

Traduzione del testo del brevetto europeo n° 2897611

Titolare: **AbbVie Inc.**

Titolo: **METODI PER IL TRATTAMENTO DI EPATITE C**

* * * * *

5

DESCRIZIONE

Campo

[0001] La presente invenzione si riferisce a inibitori pan-genotipici dell'HCV e a metodi per utilizzare gli stessi per trattare un'infezione da HCV.

Stato dell'arte

10 [0002] Il virus dell'epatite C (HCV) è un virus RNA appartenente al genere Hepacivirus della famiglia Flaviviridae. Il virione dell'HCV avvolto contiene un genoma di RNA a filamento positivo che codifica tutte le proteine specifiche del virus conosciute in un singolo quadro di lettura aperto ininterrotto. Il quadro di lettura aperto comprende circa 9500 nucleotidi e codifica una singola grande poliproteina di circa 3000 aminoacidi. La poliproteina comprende
15 una proteina centrale, le proteine dell'involucro E1 ed E2, una proteina legata alla membrana p7 e le proteine non strutturali NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B.

[0003] L'infezione da HCV è associata a una patologia epatica progressiva, tra cui cirrosi e carcinoma epatocellulare. L'epatite C cronica può essere trattata con peginterferone alfa in combinazione con ribavirina. Restano limiti sostanziali all'efficacia e alla tollerabilità poiché
20 molti utenti soffrono di effetti collaterali, e l'eliminazione virale dal corpo è spesso inadeguata. Pertanto, sono necessari nuovi farmaci per trattare un'infezione da HCV.

Sommario

[0004] È stato sorprendentemente scoperto che il metil {(2S,3R)-1-[(2S)-2-{5-[(2R,5R)-1-{3,5-difluoro-4-[4-(4-fluorofenile)piperidin-1-il]fenil}-5-(6-fluoro-2-[(2S)-1-[N-(metossicarbonil)-O-metil-L-treonil]pirrolidin-2-il)}-1H-benzimi-dazol-5-il]pirrolidin-2-il]-6-

25

fluoro-1H-benzimidazol-2-il}pirrolidin-1-il]-3-metossi-1-oxobutan-2-il} carbammato (di seguito "Composto 1") e i suoi sali farmaceuticamente accettabili sono inibitori pan-genotipici dell'HCV. Questi composti sono efficaci nell'inibire una vasta gamma di genotipi e varianti dell'HCV, come il genotipo 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dell'HCV.

5 [0005] Di conseguenza, un primo aspetto dell'invenzione presenta metodi per il trattamento dell'HCV. I metodi comprendono la somministrazione di una quantità efficace di Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile a un paziente con HCV, indipendentemente dagli uno o più genotipi specifici dell'HCV che ha il paziente. Pertanto, il paziente preferibilmente non viene genotipizzato prima del trattamento, e il trattamento può essere
10 iniziato senza pre-screening del paziente per specifici genotipi dell'HCV.

[0006] In una forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il paziente è infetto dal genotipo 2, come il genotipo 2a o 2b. In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il paziente è infetto dal genotipo 3, come il genotipo 3a. In un'altra forma di
15 realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il paziente è infetto dal genotipo 4, come il genotipo 4a. In ancora un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il paziente è infetto dal genotipo 5, come il genotipo 5a. In ancora una forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il paziente è infetto dal genotipo 6, come il genotipo 6a.

[0007] In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il Composto 1 o il suo sale viene combinato o co-somministrato con un altro agente anti-HCV. Esempi non
20 limitativi di detto altro agente anti-HCV includono inibitori della polimerasi dell'HCV, inibitori della proteasi dell'HCV, altri inibitori dell'NS5A dell'HCV, inibitori di CD81, inibitori di ciclofilina o inibitori del sito di ingresso ribosomiale interno (IRES). In un esempio, il paziente è infetto dal genotipo 2, come il genotipo 2a o 2b. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 3, come il genotipo 3a. In un altro esempio, il paziente è infetto dal
25 genotipo 4, come il genotipo 4a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo

5, come il genotipo 5a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 6, come il genotipo 6a.

[0008] In ancora un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il Composto 1 o il suo sale viene combinato o co-somministrato con un inibitore della proteasi dell'HCV o un inibitore della polimerasi dell'HCV. In un esempio, il paziente è infetto dal genotipo 2, come il genotipo 2a o 2b. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 3, come il genotipo 3a. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 4, come il genotipo 4a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 5, come il genotipo 5a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 6, come il genotipo 6a.

10 [0009] In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il Composto 1 o il suo sale è combinato o co-somministrato con un inibitore della proteasi dell'HCV. In un esempio, il paziente è infetto dal genotipo 2, come il genotipo 2a o 2b. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 3, come il genotipo 3a. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 4, come il genotipo 4a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 5, come il genotipo 5a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 6, come il genotipo 6a.

[0010] In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il Composto 1 o il suo sale è combinato o co-somministrato con un inibitore della polimerasi dell'HCV. In un esempio, il paziente è infetto dal genotipo 2, come il genotipo 2a o 2b. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 3, come il genotipo 3a. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 4, come il genotipo 4a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 5, come il genotipo 5a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 6, come il genotipo 6a.

20 [0011] In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il Composto 1 o il suo sale è combinato o co-somministrato con un inibitore della proteasi dell'HCV e un inibitore
25

della polimerasi dell'HCV. In un esempio, il paziente è infetto dal genotipo 2, come il genotipo 2a o 2b. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 3, come il genotipo 3a. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 4, come il genotipo 4a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 5, come il genotipo 5a. In ancora un altro esempio, 5 il paziente è infetto dal genotipo 6, come il genotipo 6a.

[0012] In questo aspetto dell'invenzione, così come ogni forma di realizzazione ed esempio descritti di seguito, il trattamento dura preferibilmente per meno di 24 settimane e non include una somministrazione di interferone a detto paziente. Tale trattamento può, ad esempio, comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a un inibitore della proteasi dell'HCV o un inibitore della polimerasi 10 dell'HCV o una combinazione di un inibitore della proteasi dell'HCV e un inibitore della polimerasi dell'HCV, a detto paziente. Ad esempio, il trattamento può comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a un inibitore della proteasi dell'HCV, a detto paziente. Per un altro esempio, il trattamento può 15 comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a un inibitore della polimerasi dell'HCV, a detto paziente. Per ancora un altro esempio, il trattamento può comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a una combinazione di un inibitore della proteasi dell'HCV e un inibitore della polimerasi dell'HCV, a detto paziente.

20 [0013] In questo aspetto dell'invenzione, così come ogni forma di realizzazione ed esempio descritti di seguito, il trattamento dura preferibilmente non più di 12 settimane (ad esempio, il trattamento dura 8, 9, 10, 11 o 12 settimane; preferibilmente, il trattamento dura 12 settimane) e non include una somministrazione di interferone a detto paziente. Tale trattamento può, ad esempio, comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale 25 farmaceuticamente accettabile, insieme a un inibitore della proteasi dell'HCV o un inibitore

della polimerasi dell'HCV o una combinazione di un inibitore della proteasi dell'HCV e un inibitore della polimerasi dell'HCV, a detto paziente. Ad esempio, il trattamento può comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a un inibitore della proteasi dell'HCV, a detto paziente. Per un altro

5 esempio, il trattamento può comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a un inibitore della polimerasi dell'HCV, a detto paziente. Per ancora un altro esempio, il trattamento può comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a una combinazione di un inibitore della proteasi dell'HCV e un inibitore della polimerasi dell'HCV, a detto

10 paziente.

[0014] In questo aspetto dell'invenzione, così come ogni forma di realizzazione ed esempio descritti di seguito, il trattamento può o meno includere una somministrazione di ribavirina a detto paziente; ad esempio, il trattamento può includere una somministrazione di ribavirina a detto paziente.

15 **[0015]** In un secondo aspetto, la presente invenzione presenta metodi per trattare l'HCV. I metodi che comprendono una somministrazione di una quantità efficace del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile a un paziente con HCV, in cui detto paziente è infettato dal genotipo 2, 3, 4, 5 o 6 dell'HCV.

[0016] In una forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il paziente è infetto dal

20 genotipo 2, come il genotipo 2a o 2b. In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il paziente è infetto dal genotipo 3, come il genotipo 3a. In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il paziente è infetto dal genotipo 4, come il genotipo 4a. In ancora un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il paziente è infetto dal genotipo 5, come il genotipo 5a. In ancora una forma di realizzazione di

25 questo aspetto dell'invenzione, il paziente è infetto dal genotipo 6, come il genotipo 6a.

[0017] In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il Composto 1 o il suo sale viene combinato o co-somministrato con un altro agente anti-HCV. Esempi non limitativi di detto altro agente anti-HCV includono inibitori della polimerasi dell'HCV, inibitori della proteasi dell'HCV, altri inibitori dell'NS5A dell'HCV, inibitori di CD81, inibitori di ciclofilina o inibitori del sito di ingresso ribosomiale interno (IRES). In un esempio, il paziente è infetto dal genotipo 2, come il genotipo 2a o 2b. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 3, come il genotipo 3a. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 4, come il genotipo 4a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 5, come il genotipo 5a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 6, come il genotipo 6a.

[0018] In ancora un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il Composto 1 o il suo sale viene combinato o co-somministrato con un inibitore della proteasi dell'HCV o un inibitore della polimerasi dell'HCV. In un esempio, il paziente è infetto dal genotipo 2, come il genotipo 2a o 2b. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 3, come il genotipo 3a. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 4, come il genotipo 4a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 5, come il genotipo 5a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 6, come il genotipo 6a.

[0019] In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il Composto 1 o il suo sale è combinato o co-somministrato con un inibitore della proteasi dell'HCV. In un esempio, il paziente è infetto dal genotipo 2, come il genotipo 2a o 2b. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 3, come il genotipo 3a. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 4, come il genotipo 4a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 5, come il genotipo 5a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 6, come il genotipo 6a.

