

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 726**

51 Int. Cl.:

C07F 9/6561 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2016 PCT/CN2016/083407**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16192560**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2016 E 16802483 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3305795**

54 Título: **Profármaco tenofovir éster monobencílico fosfamida, método de preparación y uso del mismo**

30 Prioridad:

29.05.2015 CN 201510290530

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

18.02.2021

73 Titular/es:

**JIANGSU TASLY DIYI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
No. 168 Chaoyang Road, Qingpu Industrial Park
Huai'an, Jiangsu 223003, CN**

72 Inventor/es:

**WANG, GUOCHENG y
WU, HUIMIN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 806 726 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Profármaco tenofovir éster monobencílico fosfamida, método de preparación y uso del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo de la química médica, y específicamente se refiere a un novedoso compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida, o el hidrato, solvato, sal farmacéuticamente aceptable o isómero quiral individual del mismo, así como al método de preparación del mismo y uso del mismo en medicina.

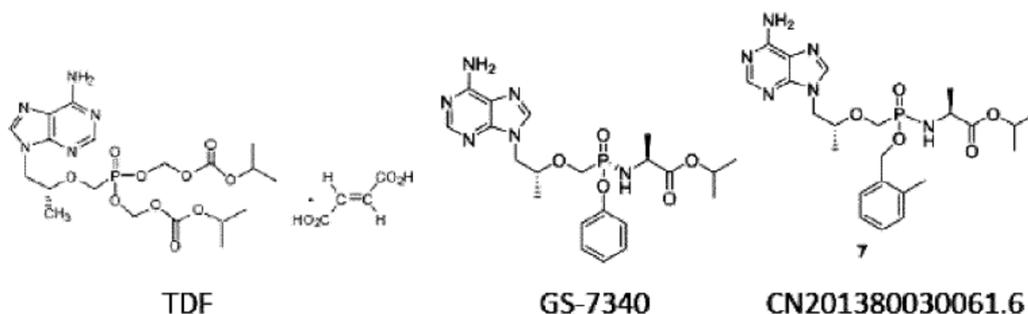
10

Antecedentes técnicos

El fumarato de tenofovir disoproxilo (TDF) es un fármaco oral soluble en agua anti-VIH y anti-VHB, estable en el estómago, entra en el cuerpo con la sangre después de la absorción intestinal, y se distribuye uniformemente en los tejidos humanos; menos del 20% se metaboliza y activa al fármaco parental tenofovir bajo la acción de esterasa, y después de difosforila a difosfato de tenofovir para tener efecto, y aproximadamente el 80% restante se excreta fuera del cuerpo en forma original. Para mejorar la biodisponibilidad, actualmente, se adopta habitualmente la estrategia de introducir el grupo enmascarador en el grupo fosfato de tenofovir para formar el profármaco liposoluble. Estructuralmente, un grupo enmascarador se une con el grupo fosfato para formar una estructura fosforamida, otro grupo unido con el grupo fosfato para formar una estructura de fosfolípido. Se ha demostrado que el compuesto con esta estructura tiene el efecto de dirigirse al tejido linfático y hepático. Los grupos formadores de ésteres incluyen varios anillos aromáticos y anillos heteroaromáticos, especialmente el fenilo sustituido o sin sustituir (documentos CN201310041647.4, WO02082841). La patente (CN01813161) divulgó un compuesto GS-7340 obtenido al usar tal estrategia de profármaco, que aumentó las propiedades de dirigirse al hígado comparado con el fumarato de tenofovir disoproxilo (TDF), mientras que la eficacia aumentó y la toxicidad se redujo. Sin embargo, debido a la inestabilidad del grupo fenol que actúa como el grupo enmascarador, todavía se puede producir metabolismo en la sangre para producir el fármaco parental activo tenofovir y, por tanto, produce cierta toxicidad sistémica. El fenol producido por el metabolismo también tiene toxicidad relativamente alta él mismo. El compuesto profármaco de tenofovir de tipo bencilo con sustitución(es) en el anillo de benceno ha demostrado tener actividades que se dirigen al hígado. Las patentes US20130210757 y CN201380030061.6 divulgaron que un grupo enmascarador era fosforamida formada por el éster de aminoácido y el grupo fosfato; otro grupo enmascarador era éster bencílico con sustitución(es) en el anillo de benceno formado por bencilo con los grupos donantes de electrones tal como metilo en el anillo de benceno en la posición orto o para, y el grupo fosfato. Sin embargo, no hay notificación de las investigaciones de síntesis y bioactividad para el compuesto profármaco de tenofovir usando el bencilo sin sustituir como un grupo formador de éster, en parte porque el grupo bencilo sin sustitución(es) en el anillo de benceno no se puede metabolizar durante el uso del profármaco de nucleótido 5-fluorouracilo, lo que produce que no sea activo (documento WO02082841).

El grupo enmascarador de o-metil bencilo de la estructura del compuesto divulgado en el documento CN201380030061.6 tiene una alta actividad de grupo saliente y baja estabilidad durante el metabolismo de esterasa en sangre, el grupo de direccionamiento es relativamente más fácil que se separe, por tanto, lleva al aumento relativo del fármaco parental activo en la sangre y la relativa disminución del fármaco parental activo en el hígado, y afecta la actividad y toxicidad sistémicas. El compuesto 7 también se divulgó en el documento US 2013/2010757 A1 para el tratamiento de enfermedades infecciosas o cáncer. Compuestos estructuralmente relacionados adicionales que portan o-metil bencilo o grupos enmascaradores de bencilo más sustituido se divulgaron en el documento CN 103980318 A y por W.A. Lee et al. en *ANTIMICROB AGENTS CH*, 2005, p.1889-1906.

45



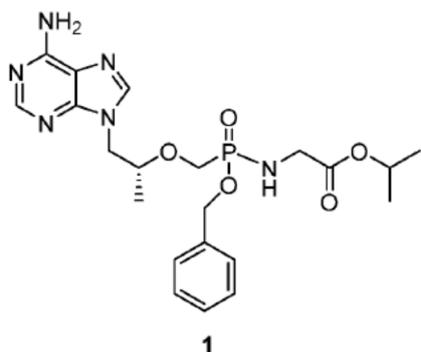
Para aumentar la bioactividad de tenofovir y actualizar su actividad antiviral, la presente invención proporciona una clase de compuestos de tenofovir éster monobencílico fosfamida sin sustitución(es) en el anillo de benceno del grupo bencilo, y el método de preparación de los mismos, así como su uso en la infección anti-SIDA dirigida a la linfa y el tratamiento anti-hepatitis B dirigido al hígado; comparados con GS-7340 y el compuesto 7, tales profármacos son más estables frente a esterasa, y aumentan más la estabilidad sistémica y el efecto antiviral dirigido al hígado de los análogos de tenofovir.

50

Compendio de la invención

Los inventores de la presente invención inventaron una clase de compuestos de tenofovir éster monobencílico fosfamida, y accidentalmente encontraron que los compuestos de la presente invención se pueden metabolizar al fármaco parental activo de tenofovir (TFV) en el ensayo celular, y por tanto tienen actividades antiviral. En el ensayo animal in vivo, después de alimentación forzada gástrica a los ratones, los compuestos se pueden enriquecer en el hígado, donde se metabolizan al producto activo de tenofovir. Comparados con el estado de la técnica, los compuestos de la presente invención tienen una mayor actividad anti-VHB, o son más estables en el plasma, sus segmentos metabólicos son más seguros, y por tanto los efectos secundarios y tóxicos sistémicos causados por el metabolismo en plasma se reducen.

En particular, la presente invención proporciona un compuesto de tenofovir éster monometílico fosfamida de fórmula general X, y el hidrato, solvato, sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el isómero individual resuelto del mismo.



en donde Z se selecciona de O, S, Se, NH- o CH₂-,

R₁, R₂, R₃, R₄, y R₅ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo lineal de C₁-C₁₀ sustituido o sin sustituir, alquilo ramificado de C₃-C₁₀, cicloalquilo de C₃-C₁₀, y arilo o heteroarilo de C₆-C₁₀, en donde la sustitución es de uno a tres heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y Se.

Preferiblemente,

Z se selecciona de O o S,

R₁, R₂, R₃, R₄, y R₅ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo lineal de C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquilo ramificado de C₃-C₆, cicloalquilo de C₃-C₆, y arilo o heteroarilo de C₆-C₁₀.

