

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 880 391**

51 Int. Cl.:

C07F 9/6574 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61K 31/662 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2017 PCT/CN2017/089850**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.12.2017 WO17220028**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2017 E 17814766 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.05.2021 EP 3476854**

54 Título: **Compuesto de ciclofosfato de nucleósido de fármaco precursor antivírico y uso del mismo**

30 Prioridad:

24.06.2016 CN 201610492624

18.04.2017 CN 201710254377

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

24.11.2021

73 Titular/es:

**ZHEJIANG PALOALTO PHARMACEUTICAL
TECHNOLOGY CO LTD (100.0%)**

**Building 1 Room 301 and 302 889 Century
Avenue Kecheng District
Quzhou, Zhejiang 324099, CN**

72 Inventor/es:

**XI, ZHIJIAN;
XU, HUAQIANG;
LU, CHUNPING;
WU, ZHONGSHAN;
SUN, FENG y
ZHANG, ZHENWEI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 880 391 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

Compuesto de ciclofosfato de nucleósido de fármaco precursor antivírico y uso del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un profármaco antivírico de compuesto de ciclofosfato de nucleósido basado en administración específica de hígado o un isómero óptico, un hidrato, un solvato, una sal farmacéuticamente aceptable o una composición farmacéutica del mismo, y a usos del mismo.

10

Antecedentes

Los virus tales como el virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis D (VHD), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son las mayores amenazas para la salud humana. Por ejemplo, la hepatitis vírica B (hepatitis B) está provocada por el virus de la hepatitis B y principalmente en forma de lesiones inflamatorias del hígado, que conduce a daños en múltiples órganos. Los resultados de la encuesta de la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran que hay 240 millones de casos infectados con hepatitis B crónica y que cada año mueren 780.000 casos de hepatitis B, donde 650.000 casos mueren por cirrosis y cáncer de hígado provocado por hepatitis B crónica y 130.000 casos mueren por hepatitis B aguda. La hepatitis B ha sido un problema crítico y global para la salud.

20

Los fármacos anti-VHB generalmente incluyen una clase de fármacos nucleotídicos como adefovir dipivoxil, tenofovir disoproxil fumarato (TDF), tenofovir alafenamida (TAF), entecavir, lamivudina y telbivudina. Estos fármacos actúan mediante la activación en un metabolito trifosfato en las células para inhibir la actividad ADN o ARN polimerasa del virus, evitando de esta manera la síntesis de ADN o ARN e inhibiendo la replicación vírica.

25

Algunos compuestos de nucleótidos, tales como adefovir, tenofovir, etc., son altamente electronegativos a pH fisiológico y, por lo tanto, tienen poca capacidad transmembrana y baja biodisponibilidad para la administración oral. Mientras tanto, la administración oral de tales compuestos puede aumentar el efecto tóxico en el tracto gastrointestinal y el riñón. Sin embargo, los compuestos de nucleótidos pueden esterificarse para formar profármacos de éster tales como adefovir dipivoxil y tenofovir disoproxil fumarato, mejorando la biodisponibilidad y la distribución tisular. Sin embargo, antes de captarse por los hepatocitos, la mayoría de los profármacos de éster pueden hidrolizarse a componentes bioactivos electronegativos (tales como adefovir y tenofovir) por la éster hidrolasa que se distribuye ampliamente en el cuerpo. Dichos componentes no ingresan fácilmente a los hepatocitos, pero se transportan activamente y se absorben por el túbulo proximal renal provocando nefrotoxicidad.

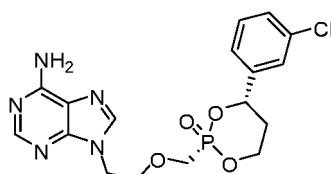
30

La estructura del precursor del ciclofosfato (4-aryl-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinano) asegura un excelente rendimiento de administración específico del hígado y su mecanismo es muy claro. Como se muestra en la Figura 1, la posición 4-aryl-sustituída está catalizada específicamente por CYP3A de la familia de isozimas del citocromo P450 en los hepatocitos para dar un grupo hidroxilo seguido de apertura del anillo para formar un intermedio fosfato electronegativo. Este intermedio se mantiene dentro de la célula debido a la dificultad para atravesar la membrana celular. El intermedio de fosfato electronegativo se hidroliza y se elimina en β para formar un compuesto de monofosfato de nucleósido bajo catálisis de fosfodiesterasa. El compuesto de nucleósido monofosfato se cataliza después por nucleótido quinasas para formar un compuesto de nucleótido trifosfato bioactivo. Al mismo tiempo, un subproducto metabólico aril vinil cetona se retira mediante una reacción de adición 1,4 con glutatión, que es abundante en hepatocitos y tiene actividad antioxidante y captadora de radicales libres. Además, No se ha informado que el producto de adición tenga efectos secundarios.

40

Usando adefovir como un componente activo, se encuentra que a través de la modificación de sustituyentes en el grupo arilo, por ejemplo mono-sustitución, disustitución, un compuesto sustituido con cloruro en una posición *meta* sobre el anillo aromático, es decir, pradefovir, se metaboliza a adefovir en presencia de la enzima CYP3A a una tasa de metabolismo más alta, casi 5 veces la del compuesto sustituido con cloruro en las posiciones 3 y 5 del anillo aromático (documento US200707214668 B2).

45



55

Pradefovir

Sin embargo, todavía hay una falta de compuestos inhibidores víricos con alta actividad, fuerte especificidad de administración hepática y efectos tóxicos y secundarios bajos. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de

desarrollar un novedoso compuesto antivírico con alta actividad, fuerte especificidad de administración hepática y efectos tóxicos y secundarios bajos.

Sumario

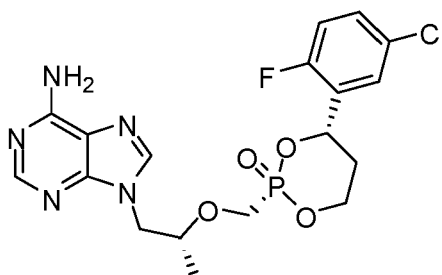
5

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

10

La presente invención sintetiza un ciclofosfato de un fármaco nucleotídico antivírico y además modifica sustituyentes en su anillo aromático para producir una clase de profármacos capaces de administración específica hepática (LSD, por sus siglas en inglés) y con efectividad más alta y menos efectos tóxicos y secundarios.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la siguiente fórmula estructural en configuración *S-cis*, una sal farmacéuticamente aceptable, un hidrato o un solvato del mismo:



15

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, una sal farmacéuticamente aceptable, un hidrato o un solvato del mismo y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptables.

20

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el uso del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable, un hidrato o un solvato del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o la composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto de la invención en el tratamiento de una enfermedad aguda o crónica asociada a infección por el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de hepatitis D (VHD) o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

25

En otra realización preferida, la enfermedad aguda o crónica asociada a la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis D (VHD) o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se selecciona del grupo que consiste en hepatitis B, hepatitis D o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

30

Breve descripción de los dibujos

35

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra el mecanismo de acción de un compuesto basado en administración específica hepática.

40

La Figura 2 muestra la relación de los respectivos compuestos basados en administración específicos del hígado (racemato) metabolizados a moléculas activas en presencia de la enzima CYP3A4. Los nombres de los compuestos se muestran en la Tabla 1 y las moléculas metabólicas activas correspondientes a todos los compuestos son PMPA.