[0020] In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il Composto 1 o il

suo sale è combinato o co-somministrato con un inibitore della polimerasi dell'HCV. In un esempio, il paziente è infetto dal genotipo 2, come il genotipo 2a o 2b. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 3, come il genotipo 3a. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 4, come il genotipo 4a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal
5 genotipo 5, come il genotipo 5a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 6, come il genotipo 6a.

[0021] In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, il Composto 1 o il suo sale è combinato o co-somministrato con un inibitore della proteasi dell'HCV e un inibitore della polimerasi dell'HCV. In un esempio, il paziente è infetto dal genotipo 2, come il genotipo
10 2a o 2b. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 3, come il genotipo 3a. In un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 4, come il genotipo 4a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 5, come il genotipo 5a. In ancora un altro esempio, il paziente è infetto dal genotipo 6, come il genotipo 6a.

[0022] In questo aspetto dell'invenzione, così come ogni forma di realizzazione ed esempio
15 descritti di seguito, il trattamento dura preferibilmente per meno di 24 settimane e non include una somministrazione di interferone a detto paziente. Tale trattamento può, ad esempio, comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a un inibitore della proteasi dell'HCV o un inibitore della polimerasi dell'HCV o una combinazione di un inibitore della proteasi dell'HCV e un inibitore della
20 polimerasi dell'HCV, a detto paziente. Ad esempio, il trattamento può comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a un inibitore della proteasi dell'HCV, a detto paziente. Per un altro esempio, il trattamento può comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a un inibitore della polimerasi dell'HCV, a detto paziente. Per ancora un
25 altro esempio, il trattamento può comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un

suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a una combinazione di un inibitore della proteasi dell'HCV e un inibitore della polimerasi dell'HCV, a detto paziente.

[0023] In questo aspetto dell'invenzione, così come ogni forma di realizzazione ed esempio descritti di seguito, il trattamento dura preferibilmente non più di 12 settimane (ad esempio, il
5 trattamento dura 8, 9, 10, 11 o 12 settimane; preferibilmente, il trattamento dura 12 settimane) e non include una somministrazione di interferone a detto paziente. Tale trattamento può, ad esempio, comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme ad un inibitore della proteasi dell'HCV o un inibitore della polimerasi dell'HCV o una combinazione di un inibitore della proteasi dell'HCV e un
10 inibitore della polimerasi dell'HCV, a detto paziente. Ad esempio, il trattamento può comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a un inibitore della proteasi dell'HCV, a detto paziente. Per un altro esempio, il trattamento può comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a un inibitore della polimerasi dell'HCV, a detto
15 paziente. Per ancora un altro esempio, il trattamento può comprendere una somministrazione del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, insieme a una combinazione di un inibitore della proteasi dell'HCV e un inibitore della polimerasi dell'HCV, a detto paziente.

[0024] In questo aspetto dell'invenzione, così come ogni forma di realizzazione ed esempio
20 descritti di seguito, il trattamento può o meno includere una somministrazione di ribavirina a detto paziente; ad esempio, il trattamento include una somministrazione di ribavirina a detto paziente.

[0025] La presente invenzione presenta anche il Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso per trattare un paziente con HCV, indipendentemente dagli uno o più
25 genotipi specifici dell'HCV che il paziente ha. Tali usi sono illustrati nel primo aspetto

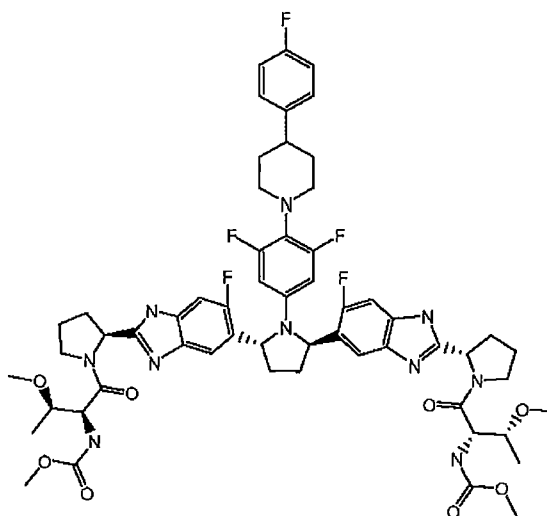
dell'invenzione sopra descritto, includendo ogni forma di realizzazione ed esempio descritti di seguito.

[0026] La presente invenzione presenta inoltre il Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso per un trattamento di un paziente con HCV, infetto da
5 genotipo 2, 3, 4, 5 o 6 dell'HCV. Tali usi sono illustrati nel secondo aspetto dell'invenzione sopra descritto, includendo ogni forma di realizzazione ed esempio descritti di seguito.

[0027] Altre caratteristiche, scopi e vantaggi della presente invenzione sono evidenti nella descrizione dettagliata che segue. Dovrebbe essere inteso, tuttavia, che la descrizione dettagliata, pur indicando forme di realizzazione preferite dell'invenzione, è data solo a scopo
10 illustrativo, non limitativo. Vari cambiamenti e modifiche nell'ambito dell'invenzione risulteranno evidenti agli esperti del ramo dalla descrizione dettagliata.

Descrizione dettagliata

[0028] Il Composto 1, noto anche come metil {(2S,3R)-1-[(2S)-2-{5-[(2R,5R)-1-{3,5-
difluoro-4-[4-(4-fluorofenil)piperidin-1-il]fenil}-5-(6-fluoro-2-{(2S)-1-[N-
15 (metossicarbonil)-O-metil-L-treonil]pirrolidin-2-il}-1H-benzimidazol-5-il)pirrolidin-2-il]-6-
fluoro-1H-benzimidazol-2-il]pirrolidin-1-il]-3-metossi-1-oxobutan-2-il} carbammato, è
descritto nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense N. 2012/0004196.



Composto 1

[0029] È stato scoperto che il composto 1 ha valori di EC₅₀ inferiori a 10 pM rispetto a repliconi subgenomici stabili con NS5A da una vasta gamma di genotipi dell'HCV clinicamente rilevanti, come genotipo dell'HCV 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a, 5a e 6a. Nei saggi di
5 repliconi subgenomici transitori, è stato scoperto che il Composto 1 ha valori EC₅₀ inferiori a 5 pM rispetto a molte varianti dell'HCV che sono resistenti ad altri inibitori dell'NS5A, come la variante di genotipo 2a T24A, le varianti di genotipo 2b L28F e L31V, varianti di genotipo 3a M28T e Y93H, le varianti di genotipo 4a L28V e L30H, le varianti di genotipo 5a L28I, L31F e L31V e le varianti di genotipo 6a L31V, T58N e T58A. I valori di EC₅₀ sono stati
10 determinati in presenza di siero bovino fetale al 5%, ma in assenza di plasma umano secondo le procedure descritte di seguito.

[0030] La presente invenzione presenta l'uso del Composto 1 o di un suo sale farmaceuticamente accettabile per trattare l'HCV come sopra descritto. In qualsiasi metodo o uso qui descritto, il Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile può essere
15 formulato in una forma di dosaggio liquida o solida adatta. Preferibilmente, il Composto 1 o il suo sale è formulato in una composizione solida comprendente il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) in forma amorfa, un polimero idrofilo farmaceuticamente accettabile, e facoltativamente un tensioattivo farmaceuticamente accettabile.

[0031] Un modo non limitativo di formare una forma amorfa del Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) è attraverso la formazione di dispersioni solide con un veicolo polimerico. Come qui usato, il termine "dispersione solida" definisce un sistema in uno stato solido (al contrario di uno stato liquido o gassoso) comprendente almeno due componenti, in cui un componente è disperso in tutto l'altro componente o componenti. Ad esempio, un ingrediente attivo o una combinazione di ingredienti attivi può essere disperso in una matrice
20 composta da uno o più polimeri idrofili farmaceuticamente accettabili e uno o più tensioattivi
25

farmaceuticamente accettabili. Il termine "dispersione solida" comprende sistemi aventi piccole particelle di una fase disperse in un'altra fase. Queste particelle hanno spesso dimensioni inferiori a 400 μm , ad esempio, dimensioni inferiori a 100, 10 o 1 μm . Quando una dispersione solida dei componenti è tale che il sistema è chimicamente e fisicamente uniforme
5 o omogeneo in tutto o è costituito da una fase (come definita in termodinamica), tale dispersione solida viene chiamata "soluzione solida". Una soluzione vetrosa è una soluzione solida in cui un soluto viene disciolto in un solvente vetroso.

[0032] Qualsiasi metodo qui descritto può impiegare una composizione solida che comprende (1) Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) in forma amorfa, (2) un
10 polimero idrofilo farmaceuticamente accettabile e (3) un tensioattivo farmaceuticamente accettabile. Il Composto 1 (o il suo sale) e il polimero sono preferibilmente formulati in una dispersione solida. Il tensioattivo può anche essere formulato nella stessa dispersione solida; oppure il tensioattivo può essere combinato o miscelato separatamente con la dispersione solida.

