adăugarea unui antioxidant, cum ar fi acidul ascorbic.

Pulberile și granulele dispersabile din invenție potrivite pentru prepararea unei suspensii apoase prin adăugarea apei furnizează un ingredient activ în amestec cu un agent de dispersare sau umectare, cu un agent de suspendare și cu unul sau mai mulți conservanți. Agenții de dispersare sau umectare potriviți și agenții de suspendare sunt exemplificați de cei descriși mai sus. Excipienții suplimentari, de exemplu agenții de îndulcire, aromatizare și colorare, pot fi de asemenea prezenți.

Compozițiile farmaceutice ale invenției pot fi de asemenea sub formă de emulsii ulei-in-apă. Faza uleioasă poate fi un ulei vegetal, cum ar fi uleiul de măsline sau uleiul de arahide, un ulei mineral, cum ar fi parafina lichidă, sau un amestec al acestora. Agenții de emulsionare potriviți includ gume produse natural, cum ar fi guma acacia și guma tragacant, fosfatide produse în mod natural, cum ar fi lecitina de soia, esterii sau esterii parțiali derivați din acizi grași și hexitolanhidridă, de exemplu sorbitanul și produse de condensare ale acestor esteri parțiali cu etilenoxida, cum ar fi polioxietilensorbitana. Emulsia poate conține de asemenea agenți îndulcitori și aromatizanți. Siropurile și elixirele pot fi formulate cu agenți de îndulcire, cum ar fi glicerolul, sorbitolul sau zaharoza. Astfel de formulări pot conține de asemenea un agent emolient, conservant, aromatizant sau colorant.

Compozițiile farmaceutice ale invenției pot fi sub forma unui preparat injectabil steril, cum ar fi o suspensie apoasă sau oleaginoasă injectabilă sterilă. Această suspensie poate fi formulată conform stadiului cunoscut al tehnicii folosind agenții potriviți de dispersare sau umectare și agenți de suspendare care au fost menționați în prezenta invenție. Preparatul injectabil steril
5 poate fi de asemenea o soluție sau suspensie injectabilă sterilă într-un diluant sau solvent acceptabil parenteral netoxic, cum ar fi o soluție în 1,3-butan-diol sau preparat sub formă de pulbere liofilizată. Printre vehiculele și solvenții acceptabili care pot fi folosiți sunt apa, soluția Ringer și soluția izotonică de clorură de sodiu. În plus, uleiurile fixe sterile pot fi în mod convențional utilizate ca solvent sau mediu de suspensionare. În acest scop, poate fi utilizat orice
10 ulei stabil neiritant, inclusiv mono - sau digliceridele sintetice. În plus, la prepararea produselor injectabile, de asemenea, pot fi utilizați acizii grași precum acidul oleic.

Cantitatea de ingredient activ care poate fi combinată cu materialul purtător pentru a produce o singură formă medicamentoasă va varia în funcție de modul particular de administrare și de pacientul tratat. De exemplu, o formulare cu eliberare în timp destinată administrării pe cale orală la oameni poate conține aproximativ de la 1 la 1000 mg de material activ compus cu o
15 cantitate corespunzătoare și convenabilă de material purtător care poate varia de la circa 5 la circa 95% din totalul compozițiilor (masă:masă). Compoziția farmaceutică poate fi preparată pentru a asigura cantități ușor măsurabile pentru administrare. De exemplu, o soluție apoasă destinată pentru injecție intravenoasă poate conține aproximativ de la 3 la 500 μ g dintr-un
20 ingredient activ per mililitru de soluție pentru injecția unui volum corespunzător la un debit de aproximativ 30 mL/oră.

Formulările potrivite pentru administrare la ochi includ picături de ochi în care un ingredient activ este dizolvat sau suspensionat într-un purtător potrivit, în special un solvent apos pentru un ingredient activ. Un ingredient activ este de preferință prezent în astfel de formulări într-o
25 concentrație de la 0,5 până la 20%, în mod avantajos 0,5 la 10% în particular aproximativ 1,5% m/m.

Formulările potrivite pentru administrare locală în gură includ pastile de subț conținând un ingredient activ într-o bază aromată, de obicei zaharoză și acacie sau tragacant; pastile conținând un ingredient activ într-o bază inertă, cum ar fi gelatina și glicerina sau sucroza și acacia; și
30 gargare care conțin un ingredient activ într-un purtător lichid potrivit.

Formulările pentru administrare rectală pot fi prezentate ca un supozitor cu o bază potrivită conținând, de exemplu, unt de cacao sau un salicilat.

Formulările potrivite pentru administrare intrapulmonară sau nazală o dimensiune a particulelor de exemplu în intervalul de la 0,1 la 500 μ m (inclusiv dimensiuni ale particulelor
35 într-un interval cuprins între 0,1 și 500 μ m în incremente, cum ar fi 0,5 μ m, 1 μ m, 30 μ m, 35 μ m etc.), acestea fiind administrate prin inhalare rapidă prin canalul nazal sau prin inhalare pe gură, astfel încât să se ajungă la sacii alveolari. Formulările potrivite includ soluții apoase sau uleioase de un ingredient activ. Formulările potrivite pentru administrarea aerosolilor sau pulberilor uscate pot fi preparate conform metodelor tradiționale și pot fi livrate cu alți agenți terapeutici,
40 cum ar fi compușii utilizați până acum în tratamentul sau profilaxia infecțiilor descrise în prezenta invenție.

Formulările potrivite pentru administrarea vaginală pot fi prezentate ca pesare, tampoane, creme, geluri, paste, spume sau formulări de pulverizare care mai conțin în afară de ingredientul activ asemenea purtători care sunt cunoscuți în nivelul tehnicii ca fiind corespunzători.

Formulările potrivite pentru administrare parenterală includ soluții apoase și neapoase injectabile sterile care pot conține antioxidanți, soluții-tampoan, substanțe bacteriostatice și dizolvate care oferă formularea izotonică cu sângele viitorului recipient; și suspensii apoase și
45 neapoase sterile care pot include agenți de suspensionare și agenți de îngroșare.

Formulările pot fi prezentate în containere cu doză unitară sau multi-doză, de exemplu fiole și flacoane sigilate, și pot fi depozitate într-o stare liofilizată care necesită doar adăugarea purtătorului lichid steril, de exemplu apă pentru injecție, imediat înainte de utilizare. Soluțiile și suspensiile injectabile extemporanee pot fi preparate din pulberi sterile, granule și tablete de tipul
50 descris anterior. Unitatea de dozaj preferențială a formulării poate fi aceea care conține o doză zilnică sau o unitate sub-doză zilnică, așa cum s-a menționat mai sus, sau o fracțiune potrivită a acesteia, a unui ingredient activ.

Se va înțelege că, pe lângă ingredientele menționate în particular mai sus, formulările de Compuși Combinați și/sau alte ingrediente active, pot include alți agenți tradiționali în nivelul tehnicii având în vedere tipul formulării în cauză, de exemplu cele potrivite pentru administrare orală pot include agenți de aromatizare.

Compușii Combinați și alte ingrediente active pot fi de asemenea formulate pentru a asigura eliberarea controlată a unui ingredient activ pentru a permite administrarea dozei mai rară sau pentru a îmbunătăți profilul farmacocinetic sau de toxicitate al ingredientului activ. În consecință, invenția prevede de asemenea compoziții care conțin doi sau mai mulți dintre

5 Compușii Combinați formulați pentru eliberarea prelungită sau controlată.

Dozarea

Doza eficientă a unui ingredient activ depinde cel puțin de natura afecțiunii de tratat, de toxicitate, dacă compusul este utilizat în scop profilactic (doze mai mici) sau împotriva unei boli sau stări active, de metoda de administrare și formularea farmaceutică, sau poate fi determinată

10 de clinician folosind studiile tradiționale de creștere a dozei.

Prin exemplu, compozițiile invenției (de exemplu, tabletele) pot fi formulate pentru a asigura dozele efective. De exemplu, în ceea ce privește Compusul 1, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, compoziția poate conține de la 1,0 mg până la 100 mg, de la 5 mg până la 40 mg, de la 30 mg până la 50 mg, sau 20 mg sau 40 mg și poate fi adaptată pentru a fi administrată o dată sau de mai multe ori pe zi la o ființă umană care necesită aceasta, în combinație cu unul sau mai mulți dintre Compusul 2, Compusul 3, Compusul 6, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Referitor la Compusul 2 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, compoziția poate conține de la 25 mg până la 800 mg, de la 50 mg până la 400 mg, sau de la 60 mg până la 300 mg sau de la 70 mg până la 200 mg sau poate fi de 150 mg și poate fi adaptată pentru a fi administrată o dată sau de mai multe ori pe zi la o ființă umană care necesită aceasta, în combinație cu unul sau mai mulți dintre Compusul 1, Compusul 3, Compusul 6, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Referitor la Compusul 3 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, compoziția poate conține de la 10 mg până la 1000 mg sau 50 la 400 mg, sau 100 mg la 400 mg sau 200 mg la 400 mg și poate fi adaptată pentru a fi administrată o dată sau de mai multe ori pe zi la o ființă umană care necesită aceasta, în combinație cu unul sau mai mulți dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 6, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Referitor la Compusul 4 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, compoziția poate conține de la 25 mg la 400 mg sau de la 25 mg la 200 mg și poate fi adaptată pentru a fi administrată o dată sau de mai multe ori pe zi la o ființă umană care necesită aceasta, în combinație cu unul sau mai mulți dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 6, Compusul 5 și Compusul 7. Referitor la Compusul 5 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, compoziția poate conține de la 50 mg până la 1000 mg sau 100 mg la 750 mg și poate fi adaptată pentru a fi administrată o dată sau de mai multe ori pe zi la un om care necesită aceasta, în combinație cu unul sau mai mulți dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 6, Compusul 4, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Referitor la Compusul 6 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, compoziția poate conține de la 1 mg la 500 mg sau de la 3 mg până la 300 mg, sau de la 3 mg până la 200 mg, sau de la 3 mg până la 100 mg, sau de la 10 mg până la 90 mg, sau de 30 mg până la 90 mg și poate fi adaptată pentru a fi administrată o dată sau de mai multe ori pe zi la o ființă umană care necesită aceasta, în combinație cu unul sau mai mulți dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Referitor la Compusul 7 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, compoziția poate conține de la 100 micrograme până la 3000 mg, de la 25 mg până la 2000 mg, sau de la 50 mg până la 1000 mg și poate fi adaptată pentru a fi administrată o dată sau de mai multe ori pe zi (de exemplu, patru ori pe zi) la o ființă umană care necesită aceasta, în combinație cu unul sau mai mulți dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Referitor la Compușii 9 și 10, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, compoziția poate conține 10 mg până la 1000 mg pe zi [2]. Referitor la Compusul 11, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestuia, compoziția poate conține 1 mg până la 1000 mg pe zi (US 20100143301 A1 2010.06.10). Pentru a ține cont de interacțiunile medicament-medicament posibile, dozele pentru Compușii 1-7, care sunt coadministrare, ar fi necesar să fie ajustate. De exemplu, cu toate că aparent Compusul 1 nu afectează sistemele de metabolizare a medicamentelor, Compusul 2 pare să aibă efectul creșterii expunerii Compusului 1 de aproximativ 2-3 ori. Prin urmare, o reducere anticipată a dozei (de exemplu, de 2-3 ori) a

Compusului 1 ar fi dorită în cazul când Compusul 1 este combinat cu Compusul 2. În combinație cu Compusul 16, Compusul 2 pare să aibă efectul creșterii expunerii Compusului 6 de aproximativ 5 ori, deci reducerea anticipată a dozei (de exemplu, de 3-5 ori) a Compusului 16 ar fi dorită când Compusul 16 este dozat cu Compusul 2. Prin urmare, o doză de 10 mg de Compusul 6 când este coadministrată cu Compusul 2 corespunde aproximativ unei doze de 30 mg.

Doi sau mai mulți Compuși Combinați pot fi administrați în asociere cu Ribavirina în cantități de circa 800 mg, 1000 mg sau 1200 mg pe zi în doze unice sau multiple (de exemplu, circa 400 mg, 500 mg sau 600 mg de două ori pe zi).

10 Utilizarea Combinațiilor invenției

În practica acestui aspect al invenției, Compușii Combinați pot fi utilizați în dozele indicate mai sus.

Un aspect al prezentei invenții include Compusul 1 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 1 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5 sau Compusul 6.

20 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 2 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 2 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 4.

25 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 3 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 3 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1 sau Compusul 6.

30 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 4 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 4 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7. Al doilea compus poate fi Compusul 1 sau Compusul 2, sau Compusul 3, sau Compusul 6.

35 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 5 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 5 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1.

40 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 6 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 6 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 sau Compusul 4.

45 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 7 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 7 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16.

50 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 9 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 9 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

55 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 10 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 10 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 11 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 11 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

5 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 12 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 12 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

10 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 13 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 13 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

15 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 14 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 14 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

20 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 15 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 15 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 16 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 16 este utilizat în combinație cu un al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

25 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 1 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 1 este utilizat în combinație cu un al doilea compus și un al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus
30 poate fi Compusul 3 sau Compusul 4, sau Compusul 5 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

35 Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 2 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 2 este utilizat în combinație cu un al doilea compus și un al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus
40 poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 3 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 3 este utilizat în combinație cu un al doilea compus
45 și un al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 4.. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi
50 Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 4 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 4 este utilizat în combinație cu un al doilea compus și un al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7. Al doilea compus poate fi Compusul 1,
55 Compusul 2, Compusul 3 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 2. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

5

10

20

25

30

35

40

45

55

Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 4 pentru utilizare într-o metodă de
tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 4 este utilizat în combinație cu un al doilea compus,
un al treilea compus și un al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul
1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7. Al doilea compus poate fi
Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 1
și al treilea compus poate fi Compusul 2. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea
compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi Compus 1 și al treilea compus poate fi
Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al
doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 6 pentru utilizare într-o metodă de
tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 6 este utilizat în combinație cu un al doilea compus,
un al treilea compus și un al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul
1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10,
Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al
doilea compus poate fi Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 sau Compusul 4. Al doilea
compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 2. Al doilea compus poate fi
Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi compus 4 și al
treilea compus poate fi compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus
poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi
Compusul 4.

Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 9 pentru utilizare într-o metodă de
35 tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 9 este utilizat în combinație cu un al doilea compus,
un al treilea compus și un al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul
1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 11 pentru utilizare într-o metodă de
tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 11 este utilizat în combinație cu un al doilea compus,
un al treilea compus și un al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul
1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 2 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 2 este utilizat în combinație cu un al doilea compus, un al treilea compus, un al patulea compus și un al cincilea compus fiecare selectat din grupul

5

10

20

30

35

45

50

55

Un alt aspect al prezentei invenții include Compusul 11 pentru utilizare într-o metodă de tratare a infecțiilor VHC, în care Compusul 11 este utilizat în combinație cu un al doilea compus,

un al treilea compus, un al patrulea compus și un al cincilea compus fiecare selectat din grupul constand din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 1 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus selectat din grupul constand din Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5 sau Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 2 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus selectat din grupul constand din Compusul 1, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 4.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 3 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus selectat din grupul constand din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1 sau Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 4 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus selectat din grupul constand din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7. Al doilea compus poate fi Compusul 1 sau Compusul 2, sau Compusul 3, sau Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 5 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus selectat din grupul constand din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 6 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus selectat din grupul constand din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 sau Compusul 4.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral,

fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 7 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16.

5 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 9 și incluzând suplimentar administrarea
10 unui al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru
15 reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 10 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru
20 reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea compusului 11 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru
25 reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 1 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus și un al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al
30 doilea compus poate fi Compusul 3 sau Compusul 4, sau Compusul 5, sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru
40 reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 2 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus și unui al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din
45 Compusul 1, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi
50 Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru
55 reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 3 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus și unui al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și

Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

5 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 4 și incluzând suplimentar administrarea
10 unui al doilea compus și unui al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7. Al doilea compus poate fi Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 2. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru
20 reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 5 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus și unui al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și
25 Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru
30 reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 6 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus și unui al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și
35 Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 sau Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 2. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 4.

40 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 7 și incluzând suplimentar administrarea
45 unui al doilea compus și unui al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru
50 reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 9 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus și unui al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.
55

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru
reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral,

fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 10 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus și unui al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

5 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 11 și incluzând suplimentar administrarea
10 unui al doilea compus și unui al treilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru
15 reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 1 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus și unui al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6,
20 Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

25 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 2 și incluzând suplimentar administrarea
30 unui al doilea compus, unui al treilea compus și unui al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi
35 Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru
40 reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 3 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus și unui al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul
45 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

50 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 4 și incluzând suplimentar administrarea
55 unui al doilea compus, unui al treilea compus și unui al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7. Al doilea compus poate fi Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 2. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și

al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 5 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus și unui al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 6 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus și unui al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 sau Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 2. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 4.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 7 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus și unui al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 9 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus și unui al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției HCV la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 10 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus și unui al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 11 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus și unui al patrulea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 1 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus, unui al patrulea compus și unui al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 2 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus, unui al patrulea compus și unui al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 3 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus, unui al patrulea compus și unui al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 4 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus, unui al patrulea compus și unui al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7. Al doilea compus poate fi Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 sau Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 2. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 6.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 5 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus, unui al patrulea compus și unui al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4,

Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 6 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus, unui al patrulea compus și unui al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16. Al doilea compus poate fi Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3 și Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 2. Al doilea compus poate fi Compusul 1 și al treilea compus poate fi Compusul 3. Al doilea compus poate fi Compusul 4 și al treilea compus poate fi Compusul 6. Al doilea compus poate fi Compusul 2 și al treilea compus poate fi Compusul 4. Al doilea compus poate fi Compusul 3 și al treilea compus poate fi Compusul 4.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 7 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus, unui al patrulea compus și unui al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 9 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus, unui al patrulea compus și unui al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 10 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus, unui al patrulea compus și unui al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om, o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC, o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman și o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral, fiecare metodă incluzând administrarea Compusului 11 și incluzând suplimentar administrarea unui al doilea compus, unui al treilea compus, unui al patrulea compus și unui al cincilea compus fiecare selectat din grupul constând din Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 5, Compusul 6 și Compusul 7.

Căi și moduri de administrare

Doi sau mai mulți dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 și orice alte componente ale unei terapii combinate pot fi adaptate pentru a fi administrate pe orice cale potrivită stării care urmează să fie tratată. Căile potrivite includ pe cele orală, rectală, nazală, topică (inclusiv bucală și sublinguală), vaginală și parenterală (inclusiv subcutanată, intramusculară, intravenoasă, intradermică, intratecală și epidurală) și altele asemănătoare. În funcție de starea pacientului, se va înțelege că, calea preferată poate varia

Un efect sinergetic poate fi atins atunci cand ingredientele active sunt: (1) coformulate (de exemplu, într-o formă de dozare unitară) și administrate sau distribuit simultan într-o formulare combinată; (2) distribuite prin alternanță sau în paralel ca formulări separate; sau (3) printr-o altă metodă. Când sunt distribuiți în terapia alternantă, efectul sinergetic poate fi atins atunci când

- 5 compuşii sunt administrați sau distribuiți secvențial, de exemplu, sub formă de tablete, pilule sau capsule separate sau prin injecții diferite în seringi separate. În general, în timpul terapiei alternante, o doză eficientă de fiecare ingredient activ este administrată secvențial, adică serial, în timp ce în terapia combinată, dozele eficiente de două sau mai multe ingrediente active sunt administrate împreună.
- 10 Coadministrarea unui Compus Combinat cu unul sau cu mai mulți Compuși Combinați se referă, în general, la administrarea simultană sau secvențială a unuia sau a mai multor Compuși Combinați, astfel încât cantitățile eficiente terapeutic a doi sau a mai multor Compuși Combinați să fie prezente în corpul pacientului. În unele cazuri, Compușii Combinați (de exemplu, doi, trei sau patru Compuși Combinați) vor fi coformulați pentru a permite administrarea simultană. În
- 15 unele cazuri, Compușii Combinați coformulați pot fi coadministrați cu unul sau mai mulți Compuși Combinați suplimentari.

- Coadministrarea include, de asemenea, administrarea dozelor unice ale Compușilor Combinați înainte sau după administrarea dozelor unice a unuia sau a mai multe alte ingrediente active, de exemplu, administrarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați în decurs câteva
- 20 secunde, minute sau ore de la administrarea a unui sau a mai multor alte ingrediente active. De exemplu, o doză unitară de un Compus Combinat poate fi administrată prima, urmată în câteva secunde sau minute de administrarea unei doze unitare de un al doilea Compus Combinat, urmată în câteva secunde sau minute de administrarea unei doze unitare a unuia sau a mai multe alte ingrediente active. Alternativ, o doză unitară a unuia sau a mai multe alte ingrediente active
- 25 poate fi administrată prima, urmată în câteva secunde sau minute de administrarea unei doze unitare a unui Compus Combinat, urmată în câteva secunde sau minute de administrarea unei doze unitare a unui al doilea Compus Combinat. În unele cazuri, poate fi de dorit să se administreze o doză unitară de un Compus Combinat ca prima, urmată, după o perioadă de ore (de exemplu, 1-12 ore), de administrarea unei doze unitare a unui al doilea Compus Combinat, urmată, după o perioadă de ore (de exemplu, 1-12 ore), de administrarea unei doze unitare a unuia sau a mai multe alte ingrediente active. În alte cazuri, poate fi de dorit să se administreze o doză unitară a unuia sau a mai multe alte ingrediente active ca prima, urmată, după o perioadă de ore (de exemplu, 1-12 ore), de administrarea unei doze unitare de un Compus Combinat, urmată, după o perioadă de ore (de exemplu, 1-12 ore), de administrarea unei doze unitare a unui al doilea Compus Combinat. În cazul în care trei sau mai mulți Compuși Combinați sunt
- 35 administrați cu unul sau mai multe ingrediente active suplimentare, Compușii Combinați pot fi administrați unul după altul în interval de secunde, minute sau ore (de exemplu, 1-12 ore) unul de la altul, precum unul sau mai multe ingrediente active suplimentare pot fi administrate înainte, în timpul sau după administrarea Compușilor Combinați. În cazul în care Compușii Combinați sunt coformulați, aceștia pot fi administrați simultan, înainte sau după administrarea unuia sau a mai multor ingrediente active.
- 40

Dacă nu se specifică altfel, terapia combinată poate fi administrată ca forme medicamentoase separate cu fiecare ingredient activ, administrate împreună sau separat, secvențial sau concurrent, și aproape sau la distanță una de alta.

- 45 Seria de tratament se poate extinde, de exemplu, de la aproximativ 12 săptămâni la aproximativ 24 săptămâni sau mai mult, de exemplu, de la aproximativ 12 săptămâni până la aproximativ 48 săptămâni.

- Prezenta invenție include o combinație de componente eficiente terapeutic pentru a ameliora cel puțin un simptom al infecției VHC la o ființă umană, inclusiv, dar nelimitat la, greață,
- 50 vărsături, pierderea poftei de mâncare, oboseală, icter, diaree, deshidratare, durere abdominală, ciroză hepatică. În plus, la unele persoane infectate cu VHC utilizarea terapiei combinate este eficientă pentru reducerea încărcăturii virale de particule virale VHC prezente în corpul persoanei infectate cu o cantitate semnificativă statistic. Încărcătură virală poate fi măsurată, de exemplu, prin măsurarea nivelelor de ARN VHC în plasmă folosind, de exemplu, analiza VHC COBAS TaqMan (Roche Molecular Systems). De obicei, o persoană infectată cu VHC care este tratată cu Compuși Combinați în conformitate cu prezenta invenție resimte o îmbunătățire în una sau toate simptomele asociate cu infecția VHC.
- 55

Combinații de doi sau mai mulți dintre Compușii Combinați cu Ribavirină, dar nu Interferon

După cum s-a discutat mai sus, unele tratamente VHC curente includ administrarea interferonului, dar acest tratament produce de obicei efecte secundare nedorite. Prin urmare, ar fi de dorit găsirea tratamentelor VHC eficiente care nu ar necesita administrarea interferonului.

5 Un aspect al prezentei invenții prevede compoziții, metode, utilizări și alte asemănătoare pentru tratamentul VHC incluzând administrarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați sau sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora și ribavirinei, fără administrarea unuia sau a mai multor interferoni. Acest aspect al invenției poate fi deosebit de util deoarece permite tratamentul eficient al VHC fara efecte secundare asociate cu administrarea unuia sau a mai multor interferoni.

10 Intr-un exemplu de realizare a prezentei invenții, cantitatea combinată de ribavirină și Compuși Combinați sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, opțional cu unul sau mai mulți agenți, este eficientă pentru tratarea infecției VHC.

15 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unuia sau a mai multor simptome ale infecției VHC la un om care include: administrarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați sau sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora și ribavirinei, fără administrarea concomitentă a unui sau a mai mulți interferoni. În acest sens, prezenta invenție nu exclude potențial dozarea a unui sau mai mulți interferoni. Mai degrabă, prezenta invenție poate fi utilizată în asociere cu o altă terapie, care, de fapt, include unul sau mai mulți interferoni. Un aspect al prezentei invenții include un tratament al VHC eficace cu ribavirina fără necesitatea unuia sau a mai multor interferoni.

20 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC incluzând: administrarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați sau sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora și ribavirinei, dar nu a unui sau mai mulți interferoni.

25 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru tratarea VHC la un subiect uman, care constă esențial din administrarea ribavirinei în asociere cu doi sau cu mai mulți dintre Compușii Combinați sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora.

30 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenții antivirali coadministrați oral incluzând: administrarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați sau a sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora și ribavirinei, fără administrarea concomitentă a unui sau a mai multor interferoni.

35 În mod similar, un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la om, conținând doi sau mai mulți dintre Compușii Combinați sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora și ribavirină, fără unul sau mai mulți interferoni. Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC conținând doi sau mai mulți dintre Compușii Combinați sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora și ribavirină, dar nu și unul sau mai mulți interferoni. Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție pentru tratarea VHC la un subiect uman, care constă în mod esențial din ribavirină în asociere cu doi sau mai mulți dintre Compușii Combinați sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora. Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție pentru terapia VHC pe baza de ribavirină conținând doi sau mai mulți dintre Compușii Combinați sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, cu condiția ca respectiva compoziție să nu includă unul sau mai mulți interferoni. Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenții antivirali coadministrați oral conținând doi sau mai mulți dintre Compușii Combinați sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora și ribavirină, fără unul sau mai mulți interferoni.

40 În mod similar, un alt aspect al prezentei invenții include utilizarea a: doi sau mai mulți dintre Compușii Combinați sau a sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora și ribavirinei, fără unul sau mai mulți interferoni, la fabricarea unui medicament pentru ameliorarea unuia sau mai multor simptome ale infecției VHC la un om; precum și utilizarea: a doi sau mai mulți dintre Compușii Combinați sau a sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora și ribavirinei, dar nu și a unui sau a mai mulți interferoni, la fabricarea medicamentului pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC; precum și utilizarea ribavirinei în asociere cu doi sau mai mulți dintre Compușii Combinați sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora pentru fabricarea unui medicament pentru tratarea VHC la un subiect uman, în care respectiva utilizare nu include utilizarea unui sau a mai mulți interferoni; precum și utilizarea a doi sau mai mulți Compuși Combinați sau a sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora, la fabricarea unui medicament pentru terapia VHC pe baza ribavirinei, în care respectiva utilizare evită

administrarea unui sau a mai multor interferoni; precum și utilizarea a doi sau mai mulți Compuși Combinați sau a sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora și ribavirinei, fără unul sau mai mulți interferoni în fabricarea unui medicament pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenții antivirali coadministrați oral.

5 Un alt aspect al prezentei invenții include o combinație care conține ribavirină și doi sau mai mulți Compuși Combinați sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, combinația fiind substanțial lipsită de unul sau de mai mulți interferoni. Într-un exemplu de realizare, combinația poate să fie produsă ca forme medicamentoase separate cu fiecare ingredient activ, administrate împreună sau separat, secvențial sau concurent, și aproape sau la distanță unele de altele.

10 Un alt aspect al prezentei invenții include un set care include: ribavirină, doi sau mai mulți Compuși Combinați și instrucțiunea cu privire la o schemă de tratament pentru a trata, a reduce încărcătura virală sau a întârzia apariția sau progresia VHC, în care schema de tratament include administrarea a doi sau mai mulți Compuși Combinați și a ribavirinei fără administrarea unui sau a mai mulți interferoni. Într-un exemplu de realizare, un astfel de set poate include, de asemenea, un ambalaj, cum ar fi un pachet blister. Alternativ, un astfel de set poate prevedea prescripția și dozarea individuală a fiecărei componente ca preparat ambalat separat, dar atunci când este combinat conform instrucțiunii cu privire la schema de tratament destinată tratării, reducerii încărcăturii virale sau întârzierii apariției sau progresiei HCV, acesta se propune să fie în domeniul de aplicare al prezentei invenții.

20 Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție farmaceutică care conține: ribavirină; doi sau mai mulți Compuși Combinați sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora și unul sau mai mulți purtători acceptabili farmaceutic. Într-un exemplu de realizare, compoziția farmaceutică poate fi o formă medicamentoasă unitară.

25 Dacă nu se specifică altfel, terapia combinată cu ribavirină poate fi administrată ca forme medicamentoase separate cu fiecare ingredient activ administrat (inclusiv Compușii Combinați), poate fi administrată împreună (de exemplu, sub forma unei doze standartizate, cum ar fi o tabletă) sau separat, secvențial sau concurent, și aproape sau la distanță una de alta. Dacă se administrează separat, fiecare compus poate fi administrat cu altul(altele) simultan, sau fie înainte sau după o astfel de administrare a altui(tora). Ingredientele active pot fi administrate zilnic. Într-un exemplu de realizare, o doză zilnică de ingrediente active este administrată în subdoze separate, cum ar fi una, două, trei sau patru ori pe zi. În mod avantajos, doza zilnică de Compuși Combinați sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora și ribavirină poate fi administrată o dată pe zi.

30 Deși prezenta invenție include compoziții, metode, utilizările și alte asemănătoare, pentru tratamentul VHC incluzând administrarea a doi sau mai mulți Compuși Combinați sau unei sări acceptabile farmaceutic a acestuia; și a ribavirinei, dar nu a unui sau a mai multor interferoni, prezenta invenție nu exclude potențial dozarea a unui sau mai multor interferoni la om. Mai degrabă, prezenta invenție poate fi utilizată în asociere cu o altă terapie sau pentru o altă indicație care, de fapt, include unul sau mai mulți interferoni.

40 Combinații de doi sau mai mulți dintre Compușii Combinați cu ribavirină și interferon

Un alt aspect al prezentei invenții prevede compoziții, metode, utilizări și alte asemănătoare incluzând administrarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați sau sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora și ribavirinei, și a unui sau a mai multor interferoni pentru tratamentul VHC. Administrarea mai multor interferoni poate fi în relație temporară cu administrarea Compușilor Combinați și ribavirinei.

45 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru ameliorarea unui sau a mai multor simptome ale infecției VHC la om, incluzând administrarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați sau a sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora, ribavirinei, și unui sau mai mulți interferoni. Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC incluzând: administrarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați sau a sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora împreună cu ribavirina și a unui sau a mai multor interferoni.

50 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă de terapie VHC în baza ribavirinei incluzând administrarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați sau a sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora împreună cu ribavirina și a unui sau a mai mulți interferoni.

55 Un alt aspect al prezentei invenții include o metodă pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenții antivirali coadministrați oral incluzând: administrarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați sau sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora împreună cu ribavirina și a unui sau a mai mulți interferoni.

Un alt aspect al prezentei invenții, include utilizarea a doi sau mai mulți Compuși Combinați sau a sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora împreună cu ribavirina și a unui sau a mai mulți interferoni, la fabricarea unui medicament pentru ameliorarea unuia sau a mai multor simptome ale infecției VHC la om. Un alt aspect al prezentei invenții include utilizarea a doi sau mai mulți Compuși Combinați sau a sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora împreună cu ribavirina și a unui sau a mai mulți interferoni, la fabricarea medicamentului pentru reducerea încărcăturii virale la un om diagnosticat cu VHC. Un alt aspect al prezentei invenții include utilizarea ribavirinei în asociere cu doi sau mai mulți dintre Compușii Combinați sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora pentru fabricarea unui medicament pentru tratarea VHC la un subiect uman, în care respectiva utilizare cuprinde utilizarea unui sau a mai multor interferoni. Un alt aspect al prezentei invenții include utilizarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați sau a sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora, la fabricarea unui medicament pentru terapia VHC în baza ribavirinei, în care respectiva utilizare cuprinde administrarea unui sau a mai multor interferoni. Un alt aspect al prezentei invenții, include utilizarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați sau a sărurilor acestora acceptabile farmaceutic, ribavirinei și a unui sau a mai mulți interferoni, la fabricarea unui medicament pentru reducerea apariției pseudotipurilor VHC cu rezistență la agenți antivirali coadministrați oral.

Un alt aspect al prezentei invenții include o combinație care conține ribavirină și doi sau mai mulți Compuși Combinați sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, combinația conținând unul sau mai mulți interferoni.

Un alt aspect al prezentei invenții include un set care conține: ribavirină, doi sau mai mulți Compuși Combinați și unul sau mai mulți interferoni; și instrucțiuni privind o schemă de tratament pentru tratarea, reducerea încărcăturii virale sau întârzierea apariției sau progresării VHC, și în care schema de tratament include administrarea a doi sau a mai mulți Compuși Combinați și ribavirinei și administrarea unui sau a mai multor interferoni. Într-un exemplu de realizare, un astfel de set poate conține, de asemenea, un ambalaj, cum ar fi un pachet blister. Alternativ, un astfel de set poate prevedea prescripția și dozarea individuală a fiecărei componente ca preparat ambalat separat, dar atunci când este combinat conform instrucțiunii cu privire la schema de tratament destinată tratării, reducerii încărcăturii virale sau întârzierii apariției sau progresării HCV, acesta se propune să fie în domeniul de aplicare al prezentei invenții.

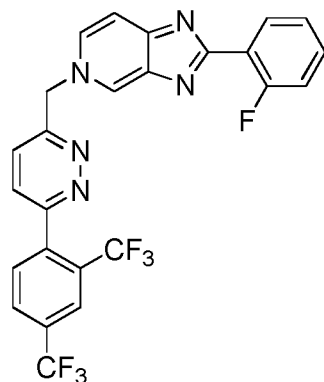
Un alt aspect al prezentei invenții include o compoziție farmaceutică care conține: doi sau mai mulți dintre Compușii Combinați sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, ribavirina și unul sau mai mulți interferoni; și unul sau mai mulți purtători acceptabili farmaceutic. Într-un exemplu de realizare, compoziția farmaceutică poate fi o formă medicamentoasă unitară.

Dacă nu se specifică altfel, terapia combinată cu ribavirină și cu unul sau cu mai mulți interferoni poate fi administrată ca forme medicamentoase separate cu unul sau cu mai mulți interferoni administrați pacientului și fiecare dintre ingredientele active rămase și care urmează să fie utilizate în terapia combinată (inclusiv Compușii Combinați) pot fi administrate împreună (de exemplu, sub forma unei doze standardizate, cum ar fi o tabletă) sau separat, secvențial sau concurent și aproape sau la distanță una de alta. Dacă se administrează separat, fiecare ingredient activ poate fi administrat cu altul(altele) în același timp sau înainte sau după o astfel de administrare a altui(altora). Ingredientele active pot fi administrate zilnic. Într-un exemplu de realizare, o doză zilnică se administrează în subdoze separate, cum ar fi una, două, trei sau patru ori pe zi.

Terapia combinată, inclusiv terapiile suplimentare

Într-un alt exemplu de realizare, exemplele nelimitative de combinații potrivite includ combinațiile de doi sau mai mulți dintre Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5, Compusul 6, Compusul 7, Compusul 9, Compusul 10, Compusul 11, Compusul 12, Compusul 13, Compusul 14, Compusul 15 și Compusul 16 cu unul sau mai multe ingrediente active suplimentare, inclusiv inhibitori ai VHC NS3 proteazei, inhibitori ai alfa-glucozidazei 1, hepatoprotectanți, inhibitori nucleozidici sau nucleotidici ai VHC NS5B polimerazei, inhibitori nonnucleozidici ai VHC NS5B polimerazei, inhibitorii ai VHC NS5A, agoniști ai TLR-7, inhibitori ai ciclofilinei, inhibitori ai IRES VHC, inhibitori de intrare a VHC, inhibitori de maturare a VHC, inhibitori de asamblare a VHC, inhibitori de infecțiozitate cu VHC și intensificatori farmacocinetici, precum și alte medicamente pentru tratarea VHC. Mai specific, unul sau mai mulți compuși ai prezentei invenții pot fi combinați cu unul sau mai mulți compuși selectați din grupul constând din:

- (i) inhibitori ai VHC NS3 proteazei, de exemplu, boceprevir (SCH-503034, SCH-7), telaprevir (VX-950), TMC-435 (IUPAC N-(2R,3aR,10Z,11aS,12aR,14aR)-2-[2-(4-Izopropiltiazol-2-il)-7-metoxi-8-metilchinolin-4-iloxi]-5-metil-4,14-dioxo-1,2,3,3a,4,5,6,7,8,9,11a,12,12a,13,14,14a-hexadecahidrociclopenta[c]ciclopropa[g][1,6]diazacicotetradecin-12a-ilcarbonil]ciclopropansulfonamidă], ABT-450, ACH-1625, ACH-2684, BI-201335, BI-1230, MK-5172, MK-7009, SCH-900518, VBY-376, VX-500, GS-9256, GS-9451, BMS-605339, PHX-1766, AS-101, YH-5258, YH-5530, YH-5531 și ITMN-191 (R-7227);
- 5 (ii) inhibitori ai alfa-glucozidazei 1, de exemplu, celgosivir (MX-3253), UT-231B, miglitol;
- 10 (iii) hepatoprotectanți, de exemplu, emericasan (IND-6556), ME-3738, silibilin și MitoQ;
- (iv) inhibitori nucleozidici sau nucleotidici ai VHC NS5B polimerazei, de exemplu, R1626, R7128 (R4048), IDX184, IDX-102, PSI-661, PSI-938, PSI-7851, PSI-7977, BCX-4678, valopicitabină (NM-283), MK-0608 și TMC649128;
- 15 (v) inhibitori nonnucleozidici ai VHC NS5B polimerazei, de exemplu, filibuvir (PF-868554), ABT-333, ABT-072, BI-207127, VCH-759, VCH-916, JTK-652, MK-3281, VBY-708, VCH-222, A848837, ANA-598, GL60667, GL59728, A-63890, A-48773, A-48547, BC-2329, VCH-796 (nesbuvir), GSK625433, BILN-1941 și XTL-2125;
- (vi) inhibitori ai VHC NS5A, de exemplu, ACH-2928, AZD-2836 (A-831), AZD-7295 (A-689), BMS-766, BMS-790052, BMS-824393 și PPI-461;
- 20 (vii) agonisti ai TLR-7, de exemplu, imichimod, 852A, ANA-773, ANA-975, AZD-8848 (DSP-3025), PF-04878691 și SM-360320 și Compusul 8;
- (viii) inhibitori ai ciclofileinei, de exemplu, DEBIO-025, SCY-635 și NIM811;
- (ix) inhibitori ai VHC IRES, de exemplu, MCI-067;
- 25 (x) intensificatori farmacocinetici, de exemplu, roxitromicină, BAS-100, SPI-452, PF-4194477, TMC-41629;
- (xi) inhibitori de intrare a VHC;
- (xii) inhibitori de asamblare a VHC;
- (xiii) inhibitori de maturare a VHC;
- (xiv) inhibitori de infecțiozitate cu VHC; și
- 30 (xv) alte medicamente pentru tratarea VHC, de exemplu, timozină alfa 1 (Zadaxin), nitazoxanidă (ALINEA, NTZ), BIVN-401 (virostat), PYN-17 (altirex), KPE02003002, Actilon CPG-10101), KRN-7000, civacir, GI-5005, XTL-6865, BIT225, PTX-111, ITX2865, TT-033i, ANA 971, NOV-205, Tarvacină, EHC-18, VGX-410C, EMZ-702, AVI 4065, BMS-650032, BMS-79132, Bavituximab, MDX-1106 (ONO-4538), Oglufanidă, FK-788 și VX-497
- 35 (merimepodib).
- Exemple de sinteză
- Protocoloalele de sinteză pentru prepararea Compușilor 1, 2, 3, 6, 7 și 8 sunt cunoscute în literatura de specialitate. În plus, un protocol de sinteză pentru prepararea fiecăruia dintre Compușii Combinați este prezentat în exemplele de mai jos.
- 40 Compusul 1 poate fi preparat utilizând metode de sinteză și intermediari asemănători celor descriși în brevetul US 7754720 B2 2010.07.13. Compusul 1 poate fi de asemenea preparat astfel cum este descris în Exemplul care urmează.
- Exemplul 1: 5-({6-[2,4-bis(trifluorometil)fenil]piridazin-3-il}metil)-2-(2-fluorofenil)-5H-imidazo[4,5-c]piridină 1.
- 45

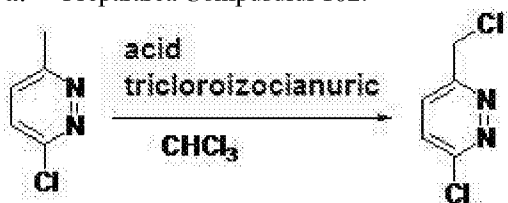


1

Compus	GM	Cantitate	Moli	Echivalenți
104	453,79	95mg	0,209	1
DME	500 μ L			
2N aq. Na ₂ CO ₃		313 μ L	0,626	3
105	257,93	80,9mg	0,313	1,5
Pd(PPh ₃) ₄	1155	12mg	0,0104	0,05

- 5 Compusul 103 a fost dizolvat în dimetoxietan (DME). La această soluție s-a adăugat acid 2,4-bis(trifluorometil)fenilboronic 105 și o soluție apoasă 2N de Na₂CO₃. La amestecul bifazic rezultat s-a adăugat Pd(PPh₃)₄ și amestecul de reacție a fost apoi încălzit la 80°C timp de 72 ore. Reacția s-a răcit la temperatura camerei și s-a filtrat prin Celită, iar Celita s-a spălat cu EtOAc. Filtratul s-a concentrat în vid. Reziduul s-a purificat pe 6g SiO₂ folosind MeOH/CH₂Cl₂ pentru a elua compusul. Compusul astfel obținut a fost contaminat cu PPh₃(O). Produsul a fost repurificat pe o placă de 1 mm Chromatotron cu 0 până la 5% MeOH/CH₂Cl₂ în 1% de pași. Frațiunile pure au fost combinate și concentrate în vid, apoi uscate în vid înalt timp de 12 ore. 11,8 mg de bază liberă a compusului 1 au fost obținute fără vreo contaminare cu PPh₃. ¹H RMN (300MHz, CD₃OD) δ 6,20 (s, 2), 7,32 (m, 3), 7,52 (m, 1), 7,78 (d, 1), 7,89 (d, 1), 7,95 (s, 2), 8,15 (m, 3), 8,35 (d, 1), 9,12 (s, 1); CL/SM M+H = 518.
- 15 Compusul intermediar 104 a fost preparat după cum urmează.

a. Prepararea Compusului 102.



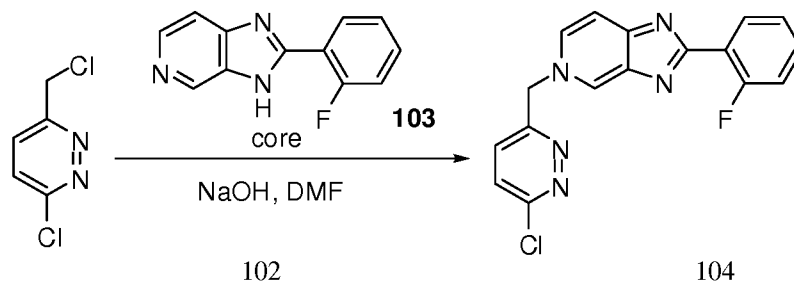
101

102

Compus	GM	Cantitate	Mmoli	Echivalenți
101	128,56	5 g	38,9	1
TCCA	232,41	3,62 g	15,6	0,4
CHCl ₃		130 mL		

- 20 La o soluție de materie primă inițială disponibilă comercial 101 în CHCl₃, s-a adăugat acid trichloroizocianuric (TCCA) la 60°C. Apoi soluția s-a agitat timp de 1,5 ore, s-a răcit și s-a filtrat cu HiFlo-Celită. Filtratul s-a concentrat și s-a uscat cu vid. Randamentul a fost de 5,037 g de compus 102.

b. Prepararea Compusului 104.