45

La Figura 3 muestra la proporción de compuestos basados en administración específica hepática (configuración *S* y *cis*) metabolizados a moléculas activas en presencia de la enzima CYP3A4. Los nombres de los compuestos se muestran en la Tabla 1 en la cual la molécula metabólica activa correspondiente al compuesto 6 *cis* es PMPA y la molécula metabólica activa correspondiente al compuesto 9 (Pradefovir) es PMEPA.

50

La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra las concentraciones de la molécula activa PMPA liberada por metabolismo *in vivo* en plasma, hígado y riñón a lo largo del tiempo después de la administración intragástrica de 30 mg/kg de PA1010 a ratas. Los nombres de los compuestos se muestran en la Tabla 1.

55

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra las concentraciones de la molécula activa PMPA liberada por metabolismo *in vivo* en plasma, hígado y riñón a lo largo del tiempo después de la administración intragástrica de 30 mg/kg de PA1007 a ratas. Los nombres de los compuestos se muestran en la Tabla 1.

La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra las concentraciones de la molécula activa PMPA liberada por metabolismo *in vivo* en plasma, hígado y riñón a lo largo del tiempo después de la administración intragástrica de

30 mg/kg de TAF a ratas.

La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra las concentraciones de la molécula activa PMPA liberada por metabolismo *in vivo* en plasma, hígado y riñón a lo largo del tiempo después de la administración intragástrica de 30 mg/kg de TDF a ratas.

Notas:

PMPA: (R)-9-(2-metoxipropil fosfato)-adenina

PMEA: 9-[2-(fosfonometoxi) etil]adenina

Configuración *S cis*, a menos que se especifique de otra manera, significa que C4 en un anillo de fosfato está en configuración *S* y P2 y el grupo arilo posicionado en 4 es *cis* en relación entre sí.

Descripción detallada de las realizaciones

A través de una investigación a largo plazo y en profundidad, el inventor ha descubierto sorprendentemente, después de una selección e investigación de una gran cantidad de compuestos, que una clase de compuestos de fórmula (I) o fórmula (III) estructural específica (por ejemplo, con diferentes halógenos en las posiciones 3 y 5 del anillo de benceno, o diferentes halógenos en las posiciones 2 y 5 del anillo de benceno) tienen excelente actividad antivírica, administración específica hepática significativamente mejorada y efectos tóxicos y secundarios significativamente reducidos.

Terminología

Como se usa en el presente documento, la expresión "alquilo C₁-C₆" se refiere a un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo o similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alcanoílo C₂-C₆" se refiere a un sustituyente de una estructura de alquil-carbonilo lineal o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, tales como acetilo, propionilo, butirilo o similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alquilamino C₁-C₆" se refiere a un sustituyente de una estructura de alquil-amino lineal o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, tales como metilamino, dimetilamino, etilamino, propilamino, dietilamino o similares.

Como se usa en el presente documento, el término "halógeno" se refiere a F, Cl, Br e I.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que contiene", "que comprende" o "que incluye" indica que pueden usarse diversos ingredientes juntos en la mezcla o composición de la invención. Por lo tanto, las expresiones "que consiste principalmente en" y "que consiste en" se incluyen en la expresión "que contiene".

Como se usa en el presente documento, la expresión "ingrediente farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que es adecuada para seres humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos excesivos tales como toxicidad, irritación y alergia, esto es, una sustancia con una relación razonable entre beneficio y riesgo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad a la cual un agente terapéutico usado puede tratar, aliviar o prevenir una enfermedad o afección diana o una cantidad a la cual un agente terapéutico usado puede exhibir un efecto terapéutico o profiláctico detectable. Una cantidad eficaz precisa para un sujeto depende del tamaño y la salud del sujeto, la naturaleza y extensión del síntoma y el agente terapéutico y/o combinación de agentes terapéuticos seleccionados. Por lo tanto, es inútil especificar una cantidad eficaz precisa de antemano. Sin embargo, para algunas condiciones específicas, un médico es capaz de determinar la cantidad eficaz a través de un experimento convencional.

A menos que se especifique de otra manera, el término "sustitución" usado en el presente documento significa que uno o más átomos de hidrógeno en un grupo están sustituidos con sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en grupo halógeno, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, nitro, hidroxilo, amino y ciano.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal formada por el compuesto de la invención con un ácido o base y adecuada para su uso como un medicamento. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales orgánicas e inorgánicas. Una clase preferida de sales está formada por el compuesto de la invención con un ácido. Los ácidos adecuados para formar las sales incluyen pero no se limitan a: ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fluorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico, ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido pícrico, ácido metanosulfónico, ácido fenilmetanosulfónico y ácido bencenosulfónico y aminoácidos ácidos tales

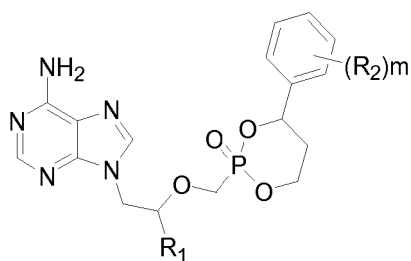
como ácido aspártico y ácido glutámico.

Algunos de los compuestos de la invención pueden cristalizarse o recristalizarse con agua o diversos disolventes orgánicos, donde pueden formarse diversos solvatos. Los solvatos de la presente invención incluyen solvatos estequiométricos tales como hidratos y compuestos que contienen cantidades variables de agua cristalina formados tras la preparación usando liofilización.

Debe entenderse que pueden estar presentes varios isómeros termodinámicamente estables después de la preparación de los compuestos de la invención, tales como un tautómero, un confórmero, un mesocompuesto y un enantiómero o un diastereómero. Tales variaciones serán evidentes para los expertos en la materia después de leer la presente invención.

Compuesto de fórmulas (I) o (III) y preparación del mismo

Con el fin de proporcionar un profármaco altamente eficaz y poco tóxico que pueda asegurar una liberación concentrada del fármaco de nucleótido antivírico en los hepatocitos a través de un mecanismo basado en la administración específica hepática, el inventor preparó un compuesto preferido de fórmula (II), esto es, un compuesto de fórmula (I) o (III)



(II);

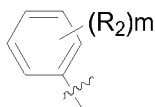
en donde:

R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, amino, alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ sustituido o no sustituido, grupo alcoxi C₁-C₆ sustituido o no sustituido y alquilamino C₁-C₆ sustituido o no sustituido; donde la sustitución comprende uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, nitro, hidroxilo, amino y grupo ciano;