15 **[0033]** Il polimero idrofilo può, ad esempio e senza limitazione, avere una T_g di almeno 50 °C, più preferibilmente almeno 60 °C, e altamente preferibilmente almeno 80 °C compresi, ma non limitati a, da 80 °C a 180 °C o da 100 °C a 150 °C. Preferibilmente, il polimero idrofilo è solubile in acqua. Esempi non limitativi di polimeri idrofili adatti includono, ma non sono
20 limitati a, omopolimeri o copolimeri di lattami N-vinilici, come omopolimeri o copolimeri di N-vinil pirrolidone (ad esempio, polivinilpirrolidone (PVP) o copolimeri di N-vinil pirrolidone e acetato di vinile o propionato di vinile); esteri di cellulosa o eteri di cellulosa, quali alchilcellulosi (ad esempio, metilcellulosa o etilcellulosa), idrossialchilcellulosi (ad esempio, idrossipropilcellulosa), idrossialchilalchilcellulosa (ad esempio, idrossipropilmetilcellulosa),
e ftalato di cellulosa o succinati (ad esempio, ftalato di acetato di cellulosa e ftalato di
25 idrossipropilmetilcellulosa, succinato di idrossipropilmetilcellulosa, o succinato di acetato di

idrossipropilmetilcellulosa); ossidi di polialchilene ad alto peso molecolare, come ossido di polietilene, ossido di polipropilene e copolimeri di ossido di etilene e ossido di propilene; poliacrilati o polimetacrilati, come copolimeri di acido metacrilico/acrilato di etile, copolimeri di acido metacrilico/metilmetacrilato, copolimeri di butilmetacrilato/ metacrilato 2-
5 dimetilamminoetile, poli(idrossialchil acrilati), e poli(metacrilati idrossialchile); poliacrilammidi; polimeri di acetato di vinile, come copolimeri di acetato di vinile e acido crotonico, e polivinilacetato parzialmente idrolizzato (noto anche come "alcool polivinilico" parzialmente saponificato); alcool polivinilico; oligo o polisaccaridi, come carragenina, galattomannani e gomma di xantano; poliidrossialchilacrilati; poliidrossialchil-metacrilati;
10 copolimeri di metilmetacrilato e acido acrilico; polietilenglicoli (PEG); o qualsiasi loro miscela.

[0034] Esempi non limitativi di polimeri idrofili preferiti includono polivinilpirrolidone (PVP) K17, PVP K25, PVP K30, PVP K90, idrossipropilmetilcellulosa (HPMC) E3, HPMC E5, HPMC E6, HPMC E15, HPMC K3, HPMC A4, HPMC A15, HPMC succinato di acetato
15 (AS) LF, HPMC AS MF, HPMC AS HF, HPMC AS LG, HPMC AS MG, HPMC AS HG, HPMC ftalato (P) 50, HPMC P 55, Ethocel 4, Ethocel 7, Ethocel 10, Ethocel 14, Ethocel 20, copovidone (copolimero vinilpirrolidone-acetato di vinile 60/40), polivinilacetato, copolimero di metacrilato/acido metacrilico (Eudragit) L100-55, Eudragit L100, Eudragit S100, polietilenglicole (PEG) 400, PEG 600, PEG 1450, PEG 3350, PEG 4000, PEG 6000, PEG
20 8000, poloxamer 124, poloxamer 188, poloxamer 237, poloxamer 338 e poloxamer 407.

[0035] Di questi, sono preferiti omopolimeri o copolimeri di N-vinil pirrolidone, come copolimeri di N-vinil pirrolidone e acetato di vinile. Un esempio non limitativo di un polimero preferito è un copolimero del 60% in peso di N-vinil pirrolidone e del 40% in peso di acetato di vinile. Altri polimeri preferiti includono, senza limitazione, idrossipropilmetilcellulosa
25 (HPMC, noto anche come ipromellosa in USP), come idrossipropil metilcellulosa grado E5

(HPMC-E5); e idrossipropil metilcellulosa acetato succinato (HPMC-AS).

[0036] Il tensioattivo farmaceuticamente accettabile impiegato può essere un tensioattivo non ionico. Preferibilmente, il tensioattivo ha un valore HLB compreso tra 2-20. Una composizione solida impiegata nell'invenzione può anche includere una miscela di tensioattivi farmaceuticamente accettabili, con almeno un tensioattivo avente un valore HLB di almeno 10 e almeno un altro tensioattivo avente un valore HLB inferiore a 10.

[0037] Esempi non limitativi di tensioattivi farmaceuticamente accettabili adatti includono derivati di olio di ricino poliossietilenico, ad esempio, poliossietilenglicerolo triricinoleato o olio di ricino polioxi 35 (Cremophor® EL; BASF Corp.) o poliossietilenglicerolo ossistearato come olio di ricino idrogenato polietilenglicole 40 (Cremophor® RH 40, anche noto come olio di ricino idrogenato poliossil 40 o macrogolglicerolo idrossistearato) o olio di ricino idrogenato polietilenglicole 60 (Cremophor® RH 60); o un estere mono acido grasso di poliossietilene sorbitano, come un estere mono acido grasso di poliossietilene (20) sorbitano, ad esempio poliossietilene (20) sorbitano monooleato (Tween® 80), poliossietilene (20) sorbitano monostearato (Tween® 60), poliossietilene (20) sorbitan monopalmitato (Tween® 40), o poliossietilene (20) sorbitan monolaurato (Tween® 20). Altri esempi non limitativi di tensioattivi adatti includono poliossietilene alchil eteri, ad esempio poliossietilene (3) lauril etere, poliossietilene (5) cetil etere, poliossietilene (2) stearil etere, poliossietilene (5) stearil etere; eteri di poliossietilene alchilarile, ad esempio poliossietilene (2) nonilfenil etere, poliossietilene (3) nonilfenil etere, poliossietilene (4) nonilfenil etere, poliossietilene (3) ottilfenil etere; esteri di acidi grassi di polietilenglicole, ad esempio, monolaurato di PEG-200, dilaurato di PEG-200, dilaurato di PEG-300, dilaurato di PEG-400, distearato di PEG-300, dioleato di PEG-300; mono esteri di acidi grassi alchilenglicolici, ad esempio, propilenglicole monolaurato (Lau-roglycol®); esteri di acidi grassi di saccarosio, ad esempio, saccarosio monostearato, saccarosio distearato, saccarosio monolaurato, saccarosio dilaurato; mono esteri

di acido grasso di sorbitano come sorbitano mono laurate (Span® 20), sorbitano monooleato, sorbitano monopalmitato (Span® 40) o sorbitano stearato. Altri tensioattivi adatti includono, ma non sono limitati a, copolimeri a blocchi di ossido di etilene e ossido di propilene, noti anche come copolimeri a blocchi di poliossietilene poliossipropilene o polipropilenglicole di poliossietilene, come Poloxamer® 124, Poloxamer® 188, Poloxamer® 237, Poloxamer® 388
5 o Poloxamer® 407 (BASF Wyandotte Corp.). Come sopra descritto, una miscela di tensioattivi può essere usata in una composizione solida impiegata nell'invenzione.

[0038] Esempi non limitativi di tensioattivi preferiti includono polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, Cremophor RH 40, Cremophor EL, Gelucire 44/14, Gelucire
10 50/13, D-alfa-tocoferil polietilene glicole 1000 succinato (vitamina E TPGS), propilenglicole laurato, sodio lauril solfato e sorbitano monolaurato.

[0039] La dispersione solida impiegata in questa invenzione è preferibilmente una soluzione solida, e più preferibilmente una soluzione vetrosa.

[0040] In una forma di realizzazione, una composizione solida impiegata nell'invenzione
15 comprende una dispersione solida amorfa o una soluzione solida che include il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) e un polimero idrofilo farmaceuticamente accettabile. La composizione solida include anche un tensioattivo farmaceuticamente accettabile che è preferibilmente formulato nella dispersione solida amorfa o soluzione solida. Il polimero idrofilo può essere selezionato, ad esempio, dal gruppo costituito da omopolimero
20 di N-vinil lattame, copolimero di N-vinil lattame, estere di cellulosa, etere di cellulosa, ossido di polialchilene, poliacrilato, polimetacrilato, poliacrilammide, alcool polivinilico, polimero di acetato di vinile, oligosaccaride e polisaccaride. A titolo di esempio non limitativo, il polimero idrofilo viene selezionato dal gruppo costituito da omopolimero di N-vinil pirrolidone, copolimero di N-vinil pirrolidone, copolimero di N-vinil pirrolidone e acetato di
25 vinile, copolimero di N-vinil pirrolidone e propionato di vinile, polivinilpirrolidone,

metilcellulosa, etilcellulosa, idrossialchilcellulose, idrossipropilcellulosa, idrossialchilalchilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, ftalato di cellulosa, succinato di cellulosa, ftalato di acetato di cellulosa, ftalato di idrossipropilmetilcellulosa, succinato di idrossipropilmetilcellulosa, succinato di acetato di idrossipropilmetilcellulosa, ossido di polietilene, ossido di polipropilene, copolimero di ossido di etilene e ossido di propilene, copolimero metacrilico acido/etilacrilato, copolimero acido metacrilico/metil metacrilato, copolimero butil metacrilato/2-dimetilamminoetil metacrilato, poli(idrossi-alchil acrilato), poli(idrossialchil metacrilato), copolimero di acetato di vinile e acido crotonico, polivinilacetato parzialmente idrolizzato, carragenina, galattomannano e gomma di xantano.

5

10 Preferibilmente, il polimero idrofilo viene selezionato tra polivinilpirrolidone (PVP) K17, PVP K25, PVP K30, PVP K90, idrossipropil metilcellulosa (HPMC) E3, HPMC E5, HPMC E6, HPMC E15, HPMC K3, HPMC A4, HPMC A15, HPMC succinato acetato (AS) LF, HPMC AS MF, HPMC AS HF, HPMC AS LG, HPMC AS MG, HPMC AS HG, HPMC ftalato (P) 50, HPMC P 55, Ethocel 4, Ethocel 7, Ethocel 10, Ethocel 14, Ethocel 20, copovidone

15 (copolimero vinilpirrolidone-acetato di vinile 60/40), polivinil acetato, copolimero di metacrilato/acido metacrilico (Eudragit) L100-55, Eudragit L100, Eudragit S100, polietilenglicole (PEG) 400, PEG 600, PEG 1450, PEG 3350, PEG 4000, PEG 6000, PEG 8000, poloxamer 124, poloxamer 188, poloxamer 237, poloxamer 338 o poloxamer 407. Più preferibilmente, il polimero idrofilo viene selezionato tra omopolimeri di vinilpirrolidone (ad

20 esempio, PVP con valori di Fikentscher K da 12 a 100, o PVP con valori di Fikentscher K da 17 a 30), o copolimeri da 30 a 70% in peso di N -vinilpirrolidone (VP) e dal 70 al 30% in peso di acetato di vinile (VA) (ad esempio, un copolimero del 60% in peso VP e del 40% in peso VA). Il tensioattivo può essere selezionato, ad esempio, dal gruppo costituito da poliossietilenglicerolo tricinoleato o olio di ricino poliossilico 35 (Cremophor® EL; BASF