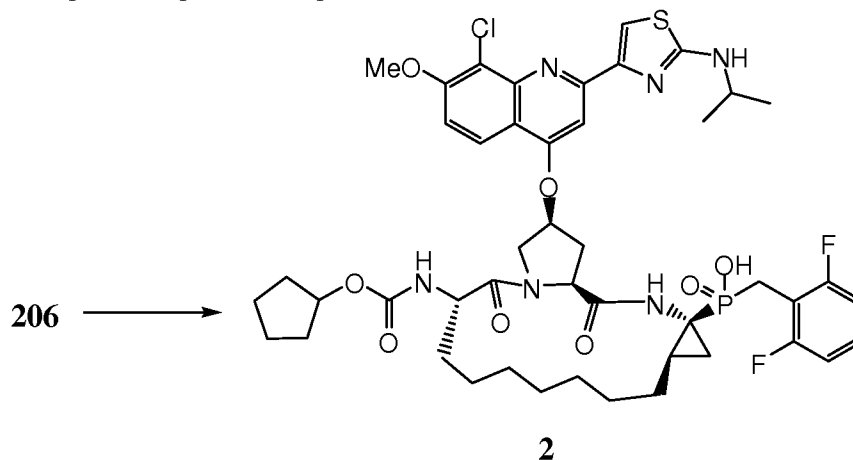


Compus	GM	Cantitate	Mmoli	Echivalenți
102	163	5,073 g	31,12	1
103	213,2	6,635 g	31,12	1
NaOH (10%)	40	1,245 g	31,12	1
DMF		320 mL		

5 La o soluție de compus 103 în DMF (dimetilformamidă) s-a adăugat NaOH. Compusul 102 s-a dizolvat în DMF (20 mL) și s-a adăugat lent la soluție. Reacția s-a agitat timp de 3 ore, s-a diluat cu apă și s-a extras cu EtOAc. Stratul organic s-a uscat cu Na₂SO₄. Solventul s-a îndepărtat și produsul s-a recristalizat cu diclormetan. Randamentul a fost de 5,7 g de compus 103.

Compusul 2 poate fi preparat prin metode de sinteză și intermediari, cum ar fi cei descriși în US 2010051763 A1 2010.03.04. Compusul 2 poate fi de asemenea preparat astfel cum este descris în Exemplul următor.

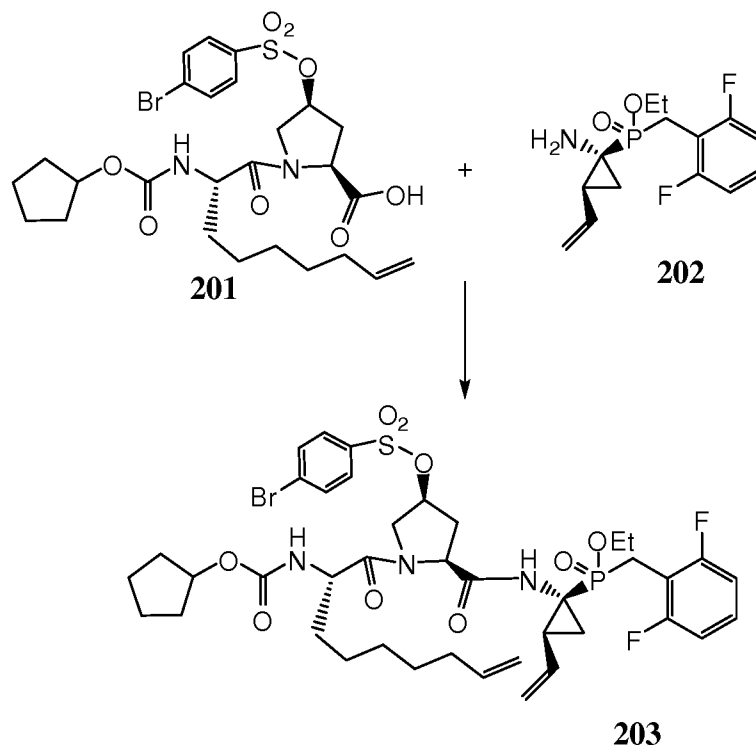
Exemplul 2: Prepararea Compusului 2.



Fosfinat ester 206 (23,7 g, 24,05 mmol) s-a dizolvat în CH₃CN (240 mL) și s-a răcit la 0°C. Iodotrimetilsilan (17,4 mL, 122,3 mmol) s-a adăugat într-un ritm rapid în picături, urmat, după 10 min, de 2,6-lutidină (17,0 mL, 146,4 mmol). Amestecul de reacție s-a încălzit lent la temperatura camerei și s-a agitat timp de 1 h, apoi răcit din nou la 0°C și s-a adăugat 2,6-lutidină (11,1 mL, 95,6 mmol), urmată de MeOH (24 mL). Soluția s-a concentrat în vid și reziduul brut a fost purificat prin HPLC pentru a se obține 12,68 g de compus 2 într-un randament de 55%. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,35 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 8,28 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,64 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 7,35-7,22 (m, 1H), 7,02-6,89 (m, 2H), 5,85 (bs, 1H), 4,82-4,71 (m, 2H), 4,33 (bs, 1H), 4,28-3,99 (m, 3H), 4,16 (s, 3H), 3,57-3,28 (m, 2H), 2,90-2,78m, 1H), 2,63-2,50 (m, 1H), 2,08-1,91 (m, 1H), 1,91-1,70 (m, 2H), 1,70-1,13 (m, 22H), 1,37 (d, J = 6,9 Hz, 6H); ³¹P RMN (121,4 MHz, CD₃OD) δ 42,4; LCMS (M+1): 957,35 g.

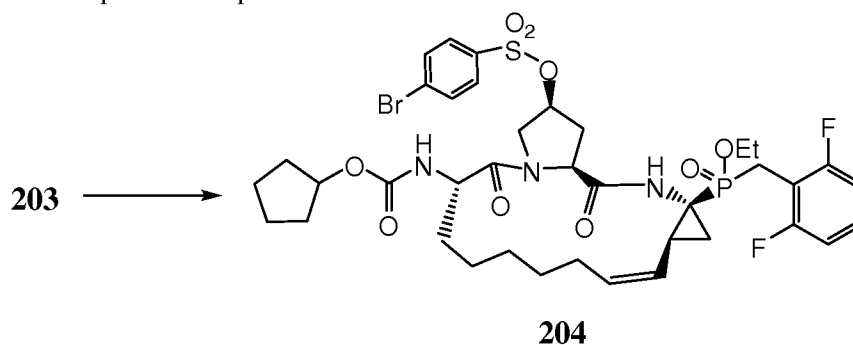
Compusul intermediar 206 a fost preparat după cum urmează.

a. Prepararea Compusului 203.



Compusul 201 (17,42 g, 28,30 mmol) s-a dizolvat în THF (136 mL) și s-a răcit la 0°C. La soluție s-a adăugat N-metilmorfolină (4,7 mL, 42,7 mmol). După 10 min la 0°C s-a adăugat prin picurare *i*-butilcloroformiat (4,05 mL, 30,96 mmol). După 1 oră suplimentară, ester etilic al acidului (1-amino-2-vinil-ciclopropil)-(2,6-difluoro-benzil)-fosfinic 202 (8,94 g, 29,70 mmol) s-a adăugat treptat sub formă de soluție în THF (20 mL). Suspensia s-a încălzit la temperatura camerei și după 2 ore s-a repartizat între H₂O (400 mL) și acetat de etil (200 mL). Stratul apos s-a extras cu acetat de etil (200 mL x 2) și straturile organice combinate s-au spălat cu acid clorhidric (1N, 225 mL) și H₂O (200 mL). Spălarea acidă și spălarea apoasă au fost combinate și extrase cu acetat de etil (175 mL x 2, 100 mL x 2). Straturile organice combinate s-au spălat cu soluție salină (400 mL), uscat pe Na₂SO₄ și s-au concentrat in vid furnizând 25,06 g de dienă 203 în 98,5% de produs brut. LCMS (M+1): 898,06.

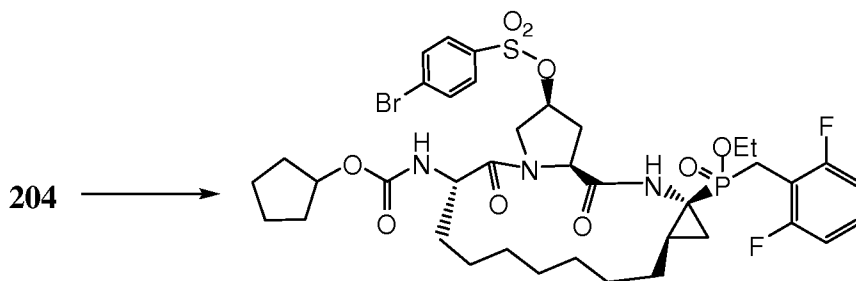
b. Prepararea Compusului 204.



Compusul 203 (12,91 g, 14,36 mmol) s-a dizolvat în CH₂Cl₂ (1440 mL) și soluția s-a degazat timp de 30 minute. Soluția s-a încălzit la 40°C și s-a adăugat catalizator Grubb G1 (2,95 g, 3,59 mmol). Reacția s-a refluxat timp de 17 ore după care s-a adăugat tris-hidroximetilfosfină (22,3 g, 18,0 mmol), TEA (50 mL, 35,9 mmol) și H₂O (400 mL) și amestecul de reacție s-a încălzit la reflux timp de încă 16 ore. Amestecul de reacție s-a răcit la temperatura camerei și cele două straturi au fost separate. Stratul organic s-a spălat cu H₂O (400 mL) și soluție salină (300 mL), s-a uscat pe MgSO₄ și s-a concentrat. Reziduul brut a fost purificat prin cromatografie pe silicagel pentru a se obține 8,30 g de olefină macrocică 204 într-un randament de 66%. LCMS (M+1): 870,09.

c. Prepararea Compusului 205.

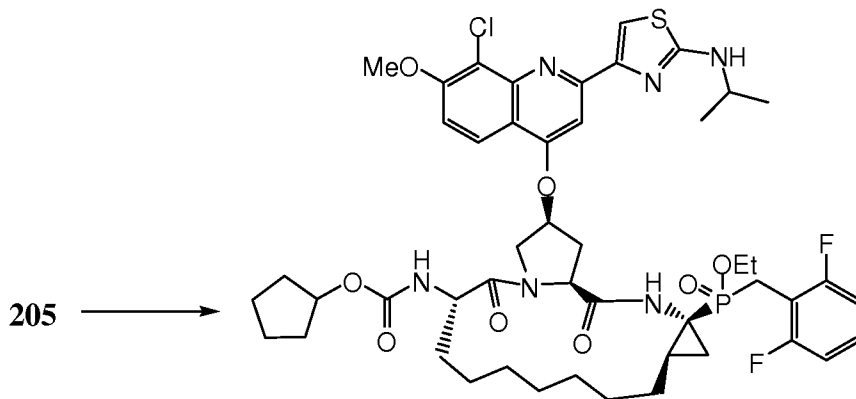
44



205

5 Olefină macrocyclică 204 (7,34 g, 8,42 mmol) s-a dizolvat în acetat de etil (105 mL) și s-a adăugat rodiiu pe alumina (5% de masă, 2,945 g, 0,40% de masă). Sistemul a fost evacuat și purtat cu H_2 (1 atm, de 3 ori). La sistem, după 3 ore, s-a adăugat mai mult rodiiu pe alumina (5% de masă, 842 mg, 0,10% de masă) și s-a evacuat și curățat cu H_2 (1 atm, de 3 ori). După 1 oră suplimentară, suspensia a fost filtrată și concentrată in vid furnizând 6,49 g de macrociclu redus 205 în 88% de produs brut. LCMS (M+1): 872,04.

d. Prepararea Compusului 206.

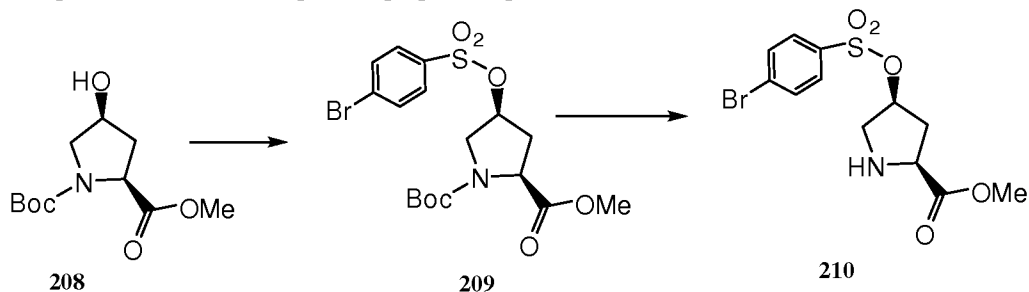


206

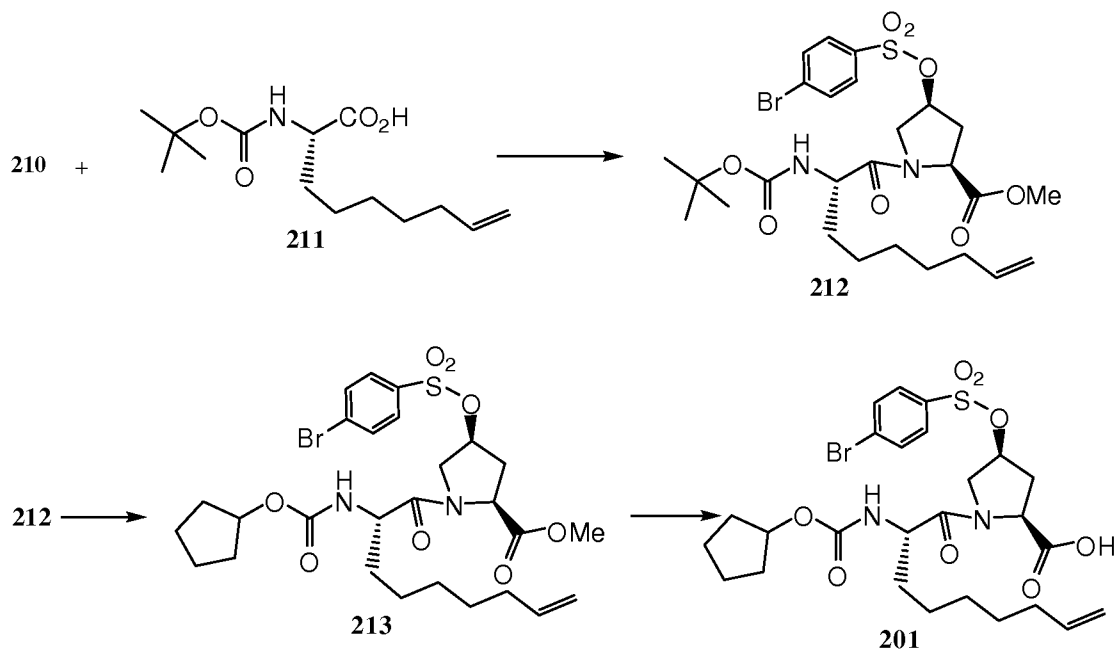
10 Macrociclu brosilat 205 (6,49 g, 7,67 mmol) s-a dizolvat în N-metilpirolidinonă (25,0 mL) și s-a adăugat 8-cloro-2-(2-izopropilamino-tiazol-4-il)-7-metoxi-chinolin-4-ol 207 (2,564 g 7,33 mmol) urmat de CS_2CO_3 (4,40 g, 13,50 mmol). Amestecul s-a încălzit la 65°C timp de 6 ore, apoi s-a diluat cu acetat de etil (200 mL) și s-a spălat cu LiCl (5%, 250 ml). Stratul apos s-a extras cu acetat de etil (100 ml x 2) și straturile organice combinate s-au spălat cu soluție salină

15 (150 mL), s-au uscat pe $Na_2SO_4/MgSO_4$ și s-au concentrat in vid. Reziduul brut s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (acetat de etil-metanol) producand 4,39 g de aminotiazol 206 cu un randament de 58%. LCMS (M+1): 985,28.

Compusul intermediar 201 poate fi preparat după cum urmează.



20



5 e. Prepararea Compusului 209.

Compusul 208 (7,00 g, 28,55 mmol) și DABCO (5,13 g, 45,94mmol) s-au dizolvat în toluen (30 mL). S-a adăugat o soluție de toluen (11 mL), chlorură de brosil (10,22 g, 40,01 mmol). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei peste noapte. Reacția s-a diluat cu EtOAc (210 mL) și 0,5 N HCl (200 mL). Cele două straturi au fost separate și stratul apos s-a extras cu EtOAc (2 x 200 mL). Straturile organice combinate s-au spălat cu soluție salină (200 mL), s-au uscat cu Na₂SO₄, s-au filtrat și s-au concentrat. Produsul brut s-a purificat prin cromatografie rapidă cu obținerea a 12,23 g de compus 209 într-un randament de 92%.

f. Prepararea compușilor 210 și 212.

Compusul 209 (12,2 g, 26,3 mmol) s-a tratat cu 4 N HCl / 1,4-dioxan (60 mL) și s-a agitat timp de 1 oră. Amestecul de reacție s-a concentrat și s-a uscat sub vid timp de 20 minute. Sarea aminei brute HCl a compusului 210 s-a dizolvat în DMF (150 mL) și s-a adăugat acidul 211 (14,2 g, 52,6 mmol). S-a adăugat HATU (20,0 g, 52,6 mmol) și NMM (13,5 g, 131,5 mmol). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei peste noapte. Reacția s-a diluat cu EtOAc (300 mL), s-a spălat cu 1N HCl (200 mL), NaHCO₃ saturat, soluție salină, uscat cu Na₂SO₄ și concentrat. Produsul brut s-a purifică prin cromatografie rapidă cu obținerea a 15,1 g de compus 212 într-un randament de 93%.

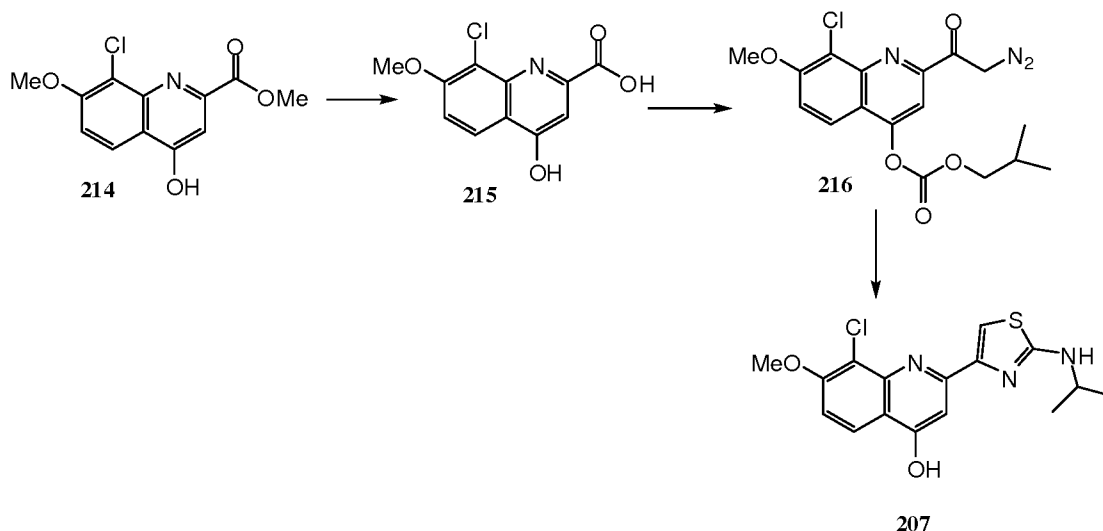
g. Prepararea Compusului 213.

La o soluție de 212 (12,8 g, 20,7 mmol) în CH₂Cl₂ (50 mL) s-a adăugat 4 N HCl în 1,4-dioxan (50 mL, 200 mmol). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 2 ore, concentrat, uscat sub vid timp de 20 minute și apoi dizolvat în CH₃CN (50 mL). NaHCO₃ saturat în H₂O (50 mL) s-a adăugat și s-a agitat timp de 5 minute. S-a adăugat ciclopentilclorofomat preparat proaspăt în THF (50 mL). Reacția s-a completat în decurs de 1 oră. Solventul s-a îndepărtat sub presiune redusă și reziduul s-a diluat cu acetat de etil. Amestecul s-a adus la pH = 2 cu 1N HCl și cele două straturi au fost separate. Straturile organice s-au spălat cu soluție salină, uscat cu Na₂SO₄, filtrat și concentrat pentru a da compusul brut 213 (3,18 g).

h. Prepararea Compusului 201.

Ester brut 213 (3,18 g, 5,07 mmol) s-a dizolvat în THF (25 mL), H₂O (25 mL) și apoi s-a adăugat MeOH (6 mL) și LiOH (660 mg, 25,4 mmol). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 1 oră și s-a diluat cu acetat de etil. Amestecul de reacție s-a acidulat la pH 2 cu 1N HCl și cele două straturi au fost separate. Stratul apos s-a extras cu EtOAc (de 2 ori). Straturile organice combinate au fost spălate cu soluție salină, uscate cu Na₂SO₄, concentrate și uscate sub vid pentru a da 3,09 g de acid 201.

8-Cloro-2-(2-izopropilamino-tiazol-4-il)-7-metoxi-chinolin-4-olul intermediar 207 poate fi preparat după cum urmează.



Prepararea acidului 8-cloro-4-hidroxi-7-metoxichinolin-2-carboxilic 215.

La o soluție de metil-8-cloro-4-hidroxi-7-metoxichinolin-2-carboxilat 214 (36,5 g, 0,145 mol) într-un amestec de 1:1 de MeOH : THF (160 mL total) s-a adăugat o soluție de LiOH (30,5 g, 0,725 mol) în H₂O (80 mL). Amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de o oră când analiza LCMS a indicat conversia completă în acid carboxilic. Reacția a fost întreruptă prin îndepărtarea produselor volatile și ajustarea pH-ului soluției la 6 folosind soluție apoasă de 6N HCl. Reziduul gumos rezultat a fost filtrat și uscat pe liofilizator timp de 2 zile pentru a da 34,4 g (99,6%) de compus 215 sub forma unui solid alb. IE SM (*m/z*) 253,9 [M+H].

i. Prepararea 2-(2-diazo-1-oxo)-8-cloro-7-metoxichinolin-4-il izobutil carbonatului 216.

La o soluție de acid 8-cloro-4-hidroxi-7-metoxichinolin-2-carboxilic 215 (10,2 g, 0,04 mol) în THF (400 mL) s-a adăugat trietilamină (12,3 mL, 0,088 mol) și *i*-butilcloroformiat (11,6 mL, 0,088 mol) la 0°C în atmosferă de argon. Amestecul s-a agitat la 0°C timp de 1 oră, atunci când analizele LCMS au demonstrat terminarea reacției pentru a furniza anhidrida mixtă dorită. IE SM (*m/z*) 454,0 [M+H]. La amestecul de reacție de anhidridă s-a adăugat o soluție 1M de diazometan (121 mL, 0,121 mol) în eter dietilic printr-o palnie de plastic la 0°C. Acest amestec s-a lăsat sub agitare încălzindu-se până la temperatura camerei timp de încă 2 ore. Analiza amestecului prin LCMS a demonstrat terminarea reacției. Septul a fost îndepărtat și reacția a fost agitată timp de încă 20 minute înainte de îndepărtarea solventului. Reziduul a fost uscat în continuare sub vid ridicat pentru a da compusul 216, care a fost utilizat mai departe în etapa următoare. IE SM (*m/z*) 377,9 [M+H].

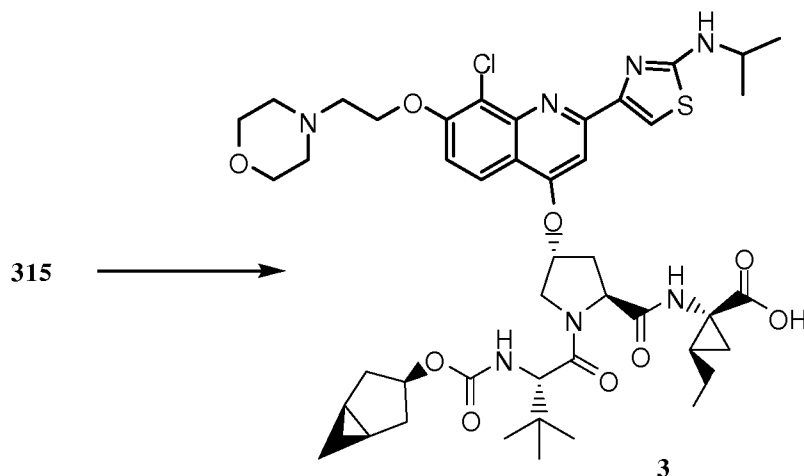
j. Prepararea 8-cloro-2-(2-(izopropilamino)thiazol-4-il)-7-metoxichinolin-4-olului 207.

La o soluție răcită de 2-(2-diazo-1-oxo)-8-cloro-7-metoxichinolin-4-il isobutil carbonat 216 (15,2 g, 0,040 mol) la 0°C în THF (268 mL) s-a adăugat 48% HBr (23 mL, 0,201 mol) lent timp de 15 minute. Soluția s-a agitat la 0°C timp de încă 40 minute, când analiza LCMS a demonstrat că reacția este completă. Reacția a fost întreruptă prin adăugarea soluției apoase de 1N NaOH (180 mL) la 0°C pentru a ajusta pH-ul stratului apos la 9. Straturile au fost separate și stratul apos s-a spălat cu EtOAc (2 x 200 mL). Extractele organice combinate s-au spălat cu soluție salină și s-au uscat pe MgSO₄. Solventul s-a îndepărtat în vid pentru a furniza 17,7 g de produs solid de culoare galbenă. IE SM (*m/z*) 431,9 [M+H].

Soluție de bromocetonă obținută din reacția anterioară s-a suspendat în *i*-propanol (270 mL) și izopropilizouree (9,4 g, 0,080 mol). Amestecul de reacție s-a încălzit la 72°C timp de 32 ore. Analiza LCMS a reacției a demonstrat conversia completă în produsul dorit. Reacția s-a lăsat să se răcească la temperatura camerei pentru a permite precipitarea produsului din soluție. Reacția s-a răcit la 0°C timp de 12 ore înainte de filtrare. Filtratul s-a spălat cu eter și s-a uscat pe un dispozitiv de liofilizare pentru a da 8,03 g de compus 207 ca un solid portocaliu. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 8,21 (d, *J*=9 Hz, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,44 (d, *J*=10 Hz, 1H), 7,07 (s, 1H), 4,05 (s, 3H), 3,92 (cvintet, *J*=6 Hz, 1H), 1,25 (d, *J*=7 Hz, 6H); IE SM (*m/z*) 350,0 [M+H].

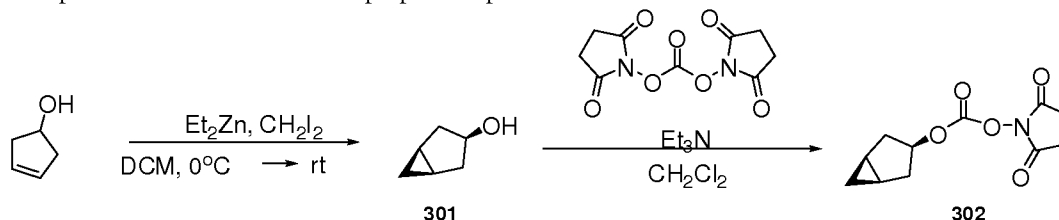
Compusul 3 poate fi preparat prin metode de sinteză și intermediari, cum ar fi cei descriși în US 2009257978 A1 2009.10.15. Compusul 3 poate fi, de asemenea, preparat astfel cum este descris în Exemplul următor.

Exemplul 3: Prepararea Compusului 3



Compusul 315 (12 g, 13 mmol) s-a dizolvat în THF (200 mL), s-a adăugat LiOH (11 g, 260 mmol) în H₂O (200 mL), urmat de MeOH (200 mL). Amestecul s-a menținut sub agitare la temperatura camerei timp de 20 ore. După terminarea reacției, s-a adăugat 4N HCl în H₂O pentru a ajusta pH-ul la 7 la 0°C. Amestecul s-a extras cu EtOAc (2 x 400 mL). Stratul organic combinat s-a spălat cu soluție salină, uscat (Na₂SO₄) și concentrat în vid pentru a da compusul 3 ca un solid galben (11 g, 93%). CL/SM = 911,52 (M⁺+1). ¹H RMN (300MHz, CD₃OD) δ 7,95 (d, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,31 (d, 1H), 5,42 (s, 1H), 4,37 (dd, 1H), 4,20 (m, 2H), 3,83-3,56 (m, 7H), 3,50 (m, 2H), 3,39 (m, 2H), 2,45 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 1,62 (m, 2H), 1,50 (m, 1H), 1,33 (m, 2H), 1,18 (m, 1H), 1,05 (m, 8H), 0,90 (m, 3H), 0,76 (m, 11H), 0,14-0,04 (m, 2H)

Compusul intermediar 315 a fost preparat după cum urmează.

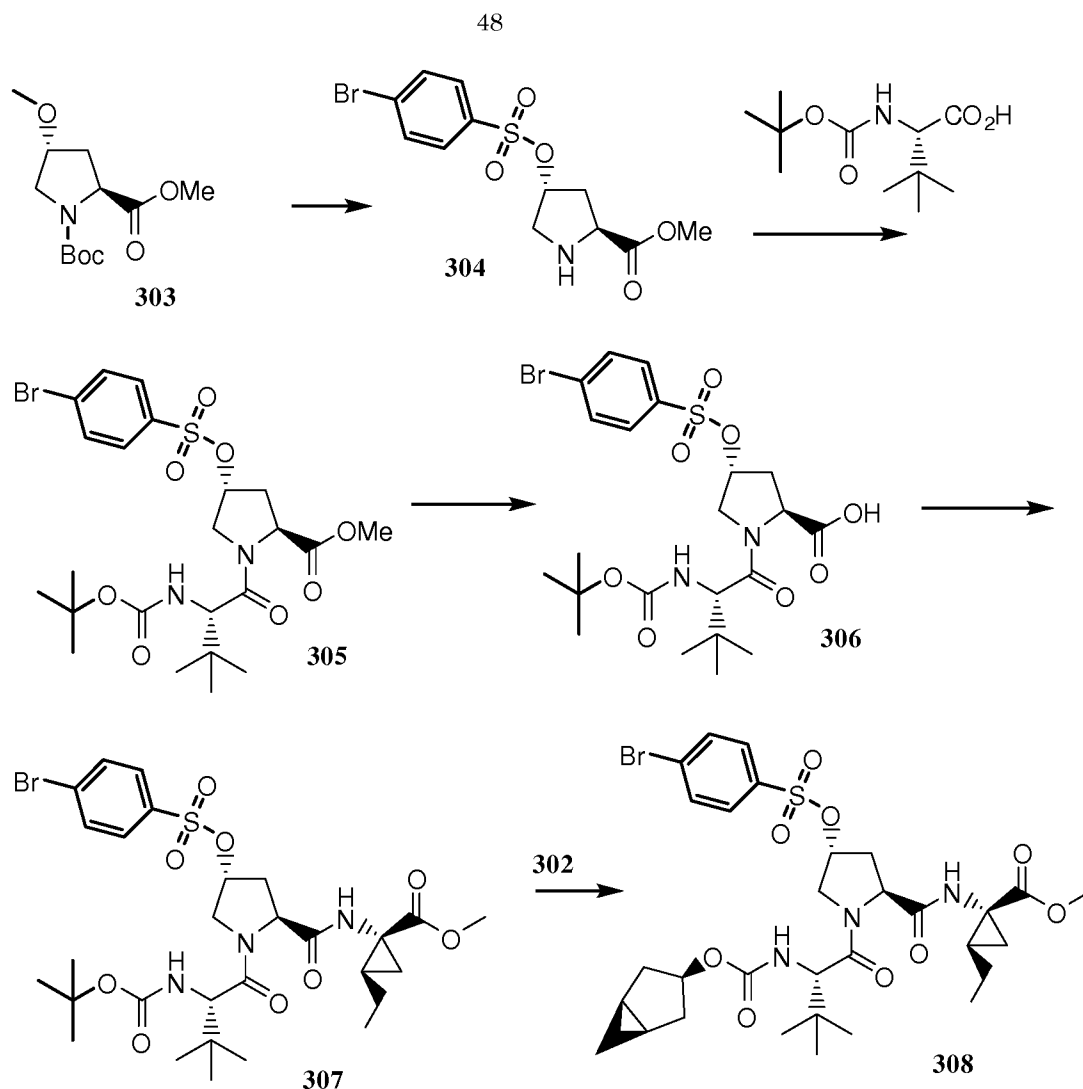


a. Prepararea Compusului 301.

La un balon cu trei gaturi, purjat cu argon cu fund rotund uscat (1000 mL) s-au adăugat diclorometan anhidru (100 mL) și Et₂Zn (28 mL, 273 mmol) la 0°C. (ATENȚIE: Sursa de argon nu poate fi de la ac. Utilizați doar adaptorul de sticlă potrivit. Un al doilea barbotor poate fi, de asemenea, atașat la vas pentru a preveni creșterea presiunii excesive). Ciclopenten-3-ol (10,0 mL, 119 mmol) s-a adăugat apoi prin picurare (s-a produs o cantitate mare de gaz etan) la balon și amestecul de reacție s-a lăsat sub agitare până când degajarea de gaz a încetat. Diiodometan (22 mL, 242 mmol) s-a adăugat apoi în picături timp de 30 minute. Reacția s-a lăsat să se încălzească la temperatura camerei și a continuat să se agite peste noapte sub un flux pozitiv de argon, în punctul căreia analiza TLC a indicat dispariția completă a alcoolului inițial. Reacția s-a diluat apoi cu CH₂Cl₂ și s-a stins cu 2M HCl (precipitatul alb trebuie să fie dizolvat complet). Amestecul bifazic s-a turnat într-o pâlnie de separare și stratul organic a fost colectat. Solventul s-a îndepărtat sub presiune redusă până la 100 mL de material care conține compusul rămas 301.

b. Prepararea Compusului 302.

Diclorometan anhidru (525 mL) s-a adăugat la balon, după care a urmat adăugarea în picături a trietilaminei (34 mL, 245 mmol). Reacția a continuat să se agite la temperatura camerei sub un flux pozitiv de azot, în acest moment disuccinimidilcarbonat (40,7 g, 159 mmol) s-a adăugat în porții la balon. Reacția s-a lăsat sub agitare până când analiza TLC a indicat dispariția completă a materiei prime inițiale (2-3 zile). După completare, amestecul de reacție s-a stins cu 1M HCl (200 mL x 2) și spălat cu H₂O (200 mL x 2). Materialul dorit s-a extras utilizând CH₂Cl₂ și straturile organice combinate au fost uscate folosind MgSO₄ anhidru și trecute printr-un strat de silice. Solventul a fost îndepărtat sub presiune redusă și materialul brut a fost purificat utilizând cromatografia rapidă (R_f=0,33, 1:1 Hex/EtOAc) pentru a da compusul 302 (22 g, 75%): ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5,24 (t, 1H), 3,82 (s, 4H), 2,24 (m, 2H), 2,03 (d, 2H), 1,38 (m, 2H), 0,48 (m, 1H), 0,40 (m, 1H).



5

c. Prepararea Compusului 304.

Ester metilic al N-*t*-Boc-cis-4-Hidroxi-L-prolinei 303 (100,0 g, 407,7 mmol) și DABCO (1,5 echiv, 68,6 g, 611,6 mmol) s-au dizolvat în toluen anhidru (200 mL) într-un balon cu trei gaturi cu fund rotund de 2 L cu un agitator mecanic și o pâlnie de adiție. După răcirea soluției la 0°C sub N₂, o soluție de clorură de 4-bromo-benzensulfonil (1,3 echiv, 135,6 g, 530,0 mmol) în 300 mL de toluen s-a adăugat prin pâlnia de adiție timp de 60 minute. Amestecul de reacție s-a agitat și s-a încălzit la temperatura camerei peste noapte (16 ore). Amestecul s-a turnat lent în 2L de 1M Na₂CO₃ (apos) și produsul s-a extras cu EtOAc (2 L). După ce faza organică s-a spălat cu 0,5 N HCl (2L), H₂O (1L) și soluție salină (1 L), acesta a fost uscat (MgSO₄), concentrat pentru a obține 195,45 g de produs brosilat uleios de culoare galbenă.

La o soluție de brosilat sus-menționat (407,7 mmol) în diclormetan (300 mL) s-a adăugat lent 4,0 M HCl în dioxan (500 mL, 5 echiv) și soluția rezultată s-a lăsat sub agitare la temperatura camerei timp de 2 ore. După aceasrta eter (500 mL) s-a adăugat la amestecul de reacție, amestecul s-a agitat timp de 15 minute și precipitatul alb a fost colectat prin filtrare. Solidul s-a spălat cu eter și hexan și apoi uscat sub vid peste noapte pentru a se obține 153,0 g de sare de hidroclozură a aminei a compusului 304, 381,8 mmol, randament 94% pentru două etape.

d. Prepararea Compusului 305.

La o soluție de Boc-terț-butil-glicină (97,0 g, 420,0 mmol) în DMF (200 mL) și clorură de metilen (200 mL) s-au adăugat HATU (217,76 g, 572,7 mmol) și bază Hunig (126 mL, 1145,4 mmol) la temperatura camerei. După ce amestecul a fost agitat timp de 20 minute la temperatura camerei, o soluție de sare HCl (153,0 g, 381,8 mmol) și bază Hunig (126 mL, 1145,4 mmol) menționate mai sus în DMF (200 mL) și diclormetan (200 mL) s-a adăugat la amestecul de acid menționat într-o porție. Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 3 ore, cu monitorizare prin LCMS. Amestecul de reacție a fost concentrat pentru a îndepărta diclormetanul

30

sub presiune redusă și solidul alb care s-a format s-a filtrat. Soluția DMF rămasă s-a diluat cu acetat de etil (1L), s-a spălat succesiv cu 3% LiCl (apoasă) (3x650mL), soluție saturată de NH₄Cl (2x500 mL), 0,5 N HCl (apoasă) (2x600mL), soluție salină (500 mL), soluție saturată de NaHCO₃ (3x500mL) și soluție salină (500 mL). Frațiunea organică rezultată a fost uscată

5

(MgSO₄) și concentrată pentru a obține compusul 305 (111 g).

e. Prepararea Compusului 306.

La o soluție de ester metilic 305 (120 g, 207,8 mmol) în THF (300 mL), MeOH (75 mL) s-a adăugat o soluție de LiOH (26,18 g, 623,4 mmol) în H₂O (150 mL). Soluția s-a lăsat sub agitare la temperatura camerei timp de 4 ore. Amestecul s-a răcit într-o baie de gheață acidulându-l cu

10

3N HCl până la un pH de aproximativ 5,5, s-a agitat timp de 10 minute, iar solidele albe rezultate au fost colectate prin filtrare. Solidele s-au spălat cu mai multă apă, eter și hexan. Solidele s-au uscat sub vid la 40°C peste noapte pentru a da 95,78 g (82%) de acid 306.

f. Prepararea Compusului 307.

La o soluție de acid carboxilic 306 (81,4 g, 144,27 mmol) în DMF (200 mL) și diclormetan (200 mL) s-a adăugat HATU (82,3 g, 216,4 mmol) și bază Hunig (47,5 mL, 432,8 mmol) la temperatura camerei. După ce amestecul a fost agitat timp de 20 minute la temperatura camerei, o soluție de amină (158,7 mmol) și bază Hunig (47,5 mL, 1145,4 mmol) în DMF (200 mL) și diclormetan (200 mL) s-a adăugat la amestecul de acid de mai sus într-o singură porție. Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 3 ore și s-a monitorizat prin

20

LCMS. După ce amestecul a fost concentrat sub presiune redusă pentru a îndepărta diclormetanul, solidele albe care s-au format au fost filtrate. Soluția DMF s-a diluat cu acetat de etil (600 mL) și spălat succesiv cu 3 % LiCl (apoasă) (2x550mL), soluție saturată de NH₄Cl (500 mL), 1N HCl (apoasă) (500 mL), soluție saturată de NaHCO₃ (500 mL) și soluție dsalină (300 mL). Frațiunea organică rezultată a fost uscată (Na₂SO₄) și concentrată pentru a obține

25

compusul 307 (111 g).

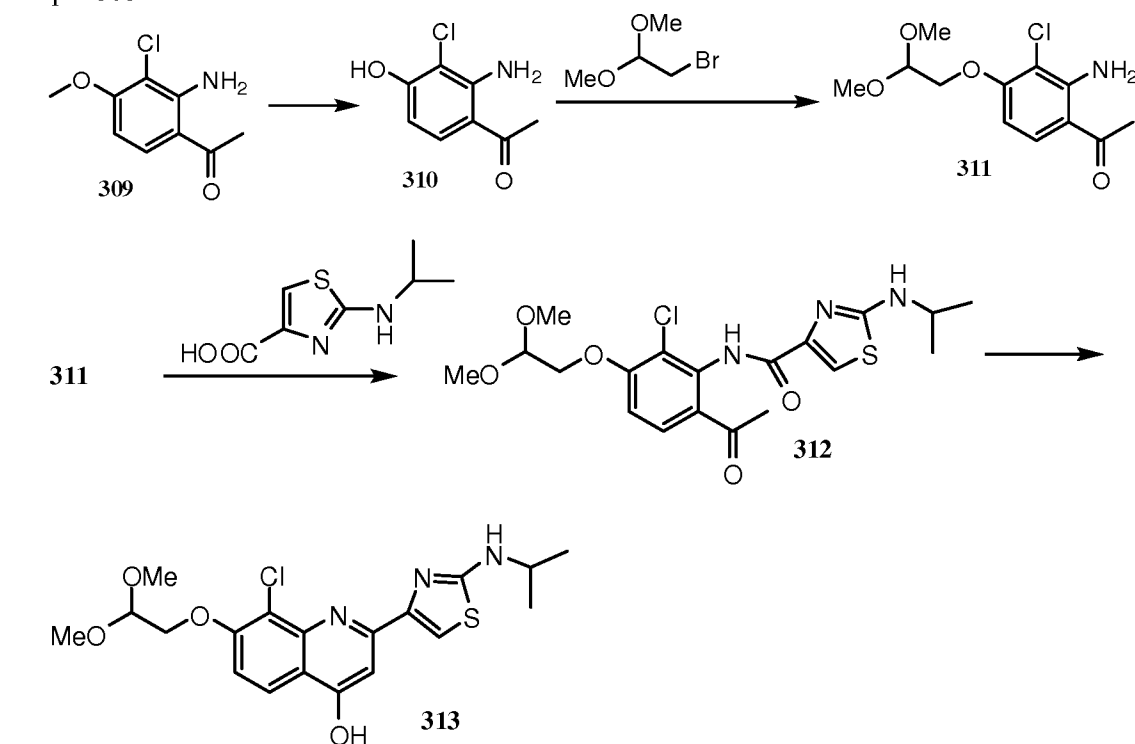
g. Prepararea compusului 308.