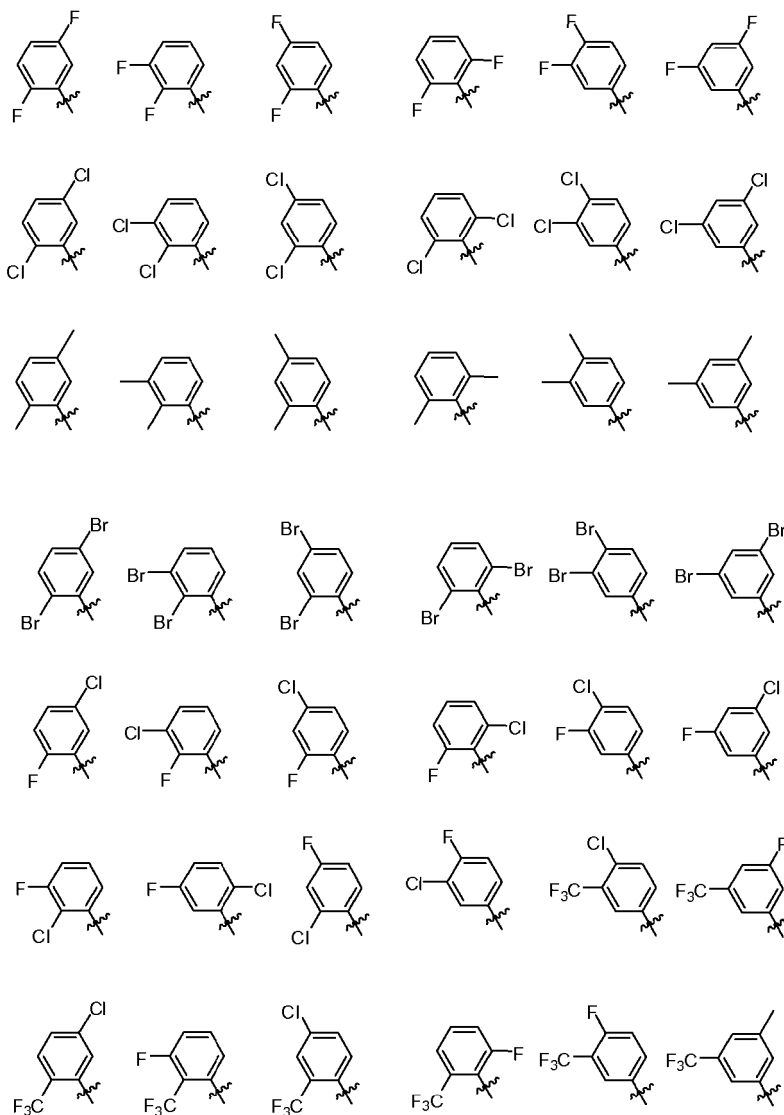
m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; cada R₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en halógeno, nitro, hidroxilo, amino, grupo ciano, alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, cicloalquilo C₃-C₈ sustituido o no sustituido, grupo alcoxi C₁-C₆ sustituido o no sustituido, alquilamino C₁-C₆ sustituido o no sustituido, carboxilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, grupo éster C₁-C₆ sustituido o no sustituido, alcanóilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido o grupo alquilamida C₂-C₆ sustituido o no sustituido;

donde la sustitución comprende uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C₁-C₃, haloalquilo C₁-C₃, nitro, hidroxilo, amino y grupo ciano; y cada centro quiral en la fórmula (II) está en configuración R o S.

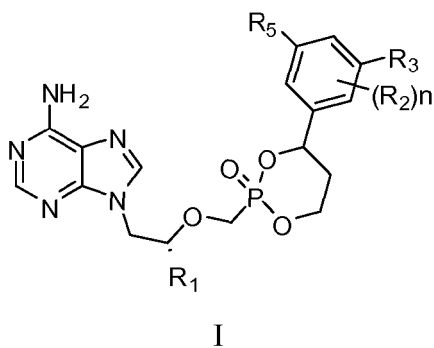
En una realización desvelada,

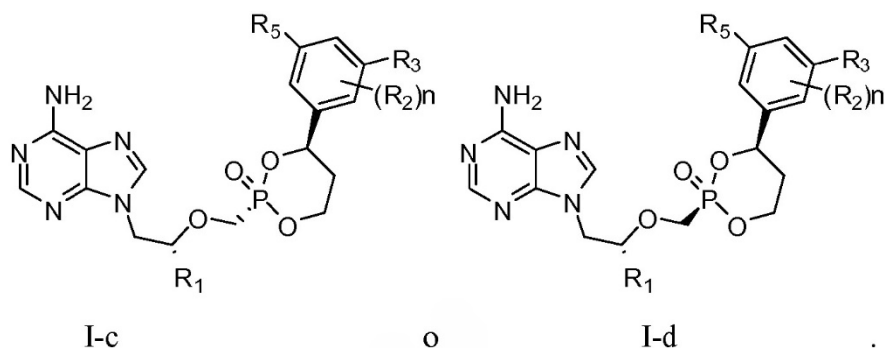
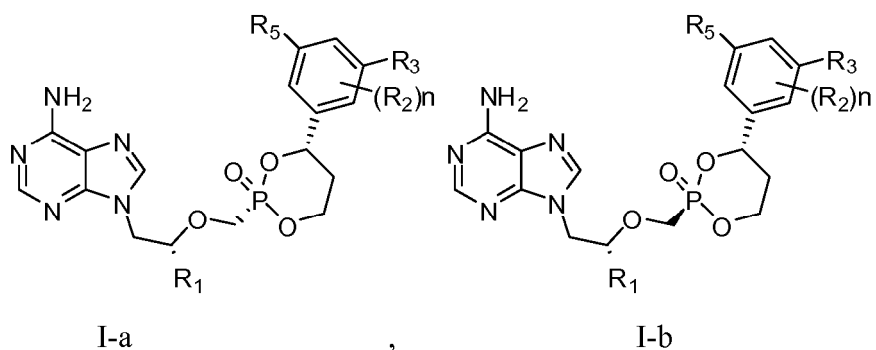


se selecciona del grupo que consiste en:



la clase desvelada de compuestos de fórmula (II) tiene una fórmula estructural mostrada como sigue:





5 En otra realización desvelada, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (I-a).

En otra realización desvelada, P2 y el arilo posicionado 4 en la estructura del ciclofosfato son *cis* en relación entre sí, y P2 está en configuración *R* y C4 está en configuración *S*.

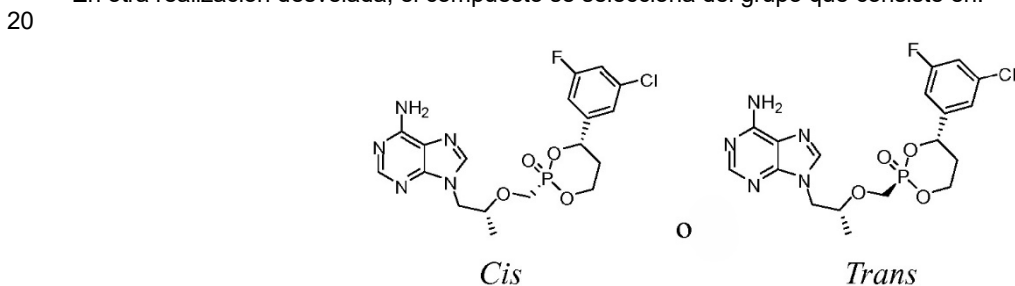
10 En otra realización desvelada, R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₃ y ciclopropilo.

En otra realización desvelada, R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, metilo y ciclopropilo.

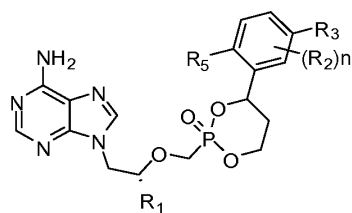
En una realización desvelada, R₃ es Cl y R₅ es F; o R₃ es Cl y R₅ es Br; o R₃ es Cl y R₅ es Cl.