Más preferiblemente,

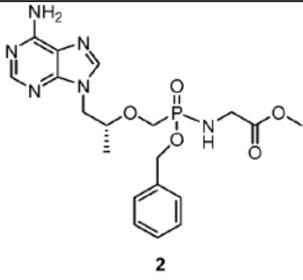
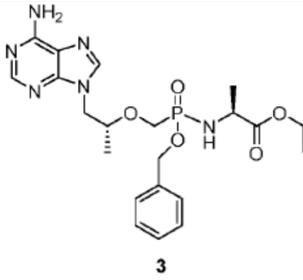
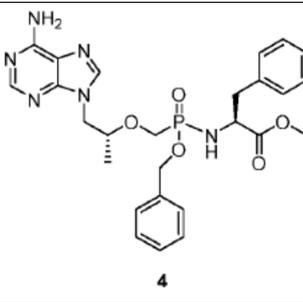
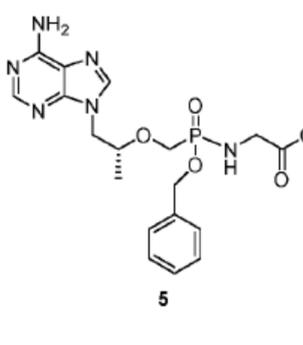
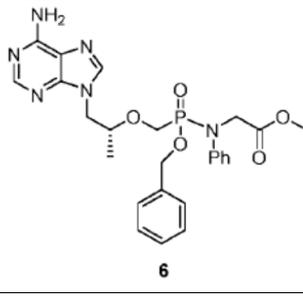
Z se selecciona de O,

R₁, R₂, R₃, R₄, y R₅ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo lineal de C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquilo ramificado de C₃-C₆, y arilo de C₆-C₁₀.

Preferiblemente, los compuestos de tenofovir éster monobencílico fosfamida de la presente invención se seleccionan de los compuestos en la tabla 1.

Tabla 1. Compuestos y las estructuras

Nombre del compuesto	Estructura
Compuesto 1	

Compuesto 2	 <p style="text-align: center;">2</p>
Compuesto 3	 <p style="text-align: center;">3</p>
Compuesto 4	 <p style="text-align: center;">4</p>
Compuesto 5	 <p style="text-align: center;">5</p>
Compuesto 6	 <p style="text-align: center;">6</p>

Se encontró que la estequiometría del profármaco puede afectar su capacidad metabólica y actividad antiviral en los tejidos a los que se dirige, y la fracción quiral está en el átomo de fósforo, y también se encuentra que está en su grupo enmascarador de aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos con configuraciones naturales tienen mejores actividades metabólicas, y el isómero S del compuesto 3 con la configuración del átomo de P tiene mayor actividad. Si los sitios quirales no son puros, estos diastereómeros o racematos necesitan ser enriquecidos quiralmente de modo que el resultado examinado tenga más sentido. El isómero con una única configuración en el centro quiral descrito anteriormente se obtiene mediante purificación por resolución quiral de modo que cada compuesto de prueba es esencialmente un compuesto con la única quiralidad. La formación del compuesto esencialmente único o enriquecimiento quiral significa que el estereoisómero en necesidad representa más de aproximadamente el 60%, habitualmente más del 80% y preferiblemente más del 95% del compuesto en peso. La separación se lleva a cabo

mediante la columna de cromatografía inversa o la columna de cromatografía quiral en la presente invención, y la fase móvil es solución acuosa de acetonitrilo.

El método de preparación del compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida puede incluir las siguientes etapas:

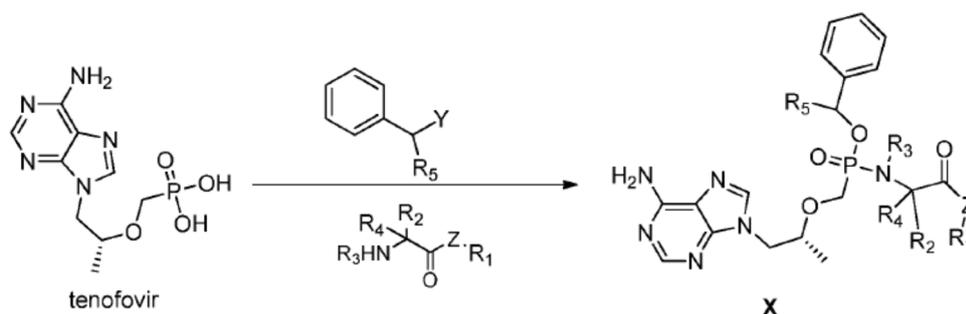
A: Se hace reaccionar tenofovir con haluro de bencilo o alcohol bencílico en presencia de bases para producir el intermedio tenofovir éster monobencílico.

B: El intermedio tenofovir éster monobencílico se hace reaccionar con varios compuestos que contienen grupos NH terminales para producir el compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida de la presente invención.

En donde, en la etapa A, tenofovir se hace reaccionar preferiblemente con bromuro de bencilo o alcohol bencílico, y la base puede ser varias bases inorgánicas u orgánicas, preferiblemente las bases orgánicas; en la etapa B, los compuestos que contienen el grupo NH terminal son preferiblemente compuestos éster de aminoácidos o compuestos amida de aminoácidos.

En particular, añadir secuencialmente diisopropil etil amina (DIPEA), bromuro de bencilo o alcohol bencílico a una suspensión de tenofovir en acetonitrilo, calentar esta mezcla a 50°C-80°C y agitar conservando el calor durante 2-4 horas, añadir piridina y disolver, y después añadir secuencialmente trietilamina y cualquiera de clorhidrato de éster bencílico de glicina, clorhidrato de éster metílico de glicina, clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina, clorhidrato de éster isopropílico de L-fenilalanina, clorhidrato de éster isopropílico de glicina, y clorhidrato de éster isopropílico de N-fenilglicina, calentar la mezcla a 50°C-80°C y agitar durante 10-60 minutos, añadir trifenilfosfina y 2,2'-ditiodipiridina a esta temperatura, agitar durante 3 horas a la temperatura de 50°C-100°C, y después centrifugar a sequedad a presión reducida. Pasar los residuos a través de una columna de gel de sílice (eluida con metanol/cloruro de metileno) para obtener un producto sólido blanco.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de preparación para un compuesto tenofovir éster monobencílico fosfoamida de fórmula general X, en donde la ruta sintética se presenta como sigue:



La presente invención incluye además el método de resolución quiral del compuesto; recoger eluyentes de diferentes tiempos de retención de la separación en columna de preparación de HPLC (columna de preparación; C18, fase móvil: solución acuosa de acetonitrilo al 10%-50% (V/V)) o la separación en columna quiral, secar para obtener los isómeros de diferentes quiralidades.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida, o el hidrato del mismo, o el solvato del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el isómero individual resuelto del mismo.

Según se desee, se pueden usar técnicas convencionales en el campo de la química, y la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de la presente invención se puede obtener mediante neutralización ácido-base. Por ejemplo, dejar el compuesto de la presente invención reaccionar con ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido acético, ácido fórmico, ácido metanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido oxálico o ácido succínico para obtener la sal correspondiente. O dejar el compuesto de la presente invención reaccionar con hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de bario, etc., un carbonato alcalino tal como carbonato de sodio y carbonato de calcio, etc., para obtener la correspondiente sal. La reacción se puede llevar a cabo en un solvente tal como agua o un solvente orgánico tal como etanol, tetrahidrofurano, dioxano, etilenglicol, y ácido acético, etc., o la mezcla de tal solvente orgánico y agua. Si se requiere, la reacción también se puede llevar a cabo sin ningún solvente.

La composición farmacéutica de la presente invención, preferiblemente en forma posológica unitaria de preparación farmacéutica, se puede hacer en cualquier forma posológica farmacéuticamente aceptable durante la preparación farmacéutica; estas formas posológicas se seleccionan de: comprimidos, comprimidos recubiertos con azúcar, comprimidos recubiertos con película, comprimidos recubiertos entéricos, cápsulas, cápsulas duras, cápsulas blandas,

líquido oral, agentes orales, gránulos, suspensiones, soluciones, inyecciones, supositorios, pomadas, emplastos, cremas, espráis y parches, preferiblemente preparaciones orales, y lo más preferiblemente comprimidos y cápsulas.

5 Además, la composición farmacéutica descrita en la presente invención también comprende un soporte farmacéuticamente aceptable.

10 Se pueden usar técnicas convencionales de la farmacéutica para preparar la preparación farmacéutica, por ejemplo, mezclar el compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida de la presente invención, o el hidrato del mismo, o el solvato del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el isómero individual resuelto del mismo con un soporte farmacéuticamente aceptable. El soporte farmacéuticamente aceptable incluye, pero no está limitado a, manitol, sorbitol, ácido sórbico o la sal de potasio del mismo, metabisulfito de sodio, bisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, clorhidrato de cisteína, ácido tioglicólico, metionina, vitamina A, vitamina C, vitamina E, vitamina D, azona, EDTA disódico, EDTA de calcio sodio, carbonato, acetato, fosfato de metal alcalino monovalente o la solución acuosa del mismo, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, aminoácido, ácido fumárico, cloruro de sodio, cloruro de potasio, lactato de sodio, xilitol, maltosa, glucosa, fructosa, dextrano, glicina, almidón, sacarosa, lactosa, manitol, derivados de silicio, celulosa y derivados de la misma, alginato, gelatina, polivinilpirrolidona, glicerol, propilenglicol, etanol, tween 60-80, span-80, cera de abeja, lanolina, parafina líquida, alcohol cetílico, éster de ácido gálico, agar, trietanolamina, aminoácido básico, urea, glioxildureido, carbonato de calcio, bicarbonato de calcio, tensoactivo, polietilenglicol, ciclodextrina, β -ciclodextrina, materiales fosfolípidos, caolín, talco, estearato de calcio, y estearato de magnesio, etc.