25 Corp.) o poliossietilenglicerolo ossistearato, estere monoacido grasso di poliossietilene

sorbitano, poliossietilchilene alchil etere, poliossietilene alchilaril etere, estere di acido grasso di polietilenglicole, mono-estere di acido grasso di alchilenglicole, estere di acido grasso di saccarosio e mono-estere di acido grasso di sorbitano. A titolo di esempio non limitativo, il tensioattivo è selezionato dal gruppo costituito da olio di ricino idrogenato polietilenglicole 40
5 (Cremophor® RH 40, noto anche come olio di ricino idrogenato poliossilico 40 o macroglicerolo idrossistearato), olio di ricino polietilenglicole 60 idrogenato (Cremophor® RH 60), un estere monoacido grasso di poliossietilene (20) sorbitano (ad esempio, poliossietilene (20) sorbitano monooleato (Tween® 80), poliossietilene (20) sorbitano monostearato (Tween® 60), poliossietilene (20) sorbitano monopalmitato (Tween® 40), o
10 poliossietilene (20) sorbitano monolaurato (Tween® 20)), poliossietilene (3) lauril etere, poliossietilene (5) cetil etere, poliossietilene (2) stearil etere, poliossietilene (5) stearil etere, poliossietilene (2) nonilfenil etere, poliossietilene (3) nonilfenil etere, poliossietilene (4) nonilfenil etere, poliossietilene (3) ottilfenil etere, PEG-200 monolaurato, PEG-200 dilaurato, PEG-300 dilaurato, PEG-400 dilaurato, PEG-300 distearato, PEG-300 dioleato, glicole
15 propilenico monolaurato, saccarosio monostearato, saccarosio distearato, saccarosio monolaurato, saccarosio dilaurato, monolaurato di sorbitano, monooleato di sorbitano, monopalmitato di sorbitano e stearato di sorbitano. Preferibilmente, il tensioattivo è selezionato tra polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, Cremophor RH 40, Cremophor EL, Gelucire 44/14, Gelucire 50/13, D-alfa-tocoferil polietilene glicole 1000
20 succinato (vitamina E TPGS), glicole propilenico laurato, lauril solfato di sodio o monolaurato di sorbitano. Più preferibilmente, il tensioattivo è selezionato tra monolaurato di sorbitano o D-alfa-tocoferil polietilenglicole 1000 succinato.

[0041] Una dispersione solida impiegata nell'invenzione comprende o consiste preferibilmente in una monofase (definita in termodinamica) in cui il Composto 1, o una
25 combinazione del Composto 1 e di un altro agente anti-HCV, viene disperso molecolarmente

in una matrice contenente gli uno o più polimeri idrofili farmaceuticamente accettabili. In tali casi, l'analisi termica della dispersione solida utilizzando la calorimetria a scansione differenziale (DSC) mostra in genere solo una singola T_g , e la dispersione solida non contiene alcun Composto 1 cristallino rilevabile misurato mediante spettroscopia di diffrazione della
5 polvere a raggi X.

[0042] Una composizione solida impiegata nell'invenzione può essere preparata mediante una varietà di tecniche come, senza limitazione, estrusione per fusione, essiccamento a spruzzo, co-precipitazione, essiccamento per congelamento o altre tecniche di evaporazione di solvente, con estrusione per fusione ed essiccamento a spruzzo essere preferiti. Il processo di estrusione
10 per fusione comprende tipicamente le fasi di preparazione di una fusione che include gli uno o più principi attivi, gli uno o più polimeri idrofili e preferibilmente gli uno o più tensioattivi, e quindi il raffreddamento della fusione fino a quando non si solidifica. "Fusione" significa una transizione in uno stato liquido o gommoso in cui è possibile incorporare un componente, preferibilmente incorporato in modo omogeneo, nell'altro componente o componenti. In molti
15 casi, gli uno o più componenti polimerici si scioglieranno e gli altri componenti, tra cui gli uno o più principi attivi e gli uno o più tensioattivi, si dissolveranno nella fusione, formando così una soluzione. La fusione di solito comporta un riscaldamento al di sopra del punto di rammollimento degli uno o più polimeri. La preparazione della fusione può avvenire in vari
20 modi. La miscelazione dei componenti può avvenire prima, durante o dopo la formazione della fusione. Ad esempio, i componenti possono essere prima miscelati e quindi fusi o contemporaneamente miscelati e fusi. La fusione può anche essere omogeneizzata al fine di disperdere gli uno o più principi attivi in modo efficiente. Inoltre, può essere conveniente prima fondere gli uno o più polimeri e quindi miscelare e omogeneizzare gli uno o più principi attivi. In un esempio, tutti i materiali tranne i tensioattivi vengono miscelati e immessi in un
25 estrusore, mentre gli uno o più tensioattivi vengono fusi esternamente e pompati durante

l'estrusione.

[0043] Per avviare un processo di estrusione per fusione, gli uno o più principi attivi (ad esempio, il Composto 1 o una combinazione del Composto 1 e di almeno un altro agente anti-HCV) possono essere impiegati nelle loro forme solide, come le rispettive forme cristalline.

- 5 Gli uno o più principi attivi possono anche essere impiegati come soluzione o dispersione in un solvente liquido adatto, come alcol, idrocarburi alifatici, esteri o, in alcuni casi, diossido di carbonio liquido. Il solvente può essere rimosso, ad esempio, evaporato, dopo la preparazione della fusione.

- 10 [0044] Vari additivi possono anche essere inclusi nella fusione, ad esempio, regolatori di flusso (ad esempio, silice colloidale), leganti, lubrificanti, riempitivi, disintegranti, plastificanti, coloranti o stabilizzanti (ad esempio, antiossidanti, stabilizzanti della luce, decontaminanti radicali e stabilizzanti contro attacco microbico).

- 15 [0045] La fusione e/o la miscelazione possono avvenire in un apparato consueto per questo scopo. Quelli particolarmente adatti sono estrusori o impastatori. Gli estrusori adatti includono estrusori a vite singola, estrusori a vite che si intersecano o estrusori a più viti, preferibilmente estrusori a doppia vite, che possono essere corotanti o controrotanti e, facoltativamente, essere dotati di dischi impastatori. Si apprezzerà che le temperature di lavoro saranno determinate dal tipo di estrusore o dal tipo di configurazione all'interno dell'estrusore utilizzato. Parte dell'energia necessaria per fondere, miscelare e dissolvere i componenti nell'estrusore può
20 essere fornita da elementi riscaldanti. Tuttavia, l'attrito e il taglio del materiale nell'estrusore possono anche fornire una notevole quantità di energia alla miscela e contribuire nella formazione di una fusione omogenea dei componenti.

- 25 [0046] La fusione può variare da sottile a pastosa a viscosa. La sagomatura dell'estruso può essere convenientemente eseguita da una calandra con due rulli controrotanti con depressioni reciprocamente corrispondenti sulla loro superficie. L'estruso può essere raffreddato e fatto

solidificare. L'estruso può anche essere tagliato a pezzi, prima (taglio a caldo) o dopo la solidificazione (taglio a freddo).

[0047] Il prodotto di estrusione solidificato può essere ulteriormente polverizzato, macinato o ridotto in altro modo a granuli. L'estruso solidificato, così come ciascun granulo prodotto, 5 comprende una dispersione solida, preferibilmente una soluzione solida, degli uno o più principi attivi in una matrice composta dagli uno o più polimeri idrofili e facoltativamente dagli uno o più tensioattivi farmaceuticamente accettabili. Laddove i granuli non contengano alcun tensioattivo, un tensioattivo farmaceuticamente accettabile sopra descritto può essere aggiunto e mescolato con i granuli. Il prodotto di estrusione può anche essere mescolato con 10 uno o più ulteriori principi attivi e/o additivi prima di essere polverizzato o macinato a granuli. I granuli possono essere ulteriormente trasformati in idonee forme di dosaggio orali solide.

[0048] L'approccio di evaporazione del solvente, mediante essiccamento a spruzzo, offre il vantaggio di consentire la lavorabilità a temperature più basse, se necessario, e consente altre modifiche al processo al fine di migliorare ulteriormente le proprietà della polvere. La polvere 15 essiccata a spruzzo può quindi essere ulteriormente formulata, se necessario, e il prodotto farmaceutico finale è flessibile per quanto riguarda la necessità di capsule, compresse o qualsiasi altra forma di dosaggio solida.

[0049] I processi esemplari di essiccamento a spruzzo e le attrezzature per l'essiccamento a spruzzo sono descritti in K. Masters, SPRAY DRYING HANDBOOK (Halstead Press, New 20 York, 4^a ed., 1985). Esempi non limitativi di dispositivi di essiccamento a spruzzo adatti alla presente invenzione includono essiccatori a spruzzo fabbricati da Niro Inc. o GEA Process Engineering Inc., Buchi Labortechnik AG e Spray Drying Systems, Inc. Un processo di essiccamento a spruzzo generalmente comporta rompere una miscela liquida in piccole goccioline e rimuovere rapidamente il solvente dalle goccioline in un contenitore (apparecchio 25 di essiccamento a spruzzo) in cui vi è una forte forza motrice per l'evaporazione di solvente

dalle goccioline. Le tecniche di atomizzazione includono, ad esempio, ugelli a due fluidi o di pressione, o atomizzatori rotanti. La forte forza motrice per l'evaporazione di solvente può essere fornita, ad esempio, mantenendo la pressione parziale del solvente nell'apparecchiatura di essiccamento a spruzzo ben al di sotto della pressione di vapore del solvente alle temperature
5 delle goccioline di essiccamento. Ciò può essere ottenuto mediante (1) mantenimento della pressione nell'apparecchiatura di essiccamento a spruzzo a un vuoto parziale; (2) miscelazione delle gocce di liquido con un gas di essiccamento caldo (ad esempio, azoto riscaldato); o (3) entrambi.