Compusul 307 a fost dizolvat în 4N HCl în dioxan (300 mL) la temperatura camerei și s-a agitat timp de 2 ore. Acesta a fost apoi concentrat sub vid și coevaporat cu diclormetan (2 x 200 mL) până la uscare. Reziduul s-a dizolvat în acetat de etil (600 mL) și soluție apoasă saturată de NaHCO₃ (1L). Acesta a fost agitat puternic. Peste 10 minute, biciclo[3.1.0]hex-3-il 2,5-dioxo-

30

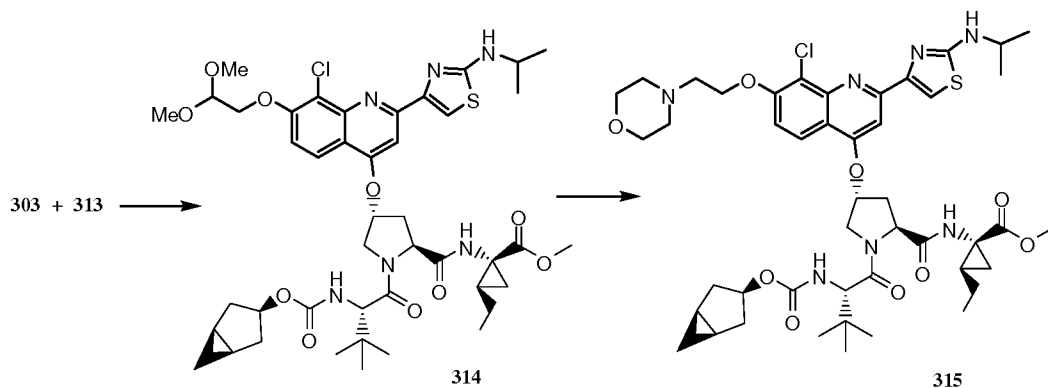
pirolidin-1-il ester al acidului carbonic 302 (41,4 g, 173,1 mmol) s-a adăugat într-o porție. După ce amestecul rezultat a fost agitat timp de încă 30 min, stratul organic a fost colectat și spălat cu soluție salină (500 mL), uscat (Na₂SO₄) și concentrat. Produsul brut s-a purificat prin cromatografie rapidă pe silicagel cu acetat de etil / hexan pentru a se obține 94,44 g (92% de

35



40

50



h. Prepararea compusului 310.

1-(2-Amino-3-cloro-4-hidroxi-fenil)-etanonă 309 (70,7 g, 354 mmol) s-a agitat în 48% HBr ap. (500 mL) la 110°C timp de 72 ore. După ce amestecul a fost răcit la 0°C cu agitare, solidele s-au filtrat și s-au spălat cu apă. Solidele rezultate au fost triturate cu o soluție saturată de NaHCO₃ (~350 mL), filtrate, spălate cu apă și uscate sub vid pentru a da ~40 g (61%) de produs brut 310 ca un solid cafeniu închis. CL/SM = 186 (M⁺+1).

i. Prepararea compusului 311.

1-(2-Amino-3-cloro-4-hidroxi-fenil)-etanonă 310 (40 g, 215 mmol) s-a dizolvat în DMF (360 mL). S-a adăugat carbonat de cesiu (140 g, 430 mmol), urmat de dimetil acetal al bromoacetaldehidei (54,5 g, 323 mmol). Amestecul s-a agitat apoi puternic la 65°C timp de 24 ore. După răcire la temperatura camerei, EtOAc (1 L) și H₂O (1 L) s-au adăugat la amestec. Stratul organic a fost extras cu acetat de etil (1 x 400 mL). Stratul organic combinat s-a spălat cu soluție apoasă de 3% LiCl (2 x 1L), soluție salină, s-a uscat (Na₂SO₄) și s-a concentrat în vid. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel pentru a da compusul 311 ca un solid alb (39 g, 67%).

j. Prepararea compusului 312.

La un amestec de 1-[2-Amino-3-cloro-4-(2,2-dimetoxi-etoxi)-fenil]-etanonă 311 (13 g, 47,5 mmol) și hidrobromură de acid izopropilaminotiazol-4-carboxilic (12,64 g, 47,5 mmol) în piridină (150 mL) s-a adăugat lent oxiklorură de fosfor (9,47 g, 61,8 mmol) la -40°C. Amestecul s-a agitat apoi la 0°C timp de 4 ore. După completarea reacției, H₂O (30 mL) s-a adăugat prin picurare la amestec. Amestecul s-a agitat apoi la 0°C timp de încă 15 minute. Amestecul a fost concentrat în vid. Reziduul s-a diluat cu acetat de etil, s-a spălat cu o soluție apoasă saturată de NaHCO₃. Stratul organic s-a uscat (Na₂SO₄) și s-a concentrat în vid. Reziduul s-a dizolvat în CH₂Cl₂, hexan s-a adăugat încet la soluție și un solid de culoare galbenă a început să se prevadă. Mai mult hexan s-a adăugat până când puțin produs a rămas în lichidul mamă pentru a obține compusul 312 (18 g, 85%).

k. Prepararea compusului 313.

[6-Acetil-2-cloro-3-(2,2-dimetoxi-etoxi)-fenil]-amida acidului 2-izopropilamino-tiazol-4-carboxilic și 312 (18 g, 40,7 mmol) a fost suspendată în toluen (400 mL). NaH (2,4 g, 61 mmol) s-a adăugat la amestecul agitat puternic monitorizând în același timp evoluția H₂. Amestecul a devenit o soluție clară în timpul încălzirii la reflux. Reacția a fost completă după reflux timp de 3 ore. Amestecul s-a răcit la temperatura camerei. O soluție de AcOH (69,2 mmol) în H₂O (3 vol.) s-a adăugat la amestec. După agitare puternică timp de 1 oră la 0°C, solidele au fost colectate prin filtrare, clătite cu H₂O. Precipitatul umed s-a uscat sub vid înalt la o greutate constantă pentru a obține compusul 313 (15 g, 86%).

l. Prepararea compusului 314.

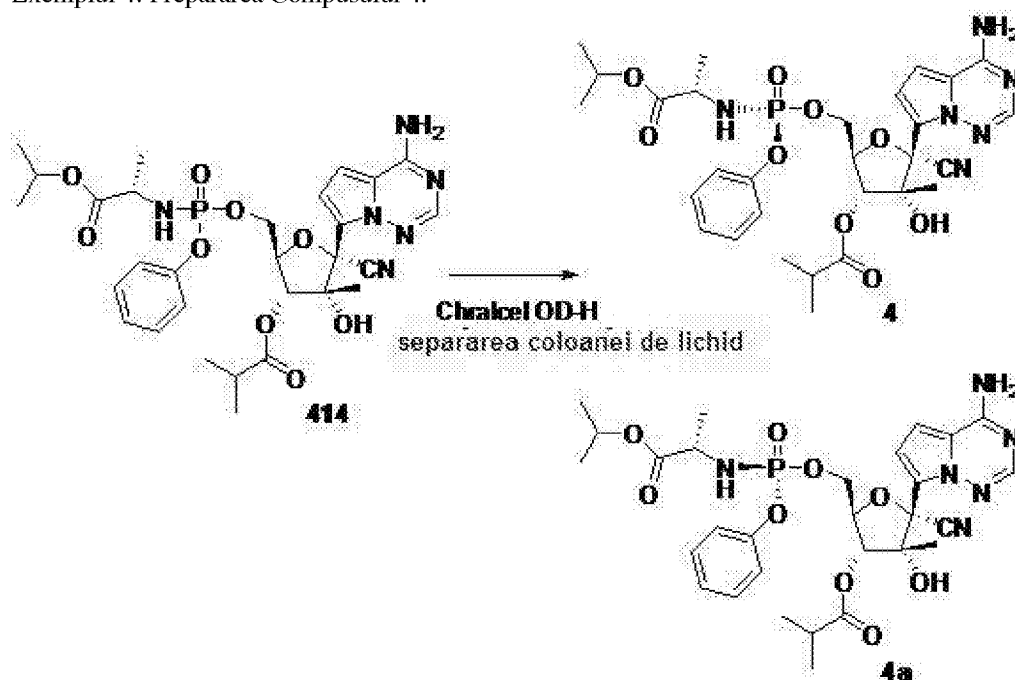
La un amestec de brosilat intermediar 303 (15 g, 35 mmol) și compus 313 (27,5 g, 38,5 mmol) în NMP (200 mL) s-a adăugat carbonat de cesiu (25,1 g, 77 mmol). Amestecul s-a agitat la 65°C timp de 5 ore. Reacția s-a răcit la temperatura camerei și EtOAc (600 mL) și o soluție apoasă de 3% LiCl (600 mL) s-au adăugat la amestec. Stratul organic s-a spălat cu soluție apoasă de 3% LiCl (1 x 600 mL), soluție salină, s-a uscat (Na₂SO₄) și s-a concentrat în vid. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel pentru a se obține esterul metilic dorit ca un solid galben (23,6 g, 75%). CL/SM = 900,13 (M⁺+1).

m. Prepararea compusului 315.

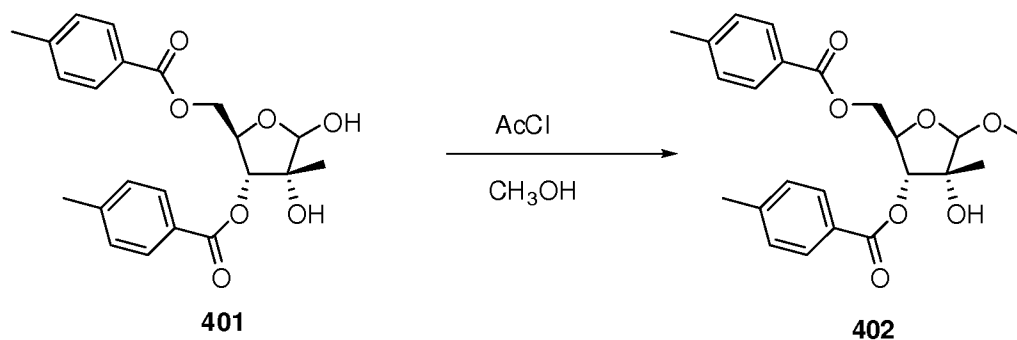
- Ester metilic 314 (23,6 g, 26 mmol) s-a dizolvat în acid acetic glacial (200 mL), 1,4 N HCl în H₂O (75 mL) s-a adăugat la soluție. Amestecul s-a agitat la 60°C timp de 1 oră. După completarea reacției, amestecul a fost concentrat pentru a îndepărta solvenții, coevaporat cu toluen (x 2) pentru a îndepărta acidul acetic rezidual. Reziduul a fost apoi dizolvat în EtOAc (500 mL) și soluție apoasă saturată de NaHCO₃ (suficient pentru a neutraliza amestecul) monitorizând în același timp evoluția CO₂. Stratul organic s-a spălat cu soluție salină, s-a uscat (Na₂SO₄) și s-a concentrat in vid. Reziduul s-a uscat în continuare sub vid înalt timp de 1 oră și s-a utilizat ca atare în etapa următoare. Produsul brut a fost dizolvat în CH₂Cl₂ (360 mL), morfolină (3,4 g, 39 mmol) și triacetoxiborohidru de sodiu (7,2 g, 34 mmol) s-au adăugat la amestec la 0°C. Apoi acid acetic glacial (0,47 g, 7,8 mmol) s-a adăugat prin picurare la amestec. Reacția a fost completă în 10 minute la 0°C. Soluție apoasă saturată de NaHCO₃ s-a adăugat pentru a stinge reacția. După agitare timp de 20 de minute, stratul organic s-a spălat cu soluție salină, s-a uscat (Na₂SO₄) și s-a concentrat in vid. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel pentru a se obține produsul dorit amina 315 ca un solid galben (12 g, 50%). CL/SM = 924,63 (M⁺+1).

Compusul 4 poate fi preparat astfel cum este descris în Exemplul următor.

Exemplul 4: Prepararea Compusului 4.

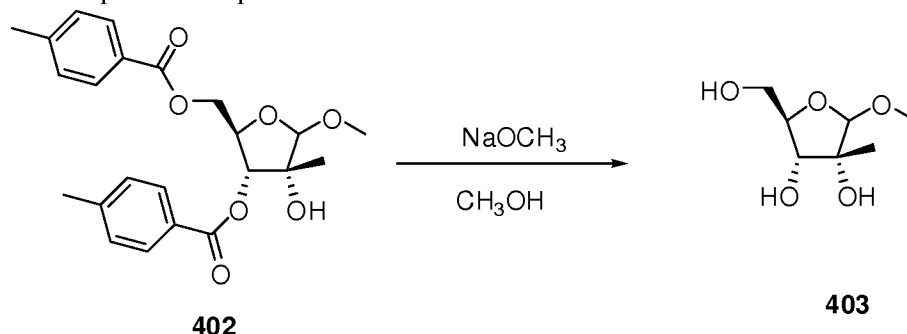


- Amestecul diastereomeric 414 s-a dizolvat în heptan și izopropanol (70%: 30%, 230 mg în 4,5 mL de amestec de solvenți) și s-a supus separării pe coloană chirală în următoarele condiții:
Coloană: Chiralcel OD-H, 2 x 25 cm
Sistem de solvenți: 70% heptan și 30% izopropanol
Debit: 6 mL/min.
- Volum de încărcare per experiment: 2,5 mL
- Compusul 4 a avut un timp de retenție de 20 de minute. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,00 (s, 1H), 7,1-7,3 (m, 5H), 6,83 (d, 1H), 6,71 (d, 1H), 6,09 (br s, 2H), 5,95 (s, 1H), 5,04 (m, 2H), 4,67 (q, 1H), 4,35-4,52 (m, 2H), 4,00 (m, 2H), 2,74 (m, 1H), 1,40 (d, 3H), 1,2-1,3 (12H), 0,98 (s, 3H). ³¹P RMN (121,4 MHz, CDCl₃): δ 2,72 (s). Compusul 4 a fost ulterior recristalizat din MTBE pentru cristale de calitate cu raze Roentgen.
- Compusul 4a avut un timp de retenție de 50 min. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,98 (s, 1H), 7,1-7,3 (m, 5H), 6,83 (d, 1H), 6,73 (d, 1H), 6,02 (br s, 2H), 5,95 (s, 1H), 5,08 (d, 1H), 5,00 (m, 1H), 4,68 (q, 1H), 4,38-4,56 (m, 2H), 3,98 (m, 2H), 2,74 (m, 1H), 1,40 (d, 3H), 1,2-1,3 (12H), 0,99 (s, 3H). ³¹P RMN (121,4 MHz, CDCl₃): δ 2,61 (s).
- Amestecul diastereomeric intermediar 414 a fost preparat după cum urmează.
- a. Prepararea Compusului 402.



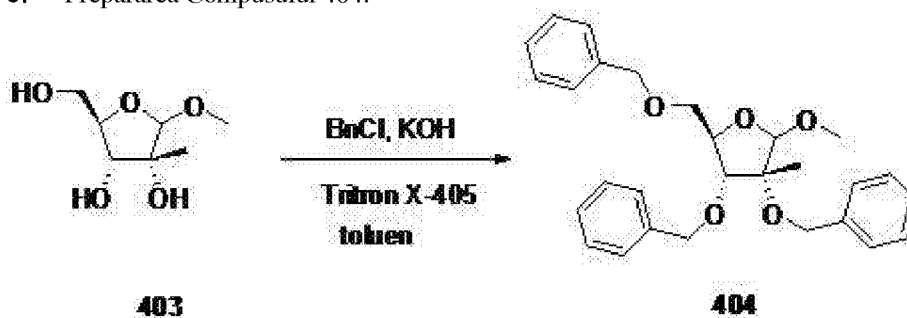
- 5 La o soluție de compus 401 (22,0 g, 54,9 mmol, preparat în conformitate cu procedurile descrise în *J.O.C.*, 2004, 6257) în metanol (300 mL) s-a adăugat prin picurare clorura de acetil (22 mL) la 0°C folosind o pâlnie de picurare timp de o perioadă de 30 minute și apoi s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 ore. Amestecul s-a concentrat, redizolvat în acetat de etil (400 mL), s-a spălat cu soluție rece ca gheața de 2 N NaOH și s-a concentrat până la uscare, obținându-se eterul metilic brut 402 sub forma unui ulei. SM = 437,2 (M+Na⁺).

b. Prepararea Compusului 403.



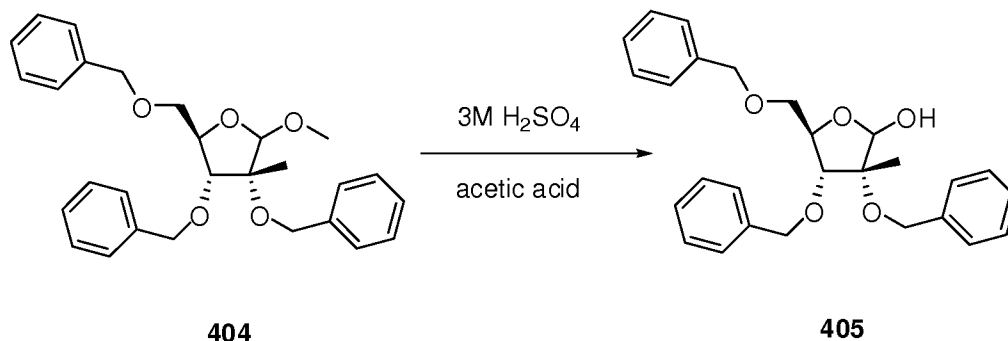
- 10 La o soluție de compus 402 în metanol (300 mL) s-a adăugat soluție de 0,5 M metoxid de sodiu în metanol (20 mL, 10 mmol) și s-a agitat timp de 16 ore la temperatura camerei. Reacția s-a stins cu soluție de 4,0 N HCl în dioxan (2,5 mL, 10 mmol). Amestecul a fost apoi concentrat, obținându-se compusul brut 403. SM = 201,0 (M+Na⁺).

15 c. Prepararea Compusului 404.



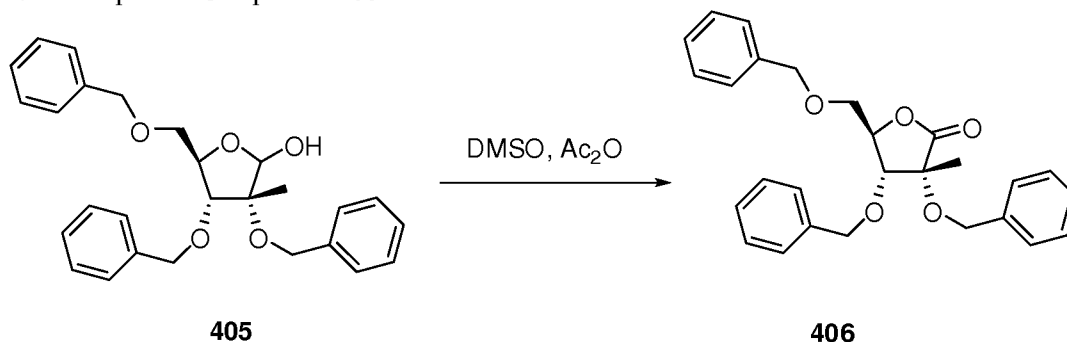
- 20 Un amestec de compus 403, Tritron X-405 (70% în apă, 6,0 g), 50% KOH (în apă, 85 g) în toluen (500 mL) s-a încălzit la reflux cu un captator Dean-Stark atașat. După 1 oră de colectare 25 mL de apă, s-a adăugat clorură de benzil (33 g, 260 mmol) și a continuat la reflux cu agitare timp de 16 ore. Amestecul s-a răcit apoi și s-a separat între acetat de etil (400 mL) și apă (300 mL). Stratul organic s-a spălat cu apă (300 mL) și s-a concentrat. Reziduul s-a purificat prin cromatografie în coloană pe silicagel (20% EtOAc/hexan), obținându-se eterul metilic 404 sub forma unui ulei (22,0 g, 89% în trei etape). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,3 (m, 15H), 4,5-4,9 (m, 7H), 4,37 (m, 1H), 3,87 (d, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,52 (s, 3H), 1,40 (s, 3H).

25 d. Prepararea Compusului 405.



5 La o soluție de 404 (22,0 g, 49,0 mmol) în acid acetic (110 mL) s-a adăugat 3 M acid sulfuric (preparat prin amestecarea a 4,8 g de acid sulfuric concentrat cu 24 mL de apă) și s-a agitat la 70°C timp de 8 ore. Amestecul a fost concentrat la un volum de 20 mL și separat între acetat de etil și NaOH 2N rece ca gheața. Stratul de acetat de etil a fost concentrat și purificat prin cromatografie în coloană pe silicagel (~35% EtOAc/hexan), obținând compusul 405 sub forma unui ulei (17,0 g, 80%). SM = 457,2 (M+Na⁺).

e. Prepararea Compusului 406.

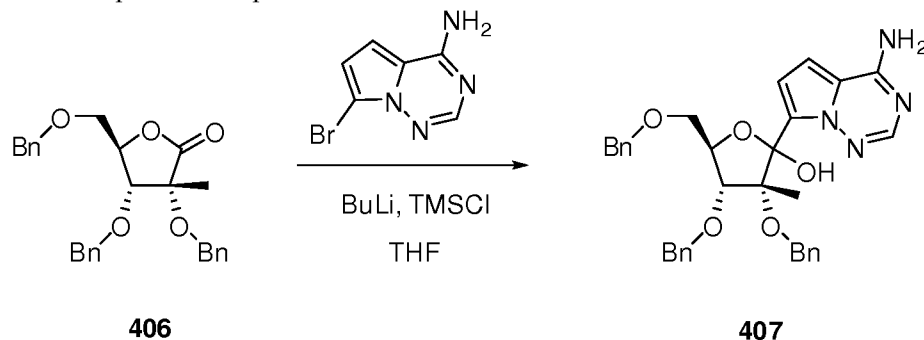


10

15 La o soluție de compus 405 (45 g, 104 mmol) în DMSO (135 mL) s-a adăugat prin picurare anhidridă acetică (90 mL, 815 mmol) la temperatura camerei sub argon. Amestecul s-a agitat timp de 16 ore la temperatura camerei și apoi s-a turnat în apă cu gheață (1 L) sub agitare. După ce gheața s-a topit complet (30 minute), s-a adăugat acetat de etil (500 mL). Stratul organic s-a separat. Acest proces de extracție a fost repetat de trei ori (3x500 mL). Extractele organice au fost combinate și concentrate. Reziduul s-a purificat prin cromatografie în coloană pe silicagel (20% EtOAc/hexan), obținând compusul 406 sub forma unui ulei (39 g, 88%). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7,3 (m, 15H), 4,4-4,8 (m, 7H), 4,08 (d, J=7,5 Hz, 1H), 3,75 (dd, J=2,4, 11,4 Hz, 1H), 3,64 (dd, J=5,4, 11,4 Hz, 1H), 1,51 (s, 3H).

20

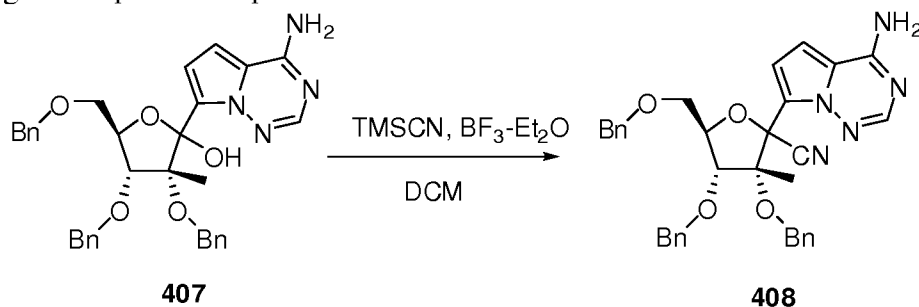
f. Prepararea Compusului 407.



25 La un balon purjat cu argon cu fund rotund uscat (100 mL) s-au adăugat 7-bromo-piolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-ilamină (234 mg, 1,10 mmol) (preparată conform [...] WO2007056170) și THF anhidru (1,5 mL). TMSCl (276 μL, 2,2 mmol) s-a adăugat apoi și amestecul de reacție s-a agitat timp de 2 ore. Balonul a fost plasat într-o baie de gheață/acetone uscată (-78°C) și BuLi (2,5 mL, 4,0 mmol, 1,6 M in hexan) s-a adăugat prin picurare. După 1 oră, o soluție de compus 406 (432,5 mg, 1,0 mmol) in THF s-a răcit la 0°C și apoi s-a adăugat prin picurare la balonul de

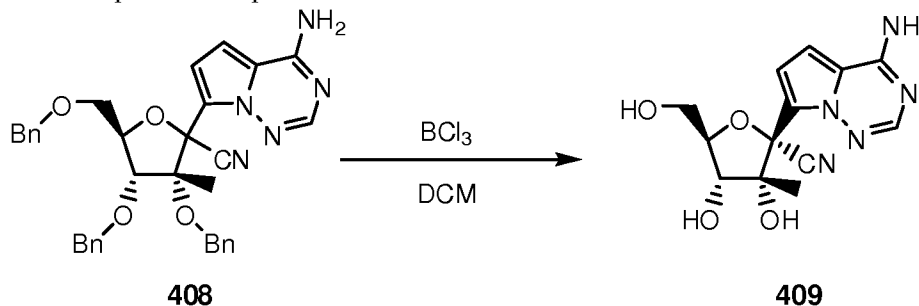
reacție. După 1 oră de agitare la -78°C , balonul a fost încălzit la 0°C și soluție saturată de NH_4Cl (5 mL) s-a adăugat pentru a stinge reacția. Substanțele organice au fost extrase utilizând EtOAc (3 x 10 mL) și straturile organice combinate au fost uscate utilizând MgSO_4 . Solventul a fost îndepărtat sub presiune redusă și materialul brut a fost purificat utilizând cromatografia rapidă (hexan/acetat de etil). 560 mg (90%) de compus 407 au fost izolate ca un amestec de doi anomeri. CL/ SM= 567,2 ($\text{M}+\text{H}^+$). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7,85 (m, 1H), 7,27 (m, 15H), 7,01 (m, 1H), 6,51 (m, 1H), 4,66 (m, 8H), 4,40 (m, 2H), 3,79 (m, 3H), 1,62 (s, 2'- CH_3 dintr-un anomer), 1,18 (s, 2'- CH_3 din celălalt anomer).

g. Prepararea Compusului 408.



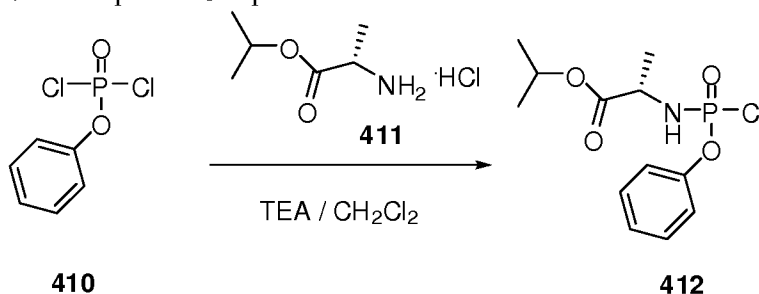
La o soluție de compus 407 (1 g, 1,77 mmol) în CH_2Cl_2 (20 mL) la 0°C s-a adăugat TMS-CN (1,4 mL, 10,5 mmol) și $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (1 mL, 8,1 mmol). Amestecul de reacție s-a agitat la 0°C timp de 0,5 oră, apoi la temperatura camerei timp de încă 0,5 oră. Reacția s-a stins cu NaHCO_3 la 0°C și s-a diluat cu $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Et}$. Faza organică s-a separat, s-a spălat cu soluție salină, s-a uscat pe Na_2SO_4 , s-a filtrat și s-a concentrat. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel, s-a eluat cu $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Et}$ -hexan (1:1 la 2:01), pentru a se obține compusul 408 (620 mg, 61%) ca un amestec izomeric. SM = 576,1 ($\text{M}+\text{H}^+$).

h. Prepararea Compusului 409.



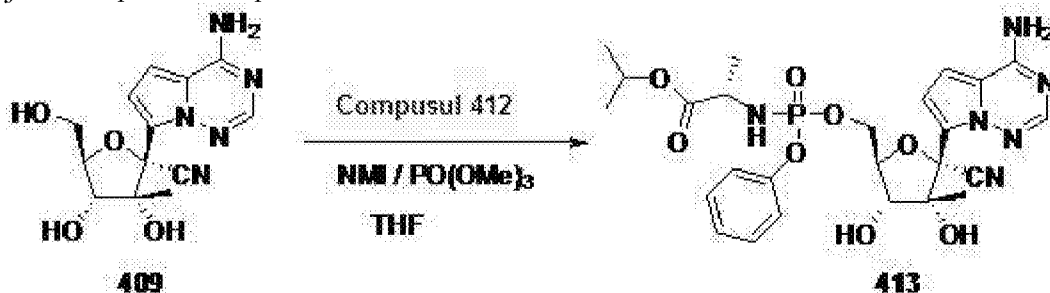
La o soluție de compus 408 (150 mg, 0,26 mmol) în CH_2Cl_2 (4 mL) la -78°C s-a adăugat BCl_3 (2 mL, 1M în CH_2Cl_2). Amestecul de reacție s-a agitat la -78°C timp de 1 oră. Reacția a fost stinsă la -78°C adăugând prin picurare TEA (2 mL) și MeOH (5 mL). Amestecul a fost lăsat să se încălzească până la temperatura camerei, evaporat și coevaporat cu MeOH de câteva ori. Reziduul a fost tratat cu NaHCO_3 (1 g în 10 mL de H_2O), concentrat și purificat prin HPLC pentru a se obține produsul dorit compusul 409 (48 mg, 60%). ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 7,74 (s, 1H), 6,76 (d, $J=5$ Hz, 1H), 6,73 (d, $J=5$ Hz, 1H), 4,1 (m, 1H), 3,9 (m, 1H), 3,8 (m, 2H), 0,84 (s, 3H). SM = 305,9 ($\text{M}+\text{H}^+$). Alt alfa-anomer a fost de asemenea obținut (9 mg, 11%): ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 7,70 (s, 1H), 6,8 (d, $J=5$ Hz, 1H), 6,7 (d, $J=5$ Hz, 1H), 4,25 (d, $J=9$ Hz, 1H), 4,07 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,7 (m, 1H), 1,6 (s, 3H). SM = 306,1 ($\text{M}+\text{H}^+$).

i. Prepararea Compusului 412.



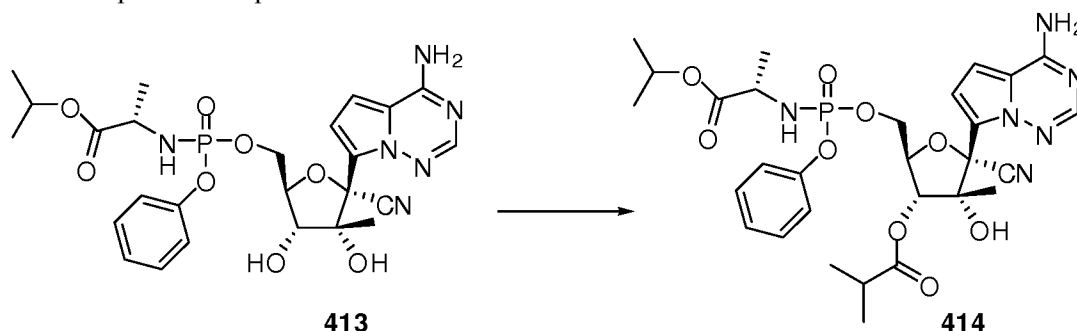
Compusul 410 (disponibil comercial, 4,99 g, 23,8 mmol) a fost dizolvat în diclormetan (100 mL) și s-a adăugat hidrociorură a esterului izopropilic al alaninei 411 (3,98 g, 23,8 mmol). Soluția limpede rezultată a fost răcită la -78°C timp de 30 min. Trietilamină (6,63 mL, 47,5 mmol) s-a adăugat prin picurare peste 15 minute. Amestecul a fost apoi lăsat să se încălzească la temperatura camerei. După 16 ore, solventul a fost îndepărtat prin curent de argon. Reziduul a fost redizolvat în MTBE (25 mL) și substanța insolubilă a fost îndepărtată prin filtrare sub argon. Filtratul a fost condensat prin curent de argon și produsul brut 412 a fost utilizat în reacția următoare fără purificare suplimentară. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 7,1-7,4 (m, 5H), 5,1 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 1,5 (d, 3H), 1,2 (m, 6H). ^{31}P RMN (121,4 MHz, CDCl_3): δ 7,8 și 8,4 (2s).

j. Prepararea Compusului 413.



La o soluție de compus 409 (1,03 g, 3,37 mmol) în trimetilfosfat (2,0 mL) și THF (20 mL) s-a adăugat N-metil imidazol (1,5 g, 18,3 mmol) la 0°C . O soluție de compus 412 (2,5 g, 8,18 mmol) în THF (3 mL) s-a adăugat prin picurare. Amestecul rezultat s-a lăsat să se încălzească la temperatura camerei timp de 1,5 ore. Amestecul a fost împărțit între acetat de etil și apă. Stratul de acetat de etil a fost concentrat și reziduul a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (acetat de etil până la 10% etanol/acetat de etil), obținându-se 1,15 g (59%) de compus 413 ca amestec diastereoizomeric 1:1 la fosfor. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8,02 (s, 1H), 7,1-7,4 (m, 5H), 6,8 (2d, 1H), 6,7 (2d, 1H), 6,08 (br s, 2H), 5,03 (m, 1H), 4,6 (m, 1H), 4,4 (m, 2H), 3,9-4,1 (m, 3H), 1,31 (d, 3H), 1,2 (m, 6H), 0,83 (s, 3H). ^{31}P RMN (121,4 MHz, CDCl_3): δ 2,78 (s). SM = 575,1 ($\text{M}+\text{H}^+$).

k. Prepararea Compusului 414.

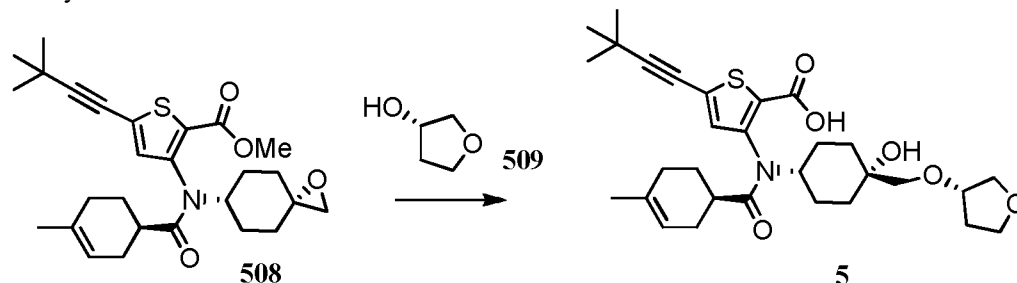


La o soluție de compus 413 (175 mg, 0,305 mmol) în acetonitril (2 mL) s-a adăugat dimetil acetal al N,N-dimetilformamidei (41 μL , 0,34 mmol, 1,1 echiv.) și s-a agitat la temperatura camerei timp de 1 oră. Reacția a fost completă (prin LCMS). Amestecul a fost apoi concentrat până la uscare. La reziduul s-a adăugat DCC (250 mg, 1,21 mmol, 4 echiv.), acetonitril (5 mL) și acid izobutiric (55 mg, 58 μL , 2 echiv.). Amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 48 ore. Apă (0,2 mL) și acid trifluoracetic (0,1 mL) s-au adăugat la 0°C și s-au agitat la temperatura camerei timp de 64 ore. Bicarbonat de sodiu (500 mg) s-a adăugat la 0°C . Amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 0,5 oră și s-a filtrat. Filtratul s-a concentrat și reziduul s-a purificat prin cromatografie în coloană pe silicagel (5% metanol/diclormetan), obținându-se 144 mg (73%) de compus 414 ca amestec diastereoizomeric 1:1 la fosfor. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8,00 (s, 1H), 7,1-7,4 (m, 5H), 6,83 (d, 1H), 6,71 (2d, 1H), 5,97 (br s, 2H), 5,94 (d, 1H), 5,07 (2d, 1H), 5,01 (m, 1H), 4,68 (m, 1H), 4,4 (m, 2H), 4,0 (m, 2H), 2,74 (m, 1H), 1,4 (2d, 3H), 1,2-1,3

(12H), 0,98 și 0,99 (2s, 3H). ^{31}P RMN (121,4 MHz, CDCl_3): δ 2,56 și 2,65 (2s). SM = 645,1 ($\text{M}+\text{H}^+$).

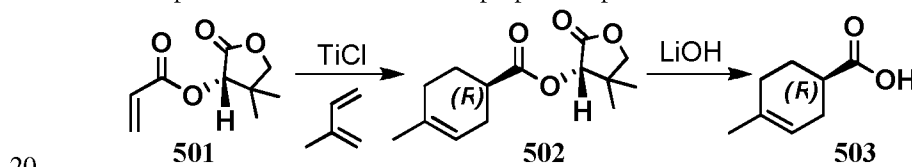
Compusul 5 poate fi preparat astfel cum este descris în Exemplul următor.

Exemplul 5: Prepararea 5: Acid 5-(3,3-dimetilbut-1-în-1-il)-3-[(cis-4-hidroxi-4-[[[(3S)-tetrahidrofuran-3-iloxi]metil]ciclohexil}[(1R)-4-metilciclohex-3-en-1-il]carbonil]amino]tiofen-2-carboxylic 5.



Ester metilic al acidului i5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-[[[(1R)-4-metil-ciclohex-3-enecarbonil)-(1-oxa-spiro[2.5]oct-6-il)-amino]-tiofen-2-carboxilic 508 (132 mg, 0,28 mmol) și (S)-tetrahidrofuran-3-ol 509 (247 mg, 2,8 mmol) în 1-metil-pirolidin-2-onă (3 mL) au fost tratați cu tert-butoxid de potasiu (251 mg, 2,24 mmol), sigilat la încălzire la 40°C timp de 16 ore. După răcire, amestecul s-a tratat cu HCl 2 M până la pH 3, împărțit între acetat de etil și apă și s-a separat. Stratul organic s-a spălat cu soluție de 5% de clorură de litiu, apă, soluție salină și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare reziduul s-a purificat prin HPLC cu CH_3CN (0,1% TFA)/ H_2O (0,1% TFA) pentru a se obține 107 mg (70% randament) de compus 5 sub formă de pulbere de culoare albă: SM (m/z): 544,0 [$\text{M}+\text{H}^+$]; Timp de retenție HPLC 4,22 min (2-98% acetonitril: apă cu 0,05% acid trifluoracetic).

Compusul intermediar 508 a fost preparat după cum urmează.



a. Prepararea Compusului 502.

(S)-3-hidroxi-4,4-dimetildihidrofuran-2(3H)-onă (2,60 g, 20 mmol) și diizopropiletilamină (5,2 mL, 30 mmol) în diclormetan (25 mL) a fost răcită la -10°C și tratată prin picurare cu clorură de acrilol (2,03 mL, 25 mmol) și s-a agitat timp de 2 ore. HCl 1M (20 mL) s-a adăugat și stratul organic s-a spălat cu bicarbonat de sodiu și apă. Stratul organic s-a uscat pe sulfat de sodiu, s-a filtrat și s-a concentrat. Cromatografia rapidă (10-40% EtOAc, hexan) a dat 2,09 g (57% randament) de (S)-4,4-dimetil-2-oxotetrahidrofuran-3-il acrilat dorit 501 sub forma unui ulei limpede.

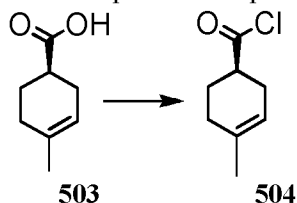
(S)-4,4-dimetil-2-oxotetrahidrofuran-3-il acrilat 501 (2,05 g, 11,1 mmol) în diclormetan (17,5 mL) și hexan (2,5 mL) a fost răcită la -10°C și s-a tratat cu tetraclorură de titan (2,2 mL, 1 M în diclormetan, 2,2 mmol). Soluția galbenă s-a agitat timp de 15 min și s-a tratat cu izopren (1,67 mL, 16,7 mmol) prin picurare timp de 5 minute. După agitare timp de 2 ore, s-a adăugat o porție suplimentară de izopren (1,67 mL, 16,7 mmol) și amestecul de reacție s-a agitat la -10 până la 0°C timp de 3,5 ore. Amestecul de reacție a fost stins cu clorură de amoniu (soluție apoasă saturată). Apă și acetat de etil: hexani (1:1) s-au adăugat. Stratul organic s-a separat și stratul apos s-a extras din nou cu acetat de etil:hexani (1:1). Straturile organice combinate s-au uscat pe sulfat de sodiu, s-au filtrat și s-au concentrat. Reziduul s-a purificat prin cromatografie rapidă (10-50% EtOAc:Hex, 80 g coloană) pentru a se obține 1,30 g (46% randament) de (R)-((S)-4,4-dimetil-2-oxotetrahidrofuran-3-il) 4-metilciclohex-3-enecarboxilatul 502 ca un ulei limpede.

b. Prepararea Compusului 503.

(R)-((S)-4,4-dimetil-2-oxotetrahidrofuran-3-il) 4-metilciclohex-3-enecarboxilat 502 (1,30 g, 5,15 mmol) în THF (10 mL), apă (1 mL) și metanol (1 mL) s-au tratat cu hidroxid monohidrat de litiu (2,16 g, 51,5 mmol) și s-au încălzit la 50°C cu agitare. După o oră, amestecul de reacție s-a tratat cu HCl 1M. Amestecul s-a extras cu hexani: THF (10:1), s-a uscat pe sulfat de sodiu, s-a

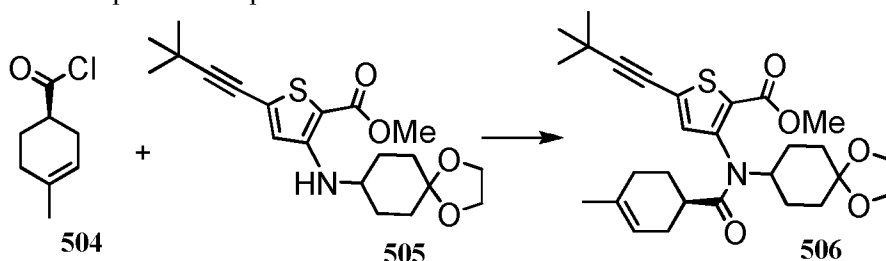
filtrat și s-a concentrat până la 0,738 g (randament cantitativ) de acid (R)-4-metilciclohex-3-encarboxilic 503 ca o pulbere albă.

c. Prepararea Compusului 504.



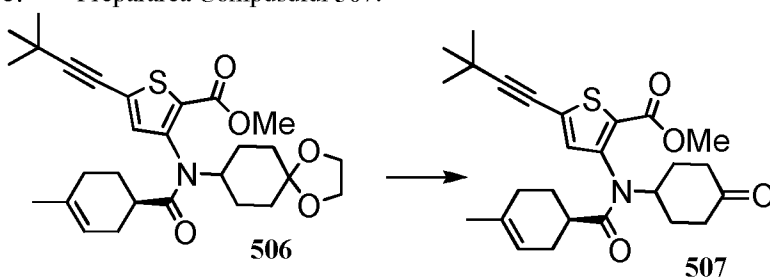
5 Acid (R)-4-metilciclohex-3-encarboxilic 503 (371 mg, 2,65 mmol) s-a uscat azeotropic prin evaporare din toluen, s-a tratat cu fosfat de potasiu tribazic (1,13 g, 7,94 mmol), s-a suspendat în diclormetan (7,6 mL) și s-a tratat cu dimetilformamidă (4 picături). Amestecul de reacție s-a răcit la 0°C și s-a tratat prin picurare cu clorură de oxalil (0,75 mL, 7,9 mmol). Amestecul de reacție
10 s-a lăsat să se încălzească la temperatura ambiantă sub agitare timp de 2 ore. După filtrarea solidelor, soluția a fost concentrată, tratată cu hexani și concentrată din nou pentru a se obține imediat în etapa următoare.

d. Prepararea Compusului 506.



15 Clorură de (R)-4-metilciclohex-3-encarbonil 504 (2,65 mmol), ester metilic al acidului 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-[(1,4-dioxa-spiro[4.5]dec-8-ilamino)-tiofen-2-carboxilic 505 (250 mg, 0,66 mmol) și fosfat de potasiu tribazic (562 mg, 2,65 mmol) au fost suspendate în dicloretan (1,7 mL), sigilate cu un capac și încălzite la 90°C. După 16 ore, amestecul de reacție s-a răcit și s-a repartizat între acetat de etil și apă. Stratul organic s-a separat, iar stratul apos s-a extras din
20 nou cu acetat de etil. Straturile organice combinate s-au uscat pe sulfat de sodiu, s-au filtrat și s-au concentrat. Cromatografia rapidă (10-40% EtOAc:hexani) a dat 220 mg (67% randament) de ester metilic al acidului 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-[(1,4-dioxa-spiro[4.5]dec-8-il)-((1R)-4-metil-ciclohex-3-encarbonil)-amino]-tiofen-2-carboxilic 506 dorit sub formă de spumă bej.