20 Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se hace en preparaciones, la forma posológica unitaria puede contener 0,1-1000 mg de la sustancia farmacéuticamente activa de la presente invención, y el resto es soporte farmacéuticamente aceptable. Los soportes farmacéuticamente aceptables representan el 0,1-99,9% del peso total de las preparaciones en peso.

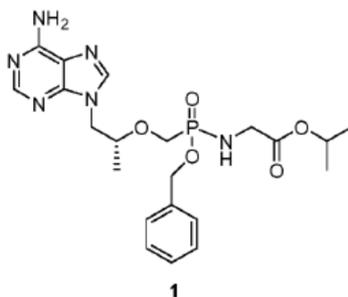
El uso y dosis de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se determinan según las condiciones de los pacientes mientras se usan.

30 La presente invención, por último, también proporciona el compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida, o el hidrato del mismo, o el solvato del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el isómero individual resuelto del mismo para uso en tratar enfermedades por infecciones víricas, preferiblemente para uso en tratar infección de SIDA o hepatitis B o enfermedades causadas por el virus de la hepatitis B.

35 Descripción detallada de la invención

La presente invención se explicará en detalle a continuación con referencia a los ejemplos específicos, de modo que los expertos en la materia puedan tener un entendimiento más exhaustivo de la presente invención. Los ejemplos específicos se usan solo para la ilustración de la solución técnica de la presente invención, y no en modo alguno para la limitación de la presente invención.

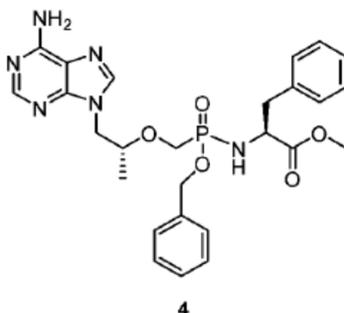
Forma de realización 1: Preparación del compuesto 1



45 Se añadieron DIPEA (10 mmol) y bromuro de bencilo (5 mmol) a la suspensión de tenofovir (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) secuencialmente, la mezcla se calentó a 80°C y se agitó durante 16 horas y después se evaporó a sequedad a presión reducida. Los residuos se disolvieron con piridina (20 ml), después se añadieron trietilamina (5 ml) y clorhidrato de éster isopropílico de glicina (10 mmol) a la solución secuencialmente. La mezcla se calentó a 50°C y se agitó durante 30 minutos, después de ello se añadieron trifetilfosfina (15 mmol) y 2,2'-ditiodipiridina (15 mmol), se agitó durante 3 horas a la misma temperatura, y se evaporó a sequedad a presión reducida después de ello. Los residuos se sometieron a columna de gel de sílice (eluida por metanol/cloruro de metileno) para dar un sólido blanco. El rendimiento fue el 48%.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,30 (s, 1H), 7,94, 7,91 (s, s, 1 H), 7,37-7,28 (m, 5 H), 6,10, 6,07 (s, s, 2 H), 5,07-4,89 (m, 3 H), 4,38-4,30 (m, 1 H), 4,14-4,05 (m, 1 H), 3,91-3,86 (m, 2 H), 3,71-3,48 (m, 4 H), 1,25-1,18(m, 9 H); ^{31}P RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 25,76, 25,66; MS (m/z) 477,32 (MH^+), 475,18 (MH^-).

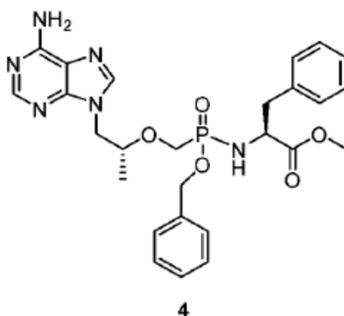
5 **Forma de realización 2:** Preparación del compuesto 2



10 Se añadieron DIPEA (10 mmol) y bromuro de bencilo (5 mmol) a la suspensión de tenofovir (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) secuencialmente, la mezcla se calentó a 80°C y se agitó durante 16 horas y después se evaporó a sequedad a presión reducida. Los residuos se disolvieron con piridina (20 ml), después se añadieron trietilamina (5 ml) y clorhidrato de éster metílico de glicina (10 mmol) a la solución secuencialmente. La mezcla se calentó a 50°C y se agitó durante 30 minutos, después se añadieron trifenilfosfina (15 mmol) y 2,2'-ditiodipiridina (15 mmol), se agitó durante 3 horas a la misma temperatura, y se evaporó a sequedad a presión reducida después de ello. Los residuos se sometieron a columna de gel de sílice (eluida por metanol/cloruro de metileno) para dar un sólido blanco. El rendimiento fue el 57%.

15 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,26 (s, 1 H), 7,93, 7,92 (s, s, 1 H), 7,31-7,4 (m, 5 H), 6,37 (s, 2 H) 5,01-4,86 (m, 2 H), 4,33-4,25 (m, 1 H), 4,10-4,01 (m, 1 H), 3,93-3,80 (m, 2 H), 3,67-3,53 (m, 4 H) 1,40-1,14(m, 6 H); ^{31}P RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 25,96, 25,73; MS (m/z) 449,30 (MH^+).

20 **Forma de realización 3:** Preparación del compuesto 3

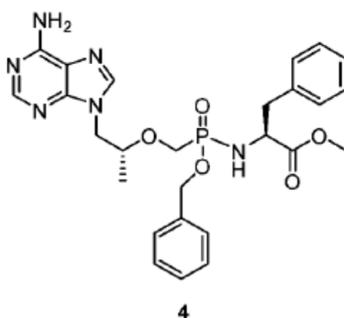


25 Se añadieron DIPEA (10 mmol) y bromuro de bencilo (5 mmol) a la suspensión de tenofovir (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) secuencialmente, la mezcla se calentó a 80°C y se agitó durante 16 horas y después se evaporó a sequedad a presión reducida. Los residuos se disolvieron con piridina (20 ml), después se añadieron trietilamina (5 ml) y clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (10 mmol) a la solución secuencialmente. La mezcla se calentó a 50°C y se agitó durante 30 minutos, después se añadieron trifenilfosfina (15 mmol) y 2,2'-ditiodipiridina (15 mmol), se agitó durante 3 horas a la misma temperatura, y se evaporó a sequedad a presión reducida después de ello. Los residuos se sometieron a columna de gel de sílice (eluida por metanol/cloruro de metileno) para dar un sólido blanco. El rendimiento fue el 54%.

30 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,34, 8,33 (s, s, 1 H), 7,93, 7,92 (s, s, 1 H), 7,36-7,30 (m, 5 H), 6,00, 5,99 (s, s, 2 H), 5,06-4,97 (m, 2 H), 4,94-4,89 (m, 1 H), 4,40-4,28 (m, 1 H), 4,14-4,06 (m, 1 H), 4,03-3,92 (m, 2 H), 3,89-3,78 (m, 2 H), 3,67-3,53 (m, 2 H), 1,33-1,18 (m, 12 H); ^{31}P RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 25,02, 24,12; MS (m/z) 491,32 (MH^+).

35 **Forma de realización 4:** Preparación del compuesto 4

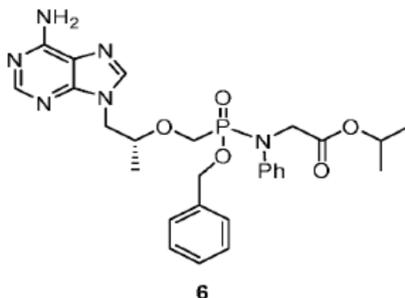
40



5 Se añadieron DIPEA (10 mmol) y bromuro de bencilo (5 mmol) a la suspensión de tenofovir (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) secuencialmente, la mezcla se calentó a 80°C y se agitó durante 16 horas y después se evaporó a sequedad a presión reducida. Los residuos se disolvieron con piridina (20 ml), después se añadieron trietilamina (5 ml) y clorhidrato de éster isopropílico de L-fenilalanina (10 mmol) a la solución secuencialmente. La mezcla se calentó a 50°C y se agitó durante 30 minutos, después se añadieron trifenilfosfina (15 mmol) y 2,2'-ditiodipiridina (15 mmol), se agitó durante 3 horas a la misma temperatura, y se evaporó a sequedad a presión reducida después de ello. Los residuos se sometieron a columna de gel de sílice (eluida por metanol/cloruro de metileno) para dar un sólido blanco. El rendimiento fue el 61%.