15 En otra realización desvelada, el isómero óptico incluye un tautómero, un isómero *cis* o *trans*, un conformero, un mesocompuesto y un enantiómero o un diastereómero.

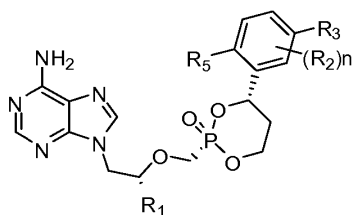
En otra realización desvelada, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



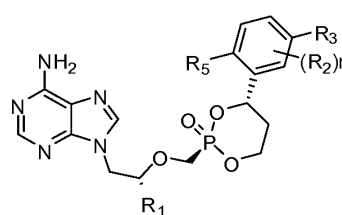
Otra clase desvelada de compuestos de fórmula (II) tiene una fórmula estructural (III) mostrada como sigue:



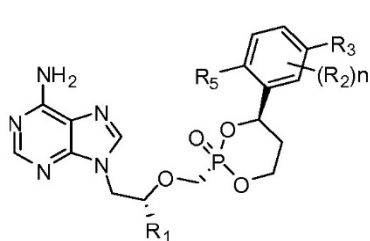
III



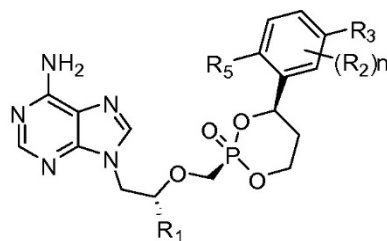
III-a



III-b



III-c



III-d

5 en donde, cada grupo se define como anteriormente.

En otra realización desvelada, el compuesto de fórmula (III) es un compuesto de fórmula (III-a).

10 En otra realización desvelada, P2 y el arilo posicionado 4 en la estructura del ciclofosfato son *cis* en relación entre sí, y P2 está en configuración *R* y C4 está en configuración *S*.

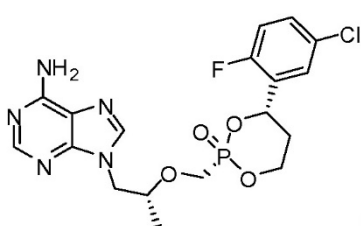
En otra realización desvelada, R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₃ y ciclopropilo.

15 En otra realización desvelada, R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, metilo y ciclopropilo.

En una realización desvelada, R₃ es Cl y R₅ es F; o R₃ es Cl y R₅ es Br; o R₃ es Cl y R₅ es Cl.

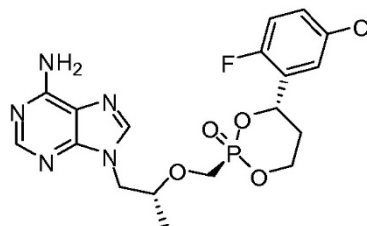
20 En otra realización desvelada, el isómero óptico incluye un tautómero, un isómero *cis-trans*, un confórmero, un mesocompuesto y un enantiómero o un diastereómero.

En otra realización desvelada, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



Cis

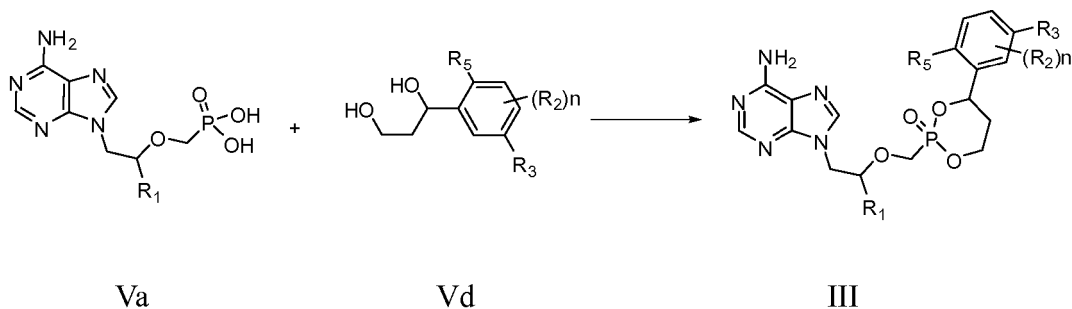
y



Trans

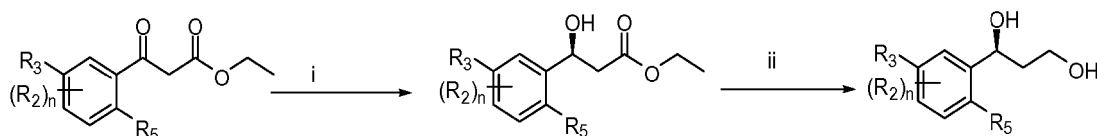
Método para preparar el compuesto (tomando como ejemplo un compuesto de fórmula (III))

Un derivado Va de monofosfato, un derivado Vd de 1,3-propanodiol y diciclohexilcarbodiimida se añaden en una solución preparada con N,N-dimetilformamida y piridina en una relación de 5:1 para producir una mezcla. La mezcla se calienta a aproximadamente 80 °C para que reaccione durante 16 horas. Después de que la reacción esté completada, el disolvente en la mezcla de reacción se retira mediante evaporación al vacío para producir un producto bruto. El producto bruto se disuelve en acetato de etilo, seguido de lavado con solución saturada de NaCl y secado con sulfato sódico anhidro. El producto resultante se evaporó a presión reducida para retirar el disolvente y después se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice para producir un compuesto de fórmula (II).

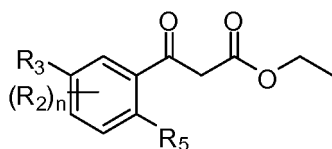


En donde, cada uno de los reactivos puede estar disponible en el mercado o puede prepararse con materias primas disponibles en el mercado usando un método convencional en la técnica.

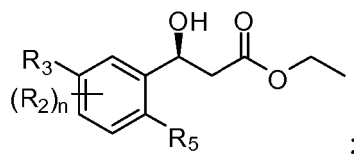
En una realización preferida de la presente invención, el derivado Vd de 1,3-propanodiol (preferentemente un derivado de 1,3-propanodiol quiral) se prepara usando el siguiente método:



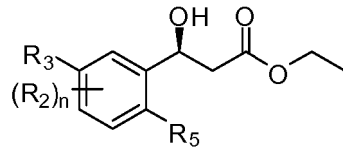
(i) reducir



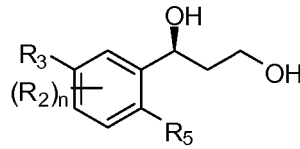
a 40-80 °C (por ejemplo, durante 1-5 horas) en presencia de HCOOH, Et₃N y (R,R)-N-(*p*-Toluenosulfonil)-1,2-difeniletanodiamina(cloro)(*p*-cimeno)rutenio(II) en un disolvente inerte (por ejemplo, DMF) para producir



y
(ii) hacer reaccionar un reductor (tal como NaBH₄) con

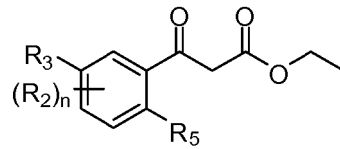


(por ejemplo, durante 1-5 horas) en un disolvente anfótero (por ejemplo, EtOH) para producir



5

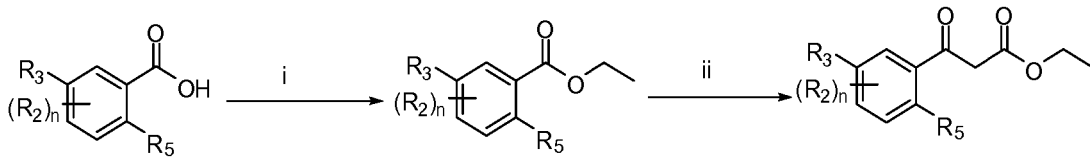
En otra realización preferida,



10

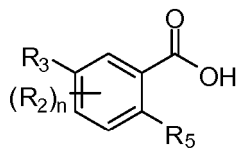
se prepara usando uno cualquiera de los siguientes métodos 1-3.