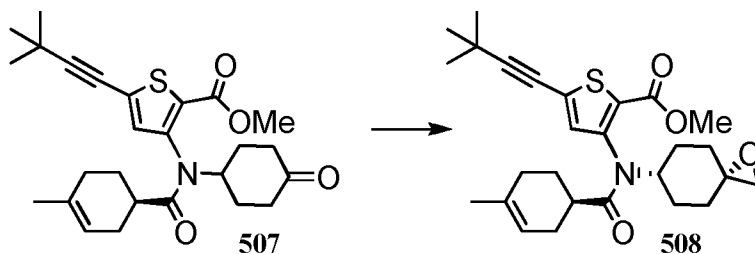
e. Prepararea Compusului 507.



25 Esterul metilic al acidului 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-[(1,4-dioxa-spiro[4.5]dec-8-il)-((1R)-4-metil-ciclohex-3-encarbonil)-amino]-tiofen-2-carboxilic 506 (219 mg, 0,438 mmol) a fost dizolvat în THF (3,5 mL) și tratat cu HCl 4M (1,75 mL, 7,01 mmol). Amestecul de reacție s-a încălzit la 45°C și s-a agitat timp de 2 ore. Acetat de etil s-a adăugat și stratul organic s-a separat,
30 apoi s-a spălat cu apă, bicarbonat de sodiu (soluție apoasă saturată), apă și soluție salină. Stratul organic s-a uscat pe sulfat de sodiu, s-a filtrat și s-a concentrat până la 0,190 g (95% randament) de Ester metilic al acidului 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-[(1,4-dioxa-spiro[4.5]dec-8-il)-((1R)-4-metil-ciclohex-3-encarbonil)-amino]-tiofen-2-carboxilic 507 dorit sub formă de spumă albă.

f. Prepararea Compusului 508.

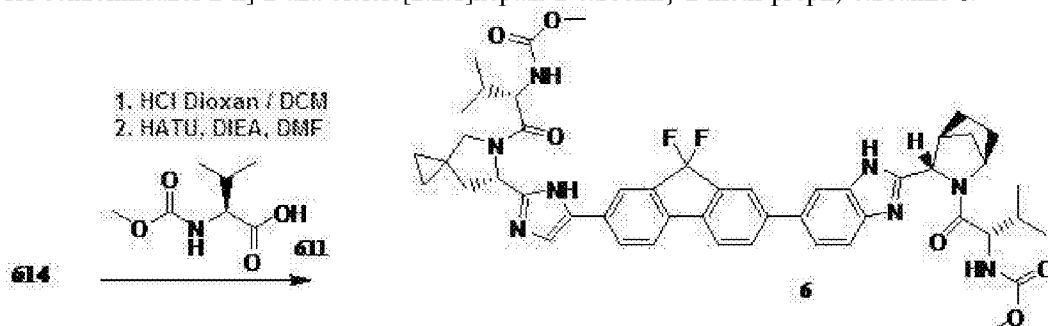
58



Clorură de trimetilsulfoxoniu (79 mg, 0,62 mmol) în DMSO (1,5 mL) s-a tratat cu hidruură de sodiu (21 mg, 60% dispersie în ulei, 0,53 mmol) și s-a agitat la temperatura ambiantă timp de 10 minute. Ester metilic al acidului 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-(((1R)-4-metil-ciclohex-3-encarbonil)-(4-oxo-ciclohexil)-amino]-tiofen-2-carboxilic 507 în THF (1 mL + 0,5 mL) s-a adăugat în picături și amestecul de reacție s-a agitat timp de 45 min. Soluția portocalie s-a tratat cu acid citric 5% până la pH 3 și s-a împărțit între apă și acetat de etil. Stratul organic s-a separat, iar stratul apos s-a extras din nou cu acetat de etil. Substanțele organice combinate au fost spălate cu 5% LiCl, apă și soluție salină și uscate pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, reziduul s-a purificat prin cromatografie rapidă (20-75% EtOAc:hexani) pentru a se obține 0,134 g (70% randament) de Ester metilic al acidului 5-(3,3-dimetil-but-1-inil)-3-(((1R)-4-metil-ciclohex-3-encarbonil)-(1-oxa-spiro[2.5]oct-6-il)-amino]-tiofen-2-carboxilic 508 ca o pulbere albă.

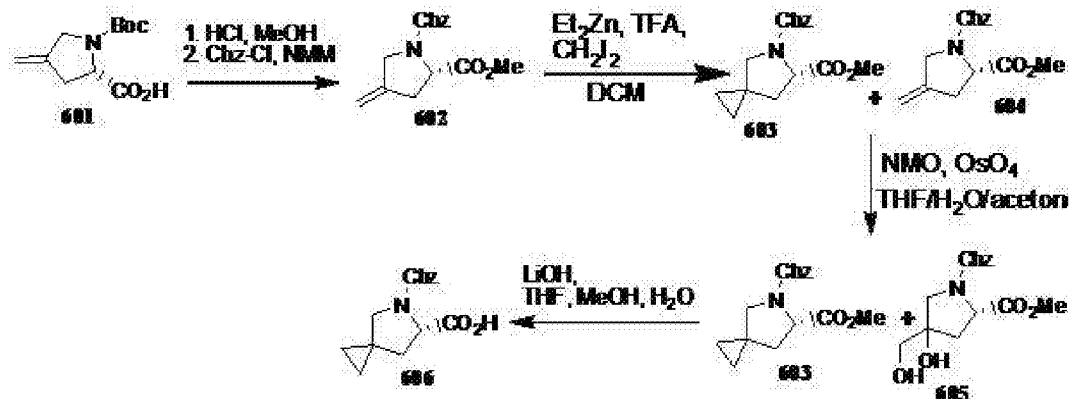
Compusul 6 poate fi preparat folosind metode de sinteză și intermediari, cum ar fi cei descriși în US 2010310512 A1 2010.12.09. Compusul 6 poate, de asemenea, fi preparat astfel cum este descris în Exemplul următor.

Exemplul 6: Prepararea esterului metilic al acidului (1-{3-[6-(9,9-difluoro-7-{2-[5-(2-metoxycarbonilamino-3-metil-butiril)-5-aza-spiro[2.4]hept-6-il]-3H-imidazol-4-il]-9H-fluoren-2-il)-1H-benzoimidazol-2-il]-2-aza-biciclo[2.2.1]heptan-2-carbonil}-2-metil-propil)-carbamic 6.



Esterul terț-butilic al acidului 3-[6-(9,9-difluoro-7-{2-[5-(2-metoxycarbonilamino-3-metil-butiril)-5-aza-spiro[2.4]hept-6-il]-3H-imidazol-4-il]-9H-fluoren-2-il)-1H-benzoimidazol-2-il]-2-aza-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilic 614 (115 mg, 0,138 mmol) a fost dizolvat în clorură de metilen (2 mL) și HCl în dioxan (4M, 2 mL) și agitata la temperatura camerei a fost continuată. După 20 de minute, toate substanțele volatile s-au îndepărtat în vid. Materialul brut a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. Materialul brut a fost dizolvat în DMF (1,5 mL) și s-a adăugat DIEA (53,4 mg, 0,414 mmol). S-a adăugat o soluție de acid (L)-3-metoxycarbonilamino-metil-butiric 611 (24,2 mg, 0,138 mmol), HATU (52,4 mg, 0,138 mmol) și DIEA (17,8 mg, 0,138 mmol) în DMF (1 mL). Reacția a fost agitată la temperatura camerei. După 20 minute, reacția a fost diluată cu EtOAc și spălată cu soluție apoasă de bicarbonat, soluție apoasă de LiCl (5%), soluție salină și uscată pe sulfat de sodiu. Filtrarea și îndepărtarea solvenților în vid a dat produsul brut, care a fost purificat prin RP-HPLC (eluent: apă / MeCN m / 0,1% TFA) pentru a se obține compusul 6 (76 mg). LCMS-IEP⁺: calculată pentru C₄₉H₅₄F₂N₈O₆: 888,9 (M⁺); Depistată: 890,0 (M+H⁺). ¹H-RMN: 300 MHz, (DMSO-d₆) δ: 8,20-7,99 (m, 8H), 7,73 (s, 2H), 7,37-7,27 (m, 2H), 5,25 (dd, J=7,2 Hz, 1H), 4,78 (s, 1H), 4,54 (s, 1H), 4,16 (m, 1H), 4,02 (m, 1H), 3,87 (m, 1H), 3,74 (m, 1H), 3,55 (s, 3H), 3,53 (s, 3H), 2,75 (m, 1H), 2,25 (m, 2H), 2,09-2,04 (m, 2H), 1,88-1,79 (m, 2H), 1,54 (m, 1H), 0,94-0,77 (m, 15H), 0,63 (m, 4H) ppm. ¹⁹F-RMN: 282 MHz, (DMSO-d₆) δ: -109,1 ppm [-74,8 ppm TFA].

Compusul intermediar 614 a fost preparat după cum urmează.



a. Prepararea compusului ester 1-benzilic 2-metilic al acidului 4-metilen-pirolidin-1,2-dicarboxilic 602.

5 Esterul 1-terț-butilic al acidului 4-metilen-pirolidin-1,2-dicarboxilic 601 (10,0 g, 44 mmol) s-a dizolvat în MeOH (75 mL) la temperatura camerei și s-a adăugat HCl (4M în dioxan, 75 mL). Agitarea la temperatura camerei a fost continuată timp de 4 ore. Toate substanțele volatile au fost îndepărtate sub vid și s-a obținut un solid de culoare bej. Materialul brut a fost suspendat în clorură de metilen (100 mL) și s-a adăugat N-metil morfolină (13,3 g, 132 mmol). Amestecul s-a răcit la 0°C și s-a adăugat cloroformat de benzil (8,26 g, 48,4 mmol) sub agitare. După 30
10 minute, reacția a fost încălzită la temperatura camerei și soluția a fost spălată cu apă și soluție apoasă de acid clorhidric (1M). Soluția a fost uscată pe sulfat de sodiu. Filtrarea și evaporarea solvenților a dat produsul brut, care s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (eluant: EtOAc/hexani) pentru a se obține compusul 602 (10,2 g). LCMS-IEP⁺: calculată pentru $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_4$: 275,3 (M⁺); Depistată: 276,4 (M+H⁺).

15 b. Prepararea unui amestec de Compuși 603 și 604.

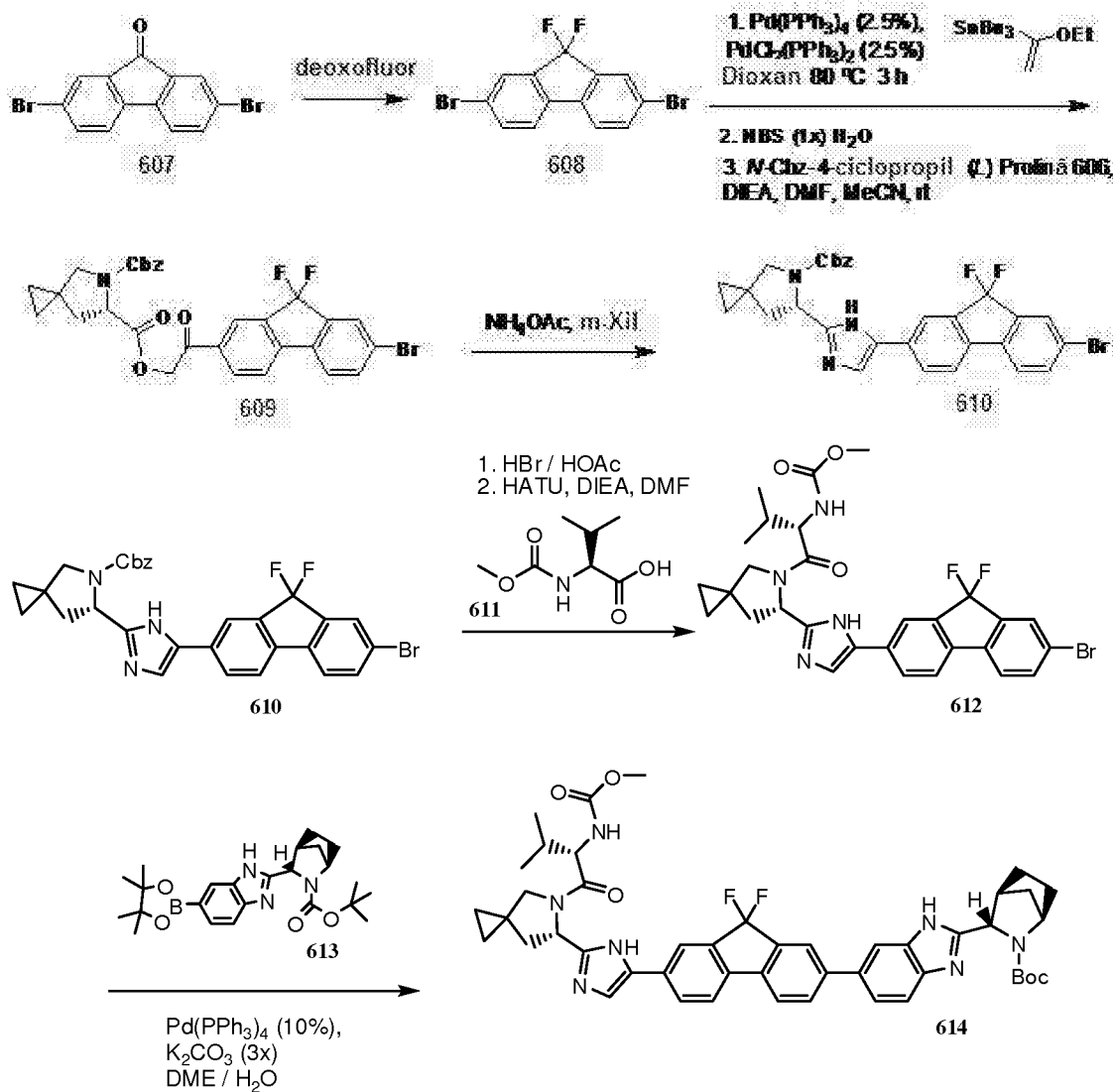
Un balon cu 3 gaturi cu fund rotund uscat în cuptor a fost dotat cu un adaptor de admisie a azotului și o pâlnie de adiție de 250 mL. Al treilea gât a fost sigilat cu un sept. Balonul a fost încărcat cu o baghetă de amestecare, diclormetan (120 mL) și dietil zinc (1,0 M în hexan, 118 mL, 118 mmol), apoi răcit la 0°C într-o baie de gheață. Pâlnia de adiție a fost încărcată cu diclormetan (40 mL) și acid trifluoracetic (9,1 mL, 118 mmol). După ce soluția de dietil zinc s-a răcit la 0°C (aproximativ 25 minute), soluție de acid trifluoracetic s-a adăugat prin picurare timp de 20 min la amestecul de reacție agitat. După agitare pentru încă 20 min la 0°C, diiodmetan (9,5 mL, 118 mmol) s-a adăugat încet timp de 4 minute. După încă 20 min, ester 1-benzilic 2-metilic al acidului 4-metilen-pirolidin-1,2-dicarboxilic 602 (8,10 g, 29,4 mmol) s-a adăugat în 30 mL de diclormetan prin canulă. Balonul care conține esterul 1-benzilic 2-metilic al acidului 4-metilen-pirolidin-1,2-dicarboxilic a fost apoi clătit cu încă 10 mL de diclormetan și această soluție a fost transferată la amestecul de reacție prin canulă. Amestecul de reacție s-a lăsat să se încălzească la temperatura camerei și s-a agitat timp de 110 ore (aproximativ 5 zile), după care reactivii au fost stinși cu soluție saturată de clorură de amoniu (~150 mL). Conținutul balonului s-a turnat lent într-o pâlnie de separare de 2 L conținând bicarbonat de sodiu apos saturat (800 mL). Faza apoasă s-a extras de trei ori cu 300 mL de acetat de etil. Amestecul organic a fost uscat pe sulfat de magneziu și concentrat pentru a da un amestec de Compuși 603 și 604.
30

c. Prepararea Compusului 603.

35 Materialul brut din sub-partea b s-a dizolvat în 3:1:1 THF/apă/acetonă (165 mL), apoi s-a tratat cu N-metilmorfolin-N-oxid (3,45 g, 29,4 mmol) și tetroxid de osmiu (4% de masă în apă, 5 mL, 0,818 mmol). După agitare la temperatura camerei timp de 7 ore, reactivii au fost stinși cu tiosulfat de sodiu 1M (~100 mL). Conținutul balonului s-a turnat apoi într-o pâlnie de separare de 1 L conținând apă (~300 mL). Faza apoasă s-a extras de trei ori cu 300 mL de diclormetan. Amestecul organic s-a uscat pe sulfat de magneziu și s-a concentrat. Reziduul brut s-a purificat prin cromatografie în coloană pe silice (5% până la 45% EtOAc/hexan) pentru a se obține esterul 5-benzilic 6-metilic al acidului 5-aza-spiro[2.4]heptan-5,6-dicarboxilic 603 sub formă de ulei limpede (5,54g, 19,15 mmol, 65%). ¹H RMN (CDCl_3) δ 7,36-7,29 (m, 5H), 5,21-5,04 (m, 2H), 4,56-4,47 (m, 1H), 3,75 (s, 1,5 H), 3,60 (m, 1,5 H), 3,51-3,37 (m, 2H), 2,32-2,25 (m, 1H), 1,87-1,80 (m, 1H), 0,64 – 0,51 (m, 4H).
40

45 d. Prepararea esterului 5-benzilic al acidului 5-aza-spiro[2.4]heptan-5,6-icarboxilic 606.

Esterul 5-benzilic 6-metilic al acidului 5-aza-spiro[2.4]heptan-5,6-dicarboxilic 603 (244 mg, 0,840 mmol) s-a dizolvat în THF (2,0 mL) / MeOH (1,5 mL). O soluție apoasă de LiOH (35,5 mg, 0,84 mmol) s-a adăugat și agitarea la temperatura camerei a fost continuată. După 3 ore, reacția a fost neutralizată cu soluție apoasă de HCl (1M) și solvenții organici s-au îndepărtat în vid. Amestecul brut s-a diluat cu apă și acetat de etil și s-a colectat stratul organic. Toate substanțele volatile au fost îndepărtate în vid și acidul brut 606 a fost utilizat fără purificare suplimentară. LCMS-IEP⁺: calculată pentru C₁₅H₁₇NO₄: 275,3 (M⁺); Depistată: 276,3 (M+H⁺).



e. Prepararea unei 2,7-Dibromo-9,9-difluoro-9H-fluorene 608.

2,7-Dibromo-fluoren-9-onă 607 (4,0 g, 11,8 mmol) s-a suspendat în deoxofluor (12 mL) la temperatura camerei și s-a adăugat EtOH (4 picături). Suspensia agitată a fost încălzită la T = 90°C timp de 24 ore (ATENȚIE: Utilizarea deoxofluorului la temperaturi ridicate, astfel cum este descris mai sus, este avertizată deoarece pot apărea exotermie rapide și violente). Reacția s-a răcit la temperatura camerei și s-a turnat pe gheață conținând bicarbonat de sodiu. S-a format un solid care s-a colectat prin filtrare. Materialul brut s-a preluat în acetat de etil și s-a spălat cu soluție apoasă de HCl (1M) și soluție salină. Soluția a fost uscată pe sulfat de sodiu. Filtrarea și evaporarea solvenților a dat produs brut, care s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (eluant: EtOAc/hexani) pentru a se obține 608 (3,2 g). ¹⁹F-RMN: 282 MHz, (DMSO-d₆) δ: -111,6 ppm. Înainte de a utiliza materialul în etapa următoare, acesta a fost expus ca o soluție în EtOAc la carbune.

f. Prepararea esterului 6-[2-(7-bromo-9,9-difluoro-9H-fluoren-2-il)-2-oxo-etil] 5-benzilic al acidului 5-Aza-spiro[2.4]heptan-5,6-dicarboxilic 609.

2,7-Dibromo-9,9-difluoro-9H-fluorenă 608 (372 mg, 1,04 mmol), Pd (PPh₃)₄ (30,0 mg, 0,026 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (18,2 mg, 0,026 mmol), As(PPh₃)₃ (5,0 mg) s-au dizolvat în dioxan (10 mL) în atmosferă de argon. S-a adăugat etoxiviniltributilstaniu (376,4 mg, 1,04 mmol). Amestecul s-a încălzit pentru 140 minute la 85°C (baie de ulei). Reacția a fost răcită la temperatura camerei. S-a adăugat N-bromosuccinimidă (177 mg, 1,0 mmol), urmată de apă (2 mL). Reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 3 ore, după care majoritatea dioxanului a fost îndepărtat în vid. Amestecul de reacție brut a fost diluat cu acetat de etil și spălat cu apă. Toate substanțele volatile s-au îndepărtat în vid. S-a adăugat toluen și toate substanțele volatile s-au îndepărtat în vid pentru a doua oară. Materialul brut s-a izolat în DMF / MeCN (2 mL, 1:1) la temperatura camerei. O soluție de N-Cbz-4-ciclopropil (L) prolină 606 (0,84 mmol) și DIEA (268 mg, 2,08 mmol) în MeCN (2 mL) s-a adăugat și agitarea la temperatura camerei a fost continuată. După 14 ore, cea mai mare parte de MeCN a fost îndepărtată în vid și amestecul de reacție brut a fost diluat cu acetat de etil. Amestecul s-a spălat cu soluție apoasă de HCl (1M), soluție apoasă de clorură de litiu (5%), soluție salină și s-a uscat pe sulfat de sodiu. Filtrarea și evaporarea solvenților au dat produsul brut de reacție, care a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (eluant: EtOAc / hexani) pentru a se obține compusul 609 (176 mg). LCMS-IEP⁺: calculată pentru C₃₀H₂₄BrF₂NO₅: 596,4 (M⁺); Depistată: 595,2 / 597,2 (M+H⁺).

g. Prepararea esterului benzilic al acidului 6-[5-(7-Bromo-9,9-difluoro-9H-fluoren-2-il)-1H-imidazol-2-il]-5-aza-spiro[2.4]heptan-5-carboxilic 610.

Esterul 6-[2-(7-bromo-9,9-difluoro-9H-fluoren-2-il)-2-oxo-etil] 5- benzilic al acidului 5-aza-spiro[2.4]heptan-5,6-dicarboxilic 609 (172 mg, 0,293 mmol) s-a dizolvat în m-xilen (6,0 mL). Acetat de amoniu (226 mg, 2,93 mmol) s-a adăugat și reacția s-a agitat la 140°C timp de 60 minute în condiții de microunde. Reacția s-a răcit la temperatura camerei și substanțele volatile s-au îndepărtat în vid. Materialul brut s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (eluant: EtOAc / hexan) pentru a da compusul 610 (80,3 mg). LCMS-IEP⁺: calculată pentru C₃₀H₂₄BrF₂N₃O₂: 576,4 (M⁺); Depistată: 575,2 / 577,2 (M+H⁺).

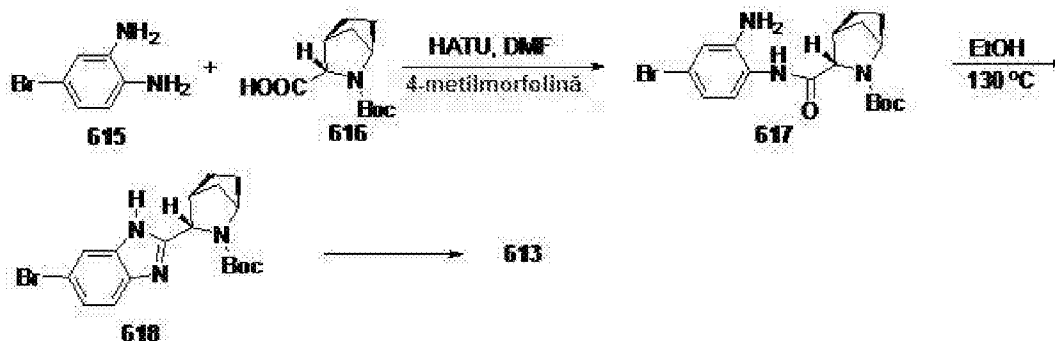
h. Prepararea esterului metilic al acidului (1-{6-[5-(7-Bromo-9,9-difluoro-9H-fluoren-2-il)-1H-imidazol-2-il]-5-aza-spiro[2.4]heptan-5-carbonil}-2-metil-propil)-carbamic 612.

Esterul benzilic al acidului 6-[5-(7-bromo-9,9-difluoro-9H-fluoren-2-il)-1H-imidazol-2-il]-5-aza-spiro[2.4]heptan-5-carboxilic 610 (800 mg, 1,38 mmol) s-a dizolvat în clorură de metilen (15 mL) și s-a adăugat HBr în AcOH (37%, 2 mL) și agitarea la temperatura camerei a fost continuată. După 180 minute, suspensia s-a diluat cu hexani și solidul s-a colectat prin filtrare și s-a spălat cu hexan și s-a supus la vid. Materialul brut a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. Materialul brut a fost dizolvat în DMF (4,0 mL) și DIEA (356 mg, 2,76 mmol). O soluție de acid 2-(L)-metoxycarbonilamino-3-metil-butiric 611 (242 mg, 1,38 mmol), HATU (524 mg, 1,38 mmol) și DIEA (178 mg, 1,38 mmol) în DMF (1 mL) s-a adăugat. Reacția s-a agitat la temperatura camerei. După 50 de minute, reacția s-a diluat cu EtOAc și s-a spălat cu soluție apoasă de bicarbonat, soluție apoasă de clorură de litiu (5%), soluție salină și s-a uscat pe sulfat de sodiu. Filtrarea și îndepărtarea solvenților în vid a dat produsul brut, care a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (eluant: EtOAc / hexan) pentru a da compusul puțin impur 612 (878 mg). LCMS-IEP⁺: calculată pentru C₂₉H₂₉BrF₂N₄O₃: 599,5 (M⁺); Depistată: 598,5 / 600,5 (M+H⁺).

i. Prepararea esterului terț-butilic al acidului 3-[6-(9,9-Difluoro-7-{2-[5-(2-metoxycarbonilamino-3-metil-butiril)-5-aza-spiro[2.4]hept-6-il]-3H-imidazol-4-il}-9H-fluoren-2-il)-1H-benzoimidazol-2-il]-2-aza-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilic 614.

Esterul metilic al acidului (1-{6-[5-(7-Bromo-9,9-difluoro-9H-fluoren-2-il)-1H-imidazol-2-il]-5-aza-spiro[2.4]heptan-5-carbonil}-2-metil-propil)-carbamic 612 (840 mg, 1,4 mmol), esterul terț-butilic al acidului 3-[6-(4,4,5,5-Tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol-2-il]-2-aza-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilic 613 (615 mg, 1,4 mmol), Pd(PPh₃)₄ (161 mg, 0,14 mmol), K₂CO₃ (579 mg, 4,2 mmol) s-au dizolvat în DME (15 mL) / apă (3 mL) în atmosferă de argon. Amestecul s-a încălzit timp de 120 de minute la 85-90°C (baie de ulei). După 120 minute ester boronat suplimentar (61 mg, 0,14 mmol) s-a adăugat și încălzirea a fost continuată. După 3 ore, reacția a fost răcită la temperatura camerei. Cea mai mare parte din DME a fost îndepărtată în vid și amestecul de reacție brut a fost diluat cu acetat de etil. Amestecul s-a spălat cu soluție salină și s-a uscat pe sulfat de sodiu. Filtrarea și evaporarea solvenților au dat produsul brut de reacție, care a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (eluant: EtOAc / hexan) pentru a se obține compusul 614 (878 mg). LCMS-IEP⁺: calculată pentru C₄₇H₅₁F₂N₇O₅: 831,9 (M⁺); Depistată: 832,7 (M+H⁺).

Compusul intermediar 613 poate fi preparat după cum urmează.



j. Prepararea esterului terț-butilic al acidului 3-(2-Amino-4-bromo-fenilcarbamoil)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilic 617.

La o soluție de ester 2-terț-butilic al acidului 2-aza-biciclo[2.2.1]heptan-2,3-dicarboxilic 616 (0,327 g, 1,36 mmol, 1 echiv.), 4-bromo-benzen-1,2-diamină 615 (0,507 g, 2,71 mmol, 2 echiv.) și 4-metilmorfolină (0,299 mL, 2 echiv.) în 10 mL DMF s-a adăugat HATU (0,543 g, 1,05 echiv.). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 1 oră, apoi concentrat. Amestecul de reacție a fost diluat cu acetat de etil și spălat cu soluție apoasă de NaHCO_3 diluat și soluție salină. Stratul organic a fost concentrat și purificat prin cromatografie rapidă încoloană (silicagel, 20 până la 80% acetat de etil/hexan) pentru a da un amestec de regioizomer esterul terț-butilic al acidului 3-(2-Amino-4-bromo-fenilcarbamoil)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilic 617.

k. Prepararea esterului terț-butilic al acidului 3-(6-Bromo-1H-benzoimidazol-2-il)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilic 618.

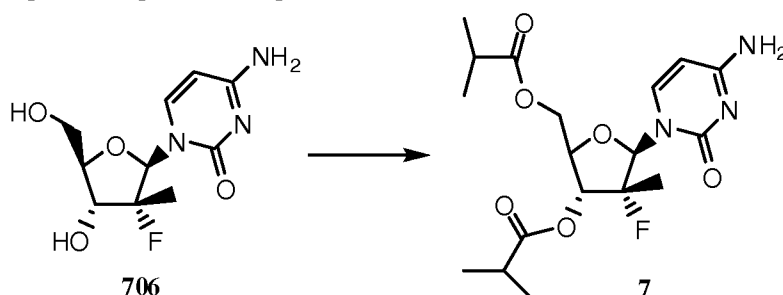
Amestecul de mai sus de regioizomer ester terț-butilic al acidului 3-(2-Amino-4-bromo-fenilcarbamoil)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilic 617 a fost dizolvat în etanol și încălzit la 130°C într-un tub sigilat peste noapte și încălzirea a continuat la 170°C timp de 3 zile. CL- S Ma arătat produsul dorit și produsul descompus Boc (aproximativ 1:1). Amestecul a fost concentrat și dizolvat în HCl. Bicarbonat di-terț-butilic (0,6 echiv.) s-a adăugat și reacția s-a agitat peste noapte la temperatura camerei. Amestecul de reacție a fost concentrat și purificat prin cromatografie rapidă încoloană (silicagel, 20 până la 80% acetat de etil/hexan) pentru a da esterul terț-butilic al acidului 3-(6-Bromo-1H-benzoimidazol-2-il)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilic 618 (0,383 g, 72%) sub forma unei spume portocalii.

l. Prepararea Compusului 613.

Un amestec de ester terț-butilic al acidului 3-(6-Bromo-1H-benzoimidazol-2-il)-2-aza-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilic 618 (264 mg, 0,673 mmol), ester dipinocal al acidului benzen-1,4-diboronic (5 echiv., 3,36 g, 6,95 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladiu (5%, 39 mg) și soluție apoasă de carbonat de potasiu 2M (3 echiv., 1,01 mL) în 5 mL de DME a fost încălzit la 90°C sub Ar timp de 4 ore. Amestecul de reacție a fost răcit și diluat în acetat de etil și spălat cu soluție saturată de bicarbonat de sodiu. Stratul organic s-a uscat (MgSO_4), concentrat și purificat prin cromatografie în coloană (silicagel, 20 până la 60% acetat de etil/hexan) pentru a da esterul terț-butilic al acidului 3-{6-[4-(4,4,5,5-Tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenil]-1H-benzoimidazol-2-il}-2-aza-biciclo[2.2.1]heptan-2-carboxilic 613 (295 mg, 85% randament). LCMS-IEP: calculată pentru $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{BN}_3\text{O}_4$: 515,45; Depistată: 516,1 ($\text{M}+\text{H}^+$).

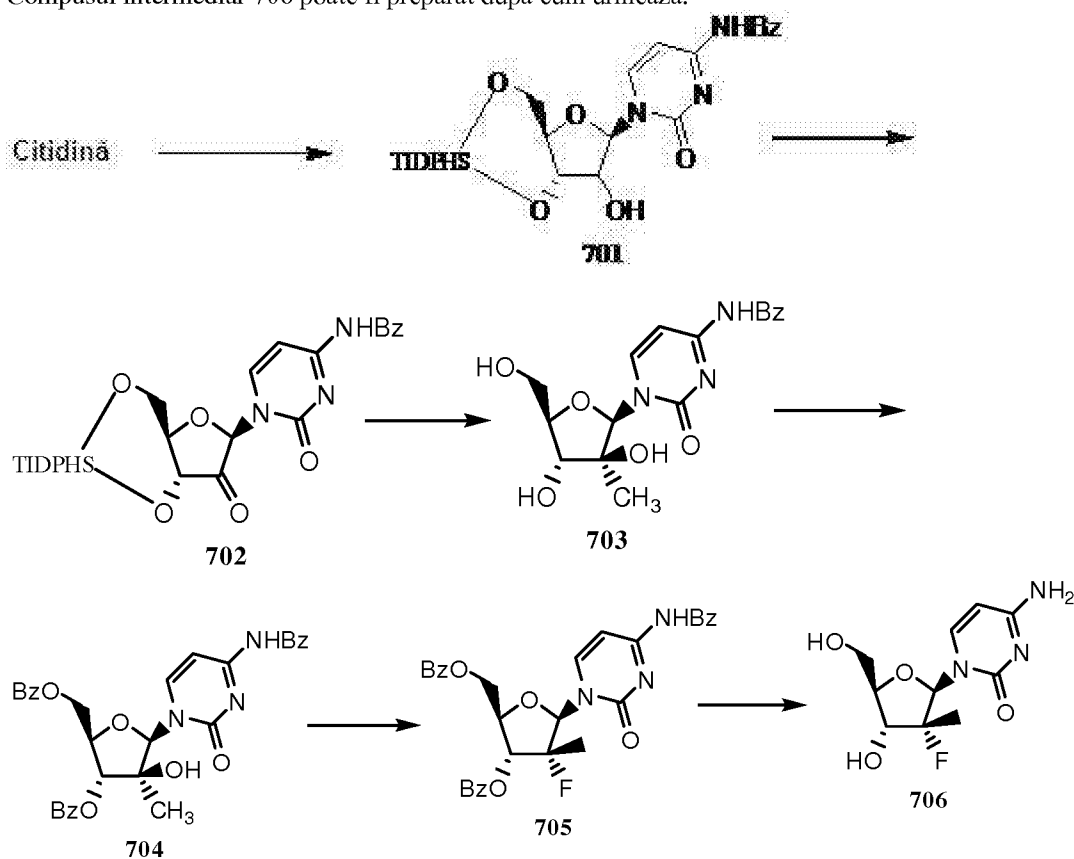
Compusul 7 poate fi preparat folosind metode de sinteză și intermediari, cum ar fi cei descriși în brevetul US 7429572 B2 2008.09.30. Compusul 7 poate fi, de asemenea, preparat astfel cum este descris în Exemplul următor.

Exemplul 7: Prepararea Compusului 7.



La o suspensie răcită cu gheață de compus 701 (970 g, 3,74 mol) și DMAP (50 g, 0,412 mol) în THF (10 L) s-a adăugat TEA (2,3 kg, 16,5 mol) și apă (7 L) care a produs o soluție limpede. Clorură de izobutiril (3 echivalenți) s-a adăugat încet la amestecul agitat, menținând temperatura la aproximativ 0°C. O cantitate suplimentară de 1,2 apoi 0,7 echivalenți ai clorurii de izobutiril s-a adăugat până când HPLC a indicat că reacția a procedat în mod esențial la completare (un total de aproximativ 1,95 kg). Amestecul de reacție s-a acidulat cu acid clorhidric concentrat la un pH de aproximativ 6,4 și faza organică s-a spălat cu EtOAc (2 x 10 L). Extractele combinate s-au spălat cu apă (1 x 15 L). Faza organică s-a filtrat și s-a concentrat in vid. Reziduul s-a dizolvat în IPA (cca. 20 kg) și s-a adăugat heptan (4,2 kg). Soluția s-a încălzit la aproximativ 74-75°C pentru a produce o soluție limpede, apoi aproximativ 5L s-a îndepărtat prin distilare. Soluția rezultată a fost răcită lent la temperatura camerei. S-a format un precipitat la aproximativ 42-43°C. Răcirea a fost continuată lent la 5°C, apoi s-a agitat peste noapte. Solidul rezultat s-a filtrat și filtratul s-a spălat cu amestec (1:8) de IPA/heptan (3,4 kg) și s-a uscat in vid la circa 60-70°C pentru a se obține 1,295 kg (86,65%) de compus 7, care este de 99,45% pur prin HPLC.

Compusul intermediar 706 poate fi preparat după cum urmează.



20 a. Prepararea Compusului 701.

La o suspensie de citidină (100 g, 0,411 mol) în DMF (2,06 L) s-a adăugat anhidridă benzoică (102,4 g, 0,452 mol). Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 20 ore. DMF a fost îndepărtat în vid și reziduul a fost triturat cu dietil eter. Solidul rezultat a fost colectat prin filtrare cu aspirare și spălat cu eter dietilic (2 x 200 mL). Uscarea suplimentară în vid la temperatura camerei a dat *N*^H benzamida (140,6 g, 98,3%). O porțiune din acest material (139,3 g, 0,401 mol) a fost dizolvată în piridină anhidră (1,2 L) și a fost tratată cu 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraizopropil-disiloxan (141,4 mL, 0,441 mol) la temperatura camerei. Soluția s-a agitat la temperatura camerei peste noapte. Amestecul a fost concentrat până la uscare în vid și coevaporat cu toluen (3 x 200 mL). Reziduul a fost tratat cu EtOAc (1,8 L) și spălat cu HCl (2 x 200 mL, 0,05 N), NaHCO₃ (5%, 2 x 400 mL). Stratul organic s-a spălat și uscat (Na₂SO₄), filtrat și evaporat până la uscare. Compusul 701 (256,5 g, >100%) a fost izolat ca o spumă albă și utilizat fără purificare suplimentară.

b. Prepararea Compusului 702.

Compusul 701 (236,5 g, 0,40 mol) a fost dizolvat în THF uscat (1,22 L). DMSO anhidru (180,8 mL, 2,1 mol) s-a adăugat și soluția rezultată a fost răcită între -20°C și -15°C. Anhidridă trifluoracetică (90,6 mL, 0,64 mol) s-a adăugat prin picurare timp de 45 min și soluția s-a agitat între -20°C și -15°C timp de 2 ore după care s-a adăugat trietilamină anhidră (223,5 mL, 1,6 mol) timp de 20 minute. Reacția brută conținând cetona 702 s-a dizolvat în EtOAc (500 mL) și soluția rezultată s-a spălat cu H₂O (3 x 400 mL), s-a uscat (Na₂SO₄) și solvenții s-au îndepărtat în vid pentru a da un solid galben care a fost purificat pe o coloană de silicagel eluând cu un gradient treptat de Et₂O (0-60%) în hexani urmat de un gradient treptat de EtOAc (50-100%) în hexani. Cetona brută astfel obținută (~192 g) s-a cristalizat din eter de petrol pentru a da cetona 702 (138,91 g, 57,5% din citidină) sub forma unui solid alb și 22 g de materie primă inițială nereacționată 701, sub forma unui solid de culoare galbenă.

c. Prepararea Compusului 703.

Compusul 702 (48,57 g, 8,26 mmol) s-a dizolvat în toluen anhidru (~400 mL) și s-a înlăturat solvenul în vid, cu excluderea umidității. Reziduul a fost apoi uscat suplimentar în vid (pompa de ulei) timp de încă 2 ore. Cu excluderea strictă a umidității, spuma reziduală s-a dizolvat în eter dietilic anhidru (1,03 L) sub argon. Soluția rezultată a fost răcită la -78°C sub argon și MeLi (1,6 M, 258,0 mL, 0,413 mol) s-a adăugat prin picurare printr-o pâlnie suplimentară. După ce adăugarea a fost completă, amestecul s-a agitat timp de 2 ore la -78°C. Soluție apoasă de NH₄Cl 1M (500 mL) s-a adăugată încet. După încălzire la temperatura camerei, amestecul s-a spălat cu H₂O (2 x 500 mL), s-a uscat (Na₂SO₄) și apoi s-a concentrat până la uscare pentru a da o spumă cafenie (~60 g, >100%).

Reacția a fost realizată de încă două ori folosind 37,62 g și 56,4 g de compus 702. Produsele brute combinate (128,0 g, 0,212 mol) au fost dizolvate în THF (1,28 L) și tratate cu HOAc concentr. (23 mL, 0,402 mol). La soluție s-a adăugat TBAF (384,0 mL, 1M în THF). Soluția s-a agitat la temperatura camerei timp de 0,75 ore, iar amestecul s-a tratat cu silicagel (750 g) și s-a concentrat până la uscare. Pulberea s-a plasat într-o coloană pe silicagel ambalate în CH₂Cl₂. Eluția cu 1:7 EtOH-CH₂Cl₂ a dat un solid ceros de culoare închisă, care s-a pre-adsorbit pe silicagel (300 g) și s-a cromatografiat ca înainte. Compusul 703 (46,4 g, 53,0% din 702) a fost izolat ca un solid alb-cenușiu. ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 1,20 (s, 3H, CH₃), 3,62-3,69 (m, 2H), 3,73-3,78 (m, 2H), 5,19 (t, 1H, J=5,4 Hz, OH-5'), 5,25 (s, 1H, OH-2'), 5,52 (d, 1H, J=5,0 Hz, OH-3'), 5,99 (s, 1H, H-1'), 7,32 (d, 1H, J=5,8 Hz), 7,50 (ψt, 2H, J=7,7 Hz), 7,62 (ψ, 1H, J=7,3 Hz), 8,00 (d, 2H, J=7,3 Hz), 8,14 (d, 1H, J=6,9 Hz), 11,22 (s, 1H, NH). Calculată anal. pentru C₁₇H₁₉N₃O₆ · 0,5 H₂O: C, 55,13; H, 5,44; N, 11,35. Depistată: C, 55,21; H, 5,47; N, 11,33.

d. Prepararea Compusului 704.

Compusul 703 (46,0 g, 0,13 mol) s-a dizolvat în piridină anhidră și s-a concentrat până la uscare in vid. Siropul rezultat s-a dizolvat în piridină anhidră sub argon și s-a răcit la 0°C cu agitare. Soluția brună a fost tratată cu clorură de benzoil (30 mL, 0,250 mol) prin picurare timp de 10 minute. Baia de gheață a fost îndepărtată și agitarea a continuat timp de 1,5 ore, în acest moment TLC a arătat lipsa materiei prime rămasă. Amestecul s-a stins prin adăugarea apei (5 mL) și s-a concentrat până la uscare. Reziduul a fost dizolvat într-o cantitate minimă de CH₂Cl₂ și spălat cu soluție saturată de NaHCO₃ (1 x 500 mL) și H₂O (1 x 500 mL). Faza organică a fost uscată (Na₂SO₄) și filtrată, concentrată până la uscare și cromatografiată pe silicagel, eluând cu un gradient treptat de EtOAc-hexani (25-60%) pentru a se obține compusul 704 sub formă de spumă galbenă (48,5 g, 67%). ¹H RMN (CDCl₃): δ 1,64 (s, 3H, CH₃), 4,50 (m, 1H, H-4), 4,78-4,85 (m, 2H, H-5', 5a'), 5,50 (d, 1H, J=3,4 Hz, H-3'), 6,42 (s, 1H, H-1'), 7,44-7,54 (m, 7H, Ar), 7,57-7,66 (m, 3H, Ar), 7,94 (d, 2H, J=7,8 Hz), 8,05-8,09 (m, 4H, Ar), 8,21 (d, 1H, J=7,3 Hz). Calculată anal. pentru C₃₁H₂₇NO₈: C, 65,37; H=4,78; N, 7,38. Depistată: C, 65,59; H, 4,79; N, 7,16.

e. Prepararea Compusului 705.