15 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,33 (s, 1 H), 7,90 (s, 1 H), 7,30-7,09 (m, 10 H), 6,23 (s, 2 H), 5,03-4,88 (m, 2 H), 4,33-4,29 (m, 1 H), 4,15-3,90 (m, 3 H), 3,81-3,71 (m, 1 H), 3,48-3,43 (m, 1 H), 3,21-3,02 (m, 3 H), 2,94-2,76 (m, 2 H), 1,47-1,42 (m, 3 H), 1,26-1,07 (m, 9 H); ³¹P RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 20,78; MS (m/z) 567,32 (MH⁺).

Forma de realización 5: Preparación del compuesto 5

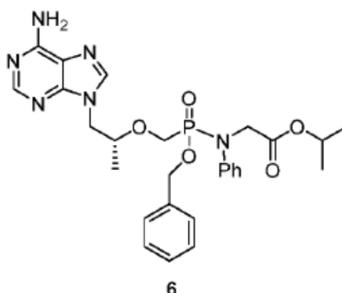


20 Se añadieron DIPEA (10 mmol) y bromuro de bencilo (5 mmol) a la suspensión de tenofovir (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) secuencialmente, la mezcla se calentó a 80°C y se agitó durante 16 horas y después se evaporó a sequedad a presión reducida. Los residuos se disolvieron con piridina (20 ml), después se añadieron trietilamina (5 ml) y clorhidrato de éster bencílico de glicina (10 mmol) a la solución secuencialmente. La mezcla se calentó a 50°C y se agitó durante 30 minutos, después se añadieron trifenilfosfina (15 mmol) y 2,2'-ditiodipiridina (15 mmol), se agitó durante 3 horas a la misma temperatura, y se evaporó a sequedad a presión reducida después de ello. Los residuos se sometieron a columna de gel de sílice (eluida por metanol/cloruro de metileno) para dar un sólido blanco. El rendimiento fue el 58%.

30 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,30, 8,29 (s, s, 1 H), 7,93, 7,92 (s, s, 1 H), 7,37-7,27 (m, 10 H), 6,14 (s, 2 H), 5,31 (s, 1 H), 5,15 (s, 1 H), 5,10 (s, 1 H), 5,04-4,87 (m, 2 H), 4,34-4,26 (m, 1 H), 4,09-4,00 (m, 1 H), 3,92-3,81 (m, 2 H), 3,76-3,54 (m, 1 H), 3,17-3,11 (m, 2 H), 1,18-1,16 (m, 3 H); ³¹P RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 25,81, 25,61; MS (m/z) 525,19 (MH⁺).

Forma de realización 6: Preparación del compuesto 6

35



Se añadieron DIPEA (10 mmol) y bromuro de bencilo (5 mmol) a la suspensión de tenofovir (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) secuencialmente, la mezcla se calentó a 80°C y se agitó durante 16 horas y después se evaporó a sequedad a presión reducida. Los residuos se disolvieron con piridina (20 ml), después se añadieron trietilamina (5 ml) y clorhidrato de éster isopropílico de N-fenilglicina (10 mmol) a la solución secuencialmente. La mezcla se calentó a 50°C y se agitó durante 30 minutos, después se añadieron trifetilfosfina (15 mmol) y 2,2'-ditiodipiridina (15 mmol), se agitó durante 3 horas a la misma temperatura, y se evaporó a sequedad a presión reducida después de ello. Los residuos se sometieron a columna de gel de sílice (eluída por metanol/cloruro de metileno) para dar un sólido blanco. El rendimiento fue el 27%.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,29 (s, 1 H), 8,09 (s, 1 H), 7,50-7,14 (m, 10 H), 6,60 (s, 2 H), 5,07-4,90 (m, 3 H), 4,37-4,34 (m, 7 H), 3,17-3,12 (m, 3 H), 1,45-1,41 (m, 6 H); ³¹P RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 24,43, 24,15; MS (m/z) 553,25 (MH⁺).

Forma de realización 7: Preparación de los compuestos mediante resolución quiral

Resolución a través de HPLC con columna de fase inversa o columna quiral: el compuesto 2 de la **forma de realización 2** se resolvió de forma quiral por HPLC con columna de fase inversa (columna: Diamonsil C18, 5 μm, 150x21,1 mm; fase móvil: solución acuosa de acetonitrilo al 20% (V/V)), dio el compuesto 2a (83 mg; tiempo de retención: 14 min) y el compuesto 2b (90 mg; tiempo de retención: 17 min).

Compuesto 2a: MS (m/z) 449,26 (MH⁺); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,28 (s, 1 H), 7,92 (s, 1 H), 7,32-7,24 (m, 5 H), 6,58 (s, 2 H), 5,02-4,88 (m, 2 H), 4,30-4,26 (m, 1 H), 4,16-4,02 (m, 1 H), 3,90-3,84 (m, 2 H), 3,69-3,65 (m, 5 H), 3,60-3,54 (m, 1 H), 1,16 (s, 3 H); ³¹P RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 25,87;

Compuesto 2b: MS (m/z) 449,32 (MH⁺); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,28 (s, 1 H), 7,92 (s, 1 H), 7,32-7,27 (m, 5 H), 6,64 (s, 2 H), 5,03-5,01 (m, 2 H), 4,34-4,30 (m, 1 H), 4,10-4,01 (m, 2 H), 3,93-3,84 (m, 2 H), 3,66-3,59 (m, 5 H), 1,14 (s, 3 H); ³¹P RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 25,64.

Se aplicó una resolución similar a los compuestos 1, 3 y 5, y dieron los compuestos 1a y 1b, 3a y 3b, 5a y 5b respectivamente.

Compuesto 1a: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,25 (s, 1 H), 7,93 (s, 1 H), 7,30-7,26 (m, 5 H), 6,17 (s, 2 H), 5,00-4,90 (m, 2 H), 4,34-4,29 (m, 1 H), 4,11-4,06 (m, 2 H), 3,92-3,81 (m, 2 H), 3,63-3,59 (m, 3 H), 1,18-1,23 (m, 9 H); ³¹P RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 25,79;

Compuesto 1b: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,28 (s, 1 H), 7,92 (s, 1 H), 7,32-7,27 (m, 5 H), 6,64 (s, 2 H), 5,03-5,01 (m, 2 H), 4,34-4,30 (m, 1 H), 4,10-4,01 (m, 2 H), 3,93-3,84 (m, 2 H), 3,66-3,59 (m, 3 H), 1,16-1,14 (m, 9 H); ³¹P RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 25,60.

Compuesto 3a: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,30 (s, 1 H), 7,90 (s, 1 H), 7,32-7,27 (m, 5 H), 6,19 (s, 2 H), 5,03-4,96 (m, 2 H), 4,92-4,87 (m, 1 H), 4,30-4,25 (m, 1 H), 4,09-4,03 (m, 1 H), 3,97-3,94 (m, 1 H), 3,90-3,76 (m, 2 H), 3,56-3,50 (m, 1 H), 1,30-1,15 (m, 12 H); ³¹P RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 24,18;

Compuesto 3b: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,30 (s, 1 H), 7,91 (s, 1 H), 7,36-7,29 (m, 5 H), 6,09 (s, 2 H), 4,99-4,96 (m, 2 H), 4,94-4,87 (m, 1 H), 4,38-4,34 (m, 1 H), 4,12-4,06 (m, 1 H), 3,96-3,90 (m, 2 H), 3,87-3,81 (m, 1 H), 3,60-3,55 (m, 1 H), 3,45-3,40 (m, 1H), 1,31-1,16 (m, 12 H); ³¹P RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 25,04

Compuesto 5a: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,28 (s, 1 H), 7,95 (s, 1 H), 7,40-7,23 (m, 10 H), 6,33 (s, 2 H), 5,10-4,95 (m, 4 H), 4,32-4,28 (m, 1 H), 4,01-3,84 (m, 2 H), 3,82-3,55 (m, 4 H), 1,24 (s, 3 H); ³¹P RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 25,88

Compuesto 5b: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ; 8,27 (s, 1 H), 7,94 (s, 1 H), 7,34-7,27 (m, 10 H), 6,12 (s, 2 H), 4,96-4,84 (m, 4 H), 4,28-4,23 (m, 1 H), 3,83-3,51 (m, 6 H), 1,15 (s, 3 H); ³¹P RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 25,59