Método 1



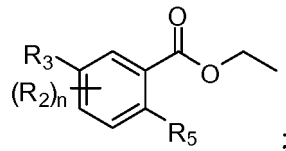
15

(i) hacer reaccionar SOCl_2 con



20

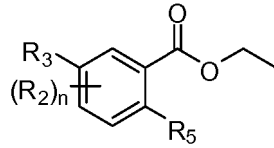
en un disolvente anfótero (por ejemplo, EtOH) para producir



25

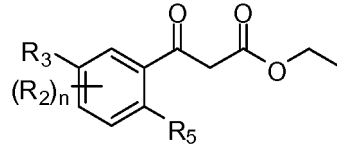
y

(ii) hacer reaccionar acetato de etilo con

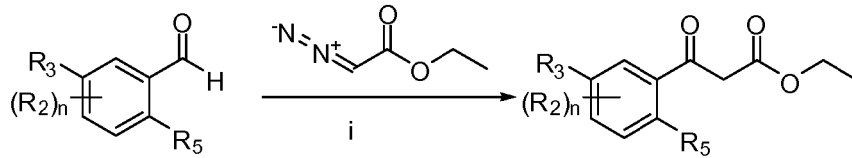


de -60 a -20 °C (por ejemplo, durante 10-30 minutos) en presencia de una base (por ejemplo, LiHMDS) en un disolvente inerte (por ejemplo, THF) para producir

5

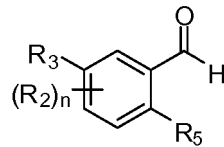


Método 2



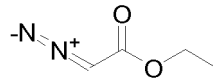
10

(i) hacer reaccionar



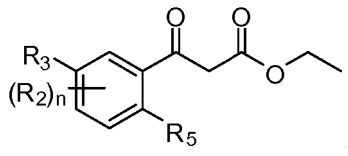
15

con



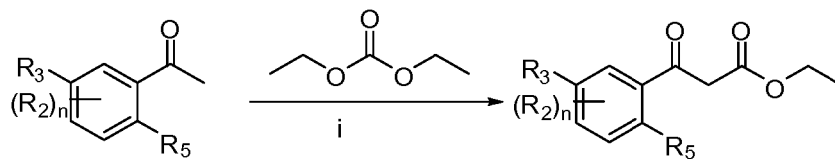
20

a temperatura ambiente en presencia de $SnCl_2$ en un disolvente inerte (tal como DCM) para producir

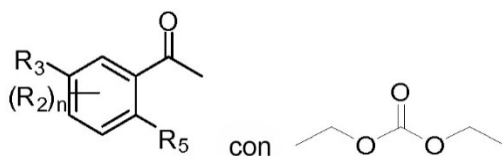


Método 3

25

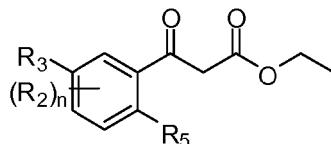


(i) hacer reaccionar



a temperatura de reflujo durante la noche en presencia de una base (por ejemplo, *tert*-butóxido potásico) en un disolvente inerte (por ejemplo, THF) para producir

5



Debe entenderse que los métodos anteriores simplemente toman el compuesto de fórmula (III) como ejemplo, y los expertos en la materia pueden llegar a otros compuestos de fórmula (I) o (II) mediante la sustitución sencilla de las materias primas correspondientes.

10

Composición farmacéutica y administración

Debido a su excelente actividad inhibidora contra el virus de la hepatitis B (VHB), el compuesto de la presente invención y diversas formas cristalinas del mismo, sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables, hidratos o solvatos de los mismos y una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención como un principio activo principal puede usarse para curar, prevenir y aliviar las enfermedades provocadas por el virus de la hepatitis B. De acuerdo con la técnica anterior, el compuesto de la presente invención puede usarse para el tratamiento de enfermedades que incluyen las enfermedades provocadas por la infección por VHB, VHD o VIH.

15

20

La composición farmacéutica de la presente invención incluye el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad segura y eficaz, y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Donde, la "cantidad segura y eficaz" se refiere a una cantidad en la cual el compuesto usado es suficiente para mejorar significativamente los síntomas sin provocar efectos secundarios graves. En general, la composición farmacéutica incluye el compuesto de la presente invención a 0,1-1000 mg por dosis, y preferentemente 0,5-500 mg por dosis. Preferentemente, el "por dosis" se refiere a una cápsula o comprimido.

25

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una o más cargas sólidas o líquidas compatibles o materiales en gel que son adecuados para su uso humano y deben tener una pureza suficiente y una toxicidad suficientemente baja. La "compatibilidad" indica en el presente documento que cada componente de una composición es capaz de combinarse entre sí y con el compuesto de la invención sin reducir significativamente el efecto del compuesto. Partes de los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen celulosa y sus derivados (tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa sódica y acetato de celulosa), gelatina, talco, lubricantes sólidos (tales como ácido esteárico y estearato magnésico), sulfato cálcico, aceites vegetales (tales como aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de cacahuete y aceite de oliva), polioles (tales como propilenglicol, glicerina, manitol y sorbitol), emulsionantes (tales como Tween®), agentes humectantes (tales como dodecilsulfato sódico), colorantes, agentes saborizantes, estabilizantes, antioxidantes, conservantes y agua libre de pirógenos.

30

35

Las administraciones del compuesto o composición farmacéutica de la presente invención no están particularmente limitadas, y las administraciones representativas incluyen pero no se limitan a: administraciones oral, rectal, parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea) y tópica y de manera particularmente preferida la administración oral.

40

Las preparaciones sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales preparaciones sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente (o vehículo) inerte convencional tales como citrato sódico o fosfato dicálcico, o se mezcla con los siguientes componentes incluyendo: (a) una carga o compatibilizador tales como almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (b) un aglutinante tales como hidroximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga; (c) un humectante tal como glicerol; (d) un agente disgregante, tales como agar, carbonato cálcico, almidón de patata o almidón de tapioca, ácido algínico, algunos silicatos compuestos y carbonato sódico; (e) un disolvente retardante, tales como parafina; (f) un acelerador de la absorción, tal como un compuesto de amina cuaternaria; (g) un agente humectante, tales como cetanol y monoestearato de glicerilo; (h) un adsorbente, tal como caolín; y (i) un lubricante, tales como talco, estearato cálcico, estearato magnésico, polietilenglicol sólido, dodecil sulfato sódico o una mezcla de los mismos. También puede incluirse un tampón en las preparaciones de cápsula, comprimido y píldora.