Compusul 704 (7,50 g, 0,013 mol) s-a dizolvat în toluen anhidru (150 mL) sub argon și răcit la -20°C. DAST (2,5 mL, 18,9 mmol) s-a adăugat încet și baia de răcire a fost îndepărtată după complșetarea adăugării. S-a continuat agitarea timp de 1 oră și amestecul s-a turnat în soluție saturată de NaHCO₃ (100 mL) și s-a spălat până când degajarea gazului a încetat. Faza organică a fost uscată (Na₂SO₄), concentrată și purificată prin cromatografie pe silicagel eluând cu 1:1 EtOAc: hexani. Randamentul a fost de 1,22 g (16,3%) de 705 pur sub forma unui solid alb. Punctul de topire 241°C (CH₂Cl₂-hexani); ¹H RMN (CDCl₃): δ 1,49 (d, 3H, J=22,4 Hz, CH₃), 4,64 (dd, 1H, J=3,44, 12,9 Hz, H-5'), 4,73 (d, 1H, J=9,5 Hz, H-4'), 4,90 (dd, 1H, J=2,4, 12,7 Hz, H-5a'), 5,56 (dd, 1H, J=8,6, 20,7 Hz, H-3'), 6,52 (d, 1H, J=18,0 Hz, H-1'), 7,47-7,57 (m, 7H, Ar), 7,62-7,71 (m, 3H, Ar), 7,89 (d, 2H, J=6,9 Hz), 8,07-8,11 (m, 5H, Ar), 8,67 (bs, 1H, NH). ¹⁹F

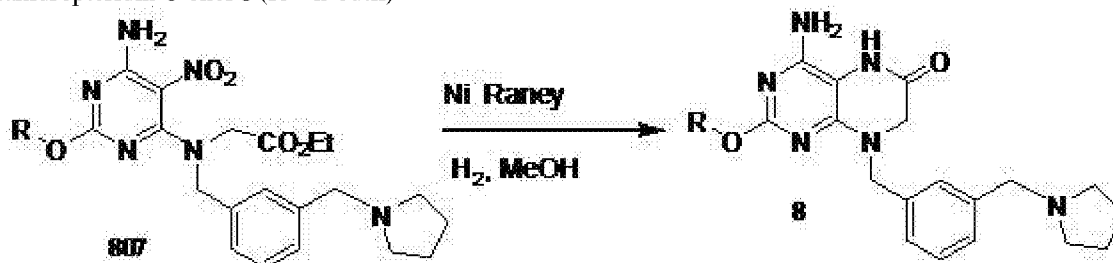
RMN (CDCl_3): δ 3,3 (m). Calculată anal. pentru $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{FN}_3\text{O}_7 \cdot 0,7 \text{ H}_2\text{O}$: C, 63,74; H, 4,72; N, 7,20. Depistată: C, 63,71; H, 4,54; N, 7,20.

f. Prepararea Compusului 706.

Compusul 705 (6,30 g, 0,011 mol) a fost suspendat în amoniac metanolic (cca 7N, 150 mL) și s-a agitat la temperatura camerei peste noapte. Solventul s-a îndepărtat în vid, coevaporat cu metanol (1 x 20 mL) și preadsorbit pe silicagel. Pulberea albă a fost plasată într-o coloană pe silicagel (ambalată în CHCl_3) și coloana a fost eluată cu 9% EtOH în CHCl_3 , apoi cu 17% EtOH și în final cu 25% EtOH în CHCl_3 . Concentrarea fracțiilor care conțin produsul, filtrarea printr-un disc de 0,4 μm și liofilizarea din apă au oferit compusul 706, 2,18 g (76%). ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): δ 1,17 (d, 3H, $J=22,3$ Hz, CH_3), 3,63 (dd, 1H, $J=2,7, 13,7$ Hz, H-5'), 3,70-3,84 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,24 (app s, 1H, OH-3'), 5,60 (d, 1H, $J=5,4$ Hz, H-5'), 5,74 (d, 1H, $J=7,71$ Hz, H-5), 6,07 (d, 1H, $J=18,9$ Hz, H-1'), 7,31 (s, 1H, NH_2), 7,42 (s, 1H, NH_2), 7,90 (d, 1H, $J=7,3$ Hz, H-6). ^{19}F RMN ($\text{DMSO}-d_6$): δ 2,60 (m). Calculată anal. pentru $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FN}_3\text{O}_4 \cdot 1,4 \text{ H}_2\text{O}$: C, 44,22; H, 5,95; N, 14,77. Depistată: C, 42,24; H, 5,63; N, 14,54. Compusul 706 (0,10 g, 0,386 mmol) a fost transformat în sare de hidrociorură prin dizolvare în apă (2 mL) și ajustarea pH-ului la aproximativ 3,0 cu HCL 1M. Apa a fost îndepărtată în vid și reziduul cristalizat din EtOH apos pentru a da Compusul 706 ca sare de hidrociorură (71,0 mg). Punctul de topire 243°C (dec); ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): δ 1,29 (d, 3H, $J=22,6$ Hz, CH_3), 3,65 (dd, 1H, $J=2,3, 12,7$ Hz, H-5'), 3,76-3,90 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,96 (d, 1H, $J=17,3$ Hz, H-1'), 6,15 (d, 1H, $J=7,9$ Hz, H-5), 8,33 (d, 1H, $J=7,9$ Hz, H-6), 8,69 (s, 1,5 H, NH), 9,78 (s, 1,5 H, NH). ^{19}F RMN ($\text{DMSO}-d_6$): δ 1,69 (m). Calculată anal. pentru $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FN}_3\text{O}_4 \cdot \text{HCl}$: C, 40,62; H, 5,11; N, 14,21. Depistată: C, 40,80; H, 5,09; N, 14,23.

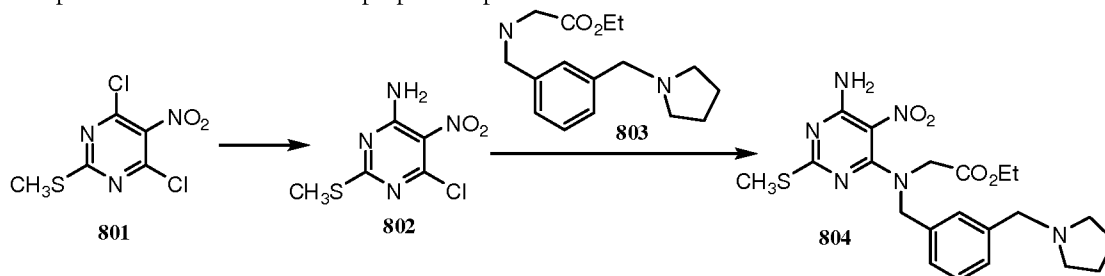
Compusul 8 poate fi preparat prin metode de sinteză și intermediari, cum ar fi cei descriși în US 20100143301 A1 2010.06.10. Compusul 8 poate fi de asemenea preparat ca în Exemplul următor.

Exemplul 8: Prepararea 4-amino-2-n-butoxi-8-[3'-(pirolidin-1''-ilmetil)-benzil]-5,6,7,8-tetrahidropteridin-6-onei 8 (R = n-butil)



La o soluție de compus nitro 807 (730 mg, 1,5 mmol) în MeOH (10 mL) s-a adăugată un Nichel Raney (~200 μL , suspensie în H_2O). Vasul de reacție a fost purjat cu H_2 și apoi agitat sub o atmosferă de H_2 timp de 1,5 ore. Amestecul s-a filtrat prin celită cu CH_2Cl_2 și MeOH (1:1). Filtratul s-a concentrat sub vid și lăsat pe liofilizator peste noapte. Baza liberă a compusului 8 a fost obținută ca un solid alb. Pentru a obține sarea de hidrociorură 8, o probă de filtrat indicat mai sus a fost îmbogățită cu HCl 1,0 M la pH = 1-2 și liofilizată. ^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz): δ 7,65 (s, 1H), 7,50 (m, 3H), 4,96 (s, 2H), 4,44 (t, $J=7$ Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,16 (s, 2H), 3,48 (m, 2H), 3,19 (m, 2H), 2,02-2,17 (m, 4H), 1,74 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 0,94 (t, $J=7$ Hz, 3H) - [sarea HCl]. LCMS-IEP⁺: calculată pentru $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_2$: 411,5 ($\text{M}+\text{H}^+$); Depistată: 411,3 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Compusul intermediar 807 a fost preparat după cum urmează.



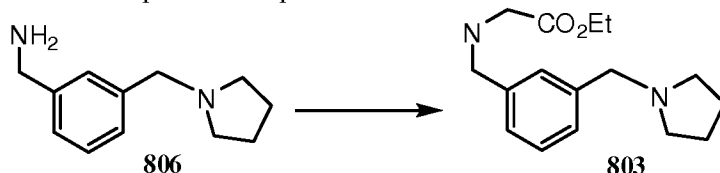
a. Prepararea compusului 802.

La o soluție de compus 801 (2,46 g, 10,2 mmol) în THF (34 mL) la -20°C s-a adăugat Et₃N (3,14 mL, 22,5 mmol) urmat de o soluție de NH₃ (2,0 M în metanol, 5,4 mL, 11 mmol). Amestecul a fost agitat cu încălzire la 0°C timp de 1,5 ore (CL/SM a indicat consumarea materiilor prime inițiale). Amestecul de reacție care conține compusul 802 a fost utilizat ulterior

5

fără prelucrare.

b. Prepararea Compusului 803.



10

La o soluție de 3-((1-pirolidinilmetil)fenil)metanamină 806 (1,95 g, 10,2 mmol) în THF (34 mL) la 0°C s-a adăugat Et₃N (3,14 mmol, 22,5 mmol) urmat de bromacetat de metil (1,04 mL, 22,3 mmol) prin picurare. Amestecul de reacție s-a agitat până când CL/SM a indicat consumul de materii prime inițiale, aproximativ 2 ore. Amestecul conținând compusul 803 a fost utilizat ulterior

fără prelucrare.

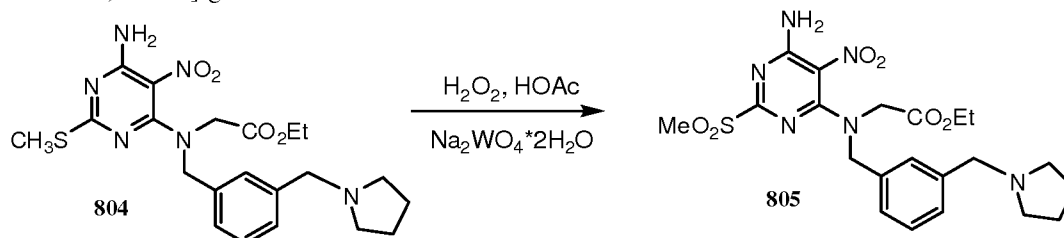
c. Prepararea Compusului 804.

15

Amestecul de reacție care conține compusul 803 a fost adăugat la amestecul de reacție care conține compusul 802 la 0°C. Amestecul de reacție s-a agitat până când CL/SM a indicat consumul de compus 802, aproximativ 45 de minute. S-a adăugat o soluție saturată de NH₄Cl (50 mL). Straturile au fost separate, iar stratul apos s-a extras cu EtOAc (2 x 30 mL). Straturile organice combinate s-au uscat pe MgSO₄, s-au filtrat și s-au concentrat sub vid. Purificarea prin cromatografie pe silicagel a dat 2,11 g de compus 804. ¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz): δ (ppm) 7,32-7,16 (m, 4H), 4,69 (s, 2H), 4,19 (q, J=7 Hz, 2H), 4,07 (s, 2H), 3,60 (s, 2H), 2,49 (m, 4H), 2,40 (s, 3H), 1,78 (m, 4H), 1,23 (t, 3H, J=7 Hz). LCMS-IEP⁺: calculată pentru C₂₁H₂₉N₆O₄S: 461,2 (M+H⁺); Depistată: 461,0 (M+H⁺).

20

d. Prepararea Etil-Nα-[4-amino-2-metanesulfonyl-5-nitropirimidin-6-il], Nα-[3'-(pirolidin-1''-ilmetil)-benzil]-glicinatului 805.



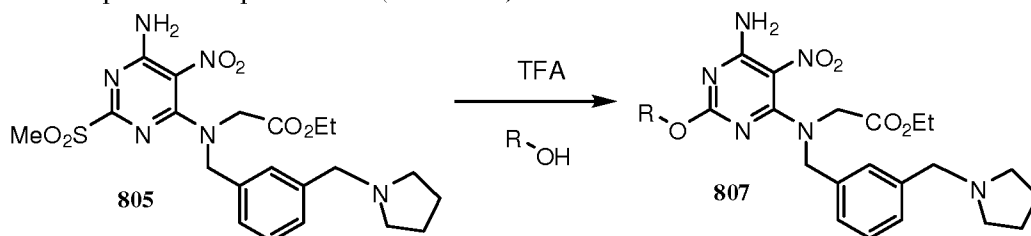
25

La o soluție-suspensie de sulfură 804 (3,68 g, 8,00 mmol) în EtOH (40 mL) la 0°C s-a adăugat secvențial tungstat dihidrat de sodiu (792 mg, 2,40 mmol), acid acetic (4,6 mL, 80 mmol) și peroxid de hidrogen (3,4 mL, ~40 mmol, 35% masă/masă în H₂O). După 3 ore, s-a adăugat suplimentar acid acetic (4,6 mL) și peroxid de hidrogen (3,4 mL). Reacția s-a menținut la 0°C timp de 16 ore. O soluție saturată de Na₂SO₃ (50 mL) s-a adăugat minuțios urmat la temperatura de 0°C de CH₂Cl₂ (75 mL). Straturile au fost separate, iar stratul apos s-a extras cu CH₂Cl₂ (4 x 50 mL). Straturile organice combinate s-au uscat pe MgSO₄, s-au filtrat și s-au concentrat sub vid pentru a obține un material care conține compusul 805, care a fost utilizat fără

35

purificare suplimentară.

e. Prepararea Compusului 807. (R = n-butil)

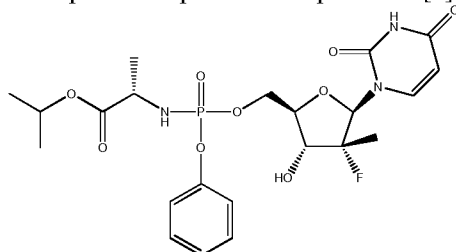


40

La o soluție de sulfonă 805 (1,0 g, 2,0 mmol) în n-butanol (10 mL) s-a adăugat TFA (470 μL, 6,1 mmol). Reacția s-a agitat la 100°C timp de 1 oră. Amestecul de reacție s-a turnat peste o

soluție saturată de NaHCO_3 (20 mL) și CH_2Cl_2 (30 mL). Straturile au fost separate, iar stratul apos s-a extras cu CH_2Cl_2 (30 mL). Straturile organice combinate s-au uscat pe MgSO_4 , s-au filtrat și s-au concentrat sub vid. Purificarea a fost realizată prin cromatografie pe silicagel (1 g substrate/10 g SiO_2) (2-15% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) pentru a se obține compusul 807.

5 Exemplul 9: Prepararea Compusului 9 [2].



9

Prepararea esterului izopropilic al acidului (S)-2-[[[(1R,4R,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihidro-2H-pirimidin-1-il)-4-(R)-fluoro-3-hidroxi-4-metil-tetrahidro-furan-2-il-metoxi]-fenoxifosforilamino]-propionic ([2], Exemplu 2)

10 Sinonim: amestecul diastereomeric de 5'-O-(izopropil-L-alanat, fenil fosforamidil)-2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridină.

Un balon cu 3 găuri de 5 L a fost echipat cu un agitator mecanic, baie de soluție salină pe gheață, termometru intern și o atmosferă de azot. Balonul a fost încărcat cu hidroclorură de ester izopropilic al L-alaninei (82,0 g, 0,490 mol) și diclormetan anhidru (0,80 L). Sub agitare s-a adăugat fenil diclorfosfat (85,0 g, 0,40 mol) într-un singur lot și agitat. Menținând temperatura internă între -5 și 5°C, o soluție de N-metilimidazol (NMI, 250 g, 3,07 mol) în diclormetan (250 mL) s-a adăugat timp de o jumătate de oră. Soluția s-a lăsat sub agitare timp de 1 oră în acest interval de temperatură. 2'-Deoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-uridină (3,800 g, 0,307 mol) s-a adăugat la 0°C într-o porție și apoi vasul de reacție s-a lăsat să se încălzească încet în baie de soluție salină. La 1 oră, temperatura internă a fost de până la -2°C. TLC (5% metanol în HCL) la 1 oră a arătat că mai mult de 50% de nucleozidă fost consumată. S-a îndepărtat baia și balonul de reacție a atins temperatura camerei timp de încă 1 oră. TLC după 3 ore și la 5 ore total a arătat că 95% de nucleozidă inițială a fost consumată. Amestecul de reacție a fost stins prin adăugarea metanolului (100 mL) și agitarea amestecului de reacție timp de 5 minute.

25 Amestecul de reacție a fost spălat cu HCl 1N (2x500 mL) urmată de soluție saturată de bicarbonat de sodiu (2x500 mL). Stratul organic separat s-a uscat pe sulfat de sodiu anhidru (50 g) și s-a filtrat. Soluția a fost evaporată sub presiune redusă și apoi sub vid înalt până la uscare pentru a obține produsul brut sub formă de ulei vâscos (170 g). Au fost luate RMNe ale produsului brut (^3P și ^1H). ^3P -RMN a indicat că aproximativ 1% din integrarea totală a fosforului s-a datorat prezenței 3' izomerului 5.

30 La produsul brut s-a adăugat piridină anhidră (1,700 mL). Solventul s-a evaporat la presiune redusă și apoi sub vid înalt pentru a reduce conținutul de apă al amestecului brut prin coevaporare. Uleiul rezultat a fost redizolvat în piridină anhidră (500 mL) și apoi s-a adăugat exces de clorură de t-butildimetilsilil (9,0 g, 60 mM). Reacția a fost agitată la temperatura ambiantă. Mersul reacției a fost monitorizat prin CLPÎ/SM. După 3 ore, 3' impuritatea 5 nu a mai putut fi detectată și reacția a fost stinsă prin adăugarea metanolului (50 mL).

35 Reacția a fost evaporată sub presiune redusă la un ulei. Reziduul s-a dizolvat în acetat de etil (1,5 L) și spălat cu HCl 1N (2x500 mL), urmat de soluție saturată de bicarbonat de sodiu (2x500 mL). Stratul organic s-a uscat pe sulfat de sodiu anhidru (50 g), filtrat și evaporat sub presiune redusă pentru a da produsul brut ca un ulei galben pal.

40 Uleiul brut a fost diluat cu același volum de diclormetan și încărcat pe un cartuș de silicagel 2.5 Kg n cu un modul de compresie radială la 100 psi de presiune a aerului. Folosind o pompă cu gradient la 60 psi și un debit de 400 mL/min, cartușul s-a spălat cu clorura de metilen (4L), după care a urmat un gradient de metanol 1-4% în clorură de metilen (48 L). Cele mai multe dintre impuritățile majore (di-(izopropilalanil) fenil fosfat, 3',5'-bis fosforamidat, 3'-fosforamidat-5'-TBDMS aductul (7)) a eluat cu un gradient de ~3%. Produsul dorit a eluat între 3 și 4% metanol. Frațiunile conținând produsul au fost sortate în două loturi. Primul a conținut cantități mici de impurități superioare și acesta din urmă a fost produsul pur. Primul set de fracțiuni a conținut cantități mici de impurități mai puțin polare (impurități superioare), cum ar fi 3',5'-bis fosforamidatul și di-alanilfenilfosfatul și o mare parte diastereomerul Rp și a necesitat o a doua purificare în coloană. (Terminologia relativă, superioară vs inferioară se referă la eluarea pe cromatografia pe silicagel cu fază normală, în care „izomer superior” înseamnă primul izomer de

eluate). Al doilea set de fracțiuni nu au avut o cantitate semnificativă de impurități – pur și simplu restul *Rp* și cea mai mare parte a diastereomerilor *Sp*. Mai târziu a fost recombinaat cu fracțiunile eluate de două ori în coloane. Solventul s-a evaporat sub presiune redusă și spuma albă rezultată a fost uscată suplimentar (0,20mmHg) timp de 1 oră pentru a se obține 42 g de lot impur (04:01 izomer superior vs inferior pe baza ^{31}P -RMN) și 38 g de lot pur (01:03 izomer superior vs inferior). Lotul impur a fost recolumnat în mod similar pentru a da 3,8 g de 97% izomer superior pur (fracție lăsată la o parte) și 36 g de produs pur într-un raport de 4:1. Cele două loturi principale au fost dizolvate în HCL, combinate, evaporate sub presiune redusă și uscate (50°C, 0,2 mm Hg, 24 ore) pentru a obține 74 g (45,7%) de produs pur (Compusul 9) cu un raport diastereomeric de 48:51, sub formă de spumă albă, cu punctul de topire de aproximativ 75-85°C.

Pentru a produce un solid amorf al amestecului diastereomeric, 74 g de spumă albă a fost agitată cu eter metil t-butil (750 mL) rezultând într-o soluție parțială și un reziduu solid cleios. Sub agitare, heptan (750 mL) s-a adăugat încet și suspensia s-a agitat mecanic timp de 1 oră până la transformarea majorității gumei într-un solid alb. Solidul a fost răzuit cu o spatulă și suspensia rezultată a fost filtrată. Solidul a fost spălat cu heptan (4x50mL) și uscat sub vid (50°C, 0,2mmHg, 24 ore) pentru a se obține o pulbere amorfă albă (64 g) cu un interval larg de topire de circa 70-80°C. ^1H și ^{31}P RMN s-a conformat structurii și HPLC a arătat o puritate de 99,8% cu un raport diastereomeric de 46:54 (de asemenea confirmat prin ^{31}P RMN).

Metoda alternativă pentru producerea unui amestec solid de Compus 9. După cromatografie, reziduul a fost coevaporat de două ori cu diclormetan (5 mL/g) și uscat timp de 24 ore la 35-40°C, la 35-45 mTorr. Reziduul spumă a fost cernut printr-o sită de 250 microni și uscat în continuare în aceleași condiții până când diclormetanul rezidual a scăzut sub 400 ppm, măsurat prin spațiul superior GC. Pulberea amorfă fină cenușiu-albă până la albă rezultată are un interval de temperatură de vitrifiere de la 53,7 până la 63,5°C.

Caracterizarea Compusului 9 (amestec de izomeri):

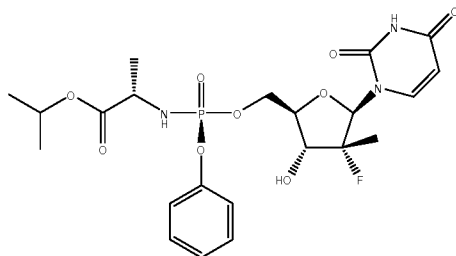
^1H -RMN (CDCl_3) 010,05 (br s, 1H, NH, *Sp*), 10,00 (br s, 1H, NH, *Rp*), 7,49 (d, 1H, C6-H, *Sp*), 7,36 (m, 5H, C6-H, *Rp*, aromatic), 7,23-7,14 (m, 6H, *Rp/Sp*, aromatic), 6,18 (br d, 2H, C1'-H, *Rp/Sp*), 5,63 (d, 1H, C5'-H, *Sp*), 5,58 (d, 1H, C5'-H, *Rp*), 5,01 (m, 2H, CH-(CH₃)₂ *Rp/Sp*), 4,46-4,33 (m, 8H, C-5'-H₂, ala-NH, C3'-OH, *Rp/Sp*), 4,12 (m, 2H, ala-CHCH₃, *Rp/Sp*), 4,01-3,85 (m, 4H, C3'-H, C4'-H, *Rp/Sp*), 1,39-1,22 (m, 12H, tot CH₃, *Rp/Sp*).

^{31}P -RMN (CDCl_3) 03,60 (*Rp*), 3,20 *Sp* față de trifenilfosfat la -17,80 ppm. SE-SM M+1 530,2. Analiza elementară: % calculat (inclusiv 0,29% apă astfel cum este depistat prin analiza Karl Fisher) C, 49,75; H, 5,54; N, 7,90, F, 3,58, P, 5,84. % depistat: C, 49,50; H, 5,44; N, 7,85; F, 3,62; P, 6,05.

Prepararea 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridinei [2] Exemplul 1)

Intr-un balon de 10 L, s-a adăugat 3',5'-O-dibenozil-2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metil-N4-benzoilcitudină (500 g, 0,874 mol) și 70% acid acetic apos (7,5 L). Soluția s-a încălzit la reflux (110°C) timp de 20 ore. CSS a indicat o reacție completă (*Rf* 0,6 în 5% metanol în diclormetan (HCL)). Amestecul s-a răcit la temperatura ambiantă și diluat cu apă (2 L). După agitare timp de 2 ore, precipitatul rezultat a fost colectat prin filtrare și solidul a fost spălat cu apă (5 L) și uscat în atmosferă la temperatura ambiantă timp de 12 ore pentru a obține 360 g (88%). Această dibenzoiluridină intermediară a fost utilizată direct în etapa următoare, prin adăugarea la amoniacul metanolic proaspăt preparat (5,4 L, cca 25%) la 0°C. Această temperatură s-a menținut timp de 3 ore și apoi s-a lăsat să se încălzească la 15°C, timp de 24 de ore. CSS a indicat o reacție completă (*Rf* 0,4 în 10% metanol în HCL). Amestecul de reacție s-a filtrat printr-un strat de Celită și s-a concentrat sub presiune redusă pentru a da produsul brut (216 g). Produsul brut s-a agitat cu acetat de etil (325 mL) timp de 3 ore la temperatura ambiantă. Solidul rezultat s-a colectat prin filtrare și s-a spălat cu acetat de etil (216 mL). Solidul a fost uscat sub vid la temperatura ambiantă timp de 4 ore pentru a obține 160 g (78%) de produs dorit în HPLC de 98,7% puritate. ^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$) 011,44 (br s, 1H, NH), 7,95 (d, 1H, C-6H), 5,97 (d, 1H, C-1'), 5,64 (d, 1H, C-5H), 3,84-3,77 (m, 3H, C-5'-Ha, C-3'H, C-4'H), 3,63-3,60 (m, 1H, C5'-Hb), 1,23 (d, 3H, C-2'-CH₃). SE-SM M-I 259.

Exemplul 10: Prepararea Compusului 10 [2].



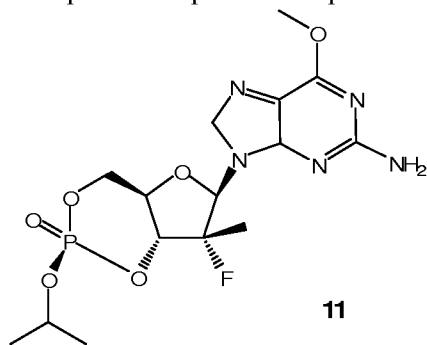
10

Precipitarea directă a Compusului 10 [2], Exemplul 4: La o soluție agitată de hidrociorură de ester izopropilic al L-alaninei (10,5 g, 61,5 mmol, uscat azeotropic, de două ori, cu 50 mL de toluen de fiecare dată) în diclormetan (100 mL) s-a adăugat fenidiclorofosfat (7,5 mL, 50 mmol) la temperatura camerei. Amestecul s-a răcit la -10°C și apoi s-a adăugat o soluție de N-metilimidazol (30,5 mL, 384,3 mmol) în 30 mL de diclormetan, timp de 30 de minute. După terminarea adăugării, amestecul s-a agitat între -10 și -15°C, timp de 1 oră. La amestecul de mai sus s-a adăugat 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridină (10 g, 38,4 mmol) (vezi exemplul US2010/0298257 1) într-un singur lot și amestecul a fost agitat sub -10°C timp de 3 ore și apoi lăsat să se încălzească încet până la 20°C. (6 ore). Amestecul s-a agitat la această temperatură peste noapte (15 ore) și apoi stins cu 10 mL de metanol. Solventul s-a evaporat și reziduul s-a redizolvat în acetat de etil (200 mL). Stratul de EtOAc a fost spălat cu apă (100 mL), HCl 1N (3x75 mL), soluție apoasă de 2% NaHCO₃ (50 mL) și soluție salină (50 mL). Stratul organic a fost uscat pe Na₂SO₄, filtrat și concentrat. Reziduul a fost uscat sub vid înalt timp de 2 ore pentru a se obține spumă albă (22 g).

Spuma de mai sus a fost dizolvată în 33 mL de HCl și apoi s-au adăugat 65 mL de eter izopropilic pentru a da o soluție saturată. Soluția a fost filtrată printr-un strat subțire de Celită și filtratul a fost agitat cu semințe de Compus 10 timp de 72 ore la temperatura ambiantă (circa 22°C – notați că răcirea suspensiei la 0°C a condus la impregnarea cu ulei a produsului brut). Solidul alb a fost filtrat, spălat cu eter izopropilic (20 mL) și uscat pentru a obține 4,58 g (~85:15 amestec de Compus 10 : izomer R la P, respectiv, astfel cum este determinat prin ³¹P RMN) de pulbere albă. Solidul de mai sus a fost suspendat în 23 mL de HCl și apoi refluxat timp de 3 ore. Amestecul s-a răcit la temperatura camerei și s-a agitat timp de 15 ore. Solidul alb a fost filtrat, spălat cu 4,5 mL de HCl rece și uscat sub vid la 45°C pentru a se obține Compusul pur 10, pt 93,9 la 104,7°C puritate HPLC 99,74% (3,11 g, 15,2% din nucleozida uridinei).

Compusul 10: ¹H-RMN (CDCl₃) δ 8,63 (br s, 1H, NH), 7,47 (d, 1H, C6-H), 7,30 (m, 2H, o-aromatic), 7,26-7,18 (m, 3H, m,p-aromatic), 6,18 (br d, H, C1'-H), 5,70 (d, H, C5'-H), 5,02 (sept, CH-(CH₃)₂), 4,53 (m, 2H, C-5'-H₂), 4,11 (d, H, C3'-H), 3,97 (m, 3H, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃), 3,77 (br s, H, ala-NH), 1,39 (d, 3H, C2'-CH₃), 1,37 (d, 3H, ala-CH₃), 1,24 (d, 6H, CH-(CH₃)₂).

Exemplul 11: Prepararea Compusului 11 (US 2010081628 A1 2010.04.01).



11

Sinteza 6-Etoxi-9-((4aR,6R,7R,7aR)-7-fluoro-2-izopropoxi-7-metil-2-oxo-tetrahidro-2,5-furo[3,2-d][1,3,2]dioxafosfinin-6-il)-9H-purin-2-il-aminei (Compusul 11) (Compusul 19, (US 2010081628 A1 2010.04.01))

(2R,3R,4R,5R)-5-(2-Amino-6-etoxi-purin-9-il)-4-fluoro-2-hidroximetil-4-metil-tetrahidrofuran-3-ol (150 mg, 0,46 mmol) s-a dizolvat în piridină anhidră (2 mL) la 0°C. O soluție de 0,45 M 1H-tetrazol în acetonitril (2,55 mL), urmat de bis (N,N-diizopropilamino) isopropilfosforamidit (0,16 mL, 0,55 mmol, 1,2 echiv.). Amestecul s-a lăsat să se încălzească lent la temperatura ambiantă timp de 3 ore. CSS a indicat o reacție completă. Reacția a fost stinsă prin adăugarea apei (0,1 mL). Soluția de reacție a fost concentrată sub presiune redusă și apoi reziduul a fost

triturat cu acetat de etil (5 mL). Precipitatul alb rezultat a fost eliminat prin filtrare și filtratul a fost concentrat sub presiune redusă.

Reziduul rezultat de fosfită ciclică intermediară a fost dizolvat în acetonitril (2 mL) și apoi tratat cu hidroperoxid de t-butil (70% în apă, 0,19 mL) timp de 5 ore la temperatura ambiantă. CSS a indicat o reacție completă. Soluția de reacție s-a concentrat sub presiune redusă și reziduul s-a purificat prin cromatografie în coloană (Analogix folosind un gradient de la 0 la 5% IPA în HCL). Cei doi diastereomeri (Compusul 11 și R-izomerul la P) au fost separați. Frațiunile conținând fiecare diastereomer au fost combinate separat și concentrate sub presiune redusă până la solide albe pentru a da 20 mg de fiecare diastereomer (randament combinat de 20%).

Compusul 11

^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO): δ = -6,49;

^1H -RMN (400 MHz, DMSO): δ = 8,17 (s, 1H), 6,47 (bs, 2H), 6,27 (d, J =21,2 Hz, 1H), 4,73-4,62 (m, 4H), 4,45 (q, J =7,0 Hz, 2H), 4,27-4,21 (m, 1H), 1,39-1,34 (m, 9H), 1,20 (d, J =22,8 Hz, 3H).

SM (IEP): m/z 432,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

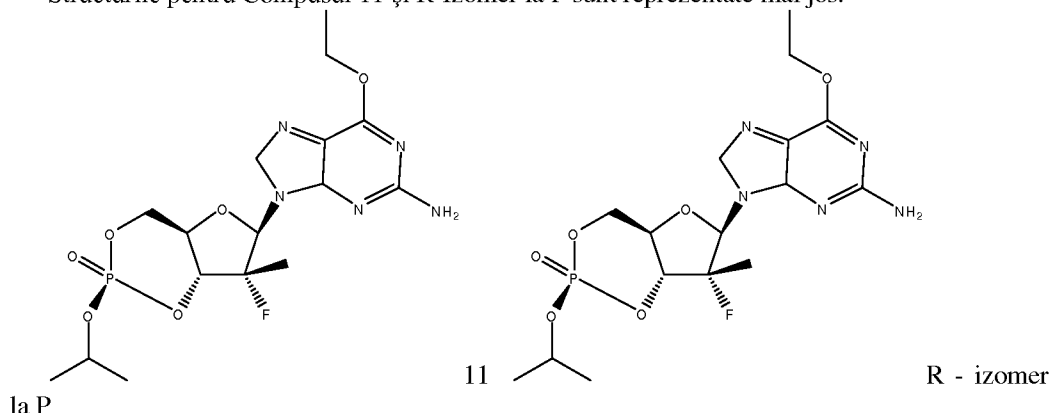
R-izomer la P

^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO): δ = -4,68;

^1H -RMN (400 MHz, DMSO): δ = 8,15 (s, 1H), 6,63 (s, 2H), 6,27 (d, J =21,2 Hz, 1H), 4,74-4,58 (m, 4H), 4,45 (q, J =6,4 Hz, 2H), 4,42-4,37 (m, 1H), 1,36 (t, J =7,2 Hz, 3H), 1,32 (d, J =3,6 Hz, 3H), 1,30 (d, J =3,6 Hz, 3H), 1,22 (d, J =22,8 Hz, 3H).

SM (IEP): m/z 432,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Structurile pentru Compusul 11 și R-Izomer la P sunt reprezentate mai jos.



la P

Sinteza (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-etoxi-9H-purin-9-il)-4-fluoro-2-(hidroximetil)-4-metiltetrahidro-furan-3-olului (Compusul 16, (US 2010081628 A1 2010.04.01))

Un balon uscat cu fund rotund de 500 mL a fost încărcat cu (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-cloro-9H-purin-9-il)-2-(benzoiloximetil)-4-fluoro-4-metiltetrahidrofuran-3-il benzoat (11 g, 20,92 mmol). Etanol anhidru absolut (210 mL) s-a adăugat, urmat de K_2CO_3 anhidru (28,91 g, 209,2 mmol). Suspensia a fost agitată și încălzită la 75°C sub azot timp de 5,5 ore. Toată materia primă inițială a fost consumată în acel moment prin testul CSS. Amestecul a fost răcit la temperatura camerei și solidul a fost filtrat. Filtratul a fost neutralizat prin adăugarea acidului acetic glacial (2,52 g) la pH~7 și concentrat sub presiune redusă. Reziduul a fost dizolvat în metanol și amestecat cu silicagel (15 g). Amestecul uscat de produs brut și silicagel a fost transferat într-un cartuș gol și separat prin cromatografie în coloană (Analogix 220 g, gradient de 0 la 15% MeOH în DCM) pentru a se obține produsul (5% MeOH în DCM) sub formă de spumă albă solidă (3,73 g, 54,5%). Un al doilea solid alb a fost izolat din coloană (10% MeOH în DCM, 1,44 g) și a fost un amestec de doi dimeri de nucleozidă. Un polar suplimentar, al treilea solid alb a fost colectat din coloană (15% MeOH în DCM, 0,47 g) și a fost un amestec de trimeri de nucleozidă. Purity HPLC a produs 99,94%.

^1H -RMN (DMSO- d_6): δ 8,16 (s, H, 8-H), 6,55 (s, 2H, NH_2), 6,04 (d, H, C1'-H), 5,66 (d, H, 3'-OH), 5,24 (m, H, 5'-OH), 4,44 (q, 2H, 6-O CH_2), 4,23-4,08 (m, H, C3'-H), 3,91-3,82 (m, 2H, C4'-H- și C5'-H $_a$), 3,71-3,66 (m, H, C5'-H $_b$), 1,36 (t, 3H, CH_3 de etil), 1,06 (d, 3H, C2'- CH_3).

Sinteza (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-cloro-9H-purin-9-il)-2-(benzoiloximetil)-4-fluoro-4-metiltetrahidrofuran-3-il benzoatului (Compusul 12, (US 2010081628 A1 2010.04.01))

Un balon cu trei gâturi cu fund rotund de 12 L a fost încărcat cu 6-cloro-2-aminopurină (225,4 g, 1,329 mol). Tert-BuOH anhidru (4,5 L) s-a adăugat și soluția a fost agitată cu un

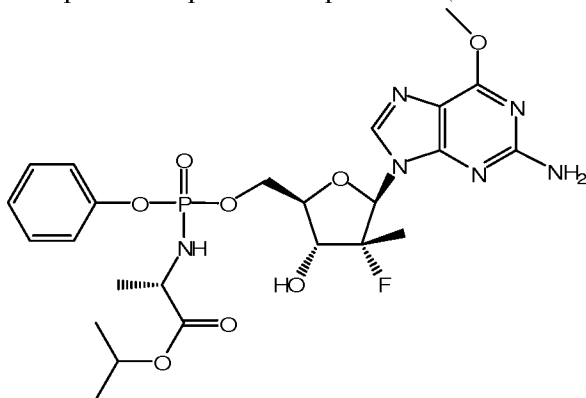
agitator mecanic la temperatura ambiantă. Terț-butoxid de potasiu (solid, 151,6 g, 1,35 mol) s-a adăugat în porțiuni sub un curent de azot gazos sub agitare. Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de încă 30 min. Un balon cu fund rotund de 5 L a fost încărcat cu α -bromura (10, 197 g, 0,451 mol) și 3 L de acetonitril anhidru la temperatura ambiantă. Soluție de bromură a fost adăugată la suspensia de bază purinică timp de 1 min la temperatura ambiantă. Balonul de 5 L s-a clătit cu acetonitril (2x1 L) pentru a transfera bromura complet la amestecul de reacție. Amestecul s-a încălzit treptat la 50°C timp de 2 ore cu o manta de încălzire și un controler, și agitat timp de 20 ore. Reacția a fost aproape completă după cum s-a demonstrat prin CSS beta (Rf 0,28, 30% acetat de etil în hexan). Reacția a fost stinsă prin adăugarea. NH₄Cl saturate (200 mL) pentru a forma o suspensie. Solidul suspendat a fost îndepărtat prin filtrare printr-un strat de Celită de 3 cm într-o pâlnie Buchner de porțelan de 2,5 L. Solidul a fost spălat cu toluen (3x100 mL). Filtratul combinat a fost neutralizat prin adăugarea soluției de HCl 6 N până la pH 7 (aproximativ 220 mL). Amestecul a fost concentrat sub presiune redusă. Când volumul amestecului a fost redus la aproximativ o treime volum, solidul precipitat suplimentar a fost îndepărtat prin filtrare într-o manieră similară. Filtratul a fost concentrat în continuare până la un volum de aproximativ 800 mL. Reziduul a fost încărcat pe o coloană cu obturator (1,6 kg silicagel de grad flash, într-o pâlnie Buchner de sticlă sinterizată de 6 L) și eluat (prin aspirație) cu un gradient de 10% acetat de etil în hexani (6 L) pentru a îndepărta impuritățile nepolare, 30% acetat de etil în hexani pentru a se obține o cantitate mică de lactol (6 L), și apoi 40% -45% acetat de etil în hexani (4 L) pentru a elua cantitatea principală de produs. Frațiunile conținând produsul au fost combinate, concentrate sub presiune redusă și uscate sub vid (0,2 mm Hg, 24 ore, temp. ambiantă) până la o spumă albă solidă (150,7 g, $\beta/\alpha=14:1$ prin RMN. ¹H-RMN. (CDCl₃) β : $\delta=1,33$ (d, 22,4 Hz, 2'-C-CH₃), α : 1,55 (d, 22 Hz, 2'-C-CH₃).

Spuma produsă a fost dizolvată în metanol (700 mL) la temperatura ambiantă. La maturare, un solid s-a format lent timp de 2 ore. Suspensia a fost răcită într-un congelator până la -5°C, timp de 17 ore. Solidul alb rezultat a fost colectat prin filtrare și spălat cu MeOH rece (-5°C 3x60 mL) și eter etilic (3x100 mL). Solidul a fost uscat sub vid (0,2 mm Hg, 24 ore, temp. ambiantă) pentru a se obține 110,5 g de β -produs excelent (β/α 99,8:1 prin HPLC). Filtratul a fost parțial concentrat (cca. 400 mL) și apoi diluat cu mai mult metanol (400 mL) cu încălzire la 60°C. Soluția a fost răcită la temperatura ambiantă, cristalizată și răcită la -5°C. A doua recoltă a fost colectată, spălată și uscată într-un mod similar pentru a da mai mult produs ca un solid alb (12,26 g) cu puritate diastereomerică similară. Lichidul mamă a fost concentrat până la uscare sub presiune redusă (cca. 25 g). Reziduul a fost un amestec de β și α -izomeri. Acesta a fost supus cromatografiei automatizate în coloană pe silicagel (Analogix, cartuş de 240 g, 40% până la 50% acetat de etil în hexani) pentru a se obține 14,52 g de produs spumă care a fost recristalizat din MeOH, spălat și uscat într-un mod similar pentru a se obține 8,46 g suplimentare de produs cu puritate mare.

Cele trei substanțe solide au fost considerate a fi de puritate similară și au fost combinate pentru a da 131,2 g de produs cristalin alb (55% din bromosugar, 49% din lactol). Pt 160,5 la 162,0°C. Puriitate prin HPLC de 99,5%, inclusiv 0,20% α .

¹H-RMN (β -anomer pur, CDCl₃): $\delta=8,03$ (m, 2H, arom.), 7,93 (m, 2H, arom.), 7,88 (s, 1H, C8-H), 7,60 (m, 1H, arom.), 7,50 (m, 1H, arom.), 7,44 (m, 2H, arom.), 7,33 (m, 2H, arom.), 6,44 (dd, 1H, C1'-H), 6,12 (d, 1H, C3'-H), 5,35 (s, 2H, NH₂), 5,00 (dd, 1H, C5'-Ha), 4,76 (m, 1H, C4'-H), 4,59 (dd, 1H, C5'-Hb), 1,33 (d, 3H, CH₃).

Exemplul 12: Prepararea Compusului 12 (US 2011015146 A1 2011.01.20).