Tabla 2: Lista de los compuestos quirales de la presente invención

Compuesto	Estructura	Compuesto	Estructura
1a		1b	
2a		2b	
3a		3b	
5a		5b	

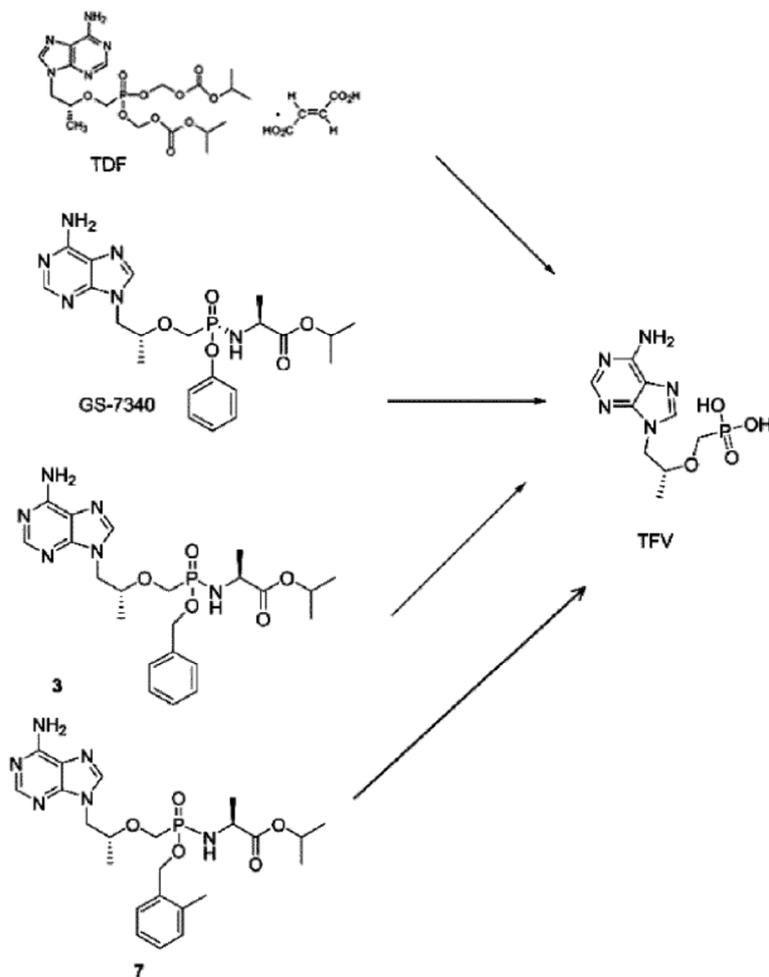
5 En los compuestos anteriores, cada una de las configuraciones a y b representa el 50% de los compuestos.

Forma de realización 8

10 La mezcla de un compuesto quiral de la forma de realización 7 en la tabla 2 (1,2 kg), ácido fumárico (285 g), y acetonitrilo (3 l) se sometió a reflujo hasta que se volvió homogénea y después se filtró mientras estaba caliente. El filtrado se enfrió a 5°C y se mantuvo durante 16 horas a la misma temperatura. El precipitado se filtró y lavó con acetonitrilo, se secó para dar el producto como un polvo blanco.

15 Ejemplos de prueba: La ventaja de la presente invención se demuestra mediante los ejemplos de prueba descritos a continuación.

- 5 El perfil más crucial de un profármaco es que sea apto para metabolizarse al fármaco parenteral activo al tiempo que se mantiene libre en otros sistemas, es decir, cuanto más estable en sistemas (aparato digestivo, sangre, etc.), y más activo en los órganos diana (linfa, hígado), entonces será más eficaz y menos tóxico como un candidato a fármaco. En los ejemplos de prueba, todos los profármacos, incluyendo los compuestos en la presente invención y en la referencia, desempeñarán sus efectos antiviral después de metabolizarse a tenofovir (TFV), el fármaco parenteral activo.



- 10 Actualmente, los compuestos con estructuras similares son los compuestos enumerados en las reivindicaciones de la patente CN201380030061.6 (abreviatura: compuesto 7 y su isómero quiral individual 7a y 7b del mismo), y el fármaco TAF (GS-7340) para tratar hepatitis B, que aprobó la FDA y lanzó Gilead muy recientemente. Estos compuestos comparten el mismo motivo de fármaco parenteral que los compuestos de la presente invención, pero los segmentos que se dirigen al hígado son diferentes.

15 Los compuestos de la presente invención son o bien más eficaces o menos tóxicos debido a la mayor estabilidad de las estructuras. Además, los metabolitos de los compuestos de la presente invención, ácidos benzoicos, son mucho más seguros que su equivalente de GS-7340, el fenol tóxico, y traen la ventaja de ser menos tóxicos al tiempo que tienen actividad superior. Además, comparados con los compuestos en las reivindicaciones del documento CN201380030061.6, porque el grupo que se dirige al hígado de los compuestos de la presente invención es bencilo, que es más estable que o-metil bencilo, y la actividad del bencilo que se va a separar durante el metabolismo de esterasa es comparativamente baja, el fármaco parenteral activo en la sangre está relativamente reducido, el fármaco parenteral en el hígado está relativamente aumentado, y por tanto muestran la mejor actividad. La toxicidad es menor después de que el bencilo se separe del compuesto de la presente invención, lo que lleva a mejor estabilidad sistémica y menor toxicidad. Están específicamente presentes como sigue:

Ejemplo de prueba 1: Actividad anti-VHB celular y ensayos de citotoxicidad

- 30 La concentración del ADN de VHB en el sobrenadante de células HepG2.2.15 se detectó mediante el método de PCR cuantitativa (qPCR) con fluorescencia a tiempo real para determinar la actividad anti-VHB del compuesto en células

HepG2.2.15, y los efectos de los compuestos de prueba para la actividad de las células HepG2.2.15 se detectó mediante Cell-Titer Blue.

8.1. Dilución de los compuestos: la concentración inicial de cada compuesto en el ensayo de actividad anti-VHB in vitro fue 1 μM , con dilución en serie de 3 veces a 8 concentraciones; la concentración inicial de cada compuesto en el ensayo de citotoxicidad fue 100 μM , con dilución en serie de 3 veces a 8 concentraciones; se usó DMSO para la dilución de licor madre del compuesto. Las concentraciones iniciales del compuesto de referencia TDF para el ensayo de actividad anti-VHB in vitro y el ensayo de citotoxicidad se ajustaron todas a 0,2 μM , con dilución en serie de 3 veces a 8 concentraciones.

8.2. Ensayo de actividad anti-VHB in vitro: las células HepG2.2.15 se sembraron en la placa de 96 pocillos (4×10^4 células/pocillo), y se cultivaron durante la noche a 37°C en CO_2 al 5%. El segundo día, se añadieron soluciones de cultivo frescas que contenían compuestos de diferentes concentraciones a los pocillos de cultivo. Véase la tabla 2 para la distribución de los compuestos. El 5º día, las soluciones de cultivo usadas en los pocillos de cultivo se aspiraron y desecharon, y se añadieron soluciones frescas que contenían compuestos de diferentes concentraciones. El 8º día, el sobrenadante en los pocillos de cultivo se recogió para la extracción de ADN de VHB en el sobrenadante. Se usó la prueba de qPCR para detectar la concentración del contenido en ADN de VHB en el sobrenadante de HepG2.2.15.

8.3. Tratamiento de las células en el ensayo de viabilidad celular: las células HepG2.2.15 se sembraron en la placa de 96 pocillos (4×10^4 células/pocillo), y se cultivaron durante la noche a 37°C en CO_2 al 5%. El 2º día, se añadieron soluciones de cultivo frescas que contenían compuestos de diferentes concentraciones a los pocillos de cultivo. Véase la tabla 2 para la distribución de los compuestos. El 5º día, las soluciones de cultivo usadas en los pocillos de cultivo se aspiraron y desecharon, y se añadieron soluciones frescas que contenían compuestos de diferentes concentraciones. El 8º día, Se añadió el agente Cell-titer Blue a cada pocillo, y el lector de microplaca se usó para detectar el valor de fluorescencia para cada pocillo.

8.4. Análisis de datos y cálculo del porcentaje de inhibición y viabilidad celular relativa:

El porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inh.} = \left[\frac{\text{cantidad de VHB de control DMSO} - \text{cantidad de VHB de la muestra}}{\text{cantidad de VHB de control DMSO}} \right] \times 100\%$$

El porcentaje de viabilidad celular se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\text{fluorescencia de la muestra} - \text{fluorescencia del medio control}}{\text{fluorescencia de DMSO control} - \text{fluorescencia del medio control}} \times 100\%$$

Se usó el software GraphPad Prism para calcular el valor de la concentración eficaz 50% (CE_{50}) y el valor de la concentración citotóxica 50% (CC_{50}) de los compuestos.