[0050] La temperatura e la portata del gas di essiccamento, nonché il design dell'essiccatore
10 a spruzzo, possono essere selezionati in modo tale che le goccioline siano sufficientemente essiccate quando raggiungono la parete dell'apparecchiatura. Questo contribuisce a garantire che le goccioline essiccate siano essenzialmente solide e possano formare una polvere fine e non aderire alla parete dell'apparecchiatura. Il prodotto essiccato a spruzzo può essere raccolto rimuovendo il materiale manualmente, pneumaticamente, meccanicamente o con altri mezzi
15 adatti. Il tempo effettivo per raggiungere il livello preferito di secchezza dipende dalle dimensioni delle goccioline, dalla formulazione e dal funzionamento dell'essiccatore a spruzzo. Dopo la solidificazione, la polvere solida può rimanere nella camera di essiccamento a spruzzo per un tempo aggiuntivo (ad esempio, 5-60 secondi) per evaporare ulteriormente il solvente dalla polvere solida. Il contenuto finale di solvente nella dispersione solida all'uscita
20 dall'essiccatore è preferibilmente a un livello sufficientemente basso in modo da migliorare la stabilità del prodotto finale. Ad esempio, il contenuto di solvente residuo della polvere essiccata a spruzzo può essere inferiore al 2% in peso. Preferibilmente, il contenuto residuo di solvente rientra nei limiti stabiliti nelle Linee guida della Conferenza internazionale sull'armonizzazione (ICH). Inoltre, può essere utile sottoporre la composizione essiccata a
25 spruzzo a un ulteriore essiccamento per diminuire il solvente residuo a livelli ancora più bassi.

I metodi per diminuire ulteriormente i livelli di solvente includono, ma senza limitazione, l'essiccamento a letto fluido, l'essiccamento a infrarossi, l'essiccamento a tamburo, l'essiccamento sottovuoto e combinazioni di questi e altri processi.

5 **[0051]** Come l'estruso solido sopra descritto, il prodotto essiccato a spruzzo contiene una dispersione solida, preferibilmente una soluzione solida, degli uno o più principi attivi in una matrice composta dagli uno o più polimeri idrofili e facoltativamente dagli uno o più tensioattivi farmaceuticamente accettabili. Laddove il prodotto essiccato a spruzzo non contiene alcun tensioattivo, un tensioattivo farmaceuticamente accettabile sopra descritto può essere aggiunto e mescolato con il prodotto essiccato a spruzzo prima di un'ulteriore
10 lavorazione.

[0052] Prima di immettere in un essiccatore a spruzzo, gli uno o più principi attivi (ad esempio, il Composto 1 o una combinazione del Composto 1 e di almeno un altro agente anti-HCV), gli uno o più polimeri idrofili, nonché altri principi attivi o eccipienti facoltativi, come gli uno o più tensioattivi farmaceuticamente accettabili, possono essere disciolti in un solvente.
15 Solventi adatti includono, ma non sono limitati a, alcanoli (ad esempio, metanolo, etanolo, 1-propanolo, 2-propanolo o loro miscele), acetone, acetone/acqua, miscele di alcano/acqua (ad esempio, miscele di etanolo/acqua) o loro combinazioni. La soluzione può anche essere preriscaldata prima di essere immessa nell'essiccatore a spruzzo.

[0053] La dispersione solida prodotta mediante estrusione per fusione, essiccamento a
20 spruzzo o altre tecniche può essere preparata in qualsiasi forma di dosaggio orale solida adatta. In una forma di realizzazione, la dispersione solida preparata mediante estrusione per fusione, essiccamento a spruzzo o altre tecniche può essere compressa in compresse. La dispersione solida può essere direttamente compressa, oppure polverizzata o macinata a granuli o polveri prima della compressione. La compressione può essere eseguita in una pressa per compresse,
25 come in uno stampo di acciaio tra due punzoni mobili. Quando una composizione solida della

presente invenzione comprende il Composto 1 e un altro agente anti-HCV, è possibile preparare separatamente dispersioni solide di ciascun singolo ingrediente attivo e quindi mescolare le dispersioni solide polverizzate o macinate facoltativamente prima della compattazione. Il Composto 1 e uno o più ulteriori principi attivi possono anche essere

5 preparati nella stessa dispersione solida, facoltativamente

polverizzati e/o mescolati con altri additivi, e quindi compressi in compresse.

[0054] Almeno un additivo selezionato tra regolatori di flusso, leganti, lubrificanti, riempitivi, disintegranti o plastificanti può essere usato per comprimere la dispersione solida. Questi additivi possono essere miscelati con dispersione solida polverizzata o macinata prima della

10 compattazione. Vari altri additivi possono anche essere usati nella preparazione di una composizione solida della presente invenzione, per esempio, coloranti come azocoloranti, pigmenti organici o inorganici, come ossido di alluminio o diossido di titanio, o coloranti di origine naturale; stabilizzanti, come antiossidanti, stabilizzatori della luce, decontaminanti di radicali, stabilizzanti contro l'attacco microbico.

[0055] In qualsiasi aspetto, forma di realizzazione ed esempio qui descritti, il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) può essere somministrato a un paziente con HCV in combinazione con un altro agente anti-HCV. Preferibilmente, tale trattamento non include l'uso dell'interferone durante il regime di trattamento. Il regime di trattamento può durare, ad esempio, e senza limitazione, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9 o 8

15 settimane. Preferibilmente, il regime di trattamento dura, ad esempio, e senza limitazione, 12 settimane. Il regime di trattamento può anche durare meno di 12 settimane, come 11, 10, 9 o 8 settimane.

[0056] Agenti anti-HCV adatti che possono essere combinati con il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) includono, ma non sono limitati a, inibitori della

20 polimerasi dell'HCV (ad esempio, inibitori della polimerasi nucleosidici o inibitori della

25

polimerasi non nucleosidici), inibitori della proteasi dell'HCV, inibitori dell'elicasi dell'HCV, altri inibitori dell'NS5A dell'HCV, inibitori di ingresso dell'HCV, inibitori della ciclofilina, inibitori di CD81, inibitori del sito di ingresso del ribosoma interno o qualsiasi loro combinazione. Ad esempio, un altro agente anti-HCV può essere un inibitore della polimerasi
5 dell'HCV. Per un altro caso, detto altro agente anti-HCV può essere un inibitore della proteasi dell'HCV.

[0057] Detto altro agente anti-HCV può anche includere due o più inibitori dell'HCV. Ad esempio, detto altro agente anti-HCV può essere una combinazione di un inibitore della polimerasi dell'HCV e un inibitore della proteasi dell'HCV. Per un altro caso, detto altro agente
10 anti-HCV può essere una combinazione di due diversi inibitori della proteasi dell'HCV. Per un altro caso, detto altro agente anti-HCV può essere una combinazione di due diversi inibitori della polimerasi dell'HCV (ad esempio, uno è un inibitore nucleosidico o nucleotidico della polimerasi e l'altro è un inibitore non nucleosidico della polimerasi; oppure entrambi sono inibitori nucleosidici o nucleotidici della polimerasi; o entrambi sono inibitori non nucleosidici
15 della polimerasi). In ancora un altro esempio, detto altro agente anti-HCV può essere una combinazione di un altro inibitore dell'NS5A dell'HCV e un inibitore della polimerasi dell'HCV. In ancora un altro esempio, detto altro agente anti-HCV può essere una combinazione di un altro inibitore NS5A dell'HCV e un inibitore della proteasi dell'HCV. In ancora un altro esempio, detto altro agente anti-HCV può essere una combinazione di altri due
20 inibitori dell'NS5A dell'HCV.

[0058] Esempi specifici di agenti anti-HCV che sono adatti per la combinazione con il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) in qualsiasi aspetto, forma di realizzazione o esempio qui descritti includono, ma non sono limitati a, PSI-7977 (Pharmasset/Gilead), PSI-7851 (Pharmasset/Gilead), PSI-938 (Pharmasset/Gilead), PF-
25 00868554, ANA-598, IDX184, IDX102, IDX375, GS-9190, VCH-759, VCH-916, MK-3281,

BCX-4678, MK-3281, VBY708, ANA598, GL59728, GL60667, BMS-790052, BMS-791325, BMS-650032, BMS-824393, GS-9132, ACH-1095, AP-H005, A-831 (Arrow Therapeutics), A-689 (Arrow Therapeutics), INX08189 (Inhibitex), AZD2836, telaprevir, boceprevir, ITMN-191 (Intermune/Roche), BI-201335, VBY-376, VX-500 (Vertex), PHX-B, 5 ACH-1625, IDX136, IDX316, VX-813 (Vertex), SCH 900518 (Schering-Plough), TMC-435 (Tibotec), ITMN-191 (Intermune, Roche), MK-7009 (Merck), IDX-PI (Novartis), BI-201335 (Boehringer Ingelheim), R7128 (Roche), MK-3281 (Merck), MK-0608 (Merck), PF-868554 (Pfizer), PF-4878691 (Pfizer), IDX184 (Novartis), IDX-375, PPI-461 (Presidio), BILB-1941 (Boehringer Ingelheim), GS-9190 (Gilead), BMS-790052 (BMS), CTS-1027 (Conatus), GS-10 9620 (Gilead), PF-4878691 (Pfizer), RO5303253 (Roche), ALS-2200 (Alios BioPharma/Vertex), ALS-2158 (Alios BioPharma/Vertex), GSK62336805 (GlaxoSmithKline), o qualsiasi loro combinazione.