Sinteza (2S)-izopropil2-(((2R,3R,4R,5R)-5(2-amino-6-metoxi-9H-purin-9-il)-4-fluoro-3hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi) (fenoxi) fosforilaminoacid)propanoatului

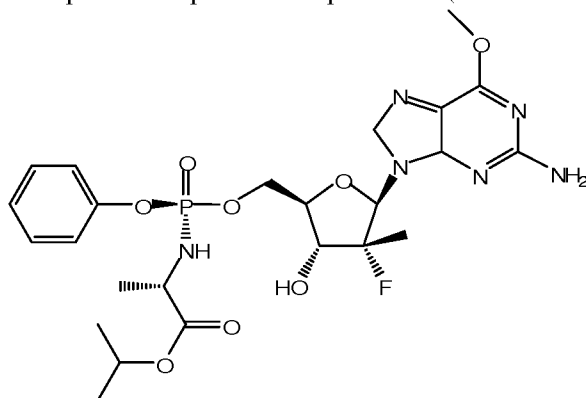
Un balon uscat cu fund rotund de 250 mL a fost încărcat cu fenildiclorfosfat (2,66 g, 12,61 mmol) și diclormetan anhidru (40 mL). Sare a aminoesterului (2,60 g, 15,53 mmol) s-a adăugat la soluție și amestecul s-a răcit la -5°C. N-Metil imidazol (7,7 mL, 97 mmol) s-a adăugat apoi rapid prin intermediul unei seringi uscate la -5°C și soluția s-a agitat la -5°C, timp de 1 oră. Nucleozidă ((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-metoxi-9H-purin-9-il)-4-fluoro-2-(hidroximetil)-4-metiltetrahidrofuran-3-ol), 3,04 g, 9,7 mmol) s-a adăugat dintr-o fiolă într-o porție la -5°C și solidul s-a dizolvat lent timp de 20 de minute. Temperatura de reacție a fost lăsată să se încălzească până la temperatura ambiantă timp de 2 ore. După 17 ore, reacția nu a fost completă. Mai mulți reactivi au fost produși (de la fosfat (2,66 g), aminoester (2,60 g) și N-metil imidazol (3,8 mL, 48 mmol)) și s-au adăugat la amestecul de reacție la -5°C. Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de încă 2 ore. Reacția a fost aproape completă după cum s-a demonstrat prin rezultatul CSS și s-a diluat cu 70 mL de diclormetan. S-a adăugat soluție de HCl (1N, 70 mL). Stratul apos s-a separat și s-a extras cu diclormetan. Stratul organic s-a spălat cu soluție saturată de NaHCO₃, apă, soluție salină și s-a uscat pe MgSO₄. După îndepărtarea solventului sub presiune redusă, reziduul lipicios s-a purificat prin cromatografie în coloană automatizată folosind un cartuș de 240 g și un gradient de 0-8% 2-PrOH în diclormetan pentru a se obține produsul sub formă de spumă solidă (4,16 g, 7,14 mmol, 73% randament). Purity HPLC de 97,4%. Spectrele RMN a produsului a arătat că este un amestec de doi diastereoizomeri cu un raport de 1,2:1.

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ=7,98 (1H, s, H-8 al unui izomer), 7,95 (1H, s, H-8 al unui alt izomer), 7,37-7,32 (2H, m, arom-H), 7,22-7,15 (3H, m, arom-H), 6,6 (2H, s, NH₂), 6,11 (1H, d, Cl'-H al unui izomer), 6,09 (1H, d, H-Cl' al altui izomer), 6,09-5,98 (1H, m, amidă NH), 5,88 (1H, d, 3'-OH al unui izomer), 5,81 (1H, d, 3'-H al altui izomer), 4,85-4,75 (1H, hepta, metina H a izopropilului), 4,46-4,27 (2H, m, C4'-H, α-H a aminoesterului), 4,15-4,07 (1H, m, C3'-H), 3,96 (3H, s, OCH₃), 3,82-3,72 (2H, m, C5'-Ha și C5'-Hb), 1,23-1,06 (9H, m, CH₃ a aminoesterului), 1,03 (3H, d, C2'-CH₃).

³¹P-RMN (DMSO-d₆): 0=4,91 (un izomer), 4,72 (un alt izomer).

O metodă alternativă de purificare este de a modifica chimic produsul secundar minor 3' fosforamidatul, în scopul de a simplifica separarea cromatografică. Produsul fosforamidat brut este dizolvat în piridină anhidră (5 mL/g) și tratat cu 0,5 echivalenți molari ai clorurii de t-butildimetilsilil la temperatura ambiantă pentru a reacționa selectiv cu 5' hidroxilul primar liber al impurității 3' izomerului. Mersul reacției poate fi monitorizat prin CL/SM. După convertirea 3' izomerului într-un derivat de 5'-tBDMS-3'-fosforamidat, reacția este stinsă cu metanol (3 echiv.), concentrat sub presiune redusă, împărțit între acetat de etil și 5%acid citric și apoi stratul organic este concentrat. Reziduul este apoi supus cromatografiei care poate fi realizată acum cu o încărcare mai mare și un gradient mai rapid și pentru a atinge o puritate mai mare.

Exemplul 13: Prepararea Compusului 13 (US 2011015146 A1 2011.01.20).

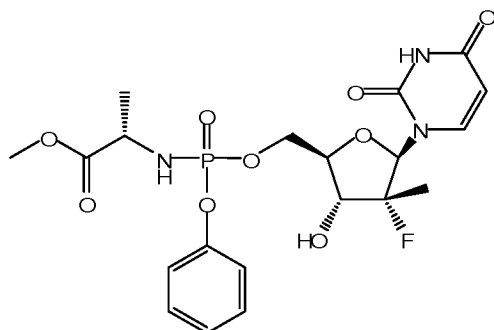


40

13

Exemplul 14: Prepararea Compusului 14 (din [1], Exemplul 5)

73

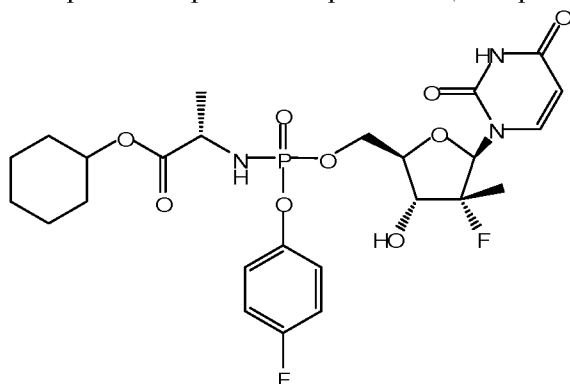


14

Prepararea 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridin-5'-fenil metoxi-alanil fosfatului

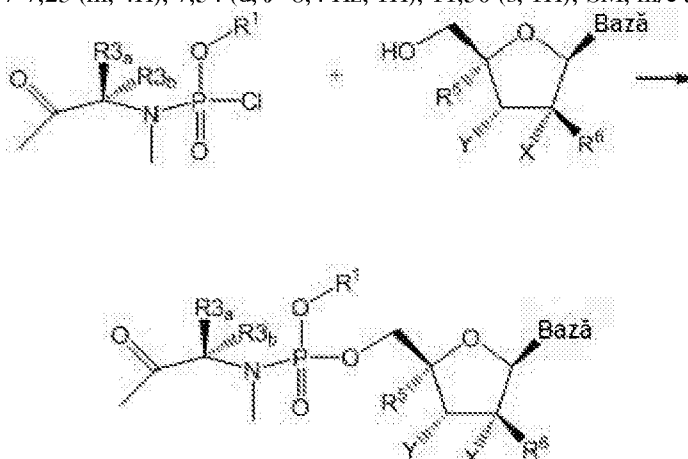
- 5 Fenil metoxialanil fosforocloridat (1 g, 6,5 echiv.) dizolvat în 3 mL de THF s-a adăugat la un amestec de 2'-Deoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridină (0,15 g, 1 echiv.) și N-metilimidazol (0,3 g, 8 echiv.) în 3 mL de THF cu agitare puternică la temperatura camerei, apoi amestecul de reacție s-a agitat peste noapte. Solventul a fost îndepărtat prin presiune redusă. Produsul brut rezultat a fost dizolvat în metanol purificat prin HPLC preparativă pe o coloană YMC 25x30x2 mm, folosind o fază mobilă a gradientului de eluție apă/acetonitril. Acetonitrilul și apa s-au îndepărtat sub presiune redusă pentru a da produsul dorit (50,1 mg, 15,6%). ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 1,20-1,27 (m, 6H), 3,58 (d, J=16,0 Hz, 3H), 3,75-3,92 (m, 2H), 4,015-4,379 (m, 2H), 5,54 (t, J=10,2 Hz, 1H), 5,83-5,91 (m, 1H), 6,00-616 (m, 1H), 7,18 (d, J=8,0 Hz, 2H), 7,22 (s, 1H), 7,35 (t, J=4,4 Hz, 2H), 7,55 (s, 1H), 11,52 (s, 1H); SM, m/e 502 (M+1)⁺.
- 10

Exemplul 15: Prepararea Compusului 15 (Exemplul 55, din [1]).



15

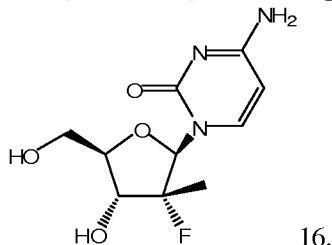
- 15 ¹H RMN (DMSO-d₆) δ >1,20-1,44 (m, 12H), 1,60-1,71 (m, 4H), 3,75-4,02 (m, 2H), 3,94-4,02 (m, 1H), 4,19-4,26 (m, 2H), 4,59-4,61 (m, 1H), 5,57 (t, J=8,4 Hz, 1H), 5,85-6,06 (m, 3H), 7,17-7,23 (m, 4H), 7,54 (d, J=8,4 Hz, 1H), 11,50 (s, 1H); SM, m/e 587,92 (M+1)⁺



- 20 O procedură generală pentru derivații nucleozidici de fosforamidat este raportată la coloana 461 din [1]. O soluție de fosforocloridat potrivit (6,5 echivalenți) în tetrahidrofuran anhidru (THF) poate fi adăugată la un amestec de nucleozidă (1 echivalent) și N-metilimidazol (8 echivalenți) în THF anhidru cu agitare puternică la temperatura camerei, cu amestecul de reacție agitat peste noapte. Solventul poate fi îndepărtat sub vid și produsul brut purificat prin

cromatografie în coloană și/sau cromatografie preparativă în strat subțire pentru a obține compusul dorit.

Exemplul 16: Prepararea Compusului 16 (US 7429572 B2 2008.09.30)



16.

5 Sinteza (2'R)-2'-Deoxi-2'-Fluoro-2'-C-Metilcitidinei pornind de la Citidină

Etapa 1: La o suspensie de citidină (100 g, 0,411 mol) în DMF (2,06 L) s-a adăugat anhidridă benzoică (102,4 g, 0,452 mol). Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 20 ore. DMF a fost îndepărtat în vid și reziduul a fost triturat cu eter dietilic. Solidul rezultat a fost colectat prin filtrare cu aspirare și spălat cu eter dietilic (2x200 mL). Uscarea ulterioară în vid la temperatura camerei a dat N_4 benzamida (140,6 g, 98,3%). O porțiune din acest material (139,3 g, 0,401 mol) a fost dizolvată în piridină anhidră (1,2 L) și a fost tratată cu 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraizopropil-disiloxan (141,4 mL, 0,441 mol) la temperatura camerei. Soluția a fost agitată la temperatura camerei peste noapte. Amestecul a fost concentrat aproximativ până la uscare în vid și coevaporat cu toluen (3x200 mL). Reziduul a fost tratat cu EtOAc (1,8 L) și spălat cu HCl (2x200 mL, 0,05 N), $NaHCO_3$ (5%, 2x400 mL). Stratul organic a fost spălat, uscat (Na_2SO_4), filtrat și evaporat până la uscare. Compusul 16-1 (Compusul 4-1 din US 7429572 B2 2008.09.30) (256,5 g, >100%) a fost izolat ca o spumă albă și utilizat fără purificare suplimentară.

Etapa 2: Compusul 16-1 (236,5 g, 0,40 mol) a fost dizolvat în THF uscat (1,22 L). DMSO anhidru (180,8 mL, 2,1 mol) s-a adăugat și soluția rezultată a fost răcită la între -20°C și -15°C. Anhidridă trifluoracetică (90,6 mL, 0,64 mol) s-a adăugat prin picurare timp de 45 min și soluția s-a agitat între -20°C și -15°C timp de 2 ore, după care trietilamină anhidră (223,5 mL, 1,6 mol) s-a adăugat timp de 20 min. Reacția brută conținând cetona 16-2 a fost dizolvată în EtOAc (500 mL), iar soluția rezultată a fost spălată cu H_2O (3x400 mL), uscată (Na_2SO_4) și solvenții s-au îndepărtat în vid pentru a da un solid galben care a fost purificat într-o coloană pe silicagel, eluand cu un gradient treptat de Et_2O (0-60%) în hexani urmat de un gradient treptat de EtOAc (50-100%) în hexani. Cetona brută astfel obținută (~192 g) a fost cristalizată din eter de petrol pentru a da cetona 16-2 (Compusul 4-2 din US 7429572 B2 2008.09.30) (138,91 g, 57,5% din citidină) sub forma unui solid alb g și 22 g de materie primă inițială nereacționată, 16-1, ca un solid galben.

Etapa 3: Compusul 16-2 (48,57 g, 8,26 mmol) a fost dizolvat în toluen anhidru (~400 mL) și solventul a fost îndepărtat în vid cu excluderea umidității. Reziduul a fost apoi uscat suplimentar în vid (pompă de ulei) timp de încă 2 ore. Cu excluderea strictă a umidității, spuma reziduală a fost dizolvată în eter dietilic anhidru (1,03 L) sub argon. Soluția rezultată a fost răcită la -78°C sub argon și MeLi (1,6 M, 258,0 mL, 0,413 mol) a fost adăugat prin picurare printr-o pâlnie suplimentară. După ce adăugarea a fost completă, amestecul a fost agitat timp de 2 ore la -78°C. NH_4Cl 1M apoasă (500 mL) a fost adăugată încet. După încălzire la temperatura camerei, amestecul a fost spălat cu H_2O (2x500 mL), uscat (Na_2SO_4) și apoi concentrat până la uscare pentru a da o spumă cafenier (~60 g, >100%).

Reacția a fost realizată de încă două ori folosind 37,62 g și 56,4 g de compus 16-2. Produsele brute combinate (128,0 g, 0,212 mol) au fost dizolvate în THF (1,28 L) și tratate cu HOAc concentr. (23 mL, 0,402 mol). La soluție s-a adăugat TBAF (384,0 mL, 1M în THF). Soluția s-a agitat la temperatura camerei timp de 0,75 oră și amestecul a fost tratat cu silicagel (750 g) și concentrat până la uscare. Pulberea a fost plasată într-o coloană pe silicagel ambalată în CH_2Cl_2 . Eluția cu 1:7 EtOH- CH_2Cl_2 a oferit un solid ceros de culoare închisă, care a fost preadsorbit pe silicagel (300 g) și cromatografiat ca înainte. Compusul 16-3 (Compusul 4-3 din US 7429572) (46,4 g, 53,0% 16-2) a fost izolat ca un solid alb-cenușiu. 1H RMN ($DMSO-d_6$): δ 1,20 (s, 3H, CH_3), 3,62-3,69 (m, 2H), 3,73-3,78 (m, 2H), 5,19 (t, 1H, $J=5,4$ Hz, OH-5'), 5,25 (s, 1H, OH-2'), 5,52 (d, 1H, $J=5,0$ Hz, OH-3'), 5,99 (s, 1H, H-1'), 7,32 (d, 1H, $J=5,8$ Hz), 7,05 (wt, 2H, $J=7,7$ Hz), 7,62 (wt, 1H, $J=7,3$ Hz), 8,00 (d, 2H, $J=7,3$ Hz), 8,14 (d, 1H, $J=6,9$ Hz), 11,22 (s, 1H, NH). Calculată anal. pentru $C_{17}H_{19}N_3O_6 \cdot 0,5 H_2O$: C, 55,13; H, 5,44; N, 11,35. Depistată: C, 55,21; H, 5,47; N, 11,33.

Etapă 4: Compusul 16-3 (46,0 g, 0,13 mol) a fost dizolvat în piridină anhidră și concentrat până la scare în vid. Siropul rezultat s-a dizolvat în piridină anhidră sub argon și răcit la 0°C cu agitare. Soluția brună a fost tratată cu clorură de benzoil (30 mL, 0,250 mol) prin picurare timp de 10 min. Baia de gheață a fost îndepărtată și agitarea a continuat timp de 1,5 ore, în care CSS a arătat absența materiei prime inițiale rămase. Amestecul a fost stins prin adăugarea apei (5 mL) și concentrat până la uscare. Reziduul a fost dizolvat într-o cantitate minimă de CH₂Cl₂ și spălat cu soluție saturată de NaHCO₃ (1x500 mL) și H₂O (1x500 mL). Faza organică a fost uscată (Na₂SO₄) și filtrată, concentrată până la uscare se cromatografiază pe silicagel, eluând cu un gradient treptat de EtOAc-hexani (25-60%) pentru a furniza compusul 16-4 sub formă de spumă galbenă (Compusul 4-4 din US 7429572) (48,5 g, 67%). ¹H RMN (CDCl₃): δ 1,64 (s, 3H, CH₃), 4,50 (m, 1H, H-4), 4,78-4,85 (m, 2H, H-5', 5a'), 5,50 (d, H, J=3,4 Hz, H-3'), 6,42 (s, H, H-1), 7,44-7,54 (m, 7H, Ar), 7,57-7,66 (m, 3H, Ar), 7,94 (d, 2H, J=7,8 Hz), 8,05-8,09 (m, 4H, Ar), 8,21 (d, 1H, J=7,3 Hz). Calculată anal. pentru C₃₁H₂₇N₃O₈: C, 65,37; H, 4,78; N, 7,38. Depistată: C, 65,59; H, 4,79; N, 7,16.

Etapă 5: Compusul 16-4 (7,50 g, 0,013 mol) a fost dizolvat în toluen anhidru (150 mL) sub argon și răcit la -20°C. DAST (2,5 mL, 18,9 mmol) s-a adăugat încet și baia de răcire a fost îndepărtată după ce adăugarea a fost completă.

Agitarea a fost continuată timp de 1 oră și amestecul a fost turnat în soluție saturată de NaHCO₃ (100 mL) și spălat până când degajarea gazului a încetat. Faza organică a fost uscată (Na₂SO₄), concentrată și purificată prin cromatografie pe silicagel eluând cu 1:1 EtOAc-hexani. Randamentul a fost de 1,22 g (16,3%) de 16-5 pur (Compusul 4-5 din US 7429572 B2 2008.09.30) ca un solid alb cu punctul de topire 241°C. (CH₂Cl₂-hexani); ¹H RMN (CDCl₃): δ 1,49 (d, 3H, J=22,4 Hz, CH₃), 4,64 (dd, 1H, J=3,44, 12,9 Hz, H-5'), 4,73 (d, 1H, J=9,5 Hz, H-4'), 4,90 (dd, 1H, J=2,4, 12,7 Hz, H-5a'), 5,56 (dd, 1H, J=8,6, 20,7 Hz, H-3'), 6,52 (d, 1H, J=18,0 Hz, H-1'), 7,47-7,57 (m, 7H, Ar), 7,62-7,71 (m, 3H, Ar), 7,89 (d, 2H, J=6,9 Hz), 8,07-8,11 (m, 5H, Ar), 8,67 (bs, 1H, NH). ¹⁹F RMN (CDCl₃): 3,3 δ (m) calculată anal. Pentru C₃₁H₂₆FN₃O₇·0,7 H₂O: C, 63,74; H, 4,72; N, 7,20. Depistată: C, 63,71; H, 4,54; N, 7,20.

Etapă 6: Compusul 16-5 (6,30 g, 0,011 mol) a fost suspendat în amoniac metanolic (cca 7 N, 150 mL) și agitat la temperatura camerei peste noapte. Solventul a fost îndepărtat în vid, coevaporat cu metanol (1x20 mL) și preadsorbit pe silicagel. Pulberea albă a fost plasată într-o coloană pe silicagel (ambalată în CHCl₃) și coloana a fost eluată cu 9% EtOH în CHCl₃, apoi 17% EtOH și în final cu 25% etanol în CHCl₃. Concentrarea fracțiilor care conțin produsul, filtrarea printr-un disc de 0,4 μm și liofilizarea din apă au dat compusul 16-6 (Compusul 4-6 din US 7429572), 2,18 g (76%). ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 1,17 (d, 3H, J=22,3 Hz, CH₃), 3,63 (dd, 1H, J=2,7, 13,7 Hz, H-5'), 3,70-3,84 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,24 (app s, 1H, OH-3'), 5,60 (d, 1H, J=5,4 Hz, H-5'), 5,74 (d, 1H, J=7,71 Hz, H-5), 6,07 (d, 1H, J=18,9 Hz, H-1'), 7,31 (s, 1H, NH₂), 7,42 (s, 1H, NH₂), 7,90 (d, 1H, J=7,3 Hz, H-6). ¹⁹F RMN (DMSO-d₆): δ 2,60 (m). Calculată anal. pentru C₁₀H₁₄FN₃O₄·4.1.4 H₂O: C, 44,22; H, 5,95; N, 14,77. Depistată: C, 42,24; H, 5,63; N, 14,54. Compusul 16-6 (0,10 g, 0,386 mmol) a fost transformat în sare de hidroclorură prin dizolvare în apă (2 mL) și ajustarea pH-ului la aproximativ 3,0 cu HCl 1M. Apa a fost îndepărtată în vid și reziduul s-a cristalizat din EtOH apos pentru a da 16-6 sub formă de sare de hidroclorură (71,0 mg). Punctul de topire 24°C (desc); ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 1,29 (d, 3H, J=22,6 Hz, CH₃), 3,65 (dd, 1H, J=2,3, 12,7 Hz, H-5'), 3,76-3,90 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,96 (d, 1H, J=17,3 Hz, H-1'), 6,15 (d, 1H, J=7,9 Hz, H-5), 8,33 (d, 1H, J=7,9 Hz, H-6), 8,69 (s, 1,5 H, NH), 9,78 (s, 1,5 H, NH). ¹⁹F RMN (DMSO-d₄): δ 1,69 (m). Calculată anal. pentru C₁₀H₁₄FN₃O₄·HCl: C, 40,62; H, 5,11; N, 14,21. Depistată: C, 40,80; H, 5,09; N, 14,23.

Exemple biologice

Protocolul testului

Test replicon de mare productivitate (HTBS)

Celule replicon care adăpostesc H77 (genotipul 1a) sau Con1 (genotipul 1b) ARN VHC și reporterul luciferazei Renilla au fost înșămânțate în plășete negre cu 384 godeuri la o densitate de $1,6 \times 10^3$ celule per godeu în 90 μL de mediu de cultură DMEM, cu excepția G 418. Compușii au fost diluați în serie în 100% DMSO și adăugați la celule la o diluție 1:225, atingând o concentrație finală de 0,44% DMSO într-un volum total de 90 μL cu o Biotek μFlow Workstation. Plășetele cu celule au fost incubate la 37°C cu 5% CO₂ timp de 3 zile, după care mediile de cultură au fost îndepărtate și celulele au fost testate pentru activitatea luciferazei ca un marker pentru nivelul de replicare. Expresia luciferazei a fost măsurată folosind reactivi chimici Dual-Glo pentru analiza activității luciferazei (Promega, Madison, WI). Pe scurt, 20 μL de tampon Dual-Glo pentru analizarea activității luciferazei s-a adăugat pentru liza celulelor timp de 10

minute și ulterior 20 μ L dintr-un substrat Duial-Glo Stop & Glo diluat (1:100) s-a adăugat la fiecare godeu. Semnalul de luminescență a fost măsurat pe un spectrofotometru pt. citirea plășetelor Perkin Elmer Envision Plate Reader după incubare timp de 10 minute. Nivelele de luciferază au fost convertite în procente în raport cu martorii netratați (definite ca 100%) și datele au fost potrivite pentru ecuația logistică a reacției la doză $y = a/(1+(x/b)^c)$ utilizând software-ul XLFit4 (IDBS, Emeryville, CA). Valorile EC_{50} au fost calculate din ecuațiile rezultate. Alternativ, activitatea antivirală poate fi analizată prin Determinarea IC_{50} ale proteazei NS3 VHC. Activitatea proteazei NS3 VHC a fost monitorizată folosind un substrat de depsipectidă pentru transferul energiei rezonanței fluorescente (FRET) (RET S1, AnaSpec, San Jose, CA) bazat pe metoda Taliani, Taliani M, Bianchi E, F Narjes, Fossatelli M, Urbani A, Steinkuhler C, et al. Un test continuu al proteazei virusului hepatitei C pe baza substraturilor de depsipectidă pentru transferul energiei rezonanței (MarinaTaliani et al. A Continuous Assay of Hepatitis C Virus Protease Based on Resonance Energy Transfer Depsipectide Substrates. Analytical Biochemistry, 1996, vol. 240, nr. 1, p. 60-67), încorporată aici prin referință în ceea ce privește efectuarea acestui test.

Pe scurt, 2–10 nM de domenii ale proteazei NS3 purificate au fost preincubate la 37°C timp de 10 minute cu 20 μ M de cofactori peptidici NS4A izogenici (Sigma, St. Louis, MO), în 40% de tampon glicerol, cu 50 mM HEPES pH 7,5 și 10 mM DTT. Compușii au fost diluați în serie 1:3 în DMSO, incubati cu amestec enzimă/cofactor timp de 10 minute și reacțiile au fost inițiate prin adăugarea a 2 μ M de substrat RET S1 (concentrație finală). Creșterea fluorescenței a fost măsurată în mod continuu timp de o oră utilizând un spectrofotometru pt. citirea plășetelor de fluorescență Victor3 V (Perkin Elmer, Waltham, MA). Vitezele inițiale au fost calculate pentru fiecare concentrație a inhibitorului, folosind software-ul Workout 1,5 (DAZDAQ, East Sussex, UK) cu algoritmul de înclinare maximă. Datele de viteză au fost convertite în procente în raport cu grupul de control netratat (definite ca 100%) și regresia neliniară a fost efectuată pentru a calcula concentrațiile inhibitoare de 50% (valorile IC_{50}).

Potența enzimatică a NS3: Proteaza NS3 purificată este complexată cu peptida NS4A și apoi incubată cu diluții seriale ale compușilor (DMSO folosit ca solvent). Reacțiile sunt inițiate prin adăugarea substratului peptidic marcat dublu și creșterea cinetică rezultată în fluorescență este măsurată. Regresie neliniară a datelor de viteză este efectuată pentru a calcula IC_{50} . Activitatea este inițial testată împotriva proteazei genotipului 1b. În funcție de potența obținută împotriva genotipului 1b, genotipuri suplimentare (1a, 2a, 3) și/sau enzime rezistente la inhibitorul proteazei (mutanții D168Y, D168V sau A156T) pot fi testate. BILN-2061 este utilizat ca un martor pe parcursul tuturor testelor. Compușii din Exemple au fost evaluați în acest test și s-au dovedit a avea valori IC_{50} mai mici de aproximativ 1 μ M.

Potența și citotoxicitatea repliconului: celule Huh-luc (replicand stabil repliconul genotipului 1b Bartenschlager's I389luc-ubi-neo/NS3-3'/ET) sunt tratate cu diluții seriale ale compusului (DMSO este folosit ca solvent) timp de 72 ore. Numărul de copii replicon este măsurat prin bioluminescență și regresia neliniară se efectuează pentru a calcula valorile EC_{50} . Plășete paralele tratate cu aceleași diluții de medicament sunt testate pentru citotoxicitate utilizând testul viabilității celulare Promega CellTiter-Glo. În funcție de potența obținută împotriva repliconului 1b, compușii pot fi testați împotriva unui replicon al genotipului 1a și/sau repliconilor rezistenți la inhibitor codificând mutațiile D168Y sau A156T. BILN-2061 este folosit ca un martor pe parcursul tuturor testelor. Compușii din Exemple au fost evaluați în acest test și s-au dovedit a avea valori EC_{50} mai mici de aproximativ 5 μ M.

Efectul proteinelor serice asupra potenței repliconului

Testele repliconului sunt efectuate în mediu normal de cultură celulară (DMEM + 10% FBS) suplimentat cu concentrații fiziologice ale albuminei serice umane (40 mg/mL) sau glicoproteinei α -acide (1 mg/mL). EC_{50} în prezența proteinelor serice umane sunt comparate cu EC_{50} în mediu normal pentru a determina modificarea conformațională a potenței.

Selectivitatea enzimatică: inhibarea proteazelor de la mamifere inclusiv a elastazei pancreatice porcine, elastazei leucocitelor umane, proteazei 3 și cathepsinei D este măsurată la K_m pentru substraturile respective pentru fiecare enzimă. IC_{50} pentru fiecare enzimă este comparată cu IC_{50} obținută cu NS3 proteaza 1b pentru a calcula selectivitatea.

Citotoxicitatea celulelor MT-4: celulele MT4 sunt tratate cu diluții seriale de compuși pentru o perioadă de cinci zile. Viabilitatea celulară este măsurată la sfârșitul perioadei de tratament utilizând testul Promega CellTiter-Glo și regresia neliniară este realizată pentru a calcula CC_{50} .

Concentrația compusului asociat cu celulele la EC_{50} : culturile Huh-Luc sunt incubate cu compus la concentrații egale cu EC_{50} . La mai multe momente de timp (0-72 ore), celulele sunt

spălate de 2 ori cu mediu rece și extrase cu 85% de acetonitril; un eșantion al mediului la fiecare moment de timp este de asemenea extras. Extractele celulare și de medii sunt analizate prin CL/SM/SM pentru a determina concentrația molară a compușilor din fiecare fracție.

5 Solubilitatea și stabilitatea: Solubilitatea este determinat prin luarea unei probe alicvot de 10 mM de soluție-mamă de DMSO și prepararea compusului la o concentrație finală de 100 μ M în soluțiile-test de medii (PBS, pH 7,4 și HCl 1N, pH 1,5) cu o total concentrație de DMSO de 1%. Soluțiile-test de medii sunt incubate la temperatura camerei cu agitare timp de 1 oră. Soluțiile sunt apoi centrifugate și supernatanții recuperați sunt analizate pe HPLC/UV. Solubilitatea poate fi calculată prin compararea cantității de compus detectat în soluția-test definită comparată cu
10 cantitatea detectată în DMSO la aceeași concentrație. Stabilitatea compușilor după 1 oră de incubare în mediile testate la 37°C este de asemenea determinată.

Stabilitatea hepatocitelor umane, canine și de șobolan crioconservate: Fiecare compus este incubat timp de până la 1 oră în suspensii de hepatocite (100 μ L, 80,000 de celule per godeu) la 37°C. Hepatocitele crioconservate sunt reconstituite în mediul de incubare fără ser. Suspensia
15 este transferată în planșete cu 96 de godeuri (50 μ L/godeu). Compușii sunt diluați la 2 μ M în mediul de incubare și apoi sunt adăugați la suspensii de hepatocite pentru a începe incubarea. Probele sunt prelevate la 0, 10, 30 și 60 de minute de la începutul incubării și reacția poate fi stinsă cu un amestec format din 0,3% acid formic în 90% acetonitril/10% apă. Concentrația compusului în fiecare eșantion este analizată folosind CL/SM/SM. Perioada de înjumătățire a
20 dispariției compusului în suspensia de hepatocite este determinată prin ajustarea datelor asupra dependenței dintre concentrație și timp cu o ecuație exponențială monofazică. Datele sunt, de asemenea, extinse pentru a reprezenta clearance-ul hepatic intrinsec și/sau clearance-ul hepatic total.

Stabilitatea fracțiunii S9 hepatice prelevată de la om, câine și șobolan: Fiecare compus este incubat timp de până la 1 oră în suspensie S9 (500 μ L, 3 mg proteină/mL) la 37°C ($n = 3$). Compușii sunt adăugați la suspensia S9 pentru a începe incubarea. Probele sunt prelevate la 0,
25 10, 30 și 60 de minute de la începutul incubării. Concentrația compusului în fiecare eșantion este analizată folosind CL/SM/SM. Perioada de înjumătățire a dispariției a compusului în suspensia S9 este determinată prin ajustaREA datelor asupra dependenței dintre concentrație și timp cu o ecuație exponențială monofazică.
30

Permeabilitatea Caco-2: Atât permeabilitatea directă (A-la-B), cât și permeabilitatea inversă (B-la-A) este măsurată. Monostraturile Caco-2 sunt crescute la confluență pe membrane microporoase, de policarbonat, acoperite cu collagen în planșete Costar Transwell® cu 12
35 godeuri. Compușii sunt dozați pe partea apicală pentru permeabilitatea directă (A-la-B) și sunt dozați pe partea bazolaterală pentru permeabilitatea inversă (B-la-A). Celulele sunt incubate la 37°C cu 5% CO₂ într-un incubator umidificat. La începutul incubării, la 1 oră și 2 ore după incubare, o probă alicvotă de 200 μ L este preluată din camera receptoare și înlocuită cu tampon de analiză proaspăt. Concentrația compusului în fiecare probă este determinată prin CL/SM/SM. Permeabilitatea aparentă, Papp, este calculată.

40 Fixarea proteinelor plasmatice: Legarea proteinelor plasmatice este măsurată prin dializa de echilibru. Fiecare compus este adăugat plasma de control la o concentrație finală de 2 μ M. Plasma îmbogățită cu compus și tamponul fosfat sunt plasate în părțile opuse ale celulelor de dializă asamblate, care sunt apoi rotite încet într-o baie de apă de 37°C. La sfârșitul incubării, concentrația compusului în plasmă și tamponul fosfat este determinată. Procentul nelegat este
45 calculat folosind următoarea ecuație:

$$\% \text{ Nelegat} = 100 \bullet \left(\frac{C_f}{C_b + C_f} \right)$$

Unde C_f și C_b sunt concentrațiile libere și legate determinate ca concentrații plasmatice și ale tamponului post-dializă, respectiv.

Analiza profilului CYP450: Fiecare compus este incubat cu fiecare din 5 enzime P450
50 recombinante uman, inclusiv CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 și CYP2C19 în prezența și absența NADPH. Probe seriale pot fi luate din amestecul de incubare la începutul incubării și la 5, 15, 30, 45 și 60 min după începerea incubării. Concentrația compusului în amestecul de incubare este determinată prin CL/SM/SM. Procentajul compusului rămas după incubare la fiecare momentl de timp este calculat prin comparare cu prelevarea probelor la începutul
55 incubării.

Stabilitatea plasmiei umane, de maimuță, câine și șobolan: Compușii sunt incubați timp de până la 2 ore în plasmă (de șobolan, câine, maimuță sau umană) la 37°C. Compușii sunt adăugați

la plasma la concentrații finale de 1 și 10 $\mu\text{g/mL}$. Probele alivote sunt luate la 0, 5, 15, 30, 60 și 120 min după adăugarea compusului. Concentrațiile compușilor și metaboliților majori la fiecare moment de timp sunt măsurate prin CL/SM/SM. Datele biologice (potența antivirală [EC_{50}] este determinată utilizând analiza reporterului repliconului HCV pe baza luciferazei Renilla (RLuc) –

5 VHC 1b RLuc).

Exemplul biologic 1: Activitatea anti-VHC a combinației de Compus 1 și Compus 2

Materiale și metode

Compusul 1 și Compusul 2 au fost sintetizați prin Gilead Sciences (Foster City, CA).

Linii celulare

10 Celulele replicon ale VHC genotipul 1b (Huh-luc) au fost obținute de la Replikon (Mainz, Germania). Repliconul în aceste celule este desemnat I389luc-ubi-neo/NS3-3'/ET și codifică un marker cu rezistență selectabilă (neomicin fosfotransferaza), precum și gena reporter a luciferazei extrase din licurici. Celulele Huh-luc au fost menținute în Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO, Carlsbad, CA) suplimentat cu 10% de ser fetal bovin (FBS; Hyclone, Logan, UT) și 0,5 mg/mL G-418 (GIBCO). Celulele au fost reînsămânțate de două ori

pe săptămână și menținute la niveluri subconfluente.

Determinările EC_{50}

20 Celulele replicon au fost însămânțate în planșete cu 96 godeuri la o densitate de 5×10^3 celule per godeu în 100 μL de mediu de cultură DMEM, cu excepția G-418. Compușii 1 și 2 au fost diluați în serie 1:3 în 100% DMSO (Sigma). Aceste diluții în serie s-au adăugat la celule la o diluție de 1:200 pentru a atinge o concentrație finală de 0,5% DMSO într-un volum total de 200 μL . Planșetele au fost incubate la 37°C timp de 3 zile, după care mediile de cultură au fost îndepărtate și celulele au fost lizate și testate pentru activitatea luciferazei utilizând o analiză a luciferazei disponibilă comercial (Promega, Madison, WI). Nivelurile de replicare VHC în

25 probele tratate cu medicament au fost exprimate ca un procentaj al celor din martorii netratați (definit ca 100%), iar datele au fost potrivite pentru ecuația logistică a reacției de răspuns la doză $y = a/(1 + (x/b)^c)$ utilizând software-ul XLFit4 (IDBS, Emeryville, CA). Valorile EC_{50} au fost calculate din ecuațiile rezultate astfel cum a fost descris anterior (William E. Delaney IV et al. Cross-Resistance Testing of Antihepadnaviral Compounds Using Novel Recombinant

30 Baculoviruses Which Encode Drug-Resistant Strains of Hepatitis B Virus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, vol. 45, nr. 6, p. 1705-1713).

Studii combinate antivirale

35 Celulele replicon au fost însămânțate în planșete cu 96 godeuri la o densitate de 5×10^3 celule per godeu în 100 μL de mediu de cultură. Compușii 1 și 2 au fost diluați în serie în 100% DMSO astfel cum este descris mai sus și adăugați într-un format de matrice la planșetele cu 96 godeuri, atingând unui set definit de concentrații și raporturi diferite ale medicamentului într-un volum final de 200 μL și o concentrație finală de DMSO de 0,5%. Pentru fiecare medicament în parte, valoarea EC_{50} a fost selectată ca punctul median pentru intervalul de concentrații testat. Celulele au fost incubate timp de trei zile și analizate pentru expresia luciferazei astfel cum este

40 indicat mai sus. Pentru acest studiu combinat, două experimente independente au fost realizate în trei exemplare.

Analiza combinată a datelor

45 Datele au fost analizate cu ajutorul programului II MacSynergy dezvoltat de Prichard și Shipman (Prichard MN, Aseltine KR, Shipman C, Jr., MacSynergyTM II, Version 1.0. University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 1993; Prichard M.N., Shipman C., Jr., Antiviral Res 14 (4-5):181-205 (1990); Prichard M.N., Shipman C, Jr., Antivir Ther 1 (1):9-20 (1996); Prichard M.N., et al., Antimicrob Agents Chemother 37 (3):540-5 (1993). Software-ul calculează inhibarea teoretică presupunând o interacțiune aditivă între medicamente (pe baza modelului Bliss Independence) și cuantifică diferențele statistic semnificative între valorile inhibiției

50 teoretice și cele observate. Trasarea aceste diferențe în trei dimensiuni rezultă într-o suprafață în care creșterile în planul Z reprezintă sinergia antivirală, iar scăderile reprezintă antagonismul antiviral dintre compuși. Volumele calculate ale devierilor de suprafață sunt exprimate în $\text{nM}^2\%$, Per Prichard și Shipman, efectele combinate sunt definite ca:

- Foarte sinergice dacă volumele $>100 \text{ nM}^2$.
- 55 • Slab sinergice dacă volumele sunt >50 și $\leq 100 \text{ nM}^2$.
- Aditive dacă volumele sunt $> -50 \text{ nM}^2$ și $\leq 50 \text{ nM}^2$.
- Slab antagoniste dacă volumele sunt $> -100 \text{ nM}^2$ și $\leq -50 \text{ nM}^2$.
- Antagoniste dacă volumele sunt $\leq -100 \text{ nM}^2$.

Rezultate

Înainte de a începe experimentele combinate, valorile EC_{50} în celulele replicon Huh-luc au fost determinate pentru Compusul 1 și Compusul 2, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul II. Ambii compuși au avut un efect antiviral.

5

Tabelul II

EC_{50} individuale pentru Compușii 1 și 2 anti-VHC în celulele replicon Huh-Luc

Compus	EC_{50} (nM) ^a
Compusul 1	3 ± 2
Compusul 2	11 ± 3

^a EC_{50} indică deviația medie $\pm$ standardă pentru două sau mai multe experimente independente.

10 Efectul antiviral al combinației de Compus 1 și Compus 2 a fost măsurat, iar datele rezultate au fost analizate cu ajutorul MacSynergy II, care prevede parcele de suprafață care prezintă deviații semnificative de la aditivitate. Cuantificarea deviațiilor statistic semnificative de la aditivitate a indicat că combinația de Compuși 1 și 2 a avut volume de sinergie/antagonism între -50 nM^2 și 50 nM^2 indicând efecte antivirale aditive astfel cum se arată în Tabelul III.

15

Tabelul III

Cuantificarea antagonismului și sinergiei antivirale și interacțiunile substanțelor medicamentoase pentru Combinația de Compus 1 și Compus 2

Substanța (ele) medicamentoasă(e) utilizată(e) în Combinație with Compusul 2	Volumul de sinergie (nM ²) ^a	Volumul de antagonismu(nM ²) ^a	Interacțiunea
Compusul 1	13.5 ± 10.5	0.07 ± 0.07	Additivă

^a Valorile reprezintă deviația medie $\pm$ standardă a două experimente independente efectuate în trei exemplare.

20 Rezultatele experimentelor *in vitro* prezentate în Tabelul III indică faptul că Compusul 2 are activitate antivirală aditivă când este combinat cu Compusul 1.

Exemplul biologic 2: Combinații cu Compusul 3

Materiale și metode

25

Compuși antivirali

Compusul 1 și Compusul 3 au fost sintetizați prin Gilead Sciences (Foster City, CA). Ribavirina și IFN- α au fost procurate de la Sigma (St. Louis, MO).

Linii celulare

30 Celulele replicon ale genotipului 1b VHC (Huh-luc) au fost obținute de la Replikon (Mainz, Germania). Repliconul în aceste celule este desemnat I389luc-ubi-neo/NS3-3'/ET și codifică un marker cu rezistență selectabilă (neomicin-fosfotransferaza), precum și gena reporterului luciferazei extrase din licurici. Celulele Huh-luc au fost menținute în Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) cu GlutaMAX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplimentat cu 10% de ser fetal bovin (FBS, Hyclone, Logan, UT) și 0,5 mg/mL de G 418 (Invitrogen). Celulele au fost

35

reînsămânțate de două ori pe săptămână și menținute la niveluri subconfluente.

Determinările EC_{50}

40 Celulele replicon au fost înșămânțate în planșete cu 96 godeuri la o densitate de 5×10^3 celule per godeu în 100 μL DMEM plus 10% de mediu de cultură FBS, cu excepția G-418. Compușii au fost diluați în serie 1:3 în 100% de DMSO (Sigma). Aceste diluții în serie s-au adăugat la celule la o diluție de 1:200 pentru a atinge o concentrație finală de 0,5% de DMSO într-un volum total de 200 μL . Planșetele au fost incubate la 37°C timp de 3 zile, după care mediile de cultură au fost îndepărtate și celulele au fost lizate și testate pentru activitatea luciferazei utilizând o analiză a luciferazei disponibilă comercial (Promega, Madison, WI). Nivelurile de replicare VHC în probele tratate cu medicament au fost exprimate într-un procentaj

45 al celor în martorii netratați (definit ca 100%), iar datele au fost potrivite pentru ecuația logistică a reacției de răspuns la doză $y=a/(1+(x/b)^c)$ utilizând software-ul XLFit4 (IDBS, Emeryville, CA). Valorile EC_{50} au fost calculate din ecuațiile rezultate astfel cum este descris anterior.

50

Studii combinate antivirale

5 Celulele replicon au fost însămânțate în planșete cu 96 godeuri la o densitate de 5×10^3 celule per godeu în 100 μL de mediu de cultură, cu excepția G-418. Compusul 3 și alți compuși au fost diluați în serie în 100% DMSO astfel cum este descris mai sus și adăugați într-un format de matrice pentru planșetele cu 96 godeuri, atingând unui set definit de concentrații și raporturi ale medicamentelor diferite într-un volum final de 200 μL și o concentrație finală de DMSO de 0,5%. Pentru fiecare medicament în parte (cu excepția Ribavirinei), valoarea EC_{50} a fost selectată ca punctul median pentru intervalul de concentrații testat. Pentru Ribavirină, care nu a avut un efect antiviral selectiv, o doză maximă de 6,2 μM a fost selectată deoarece aceasta a fost de aproximativ 3 ori mai mică decât concentrația la care citotoxicitatea a început să fie observată. Celulele au fost incubate cu medicamente timp de trei zile și analizate pentru expresia luciferazei astfel cum este indicat mai sus. Pentru fiecare studiu combinat, două experimente independente au fost realizate în trei exemplare.