8.5. Resultados de los ensayos y conclusiones:

Tabla 3: Valores de CE_{50} y CC_{50} de los resultados del ensayo anti-VHB de los compuestos

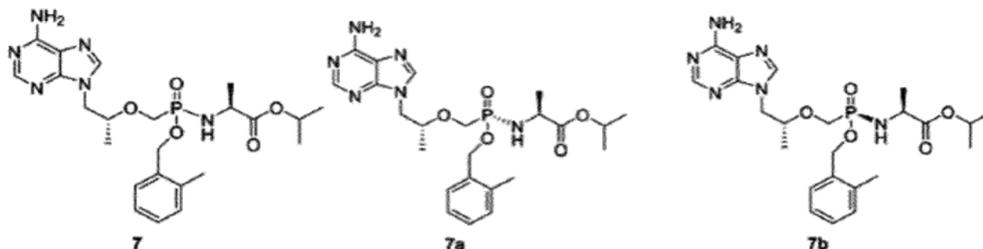
Compuestos	CE_{50} (nM)	CC_{50} (μM)
1a	>1000	>100
1b	290,1	>100
2a	418,4	>100
2b	>1000	>100
3a	3,39	>100
3b	6	>100
5a	214	>100
5b	847,6	>100

Hubo en total 8 compuestos de prueba en el presente ensayo, y los resultados del ensayo se resumieron como lo siguiente: 2 compuestos de prueba de 3a y 3b mostraron mejores actividades anti-VHB, con valores de CE_{50} por debajo del nivel 10 nM, 4 compuestos de prueba de 1b, 2a, 5a, y 5b mostraron actividades anti-VHB menores, con valores de CE_{50} entre 200 nM y 1000 nM, los valores de actividades anti-VHB de los otros 2 compuestos de prueba de 1a y 2a fueron mayores que la máxima concentración de prueba de 1000 nM.

Las estructuras de los compuestos 1, 2, 4, 5, y 6 de la presente invención eran similares a la de los compuestos 3, por tanto, tuvieron efectos farmacocinéticos similares.

Ejemplo de prueba 2: Ensayos comparativos de la actividad anti-VHB celular y citotoxicidad

9.1. Fármacos: el método de dilución y las concentraciones del compuesto 3, el compuesto de referencia (documento CN201380030061.6 y el compuesto mostrado en la reivindicación 36 (abreviatura: compuesto 7), y el isómero de los mismos) fueron los mismos que en el ejemplo 1.



5

Estructuras del compuesto 7, sus isómeros 7a y 7b.

10

9.2 Método de ensayo: el ensayo se llevó a cabo según el procedimiento del ejemplo 1.

9.3 Resultados y análisis:

Tabla 4: Valores de CE_{50} y CC_{50} de los compuestos del ensayo anti-VHB

Compuestos	CE_{50} (nM)	CC_{50} (μ M)
3a	3,39	>100
3b	6,00	>100
7a	>1000	>100
7b	274,40	>100
GS-7340	17,75	>100

15

Se pudo ver de la tabla 4 que los compuestos 3a y 3b de la presente invención mostraron buenas actividades anti-VHB, que eran significativamente mejores que la de los compuestos de referencia 7a, 7b y GS-7340. Ninguno del compuesto tuvo impacto aparente en la citotoxicidad de HepG2.2.15 (CC_{50} >100).

20

Ejemplo de prueba 3: Ensayos de actividad anti-VHB celular y citotoxicidad

9.1. La dilución y las concentraciones de los compuestos y el compuesto de referencia (documento CN201380030061.6, TDF) fueron las mismas que en el ejemplo 1.

25

9.2. Ensayo de actividad anti-VIH in vitro: después de que células MT-4 se infectaran con 24 TCID₅₀ de VIH-1 IIB/1x10⁵ células (2,4 TCID₅₀/ pocillo) a 37°C durante 1 hora, se sembraron en la placa de 96 pocillos que contenía los compuestos a diferentes concentraciones (4x10⁴ células/pocillo) y se cultivaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 5 días. Se usó CellTiter Glo para determinar la actividad para calcular el valor CE_{50} .

30

9.3. Tratamiento de las células en el ensayo de viabilidad celular: se llevaron a cabo ensayos paralelos usando el mismo método que en 9.2 excepto que la placa de 96 pocillos que contenía los compuestos de diferentes concentraciones se sustituyeron con la placa de 96 pocillos blanco, y se usó CellTiter Glo para determinar la viabilidad celular y calcular el valor CC_{50} .

35

9.4. Análisis de datos y cálculo del porcentaje de inhibición: el porcentaje de actividad se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (\%)} = (\text{Datos brutos}_{\text{cpto}} - \text{Media}_{\text{VC}}) / (\text{Media}_{\text{CC}} - \text{Media}_{\text{VC}}) * 100$$

40

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \text{Datos brutos}_{\text{cpto}} / \text{media}_{\text{VC}} * 100$$

Se usó el software GraphPad Prism para calcular el valor de la concentración eficaz 50% (CE_{50}) y el valor de la concentración citotóxica 50% (CC_{50}) de los compuestos.

45

9.5. Resultados del ensayo y conclusiones:

Tabla 5: Valores de CE_{50} y CC_{50} de los compuestos del ensayo anti-VHB

<i>Compuestos</i>	<i>CE₅₀ (nM)</i>	<i>CC₅₀ (μM)</i>
3a	5,13	22,53
3b	9,86	16,89
7b	83,65	14,72
GS-7340	14,28	13,34
TDF	16,97	21,33

Las actividades anti-VIH de los compuestos 3a y 3b fueron mayores que las de 7b y GS-7340; mientras tanto las toxicidades para las células MT-4 de 3a y 3b fueron menores que las de GS-7340 y 7b.

- 5 Conclusión: se puede ver del ejemplo 2 y 3 que, en el estudio de eficacia preliminar, los compuestos 3a y 3b presentaban buenas actividades anti-VHB y anti-VIH, y mostraron ventajas significativas comparados con la actividad de GS-7340, el principio activo de TAF. Era aparentemente superiores a los otros dos compuestos control 7a y 7b. Resultados del estudio de citotoxicidad: no hubo efecto aparente sobre la citotoxicidad de HepG2.2.15 (CC₅₀ > 100 μM); sin embargo, respecto a la toxicidad a las células MT-4, los datos mostraron que los compuestos 3a y 3b tuvieron
10 menores citotoxicidades para MT-4 que GS-7340 y 7b.

Ejemplo de prueba 4: Resultados del estudio de estabilidad

- 15 Se llevó a cabo el siguiente ensayo de estabilidad según el estado de la técnica, y los datos del ensayo de estabilidad mostrados en la tabla eran los porcentajes residuales después de que los compuestos de prueba se incubaran durante diferentes periodos de tiempo en las condiciones de ensayo.

10.1 Estabilidad en fluido gástrico simulado (Tabla 6):

<i>Compuestos</i>	<i>% 0 min</i>	<i>% 60 min</i>	<i>% 120 min</i>	<i>% 360 min</i>	<i>% 1440 min</i>
3a (10 μM)	100	85.40	58.07	14.41	0.00
3b (10 μM)	100	84.26	58.54	17.28	0.00
7b (10 μM)	100	82.76	51.39	13.16	0.00
GS-7340 (10 μM)	100	95.40	66.36	23.41	0.19
(Omeprazol 20 μM)	100	24.34	9.41	1.58	0.31

20

10.2 Estabilidad en fluido intestinal simulado (concentración de prueba: 10 μM) (Tabla 7):

<i>Compuestos</i>	<i>% 0 min</i>	<i>% 60 min</i>	<i>% 120 min</i>	<i>% 360 min</i>	<i>% 1440 min</i>
3a	100	53.62	23.45	1.26	0.00
3b	100	51.07	20.20	0.23	0.00
7b	100	31.28	8.33	0.09	0.00
GS-7340	100	30.09	6.22	0.06	0.00
(Clorambucilo)	100	29.36	3.11	0.00	0.00

25

10.3 Estabilidad en sangre humana (concentración de prueba: 2 μM) (Tabla 8):

<i>Compuestos</i>	<i>% 0 min</i>	<i>% 10 min</i>	<i>% 30 min</i>	<i>% 60 min</i>	<i>% 120 min</i>
3a	100	97.4	98.9	97.8	94.5
3b	100	97.1	96.4	96.1	93.7
7b	100	93.5	91.6	90.5	90.1
GS-7340	100	93.2	91.0	90.3	90.0
(Eucatrofina)	100	54.4	37.0	24.4	10.2

10.4 Estabilidad en S9 de hígado humano (concentración de prueba: 1 µM) (Tabla 9):

<i>Compuestos</i>	<i>T_{1/2}</i>	<i>CL_{lim(s9)}</i>	<i>CL_{lim(s9)}</i>	<i>Restante</i>
	<i>min</i>	<i>uL/min/mg</i>	<i>uL/min/kg</i>	<i>(T = 60 min)</i>
3a	9.9	70.0	246.4	6 %
3b	10.1	68.6	241.5	9%
7b	4.7	147.4	519.0	5%
GS-7340	3.3	211.0	742.7	4%
(7-Etoxicumarina)	82.2	8.4	29.7	60%
(7-Hidroxycumarina)	6.6	105.1	370.0	4%

5

La consistencia de los resultados de prueba de las sustancias control relacionadas tal como 7-etoxicumarina, 7-hidroxycumarina, eucatrofina, clorambucilo, y omeprazol, etc., verificaron la eficacia de este conjunto de ensayos.