[0059] Esempi non limitativi di inibitori della proteasi dell'HCV che sono adatti per la combinazione con il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) in qualsiasi 15 aspetto, forma di realizzazione o esempio qui descritti includono ACH-1095 (Achillion), ACH-1625 (Achillion), ACH-2684 (Achillion), AVL-181 (Avila), AVL-192 (Avila), BI-201335 (Boehringer Ingelheim), BMS-650032 (BMS), boceprevir, danoprevir, GS-9132 (Gilead), GS-9256 (Gilead), GS-9451 (Gilead), IDX136 (Idenix), IDX-316 (Idenix), IDX-320 (Idenix), MK-5172 (Merck), narlaprevir, PHX-1766 (Phenomix), telaprevir, TMC-435 20 (Tibotec), vaniprevir, VBY708 (Virobay), VX-500 (Vertex), VX-813 (Vertex), VX-985 (Vertex), o qualsiasi loro combinazione. Esempi non limitativi di inibitori della polimerasi dell'HCV che sono adatti per la combinazione con il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) in qualsiasi aspetto, forma di realizzazione o esempio qui descritti includono ANA-598 (Anadys), BI-207127 (Boehringer Ingelheim), BILB-1941 25 (Boehringer Ingelheim), BMS-791325 (BMS), filibuvir, GL59728 (Glaxo), GL60667 (Glaxo),

GS-9669 (Gilead), IDX-375 (Idenix), MK-3281 (Merck), tegobuvir, TMC-647055 (Tibotec), VCH-759 (Vertex & ViraChem), VCH-916 (ViraChem), VX-222 (VCH-222) (Vertex & ViraChem), VX-759 (Vertex), GS-6620 (Gilead), IDX-102 (Idenix), IDX-184 (Idenix), INX-189 (Inhibitex), MK-0608 (Merck), PSI-7977 (Pharmasset/Gilead), PSI-938
5 (Pharmasset/Gilead), RG7128 (Roche), TMC64912 (Medivir), GSK625433 (GlaxoSmithKline), BCX-4678 (BioCryst), ALS-2200 (Alios BioPharma/Vertex), ALS-2158 (Alios BioPharma/Vertex), o qualsiasi loro combinazione. Un inibitore della polimerasi può essere un inibitore della polimerasi nucleotide, come GS-6620 (Gilead), IDX-102 (Idenix), IDX-184 (Idenix), INX-189 (Inhibitex), MK-0608 (Merck), PSI-7977 (Pharmasset/Gilead),
10 PSI-938 (Pharmasset/Gilead), RG7128 (Roche), TMC64912 (Medivir), ALS-2200 (Alios BioPharma/Vertex), ALS-2158 (Alios BioPharma/Vertex), o qualsiasi loro combinazione. Un inibitore della polimerasi può anche essere un inibitore della polimerasi non nucleoside, come ANA-598 (Anadys), BI-207127 (Boehringer Ingelheim), BILB-1941 (Boehringer Ingelheim), BMS-791325 (BMS), filibuvir, GL59728 (Glaxo), GL60667 (Glaxo), GS-9669 (Gilead),
15 IDX-375 (Idenix), MK-3281 (Merck), tegobuvir, TMC-647055 (Tibotec), VCH-759 (Vertex & ViraChem), VCH-916 (ViraChem), VX-222 (VCH-222) (Vertex & ViraChem), VX-759 (Vertex), o qualsiasi loro combinazione. Esempi non limitativi di inibitori dell'NS5A che sono adatti per la combinazione con il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) in qualsiasi aspetto, forma di realizzazione o esempio qui descritti includono GSK62336805
20 (GlaxoSmithKline), ACH-2928 (Achillion), ACH-3102 (Achillion), AZD2836 (Astra-Zeneca), AZD7295 (Astra-Zeneca), BMS-790052 (BMS), BMS-824393 (BMS), EDP-239 (Enanta/Novartis), GS-5885 (Gilead), IDX-719 (Idenix), MK-8742 (Merck), PPI-1301 (Presidio), PPI-461 (Presidio), o qualsiasi loro combinazione. Esempi non limitativi di inibitori della ciclofilina che sono adatti per la combinazione con il Composto 1 (o un suo sale
25 farmaceuticamente accettabile) in qualsiasi aspetto, forma di realizzazione o esempio qui

descritti includono (Novartis & Debiopharm), NM-811 (Novartis), SCY-635 (Scynexis), o qualsiasi loro combinazione. Esempi non limitativi di inibitori di ingresso dell'HCV che sono adatti per la combinazione con il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) in qualsiasi aspetto, forma di realizzazione o esempio qui descritti includono ITX-4520 (iTherx),
5 ITX-5061 (iTherx), o una loro combinazione.

[0060] In qualsiasi aspetto, forma di realizzazione o esempio qui descritti, il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) può essere somministrato, per esempio e senza limitazione, contemporaneamente a detto altro agente anti-HCV. Il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) può anche essere somministrato, per esempio e senza
10 limitazione, in sequenza con detto altro agente anti-HCV. Ad esempio, il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) può essere somministrato immediatamente prima o dopo la somministrazione di detto altro agente anti-HCV. La frequenza di somministrazione può essere uguale o diversa. Ad esempio, il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) e detto altro agente anti-HCV possono essere somministrati una volta al giorno.
15 Per un altro esempio, il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) può essere somministrato una volta al giorno, e detto altro agente anti-HCV può essere somministrato due volte al giorno.

[0061] In qualsiasi aspetto, forma di realizzazione o esempio qui descritti, il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) può essere co-formulato con detto altro agente anti-
20 HCV in una singola forma di dosaggio. Esempi non limitativi di forme di dosaggio adatte includono forme di dosaggio liquide o solide. Preferibilmente, la forma di dosaggio è una forma di dosaggio solida. Più preferibilmente, la forma di dosaggio è una forma di dosaggio solida in cui il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) è in forma amorfa, o altamente preferibilmente disperso molecolarmente in una matrice che comprende un
25 polimero solubile in acqua farmaceuticamente accettabile e un tensioattivo farmaceuticamente

accettabile. Detto altro agente anti-HCV può anche essere in forma amorfa o disperso
molecolarmente nella stessa matrice o in una matrice diversa che comprende un polimero
solubile in acqua farmaceuticamente accettabile e un tensioattivo farmaceuticamente
accettabile. Detto altro agente anti-HCV può anche essere formulato in una o più diverse forme
5 (ad esempio, in una forma cristallina).

[0062] Come alternativa non limitativa, il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente
accettabile) e detto altro agente anti-HCV possono essere formulati in diverse forme di
dosaggio. Ad esempio, il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) e detto
altro agente anti-HCV possono essere formulati in diverse rispettive forme di dosaggio solide.

10 **[0063]** In qualsiasi aspetto, forma di realizzazione o esempio qui descritti, il Composto 1 o
un suo sale farmaceuticamente accettabile può essere somministrato in una quantità adatta
come, ad esempio, in dosi da circa 0,1 mg/kg a circa 200 mg/kg di peso corporeo, o da circa
0,25 mg/kg a circa 100 mg/kg o da circa 0,3 mg/kg a circa 30 mg/kg. Come altro esempio non
limitativo, il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) può essere
15 somministrato in una dose giornaliera totale da circa 5 mg a circa 300 mg, o da circa 25 mg a
circa 200 mg, o da circa 25 mg a circa 50 mg o una quantità tra. Le composizioni a dose singola
possono contenere tali quantità o loro sottomultipli per compensare la dose giornaliera.

[0064] Resta inteso, tuttavia, che il livello di dose specifico per ogni particolare paziente
dipenderà da una varietà di fattori tra cui l'attività del composto specifico impiegato, l'età, il
20 peso corporeo, la salute generale, il sesso, la dieta, il tempo di somministrazione, la via di
somministrazione, tasso di escrezione, combinazione farmacologica e gravità della malattia in
corso di terapia. Resta inteso anche che il dosaggio giornaliero totale dei composti e delle
composizioni da somministrare sarà deciso dal medico curante nell'ambito del giudizio
medico.

25 **[0065]** La seguente tabella elenca esempi non limitativi di una combinazione del Composto

1 (o di un suo sale farmaceuticamente accettabile) e di un altro agente anti-HCV che può essere usato in qualsiasi aspetto, forma di realizzazione o esempio qui descritti. Per ciascun trattamento, il Composto 1 (o un suo sale farmaceuticamente accettabile) e detto altro agente anti-HCV possono essere somministrati quotidianamente a un paziente con HCV. Ogni

5 trattamento può essere privo di interferone. Una somministrazione di ribavirina può essere inclusa in ciascun regime. Tuttavia, la presente invenzione contempla che ciascun regime di trattamento possa essere privo di interferone e ribavirina. Inoltre, se necessario, è possibile includere interferone e/o ribavirina in ciascun regime di trattamento. Ogni regime di trattamento può anche comprendere facoltativamente una somministrazione al paziente di uno

10 o più altri agenti anti-HCV. La durata di ciascun regime di trattamento può durare, ad esempio e senza limitazione, 8-48 settimane, a seconda della risposta del paziente. In qualsiasi dato regime descritto nella Tabella 1, i farmaci possono essere, ad esempio e senza limitazione, coformulati in un'unica forma di dosaggio solida. Ad esempio, tutti i farmaci usati in un regime possono essere coformulati in forme amorfe o dispersi molecolarmente in una matrice

15 comprendente un polimero solubile in acqua farmaceuticamente accettabile e facoltativamente un tensioattivo farmaceuticamente accettabile; per un altro caso, il Composto 1 è formulato in forma amorfa o disperso molecolarmente in una matrice comprendente un polimero solubile in acqua farmaceuticamente accettabile e facoltativamente un tensioattivo farmaceuticamente accettabile, e l'altro farmaco è in una o più forme cristalline e combinato con il Composto 1

20 amorfo in una singola forma di dosaggio solida. Per ancora un altro caso, il Composto 1 è formulato in una forma di dosaggio diversa da quella dell'altro farmaco.