Analiza combinată a datelor

15 Datele au fost analizate cu ajutorul programului MacSynergy II dezvoltat de Prichard și Shipman. Software-ul calculează inhibarea teoretică presupunând o interacțiune aditivă între medicamente (pe baza modelului Bliss Independence) și cuantifică diferențele statistice semnificative între valorile inhibiției teoretice și observate. Trasarea aceste diferențe în trei dimensiuni rezultată într-o suprafață în care creșterile în planul Z reprezintă sinergia antivirală, iar scăderile reprezintă antagonismul antiviral dintre compuși. Volumele calculate ale deviațiilor de suprafață sunt exprimate în $\text{nM}^2\%$. Per Prichard și Shipman, efectele combinate sunt definite după cum urmează:

- Sinergie puternică dacă volumele $>100 \text{ nM}^2$; această cantitate de sinergie este probabil importantă *in vivo*
- 25 • Sinergie moderată dacă volumele sunt >50 și $\leq 100 \text{ nM}^2$; această cantitate de sinergie poate fi importantă *in vivo*
- Sinergie minoră dacă volumele sunt >25 și $<50 \text{ nM}^2$
- Aditivitate dacă volumele sunt $>-25 \text{ nM}^2$ și $\leq 25 \text{ nM}^2$
- Antagonism minor dacă volumele sunt <-25 și $>-50 \text{ nM}^2$
- 30 • Antagonism moderat dacă volumele sunt $>-100 \text{ nM}^2$ și $>-50 \text{ nM}^2$; această cantitate de antagonism poate fi importantă *in vivo*
- Antagonism puternic dacă volumele sunt $\leq -100 \text{ nM}^2$; această cantitate de antagonism este probabil importantă *in vivo*

Rezultate

35 Valorile EC_{50} pentru compușii individuali în celulele replicon Huh-luc.

Înainte de a începe experimentele combinate, valorile EC_{50} în celulele replicon Huh-luc au fost determinate pentru fiecare compus astfel cum se arată în Tabelul IV. Toți compușii au avut un efect antiviral cu excepția ribavirinei, care nu a avut activitate antivirală până la concentrațiile care au început să arate citotoxicitate.

40 Tabelul IV

EC_{50} individuale pentru Compușii anti-VHC în celulele replicon Huh-uc

Compus	EC_{50} (nM) ^a
Compusul 3	2.3 ± 2.6
IFN- α	$0.105 \pm .003$ (U/mL) ^b
Ribavirina	$> 12,500$
Compusul 1	0.4 ± 0.14

^a EC_{50} indică deviația medie $\pm$ standardă pentru două sau mai multe experimente independente.

^b EC_{50} INF- α este exprimată în unități (U) per mililitru (mL) în loc de o concentrație nanomolară.

45 Efectele antivirale combinate și interacțiunile medicamentelor

Efectele antivirale ale Compusului 3, când sunt combinate cu IFN- α , ribavirină, și Compusului 1 au fost testate. Datele rezultate au fost analizate cu ajutorul MacSynergy II, care prevede diagrame de suprafață care prezintă deviațiile semnificative de la aditivitate. Cuantificarea deviațiilor statistic semnificative de la aditivitate au indicat că combinațiile de

50 Compus 3 cu IFN- α au rezultat în sinergie minoră (volume de sinergie de 32 și 36,5 nM^2 , respectiv, Tabelul V). Combinația Compusului 3 cu inhibitorul NS5B noenucleozidic Compusul

1 a rezultat într-un volum de sinergie de 14,5 nM² care indică o interacțiune antivirală aditivă. Nici unul dintre compuși nu a produs volume de antagonism antiviral în afara intervalului aditiv (> -25 nM²) atunci când sunt combinați cu Compusul 3 astfel cum este prezentat în Tabelul V.

Tabelul V

5 Cuantificarea antagonismului și sinergiei antivirale și interacțiunile medicamentelor pentru
Combinațiile cu Compusul 3

Medicamentul(ele) utilizat(e) în Combinație cu Compusul 2	Volumul de sinergie (nM ²) ^a	Volumul de antagonism(nM ²) ^a	Interacțiunea
IFN- α	32 $\pm$ 4,2	0,15 $\pm$ 0,2	Sinergie minoră
Ribavirina	54 $\pm$ 14,1	1,6 $\pm$ 2,3	Sinergie moderată
Compusul 1	14,5 $\pm$ 0,7	4,22 $\pm$ 5,0	Aditivă

^a Valorile reprezintă deviația medie $\pm$ standardă a două experimente independente efectuate în trei exemplare

Aceste experimente combinate antivirale *in vitro* indică faptul că noul inhibitor al proteazei
10 VHC NS3 Compusul 3 posedă sinergie minoră atunci când este combinat cu IFN- α și sinergie moderată atunci când este combinat cu Ribavirina. Aceste rezultate sugerează că Compusul 3 ar putea fi folosit în combinație cu standardul actual de îngrijire (PEG-IFN- α plus ribavirină) la pacienții cu VHC pentru a atinge creșterea suprimării încărcăturii virale fără a reduce eficacitatea oricărui dintre medicamentele individuale. Combinațiile Compusului 3 cu
15 inhibitorii polimerazei NS5B nenucleozidici (Compusul 1) a rezultat în aditivitate. Aceste rezultate indică faptul că Compusul 3 poate fi, de asemenea, potrivit pentru explorarea combinațiilor de medicamente care constau din mai multe clase de inhibitori specifici ai VHC la pacienți.

Exemplul biologic 3: Combinații ale Compusului 4

20 Materiale și metode

Agenți anti-VHC

Compusul 1, Compus 2, Compusul 3, Compusul 4, Compusul 5 și Compusul 6 au fost sintetizați prin Gilead Sciences (Foster City, CA). Puromicina, IFN- α și ribavirina au fost procurate de la Sigma (St. Louis, MO). Calcein AM a fost procurat de la AnaSpec (Fremont,
25 CA).

Linia de celule și cultura de celule

Linia de celule replicon ale genotipului 1a VHC utilizată în acest studiu a fost descrisă anterior. Celulele au fost crescute în mediu de cultură celulară conținând Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) cu GlutaMAX (Gibco, Carlsbad, CA, Cat#10569-044), suplimentat cu
30 10% de FBS (HyClone, Logan, UT, Cat#SH30071.03), 100 Unități/mL de penicilină, 100 μ g/mL de streptomycină (Gibco, Carlsbad, CA, Cat#15140-122) și 0,1 mM de aminoacizi neesențiali (Gibco, Carlsbad, CA, Cat#11140-050). Celulele replicon au fost menținute în 0,5 mg/mL de geneticină (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat#10131-035) pentru a preveni pierderea repliconului VHC. Celulele au fost reînsămânțate la fiecare 3-4 zile înainte de a ajunge la confluență.

35 Testul repliconului VHC pentru EC₅₀, determinările CC₅₀ și studiile combinate

Toți compușii au fost furnizați în 100% DMSO cu excepția IFN- α , care a fost furnizat în soluție tampon specificată prin fabricare (Sigma, St Louis, MO, Cat#I4276). Diluții seriale de compus au fost efectuate în 100% DMSO cu excepția IFN- α , care a fost diluat în serie în mediu de cultură celulară descris în secțiunea 3.2. Toate diluții seriale au fost efectuate în planșete de polipropilenă cu 384 de godeuri (Thermo Scientific, Hudson, NH, Cat#4341) utilizând o Biomek FX Workstation. Pentru determinările EC₅₀ și CC₅₀, compușii de testat au fost diluați în serie în zece etape de 1:3 diluții în coloanele 3-20 ale planșetelor cu 384 de godeuri. Pentru studiile
40 combinaționale, un compus a fost diluat serial în nouă etape de 1:2 diluții în direcția orizontală cu alți compuși diluați în serie în șapte etape de 1:2 diluții în direcția verticală. Prin aceasta s-a realizat un set definit de concentrații și rapoarte diferite ale medicamentelor. Pentru fiecare
45 medicament în parte, valoarea EC₅₀ a fost selectată ca punctul median pentru intervalul de concentrații testat. Toate diluțiile seriale au fost efectuate în patru exemplare per compus în aceeași planșetă cu 384 de godeuri. 100% DMSO s-a adăugat în coloana 1-2 a fiecărei planșete cu 384 de godeuri cu diluție în serie. Un inhibitor al proteazei VHC ITMN-191 la 100 μ M s-a adăugat în coloana 23 ca un control al 100% inhibiției a replicării VHC în timp ce puromicina la
50 10 μ M s-a adăugat în coloana 24 ca un control al 100% citotoxicitate.

La fiecare godeu al unei planșete de polistiren negru cu 384 de godeuri (Greiner Bio-one, Monroe, NC, Cat#781086, cultură de celule tratate), 90 μ L de mediu de cultură celulară (fără

geneticină) conținând 2,000 de celule replicon VHC suspendate s-au adăugat cu o Biotek μ Flow Workstation. Pentru transferul compusului în planșetele de cultură celulară, 0,4 μ L de soluție de compus de la planșeta cu diluție în serie a compusului s-a transferat la planșeta de cultură celulară pe o Biomek FX Workstation. Concentrația DMSO în godeurile finale de analiză a fost de 0,44%. Planșetele au fost incubate timp de 3 zile la 37°C cu 5% CO₂ și 85% umiditate.

Testul repliconului VHC a fost un test multiplex care poate evalua atât citotoxicitatea, cât și activitatea anti-replicon din același godeu. Testul CC₅₀ a fost efectuat primul. Mediile din planșeta de cultură celulară cu 384 godeuri au fost aspirate și godeurile au fost spălate de patru ori cu 100 μ L 1 X PBS fiecare, folosind un dispozitiv de spălat planșetele Biotek ELx405. Un volum de 50 μ L de soluție conținând 400 nM calceină AM (AnaSpec, Fremont, CA, Cat#25200-056) în 1 X PBS s-a adăugat la fiecare godeu al planșetei cu o Biotek μ Flow Workstation. Planșeta a fost incubată timp de 30 minute la temperatura camerei înainte de măsurarea semnalului de fluorescență (excitație 490 nm, emisie 520 nm) cu un spectrofotometru pt. citirea planșetelor Perkin Elmer Envision Plate Reader.

Testul EC₅₀ a fost efectuat în aceleași godeuri ca și testul CC₅₀. Soluția de calceină-PBS din planșeta de cultură celulară cu 384 de godeuri a fost aspirată cu un dispozitiv de spălat planșetele Biotek ELx405. Un volum de 20 μ L de tampon luciferază Dual-Glo (Promega, Madison, WI, Cat#E298B) a fost adăugat la fiecare godeu al planșetei cu o Biotek μ Flow Workstation. Planșeta a fost incubată timp de 10 minute la temperatura camerei. Un volum de 20 μ L de soluție conținând 1:100 amestec de substrat Dual-Glo Stop & Glo (Promega, Madison, WI, Cat#E313B) și tampon Dual-Glo Stop & Glo (Promega, Madison, WI, Cat#E314B) s-a adăugat apoi la fiecare godeu al planșetei cu o Biotek μ Flow Workstation. Planșeta a fost apoi incubată la temperatura camerei timp de 10 minute înainte de măsurarea semnalului de luminescență cu un spectrofotometru pt. citirea planșetelor Perkin Elmer Envision Plate Reader.

Analiza datelor

Efectul citotoxicității a fost determinat prin conversia AM calceinei în produs fluorescent. Citotoxicitatea procentuală a fost calculată prin ecuația 1:

$$\% \text{ citotoxicitate sau } \% \text{ inhibiție} = 100 \times \left(1 - \frac{X_C - M_B}{M_D - M_B}\right) \quad (1)$$

unde X_C este semnalul de fluorescență din godeul tratat cu compus; M_B este semnalul de fluorescență medie din godeurile tratate cu puomicină; M_D este semnalul de fluorescență medie din godeurile tratate cu DMSO. Activitatea de replicare anti-VHC a fost determinată de semnalul de luminescență generat din luciferaza Renilla reporterului repliconului VHC. Inhibarea procentuală pe repliconul VHC a fost calculată folosind ecuația 1, unde X_C este semnalul de luminescență din godeul tratat cu compus; M_B este semnalul de luminescență medie din godeurile tratate cu ITMN-191; M_D este semnalul de luminescență medie din godeurile tratate cu DMSO.

Valorile CC₅₀ au fost determinate ca fiind concentrația compusului de testare care a produs o scădere de 50% a viabilității celulare. Valorile EC₅₀ au fost determinate ca fiind concentrația compusului de testare care a produs o scădere de 50% a replicării VHC. Atât valorile CC₅₀, cât și valorile EC₅₀ au fost obținute utilizând pachetul de software Pipeline Pilot 5.0 (Accelrys, San Diego, CA) prin ajustarea regresiei neliniare a datelor experimentale la ecuația 2:

$$y = d + \frac{a - d}{\left[1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b\right]} \quad (2)$$

unde y este inhibarea % observată a repliconului VHC la concentrația x a compusului; d este răspunsul estimat la concentrația zero a compusului; a este răspunsul estimat la concentrația infinită a compusului; c este concentrația medie (CC₅₀ sau EC₅₀); b este coeficientul de inclinare Hill.

Datele experimentale ale studiului combinat au fost analizate cu ajutorul programului MacSynergy II dezvoltat de Prichard și Shipman. Software-ul (MacSynergy™ II, University of Michigan, MI) calculează inhibarea teoretică presupunând o interacțiune aditivă între medicamente (pe baza modelului Bliss Independence) și cuantifică diferențele statistice semnificative între valorile de inhibiție teoretice și observate. Trasarea grafică a acestor diferențe în trei dimensiuni rezultă într-o suprafață în care creșterile în planul Z reprezintă sinergia antivirală, iar scăderile reprezintă antagonismul antiviral între compuși. Volumele calculate ale deviațiilor de suprafață sunt exprimate în nM²%. Per Prichard și Shipman, efectele combinației sunt definite ca:

- Sinergie puternică: $> 100 \text{ nM}^2\%$
- Sinergie moderată: $> 50 \text{ și } \leq 100 \text{ nM}^2\%$
- Sinergie minoră: $> 25 \text{ și } \leq 50 \text{ nM}^2\%$
- Aditivitate: $\leq 25 \text{ și } > -25 \text{ nM}^2\%$
- 5 • Antagonism minor: $\leq -25 \text{ și } > -50 \text{ nM}^2\%$
- Antagonism moderat: $\leq -50 \text{ și } > -100 \text{ nM}^2\%$
- Antagonism puternic: $\leq -100 \text{ nM}^2\%$

Pentru fiecare studiu combinat, trei experimente independente au fost realizate cu patru probe identice în fiecare experiment.

10 Rezultate

Activitatea antivirală și citotoxicitatea compușilor individuali în genotipul VHC 1a testul repliconului.

- 15 Activitatea anti-VHC și citotoxicitatea Compusului 4 și altor compuși au fost testate în celulele Huh-7 care poartă un replicon 1a al genotipului VHC. Valorile EC_{50} și CC_{50} sunt prezentate în Tabelul VI. Nu există nici o citotoxicitate semnificativă observată pentru toți compușii până la cele mai mari concentrații testate.

Tabelul VI

EC_{50} și CC_{50} ale compușilor utilizați în acest studiu împotriva repliconului VHC genotipul 1a

Compuși	EC_{50}^a (nM)	CC_{50}^a (nM)
Compusul 1	19 ± 8	>44400
Compusul 2	496 ± 135	>22200
Compusul 3	49 ± 18	>22200
Compusul 4	201 ± 74	>44400
Compusul 5	$15 \pm 2,4$	>44400
Compusul 6	$0,033 \pm 0,011$	>44400
IFN- α	$1,4 \pm 0,3b$	$>50b$
Ribavirina	36482 ± 17507	>88800

- 20 ^a Valorile sunt deviația medie $\pm$ standardă pentru trei sau mai multe experimente independente

^b Valorile IFN- α sunt exprimate în unități (U) per mililitru (mL) în loc de o concentrație nanomolară

Activitatea antivirală și citotoxicitatea Compusului 4 în combinație cu alte clase de agenți anti-VHC.

- 25 Efectele antivirale ale Compusului 4 în combinație cu alți compuși anti-VHC au fost evaluate cu ajutorul repliconului 1a al genotipului VHC. Rezultatele au fost analizate cu ajutorul MacSynergy II, care prevede diagrame de suprafață care prezintă deviații semnificative de aditivitate. Volumele de sinergie și antagonism ($\text{nM}^2\%$) calculate din deviațiile de la suprafața aditivă sunt rezumate în Tabelul VII. La intervalul de încredere de 95%, volumele medii de sinergie și antagonism sunt între 25 și $-25 \text{ nM}^2\%$ când Compusul 4 a fost combinat cu IFN- α , Compusul 2 și Compusul 6, indicând interacțiunea aditivă cu acești compuși. Mai mult, Compusul 4 prezintă volumele de sinergie în intervalul de la 25 până la $50 \text{ nM}^2\%$ când este combinat cu Compusul 1, Compusul 5 sau Compusul 3, sugerând o interacțiune sinergică minoră.

35 Tabelul VII

Cuantificarea antagonismului și sinergiei antivirale și interacțiunile medicamentelor pentru Combinațiile medicamentoase cu Compusul 4

Medicamentul(e) utilizat(e) în Combinație cu Compusul 4	Volumul de sinergie (nM^2) ^a	Volumul de antagonism (nM^2) ^a	Interacțiunea
Compusul 1	34 ± 26	-1 ± 2	Sinergie minoră
Compusul 2	22 ± 14	-2 ± 3	Aditivitate
Compusul 3	26 ± 6	-3 ± 2	Sinergie minoră
Compusul 5	26 ± 28	-1 ± 3	Sinergie minoră
Compusul 6	19 ± 17	-7 ± 7	Aditivitate
IFN- α	12 ± 6	0 ± 0	Aditivitate

Ribavirina	1 ± 1	-43 ± 20	Antagonism minor
------------	-----------	--------------	------------------

Valorile reprezintă deviația medie $\pm$ standardă a trei experimente independente efectuate în patru exemplare

În toate studiile combinate, viabilitatea celulară este mai mare de 85% la toate raporturile de concentrație și toate combinațiile de medicamente prezintă efecte aditive asupra citotoxicității astfel cum este arătat în Tabelul VIII.

5

Tabelul VIII

Cuantificarea sinergiei și antagonismului citotoxicității și interacțiunile medicamentelor pentru Combinațiile medicamentoase cu Compusul 4

Medicamentul(e) utilizat(e) în Combinație cu Compusul 4	Volumul de sinergie (nM ² %) ^a	Volumul de antagonism (nM ² %) ^a	Interacțiunea
Compusul 1	13 ± 11	0 ± 1	Aditivitate
Compusul 2	17 ± 14	0 ± 0	Aditivitate
Compusul 3	3 ± 5	0 ± 0	Aditivitate
Compusul 5	15 ± 8	-10 ± 7	Aditivitate
Compusul 6	8 ± 4	0 ± 0	Aditivitate
IFN- α	8 ± 12	-7 ± 13	Aditivitate
Ribavirina	4 ± 3	-1 ± 2	Aditivitate

^a Valorile reprezintă deviația medie $\pm$ standardă a trei experimente independente efectuate în patru exemplare

10

Cu toate acestea, Compusul 4 prezintă un volum de antagonism de -43 nM²% atunci cand este combinat cu ribavirină, sugerând o interacțiune antagonistă minoră.

Tabelul IX

Cuantificarea sinergiei și antagonismului citotoxicității și interacțiunile medicamentelor pentru Combinațiile medicamentoase cu ribavirină

15

Medicamentul(e) utilizat(e) în Combinație cu ribavirina	Volumul de sinergie (nM ² %) ^a	Volumul de antagonism (nM ² %) ^a	Interacțiunea
Compusul 4	4 ± 3	-1 ± 2	Aditivitate

^a Valorile reprezintă deviația medie $\pm$ standard a trei experimente independente efectuate în patru exemplare

20

Concentrația ribavirinei care prezintă cel mai mare antagonism cu Compusul 4 este de aproximativ 0,5 până la 1 μ M, care este de aproximativ 10 ori mai mică decât concentrația plasmatică staționară a ribavirinei (6-11 μ M) observată la om la o doză de 800 mg/zi. La această concentrație fiziologică a ribavirinei (6-11 μ M), interacțiunea antagonistă dintre ribavirină și Compusul 4 este minimă într-un interval larg de concentrații ale Compusului 4 (0-0,44 μ M). Prin urmare, antagonismul minor observat între ribavirină și Compusul 4 în sistemul de replicon *in vitro* este puțin probabil să aibă semnificație clinică.

25

Concluzii

30

Activitatea antivirală a Compusului 4 (într-un amestec diastereomeric) a fost testată în combinație cu standardul actual de îngrijire (IFN- α /Ribavirină), precum și candidații interni în curs de dezvoltare a Gilead Sciences Compusul 1 și Compusul 5 (inhibitori ai NS5B nenucleozidici), Compusul 2 și Compusul 3 (inhibitori ai proteazei NS3) și Compusul 6 (inhibitor al NS5A). Astfel cum este rezumat în Tabelul VIII, Compusul 4 a prezentat activitate antivirală aditivă în combinație cu IFN- α , Compusul 2 și Compusul 6 și sinergie minoră cu Compusul 1, Compusul 5 și Compusul 3.

35

Combinația Compusului 4 cu ribavirină a rezultat într-un antagonism minor la concentrațiile ribavirinei între 0,5 până la 1 μ M, care sunt de aproximativ 10 ori mai mici decât concentrația fiziologică staționară a acesteia (6-11 μ M) în plasma umană. La concentrația relevantă clinic a Ribavirinei, interacțiunea antagonistă dintre cei doi compuși a devenit neglijabilă.

Exemplul biologic 4: Combinații ale Compusului 5

40

Activitatea antivirală a Compusului 5 a fost testată în celulele Huh-lunet GT-1b (folosind substanțial aceleași metode ca și în testele pentru Compusul 4) în combinație cu compuși interni în curs de dezvoltare Compusul 1, Compusul 2 și Compusul 3 (inhibitori ai proteazei NS3), Compusul 6 (inhibitor al NS5A), Compusul 4 (inhibitor al C-nuc NS5B) și, de asemenea, tratamentul VHC aprobat PEG-IFN- α și Ribavirină. Datele combinațiilor au fost analizate pe baza modelului Bliss Independence cu ajutorul software-ului MacSynergy II. Rezultatele testelor combinate au fost exprimate ca volume medii de sinergie și antagonism (nM²) calculate la

încrederea de 95% de la două experimente independente efectuate în trei exemplare. Efectele combinate sunt definite ca:

- Sinergie puternică dacă volumele $>100 \text{ nM}^2$; această cantitate de sinergie este probabil importantă *in vivo*
- 5 • Sinergie moderată dacă volumele sunt >50 și $\leq 100 \text{ nM}^2$; această cantitate de sinergie poate fi importantă *in vivo*
- Sinergie minoră dacă volumele sunt >25 și $<50 \text{ nM}^2$
- Aditivitate dacă volumele sunt $>-25 \text{ nM}^2$ și $\leq 25 \text{ nM}^2$
- Antagonism minor dacă volumele sunt <-25 și $>-50 \text{ nM}^2$
- 10 • Antagonism moderat dacă volumele sunt $>-100 \text{ nM}^2$ și $>-50 \text{ nM}^2$; această cantitate de antagonism poate fi importantă *in vivo*
- Antagonism puternic dacă volumele sunt $\leq -100 \text{ nM}^2$; această cantitate de antagonism este probabil importantă *in vivo*.
- 15 Combi-nația inhibitorilor NS5B alosterici Compusul 1 și Compusul 5 a rezultat într-o sinergie moderată în testul repliconului. Studiile cu alți inhibitori ai VHC, inclusiv PEG-IFN- α și ribavirina, au dezvăluit interacțiuni aditive până la sinergice minore.

Tabelul X

Efectele antivirale ale Compusului 5 în combinație cu alte medicamente anti-VHC în celulele replicon 1b Huh-luc

Medicamentul utilizat în combinație cu Compusul 5	Volumul de sinergie (nM^2) ^a	Volumul de antagonism (nM^2) ^a	Interacțiunea
Compusul 1	70 ± 26	0 ± 0	Sinergie moderată
Compusul 2	22 ± 12	-7 ± 7	Aditivă
Compusul 3	19 ± 13	-2 ± 2	Aditivă
Compusul 4	26 ± 28	-1 ± 3	Sinergie minoră
Compusul 6	34 ± 19	0 ± 0	Sinergie minoră
PEG-IFN- α	31 ± 23	-2 ± 4	Sinergie minoră
Ribavirina	12 ± 8	-12 ± 9	Aditivă

- 20 ^a Valorile reprezintă deviația medie $\pm$ standardă a două experimente independente efectuate în trei exemplare

Exemplul biologic 5: Compusul 6, combinații

Materiale și metode

Compuși

- 25 Compusul 1, Compusul 2, Compusul 3, Compusul 6 și Compusul 7 au fost sintetizați prin Gilead Sciences (Foster City, CA). IFN- α și ribavirina au fost procurate de la Sigma (St. Louis, MO).

Linii celulare

- 30 Celulele replicon 1b ale genotipului VHC (Huh-luc) au fost obținute de la Replikon (Mainz, Germania). Repliconul în aceste celule este desemnat I389luc-ubi-neo/NS3-3'/ET și codifică un marker cu rezistență selectabilă (neomicin-fosfotransferaza), precum și gena reporter a luciferazei extrase din licurici. Celulele Huh-luc au fost menținute în Dulbecco's Modified Eagle's Medium GlutaMax (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplimentat 10% de cu ser fetal bovin (FBS; Hyclone, Logan, UT), 1X penicilină/streptomycină, 1X aminoacizi neesențiali și 0,5 mg/mL de G-418 (toate de la Invitrogen, Carlsbad, CA). Celulele au fost reînsămânțate de două

- 35 ori pe săptămână și menținute la niveluri subconfluente.

Teste

Testul activității antivirale în celulele replicon Huh-luc VHC

- 40 Celulele replicon au fost însămânțate în plășete cu 96 godeuri la o densitate de 7×10^3 celule per godeu în 100 μL de mediu de cultură DMEM, cu excepția G-418. Compușii au fost diluați în serie 1:2 în 100% DMSO. Diluțiile seriale s-au adăugat la celule la o diluție de 1:200 pentru a atinge o concentrație finală de 0,5% de DMSO într-un volum total de 200 μL . Plășetele au fost incubate la 37°C timp de 3 zile, după care mediile de cultură au fost îndepărtate și

celulele au fost lizate și testate pentru activitatea luciferazei utilizând un test al luciferazei disponibil comercial (Promega, Madison, WI).

Studii combinate antivirale

5 Celulele replicon au fost însămânțate în planșete cu 96 godeuri la o densitate de 7×10^3 celule per godeu în 100 μ L mediu de cultură, cu excepția G-418. Compusul 6 și alți compuși au fost diluați în serie 1:2 în 100% DMSO și adăugați într-un format de matrice la planșetele cu 96 godeuri, atingând unui set definit de concentrații și raporturi diferite ale medicamentelor într-un volum final de 200 μ L și o concentrație finală de DMSO de 0,5%. Pentru fiecare medicament în parte, valoarea EC_{50} a fost selectată ca punctul median pentru intervalul de concentrații testat. 10 Celulele au fost incubate timp de 3 zile și analizate pentru expresia luciferazei utilizând un test al luciferazei disponibil comercial (Promega). Pentru fiecare studiu combinat, două experimente independente au fost realizate în trei exemplare.

Determinarea citotoxicității celulare

15 Celulele replicon au fost însămânțate și tratate cu medicamente astfel cum este descris pentru studiile combinate antivirale de mai sus. După trei zile de incubare la 37°C, mediul de cultură a fost îndepărtat și celulele au fost lizate și testate pentru citotoxicitate utilizând un test al viabilității celulare luminescente CellTiter-Glo (Promega) în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Unitățile de lumină relative au fost convertite în procente în raport cu grupele de control netratate (definite ca 100%).

20

Analiza datelor

Calculul EC_{50}

25 Conform testelor EC_{50} , nivelele de luciferază în probele tratate cu medicament au fost exprimate ca un procentaj al celor din grupele de control netratate (definit ca 100%). Valorile EC_{50} au fost calculate prin analiza regresiei neliniare a seturilor de date replicate utilizând software-ul XLfit 4 (IDBS, Emeryville, CA).

Calcularea antagonismului și sinergiei antivirale

30 Conform testelor combinației, nivelele de luciferază în probele tratate cu medicament au fost exprimate ca un procentaj al celor din grupele de control netratate (definit ca 100%). Seturile de date replicate au fost apoi analizate cu ajutorul programului MacSynergy II dezvoltate de Prichard și Shipman. Software-ul (MacSynergy™ II, University of Michigan, MI) calculează inhibarea teoretică presupunând o interacțiune aditivă între medicamente (pe baza modelului Bliss Independence) și cuantifică diferențele statistic semnificative între valorile inhibiției teoretice și observate. Trasarea grafică a acestor diferențe în trei dimensiuni rezultă într-o suprafață în care creșterile în planul Z reprezintă sinergia antivirală, iar scăderile reprezintă antagonismul antiviral între compuși. Volumele calculate ale deviațiilor de suprafață sunt exprimate în nM^2 . Per Prichard și Shipman, efectele combinate sunt definite ca:

- Sinergie puternică dacă volumele $>100 \text{ nM}^2$; această cantitate de sinergie este probabil importantă *in vivo*
- 40 • Sinergie moderată dacă volumele sunt >50 și $\leq 100 \text{ nM}^2$; această cantitate de sinergie poate fi importantă *in vivo*
- Sinergie minoră dacă volumele sunt >25 și $<50 \text{ nM}^2$
- Aditivitate dacă volumele sunt $>-25 \text{ nM}^2$ și $\leq 25 \text{ nM}^2$
- Antagonism minor dacă volumele sunt <-25 și $>-50 \text{ nM}^2$
- 45 • Antagonism moderat dacă volumele sunt $>-100 \text{ nM}^2$ și $>-50 \text{ nM}^2$; această cantitate de antagonism poate fi importantă *in vivo*
- Antagonism puternic dacă volumele sunt $\leq -100 \text{ nM}^2$; această cantitate de antagonism este probabil importantă *in vivo*

Rezultate

50 Activitatea antivirală a compușilor individuali în celulele replicon Huh-luc.

Înainte de a începe experimentele combinate, activitatea antivirală a compușilor individuali a fost determinată în celulele replicon Huh-luc. Valorile EC_{50} corespunzătoare cu rezultatele istorice au fost observate cu toți cei șapte compuși.

55

Tabelul XI

Valorile EC₅₀ individuale pentru Compușii anti-VHC în celulele replicon Huh-luc

Compus	EC ₅₀ (nM) ^a
IFN- α ^b	0,05 U/ml $\pm$ 0,04
Ribavirina	> 12 $\pm$ 2,4
Compusul 1	0,96 $\pm$ 0,39
Compusul 2	5,0 $\pm$ 0,0
Compusul 3	3,0 $\pm$ 1,2
Compusul 6	0,0018 $\pm$ 0,0007
Compusul 7	1245 $\pm$ 341

^a EC₅₀ indică deviația aritmetică medie $\pm$ standardă a trei sau mai multor experimente independente.

5 ^b EC₅₀ IFN- α este exprimată în unități (U) per mililitru (mL) în loc de o concentrație nanomolară.

Efectele antivirale combinate și interacțiunile medicamentelor

Efectele antivirale ale Compusului 6 în combinație cu alți inhibitori ai VHC au fost evaluate folosind sistemul replicon 1b VHC. Datele rezultate au fost analizate cu ajutorul MacSynergy II, care prevede diagramele de suprafață care prezintă deviații semnificative de la aditivitate. Cuantificarea deviațiilor statistic semnificative de la aditivitate din două experimente independente este rezumată în Tabelul XII. Combinațiile de Compus 6 cu IFN- α sau Compus 1 au rezultat în volume de sinergie de 32 și 34 nM², respectiv, indicând sinergie minoră. Ribavirina, Compusul 2 și Compusul 7 au produs volume de sinergie de 61, 52 și 51 atunci când au fost combinate cu Compusul 6, respectiv, indicând o interacțiune sinergică moderată între Compusul 6 și acești trei inhibitori ai VHC. Combinația Compusului 6 cu Compusul 3 a rezultat într-un volum de sinergie de 132 nM²% semnificând o interacțiune sinergică antivirală puternică. Nici unul dintre compuși nu a produs volume de antagonism antiviral în afara intervalului aditiv (> -25 nM) atunci când au fost combinați cu Compusul 6.

20 Tabelul XII

Cuantificarea antagonismului și sinergiei antivirale and interacțiunile medicamentelor pentru Combinațiile de medicamente cu Compusul 6

Medicamentul(ele) utilizat(e) în combinație cu Compusul 6	Volumul de sinergie (nM ²) ^a	Volumul de antagonism (nM ²) ^a	Interacțiunea
IFN- α	32 $\pm$ 1,4	0,0 $\pm$ 0,0	Sinergie minoră
Ribavirina	61 $\pm$ 0,5	-0,5 $\pm$ 0,1	Sinergie moderată
Compusul 1	34 $\pm$ 9,9	-17 $\pm$ 0,7	Sinergie minoră
Compusul 2	52 $\pm$ 5,1	-0,7 $\pm$ 0,7	Sinergie moderată
Compusul 3	132 $\pm$ 44	-0,1 $\pm$ 0,2	Sinergie puternică
Compusul 7	51 $\pm$ 7,8	-0,2 $\pm$ 0,1	Sinergie moderată

^a Valorile reprezintă deviația aritmetică medie $\pm$ standardă a două experimente independente efectuate în trei exemplare.

25 Procentajele viabilității celulelor pentru Compusul 6 în combinație cu alți inhibitori ai VHC

Pentru a se asigura că rezultatele combinațiilor antivirale nu au fost afectate de citotoxicitatea combinațiilor, citotoxicitatea a fost investigată în paralel, folosind aceleași concentrații de compus testate în testele antivirale (Tabelul XIII). Pentru toți compușii, viabilitatea celulelor a fost de cel puțin 98% din grupele de control netratate pentru combinații la cele mai ridicate concentrații testate. Prin urmare, nici o citotoxicitate semnificativă *in vitro* nu a fost observată la testarea Compusului 6 singur, sau în combinație cu aceste medicamente.

30 Tabelul XIII

Procentajele viabilității celulare pentru Compusul 6, Combinațiile în celulele replicon Huh-Luc

Compuși	Concentrația(iile) (nM)	Viabilitatea celulară % ^a
Compusul 6	0,014	99 $\pm$ 1
Compusul 6 + IFN- α ^b	0,014 + 0,8	102 $\pm$ 3
Compusul 6 + Ribavirină	0,014 + 8000	105 $\pm$ 4
Compusul 6 + Compusul 1	0,014 + 4,0	99 $\pm$ 3
Compusul 6 + Compusul 2	0,014 + 24,0	103 $\pm$ 3

Compusul 6 + Compusul 3	0,014 + 12,8	104 ± 4
Compusul 6 + Compusul 7	0,014 + 8800	103 ± 3

^a % viabilității celulare indică deviația aritmetică medie ± standardă a cel puțin două experimente independente efectuate în trei exemplare.

^b IFN- α este exprimat în unități (U) per mililitru (mL) în loc de o concentrație nanomolară.

Concluzii

- 5 Rezultatele acestor experimente *in vitro* indică faptul că Compusul 6 are sinergie antivirală minoră în combinație cu IFN- α sau inhibitorul polimerazei NS5B nenucleozidic Compusul 1. Combinațiile de Compus 6 cu ribavirină, inhibitor al proteazei NS3 Compusul 2 sau inhibitor al polimerazei NS5B nucleozidic Compusul 7 a rezultat într-o sinergie antivirală moderată. A fost observată sinergie antivirală puternică între Compusul 6 și inhibitorul proteazei NS3 Compusul 3. Nici o citotoxicitate semnificativă *in vitro* nu a fost identificată la testarea acestor combinații de medicamente. Aceste rezultate sugerează că Compusul 6 ar putea fi rațional combinat cu standardul actual de asistență medicală.

Exemplul biologic 6:

Compuși

- 15 Compusul 1, Compusul 3, Compusul 4 și Compusul 6 au fost sintetizați prin Gilead Sciences (Foster City, CA)

Linii celulare

- 20 Celulele replicon ale VHC genotipul 1b (Huh-luc) au fost obținute de la Replikon (Mainz, Germania). Repliconul în aceste celule este desemnat I389luc-ubi-neo/NS3-3'/ET și codifică un marker cu rezistență selectabilă (neomicin-fosfotransferaza), precum și gena reporter a luciferazei extrase din licurici. Celulele Huh-luc au fost menținute în Dulbecco's Modified Eagle's Medium GlutaMax (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplimentat cu 10% de ser fetal bovin (FBS; Hyclone, Logan, UT), 1X penicilină/streptomycină, 1X aminoacizi neesențiali și 0,5 mg/mL de G-418 (toate de la Invitrogen, Carlsbad, CA). Celulele au fost reînsemănțate de două ori pe săptămână și menținute la niveluri subconfluente.

Teste

Determinarea concentrației compusului necesară pentru suprimarea repliconului ARN de către 1-1,5 log peste 6 zile de tratament

- 30 Celulele replicon ale genotipului 1b au fost însemănțate în baloane T-75 la o densitate celulară de 2,5x10⁵ celule/balon, cu excepția G418. Compușii au fost adăugați individual la celule în concentrații variabile: Compusul 6 s-a adăugat în concentrații de fie 1pM, 2pM, 6pM, 8pM sau 12pM, Compusul 4 s-a adăugat la 125 nM, 250 nM, 375 nM, 500 nM sau 1000 nM, Compusul 1 s-a adăugat la 1,25 nM, 2,5 nM, 5 nM, 2,75 nM sau 10 nM, și Compusul 3 s-a adăugat în concentrații de 3,75 nM, 7,5 nM, 11,25 nM, 15 nM, 30 nM sau 60 nM. Baloanele au fost incubate la 37°C, mediile și compușii au fost înprospătați la fiecare două zile. După 6 zile de incubare celulele replicon au fost colectate pentru extracția ARN și analiza repliconului ARN QRT-PCR.

Test de tratare a celulelor replicon cu compuși combinați

- 40 Celule replicon ale genotipului 1b au fost însemănțate în baloane T-75 la o densitate de 2,5x10⁵ celule/balon. Compușii s-au adăugat la flacoanele T- 5 în următoarele concentrații: Compusul 6 la 4 pM, Compusul 4 la 1000 nM, Compusul 1 la 10 nM și Compusul 3 la 26,25 nM. Baloanele au fost incubate la 37°C, iar compușii și mediile au fost înprospătați la fiecare două zile. Toate experimentele au fost realizate în două exemplare și vor fi notat ca balonul 1 și balonul 2. În ziua a 6-a toate celulele au fost colectate din balonul 1 pentru extracția ARN urmată de analiza specifică QRT-PCR a repliconului VHC și celulele din balonul 2 au fost reamplasate pe plăci de cultură tisulară de 10cm, în prezența G418 timp de 14 zile pentru a înregistra formarea coloniei de celule replicon netratate.

Test QRT-PCR

- 50 ARN-ul total a fost extras cu setul RiboPure (AM1924 Life Technologies Corporation Carlsbad, CA) urmând protocolul producătorului. Probe de ARN extrase au fost depozitate la -80°C până la utilizare. Pentru testul RT-PCR cantitativ setul Qiagen One-step QRT-PCR a fost utilizat în conformitate cu protocolul producătorului (Qiagen, Valencia CA). Primerii specifici ai genei NS3 a genotipul 1b VHC, primerul direct NS3_180FL 5'-CGGCGGACTGTCTATCATGGTGC[FAM]G-3' (SEQ ID NO:1) și invers NS3_180 5'-GGTCCTGGTCCACATTGGTGT-3' (SEQ ID NO:2) și setul de primeri endogeni de control (115HM-01) 18S rRNA LUXTM [FAM] au fost produse de către Invitrogen Corporation

(Carlsbad, CA). Pentru etapa reverstranscriptazei, reacțiile au fost incubate la 44°C timp de 30 min, enzima reverstranscriptaza a fost apoi degradată prin încălzirea probei la 94°C timp de 10 min. Etapa Q-PCR a inclus 38 de cicluri la 94°C timp de 15 s și 58°C timp de 30 s.

Rezultate

- 5 Înainte de inițierea experimentelor combinate de tratare a celulelor replicon concentrația compusului necesară pentru a suprima repliconul ARN genotipului 1b prin 1-1,5 log a fost determinată pentru Compusul 6, Compusul 4, Compusul 1 și compusul 3. Scăderea logului repliconului ARN se datorează nivelelor de ARN în celule replicon tratate cu grupul de control DMSO menținute timp de 6 zile.

10 Tabelul XIV

Doza compusului individual capabilă să inducă scăderea 1-1,5log a repliconului ARN într-un test de șase zile

Compus	Scăderea log repliconului RNA	Concentrația compusului (nM)
Compusul 1	-1,0	10
Compusul 3	-0,9	26,25
Compusul 4	-1,2	1000
Compusul 6	-1,4	0,004

Test de tratare combinată a repliconului genotipului 1b

- 15 Suprimarea repliconului ARN de compușii Compusul 6, Compusul 4, Compusul 1 și Compusul 3 a fost determinată într-un test de șase zile sub formă de compuși individuali și în diferite combinații duble, triple și cvadrupe. Scăderea log-ului repliconului ARN corespunde cu nivelele de ARN din celulele replicon tratate cu grupa de control DMSO menținute timp de 6 zile împreună cu baloanele de tratament. Capacitatea diferitelor combinații de compuși pentru a trata celulele din repliconul VHC a fost determinată prin formarea coloniei. Formarea coloniei a apărut după ce tratamentul cu compuși a fost înălțurat și presiunea G418 a fost returnată timp de 14 zile. Dacă o combinație de compus tratează complet populația de celule din repliconul VHC nici o colonie nu se va dezvolta deoarece celulele sunt lipsite de rezistență la G418.

Tabelul XV

- 25 Cuantificarea combinației de compuși în testul de tratare a repliconului

Compuși	Scăderea log repliconului RNA	Numărul de colonii netratate
Compusul 6	-1,4	634
Compusul 4	-1,2	1054
Compusul 1	-1,0	657
Compusul 3	-0,9	989
Compusul 4+Compusul 6	-2,67	15
Compusul 1+Compusul 4	-2,022	14
Compusul 3+Compusul 4	-2,26	23
Compusul 1+Compusul 6	-2,3	148
Compusul 3+Compusul 6	-2,62	13
Compusul 1+Compusul 3	-1,8	113
Compusul 1+Compusul 4+Compusul 6	-2,66	0
Compusul 3+Compusul 4+Compusul 6	-2,71	0
Compusul 1+Compusul 3+Compusul 4	-2,69	0
Compusul 1+Compusul 3+Compusul 6	-2,69	0
Compusul 1+Compusul 3+Compusul 4+Compusul 6	-2,71	0
DMSO (0,2% pentru a selecta combinația cvadruplă)	0	6330

Concluzii

- 30 Rezultatele acestor experimente *in vitro* indică faptul că combinația de doi compuși crește scăderea log-ului ARN-ului viral peste 6 zile de tratament și crește rata celulelor replicon tratate. Cele două combinații de Compus 6 cu Compus 4 sau Compus 3 rezultă într-o suprimare mai mare a log-ului repliconului ARN și cel mai mic număr de colonii netratate comparativ cu toate celelalte combinații de compuși duble. Combinația de trei sau patru compuși vindecă toate celulele replicon, iar tratamentele combinate suprimă nivelele de replicon ARN la limita de detecție a testului.
- 35 Exemplul biologic 7: Rezistența încrucișată a Compusului 10 și Compusului 6

Acest studiu a fost efectuat pentru a determina profilurile rezistenței încrucișate *in vitro* ale Compusului 10 și Compusului 6. Un grup de repliconi mutanți ai VHC care poartă semnătura mutației S282T asociate cu rezistența VHC la inhibitorii nucleozidici ai polimerazei NS5B sau mai frecvent mutațiile NS5A *in vitro* și *in vivo* asociate cu rezistența VHC la medicament a fost investigat prin testul repliconului tranzitoriu pentru a determina dacă există o rezistență încrucișată între mutații ce conferă sensibilitate redusă la Compusul 10 sau Compusul 6. Nici o rezistență încrucișată nu s-a observat între acești compuși cu repliconi mutanți S282T rămași pe deplin sensibili la Compusul 6 și mutanți NS5A care nu prezintă sensibilitate redusă la Compusul 10.