45

50

Las preparaciones sólidas, tales como comprimido, píldora de azúcar, cápsula, píldora y gránulo pueden prepararse

55

usando un recubrimiento o cubierta, tales como revestimiento entérico y otros materiales conocidos en la técnica. Tales preparaciones pueden incluir un agente opacificante y la liberación del compuesto activo o el compuesto de la composición puede llevarse a cabo en una determinada parte del tracto digestivo de manera tardía. En la presente invención pueden emplearse componentes de incrustación tales como materiales poliméricos y materiales céreos. Si es necesario, el compuesto activo también puede usarse para preparar una microcápsula con uno o más de los excipientes anteriores.

Las preparaciones líquidas usadas para la administración oral incluyen emulsión farmacéuticamente aceptable, solución, suspensión, jarabe o tintura. Además del compuesto activo, las preparaciones líquidas también pueden incluir un diluyente inerte usado convencionalmente en la técnica, tales como agua u otros disolventes, solubilizante y emulsionante, incluyendo etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, propilenglicol, 1,3-butanodiol, dimetilformamida y aceites, especialmente aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo o una mezcla de los mismos.

Además de tales diluyentes inertes, la composición también puede comprender un auxiliar, tales como agente humectante, emulsionante, agente de suspensión, edulcorante, corrector y especia.

Además del compuesto activo, la suspensión puede comprender un agente de suspensión tal como alcohol isoestearílico etoxilado, polioxietileno sorbitol, un éster de sorbitán, celulosa microcristalina, metóxido de aluminio y agar o una mezcla de los mismos.

La composición para inyección parenteral puede comprender una solución acuosa o anhidra estéril fisiológicamente aceptable, una dispersión, una suspensión o una emulsión y polvo estéril para reconstituir en una solución o dispersión inyectable estéril. Los vehículos, diluyentes, disolventes o excipientes acuosos o anhidros apropiados incluyen agua, etanol, polioles y una mezcla apropiada de los mismos.

Las preparaciones del compuesto de la presente invención para administración tópica incluyen pomadas, polvos, parches, aerosoles e inhalantes. El principio activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo fisiológicamente aceptable y cualquier conservante, agente tamponante o propulsor que puedan requerirse si es necesario.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse solos o en combinación con otros compuestos farmacéuticamente aceptables.

Cuando se usa una composición farmacéutica, se administra una cantidad segura y eficaz del compuesto de la invención a un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que necesita tratamiento, donde se emplea una dosis farmacéuticamente eficaz para la administración. Para un ser humano que pesa 60 kg, la dosis diaria es 0,2-1000 mg, preferentemente 0,5-500 mg. Por supuesto, deben tenerse en cuenta otros factores incluyendo vías de administración y estado de salud del paciente para la dosis específica, que está dentro de la capacidad del médico experto.

Las ventajas de la presente invención se describen como sigue:

(1) administración específica de hígado altamente eficaz: el compuesto solo puede catalizarse específicamente en hepatocitos con CYP3A de la familia de isozimas del citocromo P450 para producir una molécula activa, que tiene una alta electronegatividad y no es fácil de descargar del hígado, conduciendo a una concentración más alta en el hígado, logrando de esta manera la administración específica;

(2) alta actividad: hay más fármacos presentes en el hígado debido a que la administración específica hepática y la actividad antivírica también se mejoran enormemente.

(3) efectos tóxicos y secundarios bajos: cuando se usa la misma cantidad de profármacos, la cantidad de moléculas activas formadas fuera del hígado por el metabolismo es muy pequeña, conduciendo a una toxicidad renal y ósea enormemente reducida.

La invención se ilustrará adicionalmente a continuación junto con realizaciones específicas. En los siguientes ejemplos, los métodos experimentales cuyas condiciones específicas no se especifican, se llevan a cabo habitualmente de acuerdo con condiciones convencionales o las condiciones recomendadas por el fabricante. A menos que se especifique de otra manera, el porcentaje y la porción se calculan en peso en el presente documento.

Ejemplo 1 preparación de

(2R)-9-[2-[(4S)-4-(3-cloro-2-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil]adenina

Se disolvieron 84 mg (0,294 mmol) de (R)-9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina en una solución preparada con 15 ml de N,N-dimetilformamida y 3 ml de piridina a la que se añadieron 182 mg (0,882 mmol) de dicitohexilcarbodiimida y 60 mg (0,294 mmol) de (S)-3-(3-cloro-2-fluorofenil)-1,3-propanodiol. La mezcla se calentó a 80 °C para reaccionar durante 16 horas. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se evaporó al vacío para retirar el disolvente a fin de producir un producto bruto. El producto bruto se disolvió en acetato de etilo seguido de lavado con solución saturada de NaCl y secado con sulfato sódico anhidro. El producto resultante se evaporó a presión reducida

para retirar el disolvente y después se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (una relación de diclorometano a metanol varía de 20:1 a 10:1) para producir un producto sólido blanco con un rendimiento del 41 % y R_f de 0,4 (una relación de diclorometano a metanol es 10:1).

5 RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ : 8,071-8,227 (m, 2H), 7,202-7,661 (m, 5H), 5,837-5,961 (m, 1H), 4,549-4,603 (m, 1H), 3,935-4,356 (m, 6H), 1,914-2,119 (m, 2H), 1,105-1,198 (m, 3H) ppm.

Ejemplo 2 Preparación de (2R)-9-{2-[(4S)-4-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina

10 Esta realización empleó un método similar al del Ejemplo 1. 84 mg (0,294 mmol) de (R)-9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina, 182 mg (0,882 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida y 60 mg (0,294 mmol) de (S)-3-(3-cloro-5-fluorofenil)-1,3-propanodiol se hicieron reaccionar para producir 35 mg de un producto sólido blanco con un rendimiento del 26 % y R_f de 0,4 (una relación de diclorometano a metanol es 10:1).

15 RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ : 8,045-8,163 (m, 2H), 7,173-7,455 (m, 5H), 5,621-5,681 (m, 1H), 4,228-4,271 (m, 1H), 4,001-4,059 (m, 6H), 1,952-2,109 (m, 2H), 1,097-1,196 (m, 3H) ppm.

Ejemplo 3 Preparación de (2R)-9-{2-[(4S)-4-(3-cloro-4-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina

20 Esta realización empleó un método similar al del Ejemplo 1. 118 mg (0,412 mmol) de (R)-9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina, 254,6 mg (1,236 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida y 84 mg (0,412 mmol) de (S)-3-(3-cloro-4-fluorofenil)-1,3-propanodiol se hicieron reaccionar completamente para producir 71 mg de un producto sólido blanco con un rendimiento del 37,8 % y R_f de 0,4 (una relación de diclorometano a metanol es 10:1).

25 RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ : 8,056-8,151 (m, 2H), 7,552-7,584 (m, 1H), 7,205-7,493 (m, 4H), 5,556-5,618 (m, 1H), 4,427-4,502 (m, 1H), 3,922-4,303 (m, 6H), 1,813-2,016 (m, 2H), 1,095-1,193 (m, 3H) ppm.

Ejemplo 4 Preparación de (2R)-9-{2-[(4S)-4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina

30 Esta realización empleó un método similar al del Ejemplo 1. 112 mg (0,39 mmol) de (R)-9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina, 242 mg (1,176 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida y 80 mg (0,39 mmol) de (S)-3-(5-cloro-2-fluorofenil)-1,3-propanodiol se hicieron reaccionar completamente para producir 60 mg de un producto sólido blanco con un rendimiento del 38 % y R_f de 0,3 (una relación de diclorometano a metanol es 10:1).