Tabella 1. Esempi non limitativi di regimi di trattamento senza interferone (con o senza ribavirina)

Regime	Farmaci usati nel trattamento	
1	Composto 1 (o suo sale)	ACH-1095 (Achillion)
2	Composto 1 (o suo sale)	ACH-1625 (Achillion)
3	Composto 1 (o suo sale)	ACH-2684 (Achillion)
4	Composto 1 (o suo sale)	ACH-2928 (Achillion)
5	Composto 1 (o suo sale)	alisporivir (Debio 025; Novartis)
6	Composto 1 (o suo sale)	ALS-2158
7	Composto 1 (o suo sale)	ALS-2200
8	Composto 1 (o suo sale)	ANA-598 (setrobuvir, Anadys)
9	Composto 1 (o suo sale)	ANA-773 (Anadys)
10	Composto 1 (o suo sale)	AVL-181 (Avila)
11	Composto 1 (o suo sale)	AVL-192 (Avila)
12	Composto 1 (o suo sale)	AZD2836 (Astra-Zeneca)
13	Composto 1 (o suo sale)	AZD7295 (Astra-Zeneca)
14	Composto 1 (o suo sale)	BCX-4678 (BioCryst)
15	Composto 1 (o suo sale)	BI-201335 (Boehringer Ingelheim)
16	Composto 1 (o suo sale)	BI-207127 (Boehringer Ingelheim)
17	Composto 1 (o suo sale)	BILB-1941 (Boehringer Ingelheim)
18	Composto 1 (o suo sale)	BMS-650032 (BMS)
19	Composto 1 (o suo sale)	BMS-790052 (BMS)
20	Composto 1 (o suo sale)	BMS-791325 (BMS)
21	Composto 1 (o suo sale)	BMS-824393 (BMS)
22	Composto 1 (o suo sale)	boceprevir

23	Composto 1 (o suo sale)	CTS-1027 (Conatus)
24	Composto 1 (o suo sale)	danoprevir
25	Composto 1 (o suo sale)	VX-985 (Vertex)
26	Composto 1 (o suo sale)	filibuvir (PF-00868554, Pfizer)
27	Composto 1 (o suo sale)	GL59728 (Glaxo)
28	Composto 1 (o suo sale)	GL60667 (Glaxo)
29	Composto 1 (o suo sale)	GS-5885 (Gilead)
30	Composto 1 (o suo sale)	GS-6620 (Gilead)
31	Composto 1 (o suo sale)	GS-9132 (Gilead)
32	Composto 1 (o suo sale)	GS-9256 (Gilead)
33	Composto 1 (o suo sale)	GS-9451 (Gilead)
34	Composto 1 (o suo sale)	GS-9620 (Gilead)
35	Composto 1 (o suo sale)	GS-9669 (Gilead)
36	Composto 1 (o suo sale)	GSK62336805
37	Composto 1 (o suo sale)	GSK625433 (GlaxoSmithKline)
38	Composto 1 (o suo sale)	IDX-102 (Idenix)
39	Composto 1 (o suo sale)	IDX-136 (Idenix)
40	Composto 1 (o suo sale)	IDX-184 (Idenix)
41	Composto 1 (o suo sale)	IDX-316 (Idenix)
42	Composto 1 (o suo sale)	IDX-320 (Idenix)
43	Composto 1 (o suo sale)	IDX-375 (Idenix)
44	Composto 1 (o suo sale)	INX-189 (Inhibitex)
45	Composto 1 (o suo sale)	ITX-4520 (iTherx)
46	Composto 1 (o suo sale)	ITX-5061 (iTherx)
47	Composto 1 (o suo sale)	MK-0608 (Merck)

48	Composto 1 (o suo sale)	MK-3281 (Merck)
45	Composto 1 (o suo sale)	MK-5172 (Merck)
50	Composto 1 (o suo sale)	narlaprevir
52	Composto 1 (o suo sale)	NM-811 (Novartis)
53	Composto 1 (o suo sale)	PF-4878691 (Pfizer)
54	Composto 1 (o suo sale)	PHX-1766 (Phenomix)
55	Composto 1 (o suo sale)	PPI-1301 (Presidio)
56	Composto 1 (o suo sale)	PPI-461 (Presidio--)
57	Composto 1 (o suo sale)	PSI-7977 (Pharmasset/Gilead)
58	Composto 1 (o suo sale)	PSI-938 (Pharmasset/Gilead)
59	Composto 1 (o suo sale)	mericitabina (RG7128; Roche)
60	Composto 1 (o suo sale)	RO5303253 (Roche)
61	Composto 1 (o suo sale)	SCY-635 (/Scynexis/)
62	Composto 1 (o suo sale)	tegobuvir
63	Composto 1 (o suo sale)	telaprevir
64	Composto 1 (o suo sale)	TMC-435 (Tibotec)
65	Composto 1 (o suo sale)	TMC-647055 (Tibotec)
66	Composto 1 (o suo sale)	TMC64912 (Medivir)
67	Composto 1 (o suo sale)	vaniprevir
68	Composto 1 (o suo sale)	VBY708 (Virobay)
69	Composto 1 (o suo sale)	VCH-759 (Vertex & ViraChem)
70	Composto 1 (o suo sale)	VCH-916 (ViraChem)
71	Composto 1 (o suo sale)	VX-222 (VCH-222) (Vertex &
72	Composto 1 (o suo sale)	VX-500 (Vertex)
73	Composto 1 (o suo sale)	VX-759 (Vertex)

74	Composto 1 (o suo sale)	VX-813 (Vertex)
75	Composto 1 (o suo sale)	TMC649128 (Medivir)
76	Composto 1 (o suo sale)	tegobuvir (GS-9190; Gilead)
77	Composto 1 (o suo sale)	GI-5005 (GlobeImmune)
78	Composto 1 (o suo sale)	IMO-2125 (Idera//)
79	Composto 1 (o suo sale)	ITX-5061 (ITheRx)
80	Composto 1 (o suo sale)	miR-122 (Regulus)
81	Composto 1 (o suo sale)	Miravirsen (SPC3649; Santaris)
82	Composto 1 (o suo sale)	ACH-3102
83	Composto 1 (o suo sale)	EDP-239
84	Composto 1 (o suo sale)	IDX-719
85	Composto 1 (o suo sale)	MK-8742

[0066] Resta inteso che le forme di realizzazione sopra descritte e i seguenti esempi sono riportati a titolo illustrativo, non limitativo. Vari cambiamenti e modifiche nell'ambito della presente invenzione risulteranno evidenti agli esperti del ramo dalla presente descrizione.

Esempio 1. Attività antivirale del Composto 1 nei saggi di coltura cellulare di repliconi
5 dell'HCV

[0067] Le attività inibitorie del Composto 1 possono essere valutate utilizzando il seguente protocollo. Per la caratterizzazione del composto nella coltura cellulare possono essere utilizzate due linee cellulari di replicone subgenomico genotipo 1 stabili: una derivata dal genotipo la-H77 e l'altra derivata dal genotipo lb-Con1. I costrutti di replicone possono essere
10 repliconi subgenomici bicistronici. Il costrutto di replicone del genotipo la contiene la regione di codifica NS3-NS5B derivata dal ceppo H77 dell'HCV (la-H77). Il replicone ha anche un reporter di luciferasi di lucciola e un marcatore selezionabile di neomicina fosfotransferasi (Neo). Queste due regioni di codifica, separate dalla proteasi FMDV 2a, comprendono il primo

cistrone del costrutto del replicone bicistrone, con il secondo cistrone contenente la regione di codifica NS3-NS5B con l'aggiunta delle mutazioni adattative E1202G, K1691R, K2040R e S2204I. Il costrutto del replicone lb-Con1 è identico al replicone la-H77, tranne per il fatto che la regione di codifica HCV 5' UTR, 3' UTR, e NS3-NS5B è derivata dal ceppo lb-Con1, e le mutazioni adattative sono K1609E, K1846T e Y3005C. Inoltre, il costrutto del replicone lb-Con1 contiene un IRES poliovirus tra l'IRES HCV e il gene della luciferasi. Le linee cellulari del replicone possono essere mantenute nel terreno Eagles modificato di Dulbecco (DMEM) contenente siero bovino fetale (FBS) al 10% (v/v), 100 UI/ml di penicillina, 100 mg/ml di streptomina (Invitrogen) e 200 mg/ml di G418 (Invitrogen). Gli effetti inibitori del Composto 1 su una replicazione dell'HCV possono essere determinati misurando l'attività del reporter della luciferasi. Ad esempio, le cellule contenenti repliconi possono essere seminate in piastre da 96 pozzetti a una densità di 5000 cellule per pozzetto in 100 µl di DMEM contenente 5% di FBS. Il giorno seguente, il Composto 1 può essere diluito in dimetilsolfossido (DMSO) per generare uno stock di 200x in una serie di otto diluizioni semilogaritmiche. Le serie di diluizioni possono quindi essere ulteriormente diluite 100 volte nel terreno contenente 5% di FBS. Durante la notte, il terreno con l'inibitore viene aggiunto alle piastre di coltura cellulare che contengono già 100 µl di DMEM con 5% di FBS. Le cellule possono essere incubate per tre giorni negli incubatori per coltura tissutale, dopodiché è possibile aggiungere 30 µl di tampone di lisi passiva (Promega) a ciascun pozzetto, e poi le piastre vengono incubate per 30-45 minuti con oscillazione per lisare le cellule. La soluzione di luciferina (100 µl, Promega) può essere aggiunta a ciascun pozzetto, e l'attività della luciferasi può essere misurata con un luminometro Victor II (Perkin-Elmer). L'inibizione percentuale della replicazione dell'RNA dell'HCV può essere calcolata per ogni concentrazione di composto e il valore EC₅₀ può essere calcolato usando una curva di regressione non lineare che si adatta all'equazione logistica a 4 parametri e al software

GraphPad Prism 4.