10 10.5 Análisis de datos y conclusiones

Los datos del ensayo del estudio de estabilidad preliminar mostraron que, para los compuestos 3a y 3b, GS-7340 y 7b, las estabildades en el S9 de hígado humano eran comparativas, también las velocidades de metabolizar al fármaco parental activo eran comparativas, lo que implica que las actividades de los compuestos de la misma concentración en las células hepáticas eran comparativas.

15

En el fluido gástrico simulado, las estabildades de 3a y 3b eran comparativas a GS-7340, pero mayores que 7b; las estabildades de 3a y 3b en el fluido intestinal simulado fueron significativamente mayores que las de 7b y GS-7340. Las estabildades de 3a y 3b en sangre humana también fueron mejores que las de los compuestos comparativos 7b y GS-7340. En general, los compuestos 3a y 3b tuvieron mayores estabildades en el aparato digestivo y sistema sanguíneo comparados con GS-7340 y 7b, de modo que la concentración de fármaco sería menor en el sistema no diana mientras que mayor en los tejidos diana, lo que implica que los compuestos 3a y 3b tendrían mejores propiedades de dirigirse al hígado y menores toxicidades sistémicas en comparación con GS-7340 y 7b.

20

25 **Ejemplo de prueba 5:** Estudio de cardiotoxicidad

11.1. Células de prueba y preparación de compuestos

Se usaron en el ensayo las células CHO obtenidas de AVivaBiosciences que podían expresar de forma estable el canal de K hERG, y las células se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% con humedad constante.

5 Después de los compuestos y el compuesto control positivo amitriptilina (Amitriptilina, Sigma-Aldrich, BCBJ8594V) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100%, se diluyeron en serie y almacenaron a -20°C para uso posterior. La concentración final de DMSO en el fluido extracelular no era mayor del 0,30%.

11.2. El registro de pinzamiento zonal de membrana manual

10 Se usó la técnica del pinzamiento zonal de membrana de célula entera en el amplificador de pinzamiento zonal de membrana Multiclamp para ensayar el compuesto a temperatura ambiente, la señal de salida se digitalizó usando la placa DigiData 1440 A/D-D/A, y se usó el software Pclamp 10 para el control del registro. La resistencia de sello mínima se ajustó a 500 MOhms, y la corriente de hERG específica mínima se ajustó a 0,4 nA para control de calidad.

15 11.3 Análisis de datos

Se usaron Clampfit (V10.2, Molecular Devices) Excel 2003 y GraphPad Prism 5.0 para el análisis de los datos. La fórmula de cálculo de la corriente:

20 $I/I_{\text{control}} = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{((\text{Log}CI_{50} - \text{Log} C) * \text{pendiente de Hill})})$

11.4 Resultados del ensayo y conclusiones (Tabla 10):

Compuestos	CI ₅₀ (µM)	Pendiente de Hill	Número de células
Amitriptilina	3,56	0,93	4
3a	>10,00	-	2
3b	>30,00	-	2
7b	>10,00	-	2
GS-7340	>10,00	-	2

25 Conclusión: La CI₅₀ de los compuestos 3a y 3b eran comparativas a las de GS-7340 y 7b en el ensayo de hERG, y estaban bien por encima de 10 µM, que eran seguras respecto a la cardiotoxicidad, y cumplían el requisito general de los datos de hERG para investigación adicional de los compuestos durante investigación y desarrollo de nuevos fármacos.

30 **Ejemplo de prueba 6:** Metabolismo in vivo y ensayo de distribución en tejidos en ratones

12.1. Animales de prueba, métodos de preparación de fármaco y pautas de dosis

35 12 ratones ICR (machos, peso corporal 30 ± 5 g, comprados del centro de animales Vital River) se dividieron aleatoriamente en 4 grupos, 3 para cada grupo, se sometieron a ayuno durante 12 horas antes de la administración de fármaco, con bebida libre durante el ayuno. Pesar con precisión 30 mg de compuesto 3 en la balanza analítica, añadir 100 µl de etanol al 75% para disolución, añadir además solución salina hasta 6 ml, la mezcla se agitó con vórtex para que se mezclara uniformemente y llevar a cabo procesamiento ultrasónico para uso adicional. La dosis de profármaco tenofovir fue 50 mg/kg, y la cantidad de administración fue 10 ml/kg.

40

12.2. Los protocolos de recogida de muestras y los métodos de tratamiento

45 Los protocolos de recogida de muestras: después de la administración por alimentación forzada gástrica, se tomó cada 0,5 ml de sangre de la órbita a los 15 min, 30 min, 1 h y 3 h; los ratones se sacrificaron, y los tejidos hepáticos se tomaron, se lavaron, y pesaron; se añadió solución salina normal al hígado con una proporción de 1:1, se homogenizó y almacenó en el congelador a -40°C para ensayo.

50 Método de tratamiento para las muestras de plasma: se tomaron 100 µl del plasma de ratón y se colocaron en un tubo de plástico EP de 1,5 ml, se añadieron 100 µl de solución de estándar interno (teofilina 200 ng/ml), se añadieron 600 µl de acetonitrilo, se agitó con el vórtex durante 2 min, se centrifugó durante 3 min (12500 rpm), el sobrenadante se tomó, se purgó con nitrógeno a sequedad, y se disolvió de nuevo con 100 µl de fase móvil (agua:metanol = 95:5), y el volumen de inyección fue 10 µl.

55 Método de tratamiento para las muestras de tejido: se tomaron 200 µl de las muestras de tejido de ratón y se colocaron en un tubo de plástico EP de 1,5 ml, se añadieron 100 µl de solución de estándar interno (teofilina 200 ng/ml), se añadieron 600 µl de acetonitrilo, se agitó con el vórtex durante 2 min, se centrifugó durante 3 min (12500 rpm), el sobrenadante se tomó, se purgó con nitrógeno a sequedad, y se disolvió de nuevo con 100 µl e fase móvil (agua:metanol = 95:5), y el volumen de inyección fue 20 µl.

60 12.3. Método para el análisis de las muestras

Se usaron el LC-MS Thermo TSQuantum y la columna de cromatografía Thermo Hypersil GOLD (2,1 × 150 mm), el estándar interno era teofilina, la elución y gradiente y análisis se llevaron a cabo después de la inyección de HPLC-MS, los tiempos de retención y áreas de picos del estándar interno, compuesto 1 y el producto metabólico de tenofovir ((TFV) se registraron, y se usó el método de detección cuantitativa SRM para el análisis.

12.4. Resultados del análisis de la muestra y conclusiones (Tabla 11)

Compuestos (MS)	C _{plasma} (nmol/ml)	C _{tejido hepático} (nmol/ml)	Selectividad tejido hepático (C _{tejido hepático} /C _{plasma})
TFV (287)	0,075	67,251	896
Compuesto 3 (490)	0,104	0,375	3,61
Marcador interior (180)	1,11	1,11	1

$$10 \quad C_{(\text{compuesto 3} + \text{TFV}) \text{ tejido hepático}} / C_{(\text{compuesto 3} + \text{TFV}) \text{ plasma}} = 377$$

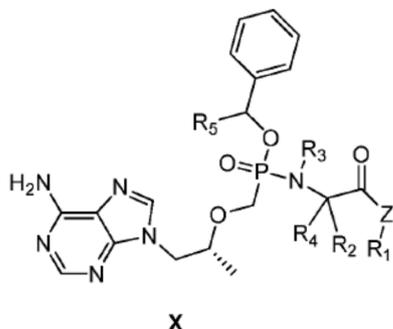
$$C_{\text{TFV plasma}} / C_{\text{compuesto 3 plasma}} = 0,72$$

$$15 \quad C_{\text{TFV tejido hepático}} / C_{\text{compuesto 3 tejido hepático}} = 166$$

Los resultados mostraron que después de 3 h, las concentraciones del compuesto 3 y su producto metabólico de tenofovir TFV en el hígado eran ambas mayores que esos en sangre, y la concentración global de ambos en el hígado es 377 veces la de en la sangre, lo que demuestra que el compuesto 3 se podía enriquecer eficazmente en el hígado. Mientras tanto, la concentración de TFV en la sangre era solo 0,72 veces la del fármaco parental compuesto 3, mientras que la concentración del fármaco parental TFV en el hígado era 166 veces la del profármaco compuesto 3, lo que demuestra que el compuesto 3 era relativamente estable en la sangre de ratón, y se metabolizaba eficazmente al fármaco parental activo tenofovir en el hígado. Por tanto, el compuesto 3 tenía estabilidad en sangre y actividad anti-VHB dirigida al hígado en el ensayo animal in vivo.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida de la fórmula general X, y el hidrato, solvato, sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el isómero individual resuelto del mismo,



en donde Z se selecciona de O, S, Se, NH- o CH₂,

- 10 R₁, R₂, R₃, R₄, y R₅ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo lineal de C₁-C₁₀ sustituido o sin sustituir, alquilo ramificado de C₃-C₁₀, cicloalquilo de C₃-C₁₀, y arilo o heteroarilo de C₆-C₁₀, en donde la sustitución es de uno a tres heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y Se.