35 RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ : 8,048-8,225 (m, 2H), 7,182-7,545 (m, 5H), 5,825-5,911 (m, 1H), 4,536-4,593 (m, 1H), 3,971-4,339 (m, 6H), 1,893-2,172 (m, 2H), 1,103-1,196 (m, 3H) ppm.

15,66 g de (2R)-9-{2-[(4S)-4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina se hicieron pasar a través de una columna quiral para producir 9,69 g de (2R)-9-{2-[(2R, 4S)-4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina en las siguientes condiciones:

40

columna: CHIRALPAK ADH;

fase móvil: etanol y acetonitrilo mezclados en una relación en volumen de 90:10;

45

longitud de onda: 254 nm; y

temperatura: 25 °C.

50 RMN ^1H (400 MHz, Metanol- D_4): δ : 8,19 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,43 - 7,34 (m, 2H), 7,19 - 7,11 (m, 1H), 5,86 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 4,70 - 4,60 (m, 1H), 4,46 - 4,26 (m, 3H), 4,16 - 4,08 (m, 1H), 4,05 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,16 - 2,08 (m, 2H), 1,30 (d, J = 6,2 Hz, 3H) ppm.

Ejemplo 5 Preparación de (2R)-9-{2-[(4S)-4-(4-piridin)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina

55 Esta realización empleó un método similar al del Ejemplo 1. 112 mg (0,39 mmol) de (R)-9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina, 242 mg (1,176 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida y 80 mg (0,39 mmol) de (S)-3-(4-piridin)-1,3-propanodiol se hicieron reaccionar completamente para producir 70 mg de un producto sólido blanco con un rendimiento del 39 % y R_f de 0,4 (una relación de diclorometano a trietilamina a metanol es 10:1:0,1).

60 RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ : 8,595-8,629 (m, 1H), 8,545 (d, J=4,8 Hz, 1H), 8,070-8,169 (m, 2H), 7,213-7,350 (m, 4H), 5,591-5,662 (m, 1H), 4,483-4,559 (m, 1H), 3,913-4,345 (m, 6H), 1,913-2,114 (m, 2H), 1,100-1,178 (m, 3H) ppm.

Ejemplo 6 Preparación de (2R)-9-{2-[(2R, 4S)-4-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina y (2R)-9-{2-[(2S, 4S)-4-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina

65

410,7 mg de (2R)-9-{2-[(4S)-4-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina se hizo

pasar a través de una columna quiral en las siguientes condiciones para producir diastereómeros de la misma: 220,2 mg de (2*R*)-9-12-[(2*R*, 4*S*)-4-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina y 166,2 mg de (2*R*)-9-12-[(2*S*, 4*S*)-4-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina.

5 (2*R*)-9-12-[(2*R*, 4*S*)-4-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ:8,350 (s, 1H), 7,930 (s, 1H), 7,074-7,100 (m, 2H), 6,890 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 5,735 (s, 2H), 5,585 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 4,655-4,711 (m, 1H), 4,343-4,429 (m, 2H), 4,157-4,212 (m, 1H), 3,970-4,059 (m, 2H), 3,801-3,860 (m, 1H), 2,014-2,108 (m, 2H), 1,316 (d, J=6,4 Hz, 3H) ppm.

10 (2*R*)-9-12-[(2*S*, 4*S*)-4-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ:8,372 (m, 1H), 7,905 (s, 1H), 7,011-7,157 (m, 3H), 5,899 (s, 2H), 5,432 (d, J = 11,2 Hz, 1H), 3,897-4,410 (m, 7H), 2,141-2,249 (m, 1H), 1,763-1,800 (m, 1H), 1,337 (d, J=6,4 Hz, 3H) ppm.

Columna: CHIRALPAK ADH.

15

Fase móvil: etanol y acetonitrilo mezclados en una relación en volumen de 90:10.

Longitud de onda: 254 nm.

20 Temperatura: 25 °C.

Ejemplo Comparativo 7 Preparación de (2*R*)-9-12-[(4*S*)-4-(3-clorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina

25 Esta realización empleó un método similar al del Ejemplo 1. 660 mg (2,419 mmol) de (i>R)-9-12-(fosfonometoxi)propil}adenina, 1,5 g (7,257 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida y 450 mg (2,419 mmol) de (i>S)-3-(3-clorofenil)-1,3-propanodiol se hicieron reaccionar completamente para producir 400 mg de un producto sólido blanco con un rendimiento del 38 % y R_f de 0,5 (una relación de diclorometano a metanol es 10:1).

30 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 7,872-8,296 (m, 2H), 7,211-7,269 (m, 4H), 6,019-6,077 (m, 2H), 5,523-5,550 (m, 1H), 4,261-4,357 (m, 1H), 3,773-4,156 (m, 6H), 1,907-1,990 (m, 2H), 1,236-1,354 (m, 3H) ppm.

Ejemplo Comparativo 8 Preparación de (2*R*)-9-12-[(4*S*)-4-(3,5-diclorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina

35 Esta realización empleó un método similar al del Ejemplo 1. 84 mg (0,294 mmol) de (i>R)-9-12-(fosfonometoxi)propil}adenina, 182 mg (0,882 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida y 60 mg (0,294 mmol) de (i>S)-3-(3,5-diclorofenil)-1,3-propanodiol se hicieron reaccionar completamente para producir 62 mg de un producto sólido blanco con un rendimiento del 45 % y R_f de 0,4 (una relación de diclorometano a metanol es 10:1).

40 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ:8,346-8,378 (m, 1H), 7,909-7,939 (m, 1H), 7,351-7,363 (m, 1H), 7,265-7,268 (m, 1H), 7,178-7,181 (m, 1H), 5,770-5,825 (m, 2H), 5,399-5,588 (m, 1H), 3,808-4,428 (m, 7H), 2,025-2,085 (m, 2H), 1,306-1,349 (m, 3H) ppm.

Ejemplo Comparativo 9 Preparación de (2*R*)-9-12-[(2*R*, 4*S*)-4-(3-clorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina

45

(2*R*)-9-12-[(2*R*, 4*S*)-4-(3-clorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina se preparó usando la solución técnica descrita en J,Am,Chem,Soc,2004,126,5154-5163.

50 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ:8,352 (s, 1H), 7,907 (s, 1H), 7,285-7,354 (m, 3H), 7,106 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 5,802 (s, 2H), 5,591 (d, J = 10,8 Hz, 1H), 4,624-4,681 (m, 1H), 4,443-4,468 (m, 2H), 4,235-4,321 (m, 1H), 3,899-4,031 (m, 4H), 1,980-2,109 (m, 2H) ppm.