- 5 [0068] La capacità del Composto 1 di inibire l'NS5A da HCV non genotipo 1 può essere valutata in base a quanto segue. Viene creato un numero di linee cellulari di replicone 1b-Con1 subgenomiche stabili contenenti una porzione di NS5A da HCV di genotipo 2a, 2b, 3a, 4a, 5a o 6a. Il costrutto di repliconi contiene un sito di restrizione NotI a monte di NS5A e un sito di restrizione BspI subito dopo l'amminoacido NS5A 214. L'RNA di HCV da soggetti infetti è isolato (si veda Middleton et al., J VIROL METHODS 145:137-145 (2007), e Tripathi et al., ANTIVIRAL RES 73:40-49 (2007)), e viene condotta RT-PCR sull'RNA per generare un frammento di DNA che codifica gli aminoacidi HCV NS5A 1-214. Il frammento PCR
- 10 incorpora le estremità compatibili NotI e BspI e questo frammento viene legato in un plasmide contenente il replicone 1b-Con1. Linee cellulari stabili contenenti questi repliconi chimerici vengono generate introducendo questi costrutti nelle cellule Huh-7. L'effetto inibitorio del Composto 1 sulla replicazione dell'HCV in questi repliconi può essere determinato misurando l'attività del gene reporter della luciferasi come descritto sopra.
- 15 [0069] Usando i saggi sopra descritti o saggi di repliconi basati su cellule simili, il Composto 1 ha mostrato attività significativamente inibitorie contro una replicazione di repliconi dell'HCV con NS5A dal genotipo 1-6 (Tabella 2).

Tabella 2

Sottotipo di replicone	Media EC ₅₀ ± Dev. Standard
Genotipo 1a-H77	1,8 ± 0,9
Genotipo 1b-Con1	4,3 ± 1,7
Genotipo 2a	2,3 ± 0,7
Genotipo 2b	1,9 ± 0,6
Genotipo 3a	2,1 ± 0,7
Genotipo 4a	1,9 ± 0,6
Genotipo 5a	1,4 ± 0,4
Genotipo 6a	2,8 ± 0,7

Esempio 2. Potenza antivirale del Composto 1 contro HCV non genotipo 1 tipo selvatico e varianti rispetto ad altri inibitori dell'NS5A dell'HCV

[0070] Il Composto 1 è stato testato contro mutanti resistenti ad altri inibitori dell'NS5A, 5 incluso il composto di riferimento mostrato nella Tabella 3. Sullo sfondo 1b-Con1 sono stati costruiti repliconi chimerici transitoriamente replicanti contenenti NS5A da genotipo 2-6 tipi selvatici o repliconi contenenti varianti all'interno di NS5A. Questi repliconi contenevano anche un gene reporter di luciferasi di lucciola. Le varianti sono state introdotte dalla mutagenesi sito-diretta usando il kit (USB) Change-IT Multiple Mutation Site Directed 10 Mutagenesis. Dopo che la mutagenesi è stata confermata dall'analisi della sequenza, i plasmidi sono stati linearizzati con un enzima di restrizione ScaI. Il kit di trascrizione TranscriptAid T7 High Yield (Fermentas) è stato utilizzato per trascrivere l'RNA subgenomico HCV dai plasmidi. L'RNA è stato trasfettato *mediante* elettroporazione in una linea cellulare derivata da Huh-7 come descritto (si veda Middleton *et al.* e Tripathi *et al.*, *supra*) tranne per il fatto 15 che 3×10^6 cellule sono state elettroporate con 15 µg di modello di RNA e la piastra da 96 pozzetti è stata seminata con $7,5 \times 10^3$ cellule per pozzetto. Quattro ore dopo la trasfezione, i

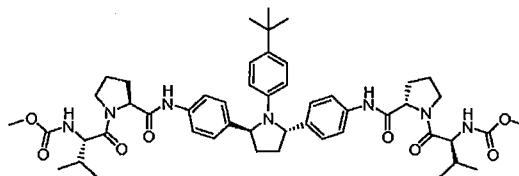
pozzetti di una piastra sono stati raccolti per la misurazione della luciferasi. Questa piastra ha fornito una misura della quantità di RNA di input traducibile e quindi dell'efficienza di trasfezione. Ai pozzetti delle rimanenti piastre, è stata aggiunta una serie di diluizioni semilogaritmiche del composto di prova in terreno di coltura (concentrazione finale di 0,5% di DMSO), e le piastre sono state incubate a 37 °C, 5% di CO₂ in un incubatore umidificato per 4 giorni. Dopo questo periodo, il terreno è stato rimosso e le piastre sono state lavate con 100 ml di soluzione salina tamponata con fosfato per pozzetto. La soluzione di luciferina (50 µl, Promega) è stata aggiunta a ciascun pozzetto, e l'attività della luciferasi è stata misurata con un luminometro Victor II (Perkin-Elmer). L'inibizione percentuale della replicazione dell'RNA dell'HCV è stata calcolata per ciascuna concentrazione di composto e il valore di EC₅₀ è stato calcolato utilizzando una curva di regressione non lineare che si adatta all'equazione logistica a 4 parametri e al software GraphPad Prism 4.

[0071] Utilizzando i saggi sopra descritti o saggi di repliconi basati su cellule simili, il Composto 1 ha mostrato attività significativamente inibitorie contro una replicazione di repliconi dell'HCV contenenti NS5A di tipo selvatico non genotipo 1 nonché NS5A con varianti resistenti (Tabella 3).

Tabella 3

Genotipo	Mutante	Media EC ₅₀ (pM)	Media EC ₅₀ (pM) (composto di
2a	WT	1,3	3,4
	T24A	1,3	92
2b	WT	1,0	1,1
	L28F	1,1	39
	L31V	0,9	427
3a	WT	1,8	7,2
	M28T	0,8	3030
	Y93H	4,3	>100.000
4a	WT	0,9	0,4
	L28V	0,8	5,3
	L30H	1,0	0,8
5a	WT	1,1	0,9
	L28I	1,0	72
	L31F	1,9	263
	L31V	0,9	221
6a	WT	1,4	80
	T58N	2,5	8468
	L31V	1,0	5035
	T58A	1,5	1145

* Il composto di riferimento è



[0072] La precedente descrizione della presente invenzione fornisce illustrazione e descrizione, ma non intende essere esaustiva o limitare l'invenzione a quella precisa descritta. Modifiche e variazioni sono possibili alla luce degli insegnamenti di cui sopra o possono essere

acquisite dalla pratica dell'invenzione. Pertanto, si osserva che l'ambito dell'invenzione è definito dalle rivendicazioni e dai loro equivalenti.

RIVENDICAZIONI

1. Metil {(2S,3R)-1-[(2S)-2-{5-[(2R,5R)-1-{3,5-difluoro-4-[4-(4-fluorofenil)piperidin-1-
5 il] fenil}-5-(6-fluoro-2-{(2S)-1-[N-(metossicarbonil)-O-metil-L-treonil]pirrolidin-2-
il}-1H-benzimidazolo-5-il)pirrolidin-2-il]-6-fluoro-1H-benzimidazol-2-il}pirrolidin-1-
il]-3-metossi-1-oxobutan-2-il}carbammato (Composto 1) o un suo sale
farmaceuticamente accettabile per l'uso in un metodo di trattamento per l'HCV, che
comprende una somministrazione di una quantità efficace del Composto 1 o di un suo
10 sale farmaceuticamente accettabile a un paziente con HCV, indipendentemente dagli
uno o più genotipi specifici dell'HCV che il paziente ha, in cui detto paziente non è
genotipizzato per detto trattamento.
2. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la
rivendicazione 1, in cui detto paziente è infetto dal genotipo 2 dell'HCV.
- 15 3. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la
rivendicazione 1, in cui detto paziente è infetto dal genotipo 3 dell'HCV.
4. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la
rivendicazione 1, in cui detto paziente è infetto dal genotipo 4 dell'HCV.
5. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la
20 rivendicazione 1, in cui detto paziente è infetto dal genotipo 5 dell'HCV.
6. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la
rivendicazione 1, in cui detto paziente è infetto dal genotipo 6 dell'HCV.
7. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo una delle
rivendicazioni 1-6, in cui detto Composto 1 o il suo sale è co-somministrato con un altro
25 agente anti-HCV.

8. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo una delle rivendicazioni 1-6, in cui detto Composto 1 è co-somministrato con un inibitore della proteasi dell'HCV o/e un inibitore della polimerasi dell'HCV.
- 5 9. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo una delle rivendicazioni 1-6, in cui detto trattamento non include una somministrazione di interferone a detto paziente e dura meno di 24 settimane o dura non più di 12 settimane.
- 10 10. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo una delle rivendicazioni 1-6, in cui detto Composto 1 è co-somministrato con un inibitore della proteasi dell'HCV o una combinazione di un inibitore della proteasi dell'HCV e un inibitore della polimerasi dell'HCV, e in cui detto trattamento non include una somministrazione di interferone a detto paziente e dura meno di 24 settimane o dura non più di 12 settimane.
- 15 11. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso in un metodo di trattamento per HCV, comprendente la somministrazione di una quantità efficace di Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile a un paziente con HCV, in cui detto paziente è infettato dal genotipo 2, 3, 4, 5 o 6 dell'HCV.
12. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la rivendicazione 11, in cui detto paziente è infetto dal genotipo 2 dell'HCV.
- 20 13. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la rivendicazione 11, in cui detto paziente è infetto dal genotipo 3 dell'HCV.
14. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la rivendicazione 11, in cui detto paziente è infetto dal genotipo 4 dell'HCV.
15. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la rivendicazione 11, in cui detto paziente è infetto dal genotipo 5 dell'HCV.

16. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la rivendicazione 11, in cui detto paziente è infetto dal genotipo 6 dell'HCV.
17. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo una delle rivendicazioni 11-16, in cui detto Composto 1 è co-somministrato con un inibitore della proteasi dell'HCV o una combinazione di un inibitore della proteasi dell'HCV e un inibitore della polimerasi dell'HCV, e in cui detto trattamento non include una somministrazione di interferone a detto paziente e dura meno di 24 settimane o dura non più di 12 settimane.
18. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la rivendicazione 1 in cui detto Composto 1 è co-somministrato con un inibitore della proteasi dell'HCV o un inibitore della polimerasi dell'HCV, e in cui detto trattamento dura meno di 24 settimane e non include una somministrazione di interferone a detto paziente.
19. Composto 1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la rivendicazione 18, in cui detto paziente è infetto da genotipo 2, 3, 4, 5 o 6 dell'HCV.