10 Materiale și metode

Reactivi

Compuși

Compusul 6 și Compusul 10 au fost sintetizați la Gilead Sciences, Inc. în Foster City, CA.

Linii celulare

15 Huh-lunet, o clonă Huh-7 care este extrem de permisivă pentru replicarea VHC, a fost obținută de la ReBLikon GmbH (Mainz, Germania). Celulele Huh-lunet au fost menținute în Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO, Carlsbad, CA) suplimentat cu 10% de ser fetal bovin (FBS; Hyclone, Logan, UT). Celulele au fost menținute la 37°C în incubatoare umidificate (85% umiditate) și în atmosferă de 5% CO₂.

20 PI-hRluc, un replicon bicistronic care codifică gena luciferazei Renilla în aval de genele nestructurale ale VHC de genotipul 1b (tulpina Con-1 și polio IRES (NS3 - NS5B) în aval de EMCV IRES, a fost utilizat pentru studiile transfecției tranzitorii. Plasmida pPI-hRluc a fost generată din plasmida pFKI341 PI-Luc/NS3-3'/ET, care codifică un replicon subgenomic (tulpina Con-1) al genotipului 1b și a fost obținut de la ReBLikon (Friebe et al., J Virol 2001; 75
25 (24):12047-57). Gena hRluc a fost PCR amplificată din pF9 CMV hRluc neo Flexi(R) (Promega, Madison, WI) prin PCR folosind Accuprime Super Mix I (Invitrogen, Carlsbad, CA) și primerii PV_Rluc_Top și 3'-Rluc (NotI). Acești doi primeri au următoarele secvențe și transporta situsuri de restricție pentru clonarea ulterioară: PV_Rluc_Top: 5' ATC AGA TTG CAA TAT CAT AAT GGC TTC CAA GGT GTA CG 3' (SEQ ID NR: 3); 3'-Rluc(NotI): 5' ACG TCA CTA TCT
30 ACG CGG CCG CTT ACT GCT CGT TCT TC3'(sit NotI subliniat) (SEQ ID NR:4). Promotorul T7, 5'UTR și Polio Virus IRES au fost PCR amplificați din plasmida pFKI341 PI-Luc/NS3-3'/ET utilizând primerii 5'-P7(SbfI) și PV_Rluc_Bottom. Acești doi primeri au următoarele secvențe și transporta situsuri de restricție pentru clonarea ulterioară: 5'-P7(SbfI): 5' GCT CAA AAG CTG CCT GCA GG T 3' (sit SbfI subliniat) (SEQ ID NR:5);
35 PV_Rluc_Bottom: 5' CGT ACA CCT TGG AAG CCA TGA TTA TAC AAT TGT CTG AT (SEQ ID NR:6). Fragmentele PCR ulterioare din cele două reacții de mai sus au fost apoi unite prin suprapunerea PCR și primerilor 5'-P7(SbfI) și 3'-Rluc(NotI). Produsul de amplificare completat P7-5'UTR-Polio Virus IRES-hRluc a fost subclonat în pCR2.1-TOPO. Plasmida rezultată a fost digerată cu NotI și SbfI, iar fragmentul excizat (P7-5'UTR-Polio Virus IRES-hRluc) a fost ligat folosind ligaza ADN T4 în pFKI341 PI-Luc/NS3-3'/ET digerat cu aceleași
40 enzime. Vectorul rezultat, pPI-hRluc, a fost secvențializat pentru a confirma orientarea corectă și secvența regiunii P75'UTR-Polio Virus IRES-hRluc a plasmidei.

Repliconii GT 1a și 2a conținând hRluc au fost descriși anterior (Robinson M. et al. Novel hepatitis C virus reporter replicon cell lines enable efficient antiviral screening against genotype
45 1a. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, vol. 54, nr. 8, p. 3099-3106).

Repliconul PI-hRluc a fost utilizat ca o carcasă pentru construcția himerei. O ștergere internă a fost efectuată în NS5B făcând-o deficientă la replicare. Ultimele perechi bazice 413 (care codifică ultimii aminoacizi 137 NS5A) de 1b-con-1 NS5A au fost sintetizate în cadrul secvențelor NS5B din genotipurile 2b, 3a, 4a, 5a și 6a (Genscript Inc. Piscataway NJ).
50 Secvențele consens NS5B pentru fiecare dintre aceste genotipuri au fost derivate prin alinierea secvențelor depozitate în baza de date European HCV și extragerea unui consens. Aceste secvențe consens noi pentru NS5B, precum și secvențele derivate din izolate clinice individuale (Koleen J. Herlihy et al. Development of Intergenotypic Chimeric Replicons To Determine the Broad-Spectrum Antiviral Activities of Hepatitis C Virus Polymerase Inhibitors. Antimicrobial
55 Agents and Chemotherapy, 2008, vol. 52, nr. 10, p. 3523-3531) au fost utilizate pentru a construi repliconii himerici NS5B. Un sit XhoI unic a fost utilizat la capătul 5' și un sit Asel unic la capătul 3' pentru a clona direcțional în vectorul 1b-hRluc/NeoR NS5B prin tehnici standard de biologie moleculară.

Mutațiile NS5B S282T au fost introduse în plasmidele replicon folosind setul de mutagenază QuikChange II XL în conformitate cu instrucțiunile producătorului (Stratagene, La Jolla, CA). Întregul replicon mutant a fost secvențat pentru a confirma prezența mutației S282T și absența oricăror mutații secundare.

5 Repliconii mutanți NS5A au fost creați prin sintetizarea unei secvențe care codifică primii 149 aminoacizi ai NS5A conținând mutația dorită flancată de un sit 5' și respectiv, 3' BsrGI și EcoRI (Genscript, Piscataway, NJ). Fragmentele sintetizate au fost apoi clonate prin tehnici standard de biologie moleculară într-o plasmidă replicon la Rluc modificată pentru a permite clonarea în situri de restricție BsrGI și EcoRI unice. Mutațiile au fost confirmate prin secvențarea ADN-ului.

10 Repliconii au fost liniarizați folosind următoarele enzime: Spe I (repliconi pe baza 1b PI-Rluc), Hpa I (repliconi pe baza 1a-Rluc) și XbaI/HpaI (repliconul 2a Rluc). ARN replicon au fost transcriși *in vitro* din plasmide care codifică repliconii utilizând un set de transcriere *in vitro* Ribomax T7 (Promega; Madison, WI), după care a urmat purificarea utilizând o coloană RNAeasy (Qiagen; Valencia, CA).

15 Teste

Determinarea sensibilității la medicament utilizând Testul de determinare a repliconului transfecției tranzitorii

ARN-ul a fost transfectat în celule Huh-1met folosind metoda lui Lohmann et al. (Lohmann V et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science, 1999, vol. 285, nr. 5424, p. 110-113). Pe scurt, celulele au fost tripsinizate și spălate de două ori cu PBS. O suspensie de 4×10^6 celule în 400 μ L de PBS au fost amestecate cu 5 μ g de ARN și supusă la electroporare folosind setările de 960 μ F și 270 V. Celulele au fost transferate în 40 mL de mediu de cultură preîncălzit și apoi însemănțate în planșete cu 96 sau 384 de godeuri. 25 Compusii au fost diluați în serie de 3 ori în 100% DMSO și adăugați la celule pentru a obține o concentrație finală de DMSO de 0,5%. Celulele au fost tratate timp de trei zile, după care mediul de cultură a fost eliminat, celulele au fost lizate, iar activitatea luciferazei Renilla a fost cuantificată folosind reactivi disponibili comercial (Promega) și un instrument Victor sau Envision (Perkin Elmer, Waltham, MA).

30 Analiza datelor

Datele au fost convertite în procentaje față de controalele netratate (definite ca 100%), iar valorile EC₅₀ au fost calculate prin regresia neliniară a două seturi de date replicate folosind software-ul GraphPad Prism sau Pipeline Pilot. Modificările multiple ale rezistenței au fost calculate ca raport dintre EC₅₀ a repliconului sălbatic și mutant.

35 Rezultate

Activitatea Compusului 10 și Compusului 6 împotriva S282T

40 Selecția rezistenței *in vitro* anterioară cu Compusul 10 a identificat în mod constant S282T în NS5B ca mutație primară în mai multe genotipuri (GT 1b, 1a și 2a). Mutația S282T NS5B a fost introdusă ulterior în repliconii primari GT 1a, 1b și 2a și repliconii himerici conținând o secvență NS5B 2b, 3a sau 4a clonată într-o carcasă GT1b. Sensibilitatea la Compusul 10, Compusul 6 și ribavirină (RBV) a fost evaluată utilizând un test de replicare tranzitorie. Mutația S282T a prezentat o sensibilitate redusă la Compusul 10 cu valori EC₅₀ în toate cele cinci genotipuri în limitele de la 117,1 nM până la 346,1 nM. Creșterea multiplă a EC₅₀ pentru S282T a variat de la 2,4 până la 16,0 comparativ cu tipul sălbatic de la genotipurile corespunzătoare care demonstrează sensibilitatea scăzută a repliconului la Compusul 10 când mutația S282T NS5B este prezentă.

50 Pentru repliconul de tip sălbatic, valorile EC₅₀ pentru RBV au fost, de asemenea, similare în cele cinci genotipuri testate cu cea mai mică EC₅₀ împotriva GT 2b. Interesant, valorile EC₅₀ pentru repliconii S282T au fost de 5 până la 10 ori mai sensibili la tratamentul cu RBV decât tipul lor sălbatic corespunzător pentru toate cele cinci genotipuri. Nu au fost observate diferențe semnificative în EC₅₀ de Compus 6 între repliconii S282T și de tip sălbatic indicând că această mutație nu alterează sensibilitatea la Compusul 6. În concluzie, în timp ce repliconul S282T a conferit sensibilitate redusă la Compusul 10, repliconul mutant a demonstrat sensibilitate sălbatică la Compusul 6 și o sensibilitate crescută la inhibarea prin RBV a celui de tip sălbatic.

55

Tabelul 7.1.

Activitatea antivirală a Compusului 10 și RBV împotriva repliconului mutant S282T și de tip sălbatic de GT1b, 2a, 2b, 3a și 4a

Replicon	Compusul 10			RBV			Compusul 6		
	EC ₅₀ nMa		Modificare a conformați onală ^b	EC ₅₀ nMa		Modificare a conformați onală ^b	EC ₅₀ nMa		Modificare a conformați onală ^b
	WT	S282T		TS	S282T		TS	S282T	
GT1b	21,5	189,2	8,8	6,6	1,6	0,2	0,5	0,4	0,8
GT2a	146,8	346,1	2,4	8,3	0,6	0,1	516 5	2336	0,5
GT2b	13,3	215,6	16,2	2,6	0,6	0,2	0,5	0,5	0,9
GT3a	33,9	117,1	3,5	6,7	1,0	0,2	0,4	0,2	0,6
GT4a	35,8	217,5	6,1	6,2	0,6	0,1	0,5	0,4	0,8

^a EC₅₀ indică media pentru două sau mai multe experimente independente.

^b Modificarea conformațională de la tipul sălbatic corespunzător.

5

Activitatea Compusului 10 și Compusului 6 împotriva repliconilor mutanți NS5A

Pentru a determina dacă mutațiile NS5A rezistente la medicamente sunt rezistente încrucișat la Compusul 10, un grup de repliconi mutanți NS5A a fost testat pentru sensibilitatea atât la Compusul 6, cât și la Compusul 10. Toți cei șapte repliconi mutanți NS5A au demonstrat o sensibilitate redusă la Compusul 6 cu o creștere a EC₅₀ de la 25 până la 3029 de ori. În contrast, nu s-a observat nici o schimbare semnificativă în EC₅₀ pentru repliconii mutanți NS5A la Compusul 10 sau la un control cu RBV.

Tabelul 7.2.

Activitatea in vitro a Compusului 10 sau Compusului 6 împotriva repliconilor mutanți NS5A în genotipul 1a

Compus	Modificarea conformațională a EC ₅₀ (EC ₅₀ DRM / EC ₅₀ 1a-H77)						
	M28T	Q30H	Q30R	Q30E	L31M	Y93C	Y93H
Compusul 6	25	73	170	997	140	327	3029
Compusul 10	0,9	1,0	0,8	1,0	1,1	ND	0,7
RBV	0,4	0,7	0,8	0,8	0,5		1,0

Concluzii

În acest exemplu, profilurile de rezistență încrucișată ale Compusului 10 și Compusului 6 au fost evaluate utilizând repliconi VHC tranzitorii care codifică mutațiile rezistente cunoscute în NS5A și NS5B care conferă sensibilitate redusă la Compusul 6 și Compusul 10, respectiv. Repliconii NS5B S282T au conferit sensibilitate redusă la Compusul 10, în timp ce nu au existat diferențe semnificative în EC₅₀ a Compusului 6 măsurată de la repliconii sălbatic și S282T. Reciproc, mutațiile ce conferă sensibilitate redusă la Compusul 6 au rămas sensibile la tratamentul cu Compusul 10.

În general, aceste rezultate indică faptul că mutațiile de rezistență pentru Compusul 10 și Compusul 6 nu demonstrează rezistență încrucișată și susțin utilizarea acestor compuși în terapia combinată viitoare pentru tratamentul VHC.

Exemplul biologic 8: Activitatea combinată

Datele studiului combinat al Compusului 10 cu inhibitorul NS5A Compusul 6, inhibitorii non-nucleozidici Compusul 1 sau Compusul 5, inhibitorul proteazei Compusul 3 sau ribavirină (RBV) sunt prezentate pentru un test in vitro de replicon care ramane standard pentru evaluarea activității antivirale pe baza celulelor a inhibitorilor VHC. Aceste rezultate au indicat faptul că Compusul 10 are activitate antivirală aditivă când este combinat cu Compusul 6, Compusul 1, Compusul 5 sau Compusul 3. Suplimentar, Compusul 10 a demonstrat sinergie minoră în combinație cu RBV in vitro.

40

Materiale și metode

Linia celulară și cultura celulară

Linia de celule replicon ale genotipului la VHC utilizată în acest studiu a fost descrisă anterior (Robinson M. et al. Novel hepatitis C virus reporter replicon cell lines enable efficient antiviral screening against genotype 1a. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, vol. 54, nr. 8, p. 3099-3106). Celulele au fost crescute în mediu de cultură celulară conținând Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) cu GlutaMAX (Gibco, Carlsbad, CA, Cat#10569-044), suplimentat cu 10% FBS (HyClone, Logan, UT, Cat#SH30071.03), 100 unități/mL penicilină, 100 μg/mL streptomycină (Gibco, Carlsbad, CA, Cat#15140-122) și 0,1 mM aminoacizi neesențiali (Gibco, Carlsbad, CA, Cat#11140-050). Celulele replicon au fost menținute în 0,5 mg/mL geneticină (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat#10131-035) pentru a preveni pierderea repliconului VHC. Celulele au fost reînsămânțate la fiecare 3-4 zile înainte de a ajunge la confluență.

Test cu repliconi ai VHC pentru determinările EC₅₀, CC₅₀ și studii combinate
Toți compușii au fost furnizați în 100% DMSO. Diluțiile seriale de compuși au fost efectuate în 100% DMSO. Toate diluții seriale au fost efectuate în planșete de polipropilenă cu 384 de godeuri (Thermo Scientific, Hudson, NH, Cat#4341) utilizând o Biomek FX Workstation. Pentru determinările EC₅₀ și CC₅₀, compușii de testat au fost diluați în serie în zece etape de 1:3 diluții în coloanele 3-20 ale planșetelor cu 384 de godeuri. Pentru studiile combinaționale, un compus a fost diluat în serie în nouă etape de 1:2 diluții în direcția orizontală cu alt compus diluat în serie în șapte etape de 1:2 diluții în direcția verticală. Aceasta a realizat un set definit de diferite concentrații și rapoarte medicamentoase. Pentru fiecare medicament individual, valoarea EC₅₀ a fost selectată ca punctul median pentru intervalul de concentrații testat. Toate diluțiile seriale au fost efectuate în patru copii per compus în aceeași planșetă cu 384 de godeuri. 100% DMSO s-a adăugat în coloana 1-2 a fiecărei planșete cu 384 de godeuri cu diluție în serie. Un inhibitor al proteazei VHC ITMN-191 la 100 μM s-a adăugat în coloana 23 ca un control al 100% inhibiție a replicării VHC în timp ce puromicină la 10 mM s-a adăugat în coloana 24 ca un control al 100% citotoxicitate.

La fiecare godeu al unei planșete de polistiren negru cu 384 de godeuri (Greiner Bio-one, Monroe, NC, Cat#781086, cultură celulară tratată), 90 μL de mediu de cultură celulară (fără geneticină) conținând 2000 de celule replicon VHC suspendate s-au adăugat cu o Biotek μFlow Workstation. Pentru transferul compusului în planșete de cultură celulară, 0,4 μL de soluție de compus de la planșeta cu diluție serială a compusului s-a transferat la planșeta de cultură celulară pe o Biomek FX Workstation. Concentrația de DMSO în godeurile analitice finale a fost de 0,44%. Planșetele au fost incubate timp de 3 zile la 37°C cu 5% CO₂ și 85% umiditate.

Testul cu repliconi ai VHC a fost un test multiplex care poate evalua atât citotoxicitatea, cât și activitatea anti-replicon din același godeu. Testul CC₅₀ a fost efectuat primul. Mediile din planșeta de cultură celulară cu 384 godeuri au fost aspirate și godeurile au fost spălate de patru ori cu 100 μL 1 X PBS fiecare, folosind un dispozitiv de spălat planșetele Biotek ELx405. Un volum de 50 μL de o soluție conținând 400 nM calceină AM (AnaSpec, Fremont, CA, Cat#5200-056) în 1 X PBS s-a adăugat la fiecare godeu al planșetei cu o Biotek μFlow Workstation. Planșeta s-a incubat timp de 30 minute la temperatura camerei înainte de măsurarea semnalului de fluorescență (excitație 490 nm, emisie 520 nm) cu un spectrofotometru pt. citirea planșetelor Perkin Elmer Envision.

Testul EC₅₀ a fost efectuat în aceleași godeuri ca testul CC₅₀. Soluția de calceină-PBS în planșeta de cultură celulară cu 384 de godeuri a fost aspirată cu un dispozitiv de spălat planșetele Biotek ELx405. Un volum de 20 μL de tampon luciferază Dual-Glo (Promega, Madison, WI, Cat#E298B) s-a adăugat la fiecare godeu al planșetei cu o Biotek μFlow Workstation. Planșeta s-a incubat timp de 10 minute la temperatura camerei. Un volum de 20 μL de soluție conținând 1:100 amestec de substrat Dual-Glo Stop & Glo (Promega, Madison, WI, Cat#E313B) și tampon Dual-Glo Stop & Glo (Promega, Madison, WI, Cat#E314B) s-a adăugat apoi la fiecare godeu al planșetei cu o Biotek μFlow Workstation. Planșeta s-a incubat apoi la temperatura camerei timp de 10 minute înainte de măsurarea semnalului de luminiscență cu un spectrofotometru pt. citirea planșetelor Perkin Elmer Envision.

Analiza datelor

Efectul citotoxicității a fost determinat prin conversia calceinei AM în produs fluorescent. Citotoxicitatea procentuală a fost calculată prin ecuația 1:

$$\% \text{ citotoxicitate sau } \% \text{ inhibiție} = 100 \times \left(1 - \frac{X_C - M_B}{M_D - M_B}\right) \quad (1)$$

unde X_C este semnalul de fluorescență din godeul tratat cu compus; M_B este semnalul de fluorescență medie din godeurile tratate cu puromicină; M_D este semnalul de fluorescență medie din godeurile tratate cu DMSO. Activitatea de replicare anti-VHC a fost determinată de semnalul de luminescență generat de luciferaza renilla reporter a repliconului VHC. Inhibarea procentuală pe repliconul VHC a fost calculată folosind ecuația 1, unde X_C este semnalul de luminescență din godeul tratat cu compus; M_B este semnalul de luminescență medie din godeurile tratate cu ITMN-191; M_D este semnalul de luminescență medie din godeurile tratate cu DMSO.

Valorile CC_{50} au fost determinate ca fiind concentrația compusului de testare care a produs o scădere de 50% a viabilității celulare. Valorile EC_{50} au fost determinate ca fiind concentrația compusului de testare care a produs o scădere de 50% a replicării VHC. Atât valorile CC_{50} , cât și valorile EC_{50} au fost obținute utilizând pachetul software Pipeline Pilot 5.0 (Accelrys, San Diego, CA) prin ajustarea regresiei neliniare a datelor experimentale la ecuația 2:

$$y = d + \frac{a - d}{\left[1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b\right]} \quad (2)$$

unde y este inhibarea % observată a repliconului VHC la concentrația x a compusului; d este răspunsul estimat la concentrația zero a compusului; a este răspunsul estimat la concentrația infinită a compusului; c este concentrația medie (CC_{50} sau EC_{50}); b este coeficientul de inclinare Hill.

Datele experimentale ale studiului combinat au fost analizate cu ajutorul programului MacSynergy II dezvoltat de Prichard și Shipman (Prichard MN, Aseltine KR, Shipman C, Jr. MacSynergyTM II, Version 1.0. University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 1993). Software-ul (MacSynergyTM II, University of Michigan, MI) calculează inhibarea teoretică presupunând o interacțiune aditivă între medicamente (pe baza modelului Bliss Independence) și cuantifică diferențele statistic semnificative între valorile inhibiției teoretice și observate. Trasarea grafică a acestor diferențe în trei dimensiuni rezultă într-o suprafață în care creșterile în planul Z reprezintă sinergia antivirală, iar scăderile reprezintă antagonismul antiviral între compuși. Volumele calculate ale deviațiilor de suprafață sunt exprimate în $\mu M^2\%$. Per Prichard și Shipman, efectele combinate sunt definite ca:

- Sinergie puternică: $> 100 \mu M^2\%$
- Sinergie moderată: $> 50 \leq 100 \mu M^2\%$
- Sinergie minoră: $> 25 \text{ și } \leq 50 \mu M^2\%$
- Aditivitate: $\leq 25 \text{ și } > -25 \mu M^2\%$
- Antagonism minor: $\leq -25 \text{ și } > -50 \mu M^2\%$
- Antagonism moderat: $\leq -50 \text{ și } > -100 \mu M^2\%$
- Antagonism puternic: $\leq -100 \mu M^2\%$

Pentru fiecare studiu combinat, trei experimente independente au fost efectuate cu patru exemplare identice în fiecare experiment.

Rezultate

Activitatea antivirală și citotoxicitatea compușilor individuali în testul cu repliconi ai genotipului VHC 1a

Activitatea anti-VHC și citotoxicitatea Compusului 10 combinat cu alți compuși anti-VHC au fost testate în celule Huh-7 purtând un replicon al VHC de genotipul 1a. Valorile EC_{50} și CC_{50} pentru toți compușii sunt listate în Tabelul următor. Nu există nici o citotoxicitate semnificativă observată pentru toți compușii individuali până la cele mai mari concentrații testate în testul combinat.

Tabelul 8.1.

EC_{50} și CC_{50} ale Compușilor utilizați în acest studiu împotriva repliconului VHC de genotipul 1a

Compuși	Clasa	EC_{50}^a (nM)	CC_{50}^a (nM)
Compusul 10	Promedicament nucleozidic al NS5B	39	>82446

Compusul 6	Inhibitor al NS5A	0.032	>44400
Compusul 1	Inhibitor non-nucleozidic al NS5B	18	>44400
Compusul 5	Inhibitor non-nucleozidic al NS5B	14	>44400
Compusul 3	Inhibitor al proteazei NS3	46	>22200
RBV	Analog nucleozidic	33626	>88800

^a Valorile sunt medii geometrice pentru trei sau mai multe experimente independente

Activitatea antivirală și citotoxicitatea Compusului 10 în combinație cu alte clase de medicamente anti-VHC.

- 5 Efectele antivirale ale Compusului 10 în combinație cu alți compuși anti-VHC au fost evaluate cu ajutorul repliconului VHC de genotipul 1a. Rezultatele au fost analizate cu ajutorul MacSynergy II, care prevede diagrame de suprafață care prezintă devieri semnificative de la aditivitate. Volumele de sinergie și antagonism ($\mu\text{M}^2\%$), calculate din devierile de la suprafața aditivă, sunt prezentate în Tabelul următor. La un interval de încredere de 95%, volumele medii
- 10 de sinergie și antagonism au fost între 25 și $-25 \mu\text{M}^2\%$ atunci când Compusul 10 a fost combinat cu Compusul 6, Compusul 1, Compusul 5 sau Compusul 3 indicând interacțiunea aditivă cu Compusul 10. Mai mult decât atât, Compusul 10 prezintă un volum de sinergie în intervalul de 25 până la $50 \mu\text{M}^2\%$ atunci când este combinat cu RBV, sugerând o interacțiune sinergică minoră. În studiile combinate utilizând antivirale cu acțiune directă cu Compusul 10, viabilitatea
- 15 celulară a fost mai mare de 93% la cele mai mari concentrații de combinații de compuși testați în timp ce studiile care analizează efectele combinate ale Compusului 10 și RBV au demonstrat viabilitate celulară mai mare de 85% la cele mai mari concentrații de medicamente combinate.

Tabelul 8.2.

20 Cuantificarea antagonismului și sinergiei antivirale și interacțiunile medicamentelor pentru combinațiile de medicamente cu Compusul 10

Compusul utilizat în combinație cu Compusul 10	Clasa	Volumul de sinergie (nM^2) ^a	Volumul de antagonism (nM^2) ^a	Interacțiunea
Compusul 6	Inhibitor al NS5A	$3,3 \pm 4,2$	$-7,7 \pm 13,3$	Aditivă
Compusul 1	Inhibitor non-nucleozidic al NS5B	$4,7 \pm 8,1$	$-11,7 \pm 10,0$	Aditivă
Compusul 5	Inhibitor non-nucleozidic al NS5B	$1,3 \pm 2,3$	$-5,7 \pm 9,0$	Aditivă
Compusul 3	Inhibitor al proteazei NS3	$1,0 \pm 1,7$	$-3,0 \pm 4,4$	Aditivă
RBV	Analog nucleozidic	$35,3 \pm 3,2$	$-2,0 \pm 2,0$	Sinergie minoră

^a Valorile reprezintă deviația medie $\pm$ standardă a trei experimente independente efectuate în patru exemplare

Tabelul 8.3.

25 Cuantificarea citotoxicității în combinațiile de compuși

Compusul utilizat în combinație cu Compusul 10	Cea mai mare concentrație a Compusului utilizat cu cea mai mare concentrație (320 nM) a Compusului 10	Citotoxicitatea la cea mai mare concentrație a combinațiilor de compuși (inhibiția % asupra creșterii celulelor)
Compusul 6	0,16 nM	5,0 + 5,0
Compusul 1	120 nM	7,0 + 4,6
Compusul 5	64 nM	4,3 + 2,9
Compusul 3	240 nM	2,0 + 3,5
RBV	16000 nM	14,0 + 4,4

^a Valorile reprezintă deviația medie $\pm$ standard a trei experimente independente efectuate în patru exemplare

Concluzii

- 30 Activitatea antivirală a Compusului 10 a fost testată în combinație cu Compusul 6, Compusul 1, Compusul 5, Compusul 3 sau RBV. Compusul 10 a demonstrat o activitate antivirală aditivă

în combinație cu Compusul 6, Compusul 1, Compusul 5 sau Compusul 3 și sinergie minoră cu RBV.

Pe scurt, aceste rezultate susțin potențialul Compusului 10 de a fi utilizat în combinație cu Compusul 6, Compusul 1, Compusul 5, Compusul 3 sau RBV pentru a realiza suprimarea virală îmbunătățită fără a reduce eficacitatea oricărei dintre medicamentele individuale.

Exemplul clinic 1: Testarea clinică a activității anti-VHC a combinației de Compus 1 și Compus 2

Acest Exemplu Clinic arată că o combinație de Compus 1 și Compus 2 plus ribavirină este mai eficientă în reducerea încărcăturii virale VHC și suprimarea recăderii virale VHC, decât o combinație de Compus 1 și Compus 2 fără ribavirină.

Schema studiului clinic:

Un studiu de faza 2 randomizat, deschis al Compusului 2 plus Compusul 1 singur și în combinație cu ribavirina timp de 28 de zile la subiecți cu infecția cronică VHC genotipul 1 netratați anterior. Subiecților din Brațul 1 li s-a administrat Compusul 2 la 75 mg + Compusul 1 la 40 mg, ambii administrați de două ori pe zi (BID) (schemă dublă) și subiecților din Brațul 2 li s-a administrat Compusul 2 la 75 mg + Compusul 1 la 40 mg, ambii administrați de două ori, și plus ribavirina, de asemenea, administrată BID (schemă triplă) timp de 28 de zile.

În Ziua 28, la toți subiecții s-a inițiat administrarea PEG/ribavirinei. În plus, protocolul numit pentru subiecții cu un răspuns virusologic insuficient (reducerea $< 2 \log_{10}$ UI/mL din ARN VHC inițial la Ziua 5) sau recidivă virologică (creșterea ARN VHC de $> 0,5 \log_{10}$ UI/mL din nivelul inferior a confirmat peste două momente de timp care apar după Ziua 5 cu o valoare absolută > 1000 UI/mL) pentru a iniția administrarea PEG/RIBA înainte de Ziua 28.

Pentru subiecții cu răspuns virologic insuficient, administrarea combinației de interferon pegilat (PEG) și ribavirină (RIBA) a fost inițiată înainte de Ziua 28 cu sau fără continuarea administrării Compusului 2 + Compusul 1. Drept rezultat, până la Ziua 28 a studiului, subiecții au primit unul din cele patru tratamente:

- (i) Compus 2 + Compus 1,
- (ii) Compus 2 + Compus 1 + RIBA,
- (iii) Compus 2 + Compus 1 + PEG/RIBA, sau
- (iv) PEG/RIBA.

Un total de 31 de subiecți au fost înrolați și dozarea a început (16 subiecți au primit o schemă dublă în Brațul 1 și 15 subiecți au primit o schemă triplă în Brațul 2). Datele demografice preliminare ale subiecților și caracteristicile de bază (Tabelul XVI) au fost în general comparabile între Brațele 1 și 2, în afară de un număr mai mare de subiecți cu genotipul 1b din Brațul 2. Patru subiecți au fost identificați ca având VHC de genotipul 1b la examinare (un subiect pe schema dublă și trei subiecți pe schema triplă), dar nu au fost confirmați ca având genotipul 1a sau 1b la o analiză mai aprofundată, cu continuarea evaluării suplimentare.

Nici un subiect nu s-a prezentat cu evenimente adverse grave. Medicamentele de studiu au fost în general bine tolerate, cu toate evenimentele adverse fiind de gradul 1-2 în severitate, cu excepția oboselii de gradul 3, care a fost singurul eveniment advers emergent din tratament care a condus la întreruperea administrării medicamentului de studiu. Înainte de inițierea administrării PEG/ribavirinei, cele mai frecvente evenimente adverse emergente din tratament care au apărut la mai mult de un subiect au fost cefalee ($n=5$) și diaree sau greață ($n=3$ fiecare) în Brațul 1 și cefalee ($n=7$), diaree sau oboseală ($n=3$ fiecare), greață, astenie, prurit sau insomnie ($n=2$ fiecare) în Brațul 2. Când Compusul 2 + Compusul 1 s-au administrat în combinație cu PEG/RIBA, singurele evenimente adverse care au apărut la mai mult de un subiect au fost boli asemănătoare gripei ($n=5$) și mialgie ($n=3$), ambele evenimente adverse comune cu terapia PEG/RIBA. În ceea ce privește anomaliile de laborator, nu au existat evenimente de Gradul 4 în timpul perioadei de tratament de 28 de zile. Printre subiecții care au primit medicamente de studiu, au existat două creșteri de Gradul 3 emergente din tratament ale bilirubinei totale în ribavirina din Brațul 2 (care au apărut în Ziua 7, dar rezolvate cu dozarea continuată a medicamentului de studiu). Au fost, de asemenea, 2 creșteri de Gradul 1 și o singură creștere de Gradul 2 a bilirubinei totale printre alți subiecți din acest Braț de dozare (cu ribavirină). Printre subiecții din Brațul 1 (fără ribavirină), au existat patru creșteri de Gradul 1 ale bilirubinei totale. Valorile ALT s-au redus cu aproximativ 40 U/L de la valoarea inițială în fiecare braț de studiu și nici un subiect nu a întrerupt administrarea medicamentelor de studiu din cauza anomaliilor QTc. Datele de siguranță preliminare sunt prezentate în Tabelul XVIII.

- ARN VHC plasmatic a fost monitorizat de aproximativ doua ori pe săptămână pentru a evalua răspunsul virusologic în raport cu criteriile specificate în protocol pentru inițierea precoce a PEG/RIBA. Din analiză preliminară a valorilor ARN VHC, declinul maximal median al ARN VHC a fost de 3,9 log₁₀ UI/mL pentru schema dublă și 5,0 log₁₀ UI/mL pentru schema triplă.
- 5 Timpul median de scădere maximă a ARN VHC a fost de 7 zile pentru schema dublă și 14 zile pentru schema triplă, cu diferența atribuită incidenței întârziate și debutului progresiei virale în brațul care conține ribavirină. Trei din 15 (20%) subiecți care au primit schema dublă și 10 din 13 (77%) subiecții care au primit schema triplă au avut valori inferioare ale ARN VHC ≤ 30 UI/mL (cu excepția subiecților non-GT1). 13/16 (81%) subiecți care au primit Compusul 2/Compusul 1 și 6/15 (40%) subiecți care au primit Compusul 2/Compusul 1/Ribavirină au inițiat administrarea PEG sau PEG/ribavirinei înainte de începerea programată în Ziua 28 a studiului. Detalii suplimentare ale rezultatelor virologice sunt prevăzute în:
- Rezultate. Compusul 2 + Compusul 1 singur și în combinație cu RIBA au fost bine tolerați până la 28 zile de subiecții cu VHC în acest studiu, atât înainte cât și după adăugarea PEG sau PEG/ribavirinei. Ambele regimuri au produs supresiunea puternică a ARN VHC, cu activitate mai mare și mai susținută în trei scheme de tratament medicamentos.
- 15

Tabelul XVI

Datele demografice preliminare și caracteristicile de bază

	Brațul #1 Compusul 2 la 75 mg BID + Compusul 1 la 40 mg BID (n=16)	Brațul #2: Compusul 2 la 75 mg BID + Compusul 1 la 40 mg BID + RIBA (n=15)
Varsta în ani - Medie	47 (30,66)	55 (27, 63)
Sex	14 masculin 2 feminin	11 masculin 4 feminin
Etnicitate	16 non-ispanic/Latino	15 non-ispanic/Latino
Rasă	13 albă 2 neagră 1 asiatică	13 albă 2 neagră 0 asiatică
Greutatea corporală inițială în kg – Medie	86,1 (57,8, 110,5)	79,0 (51, 127,5)
BMI inițial în kg/M ² – Medie	27,1 (21,5, 34,1)	24,7 (19,9, 37,6)
Log ₁₀ RNA VHC inițial (IU/mL) din Lab central– Mediu Lab central	6,17 (5,25, 7,26)	6,34 (5,41, 7,19)
Genotipul VHC inițial	8 1a 8 1b	3 1a 12 1b

20 Tabelul XVII

Rezultatele preliminare privind siguranța

	Brațul 1: Compusul 2 la 75 mg BID + Compusul 1 la 40 mg BID (n=16)	Brațul 2: Compusul 2 la 75 mg BID + Compusul 1 la 40 mg BID + RIBA (n=15)
Evenimente adverse de Gradul 3 (EA):		
Oboseală	1	0
Gradul 1/Gradul 2 (EA):		
Cefalee	5 (31%)	7 (47%)
Diaree	3 (19%)	3 (20%)
Greață	3 (19%)	2 (13%)
Oboseală	0	3 (20%)
Astenie	0	2 (13%)
Prurit	1 (6%)	2 (13%)
Insomnie	0	2 (13%)
Anomalii de laborator de Gradul 3:		
Bilirubină	0	2
Anomalii de laborator de Gradul 1/Gradul 2:		

	Brațul 1: Compusul 2 la 75 mg BID + Compusul 1 la 40 mg BID (n=16)	Brațul 2: Compusul 2 la 75 mg BID + Compusul 1 la 40 mg BID + RIBA (n=15)
Bilirubină	4	3
Hemoglobină	0	2
Glucoză (nu pe stomacul gol)	8	5

Tabelul XVIII

Rezultate virologice preliminare

	Brațul 1: Compusul 2 la 75 mg BID + Compusul 1 la 40 mg BID (n=16)	Brațul 1: Compusul 2 la 75 mg BID + Compusul 1 la 40 mg BID <i>GT1 neconfirmat Subiecții excluși (n=15)*</i>	Brațul 2: Compusul 2 la 75 mg BID + Compusul 1 la 40 mg BID + Ribavirină (n=15)	Brațul 2: Compusul 2 la 75 mg BID + Compusul 1 la 40 mg BID + Ribavirină <i>GT1 neconfirmat Subiecții excluși (n=13)</i>
Scăderea mediană maximă a RNA VHC Scăderea medie maximă a RNA VHC	-3.9 log ₁₀ UI/mL -3.4 log ₁₀ UI/mL	-4.0 log ₁₀ UI/mL -3.6 log ₁₀ UI/mL	-5.0 log ₁₀ UI/mL -4.5 log ₁₀ UI/mL	-5.0 log ₁₀ UI/mL -4.9 log ₁₀ UI/mL
Timpul mediu până la progresie	16 zile	16 zile	23 zile	23 zile
Subiecții cu un nivel inferior al RNA VHC <50 UI/mL	3/16 (19%)	3/15 (20%)	10/15 (63%)	10/13 (77%)
Subiecții cu progresie**	12 (75%)	12/15 (80%)	6/15 (40%)	6/13 (46%)
Răspunsul în Ziua 28: RVR la < 25 UI/mL RVR la < 50 UI/mL	1/16 (6%) 1/16 (6%)	1/15 (7%) 1/15 (7%)	5/15 (33%) 6/15 (40%)	5/13 (38%) 6/13 (46%)

* GT1 este o abreviere pentru VHC de genotipul 1.

- 5 Subiecții 1011, 1012 și 1043 la un Centru de studiu francez au fost excluși;
Subiectul 1004 nu a fost exclus

** Progresia definită ca creștere > 1 log a valorii inferioare a ARN VHC menționate mai sus sau ARN VHC > 25 UI/mL, după un nivel inferior de < 25 UI/mL

- 10 Datele prezentate în Tabelul XVIII arată că a existat o scădere de aproximativ 10 ori mai mare atât a nivelului median maxim de ARN VHC, cât și nivelul mediu maxim de ARN VHC ca răspuns la combinația de Compus 2 + Compus 1 în prezența ribavirinei comparativ cu lipsa ribavirinei. De asemenea, numărul de subiecți de studiu având un nivel inferior de ARN VHC sub 50 UI/mL este mai mare în prezența ribavirinei decât în absența ribavirinei. Aceste rezultate arată că ribavirina, în absența interferonului, potențează în mod semnificativ activitatea antivirală
- 15 a combinației de Compus 1 și Compus 2.

- În plus, timpul mediu până la progresia VHC, care este o măsură a creșterii eventuale de încărcăturii virale VHC deoarece virusul mutează și devine mai puțin sensibil la medicamentele antivirale, este mai mare în prezența ribavirinei decât în absența ribavirinei. Mai mult decât atât, numărul de subiecți care prezintă progresia virală este substanțial mai mic în prezența ribavirinei decât în absența ribavirinei. Aceste rezultate arată că virusul VHC este mai puțin capabil să dezvolte rezistență la combinația de Compus 1 și Compus 2 în prezența ribavirinei.
- 20

Mai mult, datele prezentate în Tabelul XVIII arată că numărul de pacienți care au obținut un răspuns virologic rapid (RVR) în prezența ribavirinei este semnificativ mai mare decât în absența ribavirinei. Atingerea RVR corelează pozitiv cu vindecarea infecției VHC.

Luete împreună datele prezentate în Tabelul XVIII arată că o combinație a Compusului 1, Compusului 2 și ribavirinei produce o reducere rapidă și semnificativă clinic a încărcăturii virale VHC, cu o recădere virală redusă, chiar și în absența administrării interferonului.

Deși exemplele de realizare specifice ale prezentei invenții sunt ilustrate aici și descrise în detaliu, invenția nu este limitată la acestea. Descrierile detaliate de mai sus sunt oferite ca exemplu de realizare a prezentei invenții și nu trebuie să fie construite ca reprezentând orice limitare a invenției. Modificările vor fi evidente pentru specialiștii în domeniu, iar toate modificările care nu se îndepărtează de esența invenției sunt destinate a fi incluse în domeniul de aplicare al revendicărilor anexate.

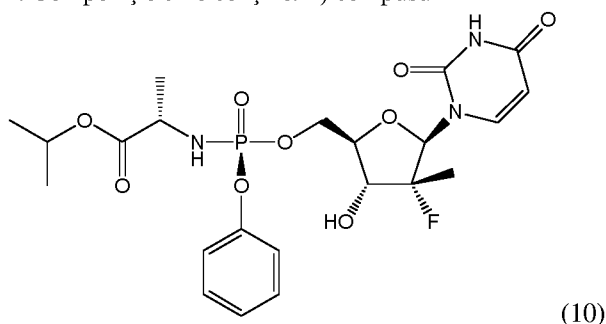
10

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. US 7964580 B2 2011.06.21
2. US 2010298257 A1 2010.11.25

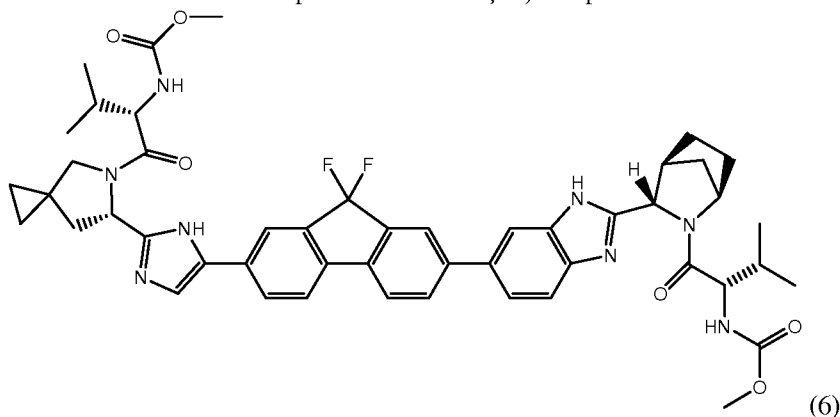
(57) Revendicări:

1. Compoziție care conține: 1) compusul 10



(10)

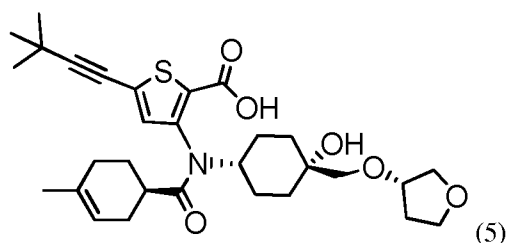
sau o sare farmaceutic acceptabilă a acestuia și 2) compusul 6



(6)

sau o sare farmaceutic acceptabilă a acestuia.

2. Compoziție conform revendicării 1, care conține suplimentar compusul 5



sau o sare farmaceutic acceptabilă a acestuia.

3. Compoziție conform revendicării 1 sau 2, care conține suplimentar unul sau mai mulți diluanți sau purtători farmaceutic acceptabili.

4. Compoziție conform revendicării 3, care este formulată ca o formă medicamentoasă standardizată pentru administrare o dată pe zi.

5. Compoziție conform revendicării 3 sau 4, care este formulată pentru administrare orală.

6. Compoziție conform revendicării 5, care este formulată ca tabletă.

7. Compoziție, astfel cum este descrisă în oricare dintre revendicările 1-6, pentru utilizare în tratamentul profilactic sau terapeutic al unei infecții VHC.

8. Compoziție utilizată conform revendicării 7, care nu este destinată administrării cu un interferon.

9. Compoziție utilizată conform revendicării 7 sau 8, care este destinată administrării cu ribavirină.