- 15 2. El compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida según la reivindicación 1, en donde

Z se selecciona de O o S,

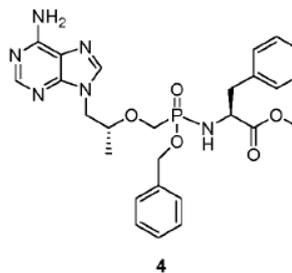
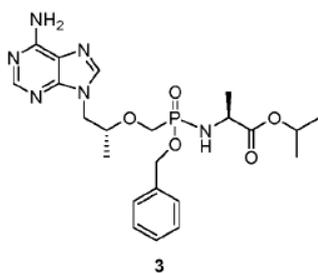
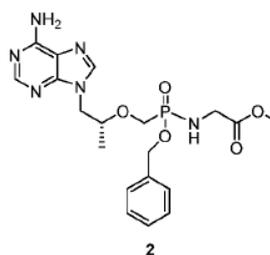
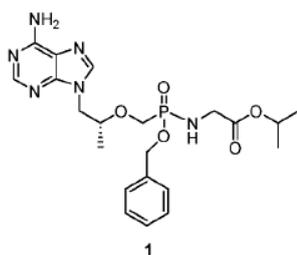
R₁, R₂, R₃, R₄, y R₅ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo lineal de C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquilo ramificado de C₃-C₆, cicloalquilo de C₃-C₆, y arilo o heteroarilo de C₆-C₁₀.

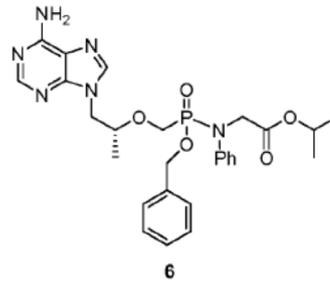
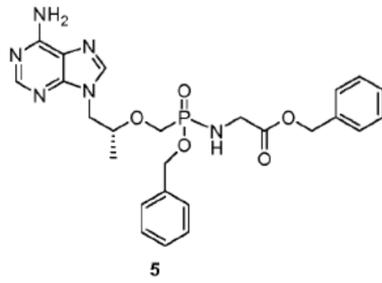
- 20 3. El compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida según la reivindicación 2, en donde

Z se selecciona de O,

25 R₁, R₂, R₃, R₄, y R₅ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo lineal de C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alquilo ramificado de C₃-C₆, y arilo de C₆-C₁₀.

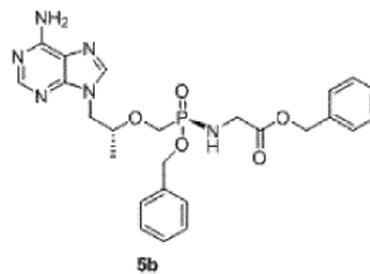
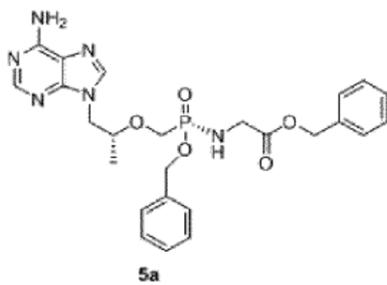
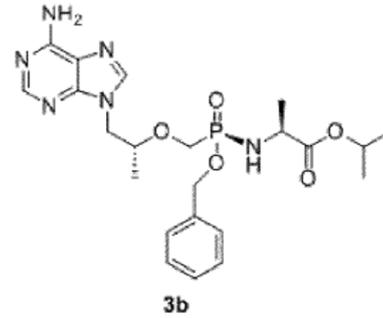
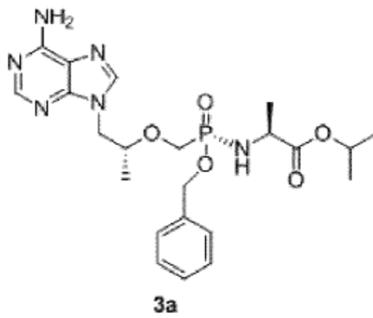
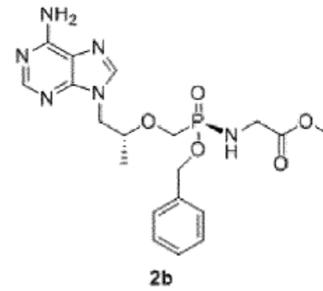
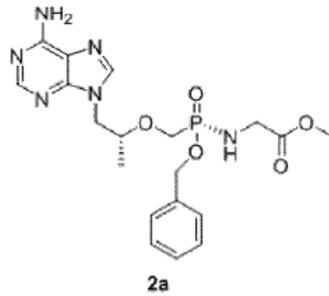
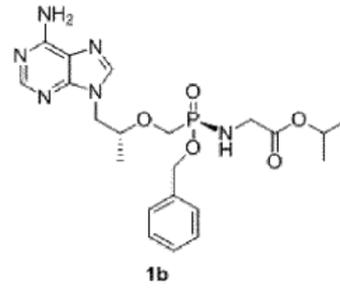
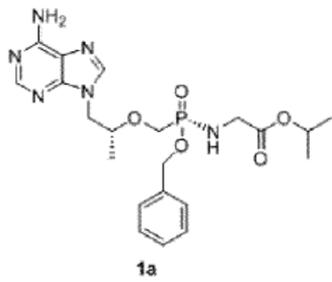
- 30 4. El compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida según la reivindicación 3, en donde el compuesto se selecciona de:





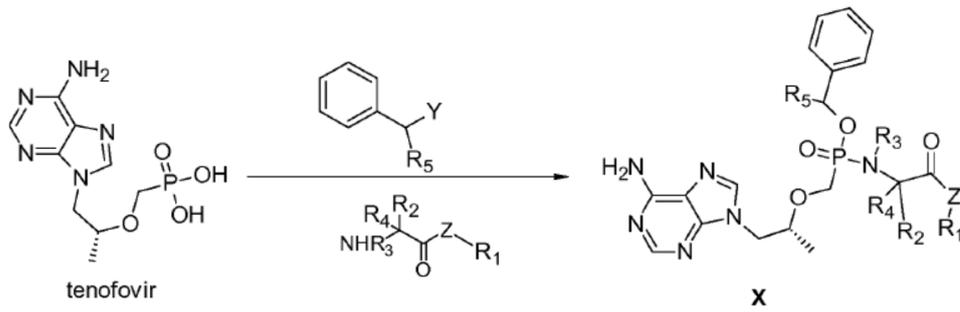
5. El compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida según la reivindicación 4, en donde los isómeros de los compuestos 1, 2, 3, y 5 son 1a y 1b, 2a y 2b, 3a y 3b, y 5a y 5b, respectivamente, con las estructuras de:

5



6. Un método de preparación para un compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida de fórmula general X según la siguiente ruta sintética:

10



en donde Z se selecciona de O, S, Se, NH- o CH₂-, y

- 5
- R₁, R₂, R₃, R₄, y R₅ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo lineal de C₁-C₁₀ sustituido o sin sustituir, alquilo ramificado de C₃-C₁₀, cicloalquilo de C₃-C₁₀, y arilo o heteroarilo de C₆-C₁₀, en donde la sustitución es de uno a tres heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y Se.
- 10 7. Compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o el hidrato del mismo, o el solvato del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el isómero individual resuelto del mismo para uso en tratar enfermedades de infecciones víricas.
- 15 8. Compuesto tenofovir éster monobencílico fosfamida según la reivindicación 7, o el hidrato del mismo, o el solvato del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el isómero individual resuelto del mismo para su uso en tratar infección de SIDA o hepatitis B o enfermedades causadas por el virus de la hepatitis B.