Tabla 1 Compuestos preparados en diversos ejemplos

Número de compuesto	Estructura	Nombre	EM
1 (PA1008-racemato)		(2 <i>R</i>)-9-12-[(4 <i>S</i>)-4-(3-cloro-2-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina	455,81

(continuación)

Número de compuesto	Estructura	Nombre	EM
2 (PA1007-racemato)		(2R)-9-{2-[(4S)-4-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina	455,81
3 (PA1009-racemato)		(2R)-9-{2-[(4S)-4-(3-cloro-4-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina	455,81
4 (PA1010-racemato)		(2R)-9-{2-[(4S)-4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina	455,81
4- <i>cis</i> (PA1010- <i>cis</i>)		(2R)-9-{2-[(2R, 4S)-4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina	455,81
4- <i>trans</i> (PA1010- <i>trans</i>)		(2R)-9-{2-[(2S, 4S)-4-(5-cloro-2-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina	455,81
5 (PA 1006-racemato)		(2R)-9-{2-[(4S)-4-(4-piridina)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina	404,36
6- <i>cis</i> (PA1007- <i>c/s</i>)		(2R)-9-{2-[(2R, 4S)-4-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina	455,81

(continuación)

Número de compuesto	Estructura	Nombre	EM
6-trans (PA1007-trans)		(2R)-9-{2-[(2S, 4S)-4-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina	455,81
Ejemplo Comparativo 7 (PA1002-racemato)		(2R)-9-{2-[(4S)-4-(3-clorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina	437,82
Ejemplo Comparativo 8 (PA1005-racemato)		(2R)-9-12-[(4S)-4-(3,5-diclorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina	472,26
Ejemplo Comparativo 9 (Pradefovir)		(2R)-9-{2-[(2R, 4S)-4-(3-clorofenil)-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il]metoxipropil}adenina	423,79

Notas: a menos que se especifique de otra manera, PA1010 usado en el presente documento es PA1010-*cis* y PA1007 usado en el presente documento es PA1010-*cis*.

Ejemplo 11 Evaluación de moléculas activas formadas por metabolismo *in vitro* con enzima CYP3A4Método de medición

- 5 La evaluación se realizó determinando la eficiencia del metabolismo de 0,1 μM de profármacos a moléculas activas (PMPA o PMEa) en presencia de 1 mg/ml de una enzima CYP3A4 humana recombinante (CYPEX). La reacción enzimática se llevó a cabo en 500 μl de una solución tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) y el sistema de reacción contenía además 5 mM de cloruro magnésico y 1 mM de NADPH. La mezcla de reacción se incubó en un baño de agua con agitación a temperatura constante a 37 °C y se tomaron muestras después de 0, 7, 17, 30 minutos, respectivamente,
- 10 y la reacción se terminó añadiendo metanol 1,5 veces el volumen de la mezcla de reacción. Las muestras se centrifugaron a una velocidad máxima de 13.600 rpm durante 20 minutos usando una centrifuga de mesa Eppendorf. El sobrenadante se recogió y se secó con un evaporador de nitrógeno y luego se redisolvió con la fase móvil A (una solución acuosa que contiene 5 mM de acetato de amonio y 0,05 % en volumen de ácido fórmico). La solución
- 15 resultante se analizó usando CL-EM/EM (Waters, columna Acquity UPLC HSS T3).

Tabla 2 Cantidad de moléculas activas derivadas de metabolismo *in vitro* con la enzima CYP3A4

Número de compuesto	Configuración	Producción de moléculas activas/concentración inicial (%) (30 min)
1	Racemato configuración S	4,00
2	Racemato configuración S	13,29
3	Racemato configuración S	3,57

(continuación)

Número de compuesto	Configuración	Producción de moléculas activas/concentración inicial (%) (30 min)
4	Racemato configuración S	5,58
5	Racemato configuración S	2,72
6- <i>cis</i>	Configuración S- <i>cis</i>	27,36
7	Racemato configuración S	8,67
8	Racemato configuración S	1,01
9	Configuración S- <i>cis</i>	17,37

5 **Análisis de resultados:** Los Compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 8 tienen cada uno una estructura de racemato de configuración S y los compuestos 6 y 9 tienen cada uno una estructura de configuración S-*cis*. Los resultados del metabolismo enzimático durante 30 minutos se muestran en la Tabla 2 y los resultados dinámicos del metabolismo enzimático se mostraron en las Figuras 2 y 3. Como se muestra en la Tabla 2, en las estructuras de racemato de configuración S, la relación de compuesto 2 metabolizado a metabolitos activos PMPA fue la más alta (13,29 %) y aquellas de los compuestos 7 y 8 en los Ejemplos comparativos 7 y 8 fueron el 8,67 % y el 1,01 %, respectivamente.

10 El compuesto 2 se resolvió para producir un compuesto en configuración S-*cis* (compuesto 6-*cis*) con una relación de metabolismo del 27,36 %, que tenía una relación de metabolismo más alta que la de su correspondiente racemato de configuración S (compuesto 2).

15 Puede verse a partir de los resultados anteriores que la relación de metabolismo del compuesto 2 de la presente invención fue aproximadamente el 50 %-1300 % mayor que la de compuestos de otras estructuras. La actividad del compuesto 2 (con diferentes halógenos de Cl y F en las posiciones 3 y 5) de la presente invención fue aproximadamente 13 veces más alta que la del compuesto 8, cuyas posiciones 3 y 5 eran ambas Cl.

20 El compuesto 2 con la mejor actividad se resolvió para producir un producto *cis* de compuesto 6-*cis* y se comparó con el compuesto Pradefovir del mismo tipo (compuesto 9, configuración S-*cis*) que se ha usado actualmente para la investigación clínica, la actividad del compuesto 6-*cis* de la presente invención fue todavía el 57,5 % más alta.

25 **Ejemplo 12 Evaluación de la formación de moléculas activas a partir de metabolismo *in vitro* con microsomas hepáticos humanos**

Método de medición

30 Los microsomas de hígado humano usados en el presente documento se adquirieron de *In Vitro* Technologies (IVT) Inc., Lote N.º: SSP X008070, un microsoma de hígado mixto extraído de los tejidos de hígado de 150 donantes. La actividad metabólica de CYP3A4 en los microsomas hepáticos de este lote se registró en la descripción del producto como 1,734 nmol/mg/min (una tasa de metabolización de testosterona en 6- β -testosterona). Los compuestos de prueba se sintetizaron por Zhejiang Paloalto Pharmaceutical Technology Co., Ltd. y se disolvió en metanol para producir una solución madre 25 mM. La reacción enzimática se llevó a cabo en 100 μ l de una solución de reacción (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7,4) a una concentración de compuesto de prueba de 25 μ M y una concentración de microsoma de hígado humano de 2 mg/ml, y se añadió NADPH para iniciar la reacción (con una concentración final de 2 mM). Después de que la reacción se realizó en un baño de agua con agitación a temperatura constante durante 5 minutos, se añadió rápidamente acetronitrilo para terminar la reacción a 1,5 veces el volumen de la mezcla de reacción. Las muestras recogidas se centrifugaron a una velocidad máxima de 13.600 rpm durante 20 minutos usando una centrifuga de mesa Eppendorf. El sobrenadante se recogió y se secó con un evaporador de nitrógeno y después se redisolvió con la fase móvil A, que era una solución acuosa que contenía acetato de amonio 5 mM y ácido fórmico al 0,05 % en volumen. La solución resultante se sometió a análisis cuantitativo usando CL-EM/EM (Waters, columna Acquity UPLC HSS T3).

45 Tabla 3 Tasas metabólicas de los compuestos de prueba en PMPA o PMEA con microsomas de hígado humano *in vitro*

Número de compuesto	Configuración	Tasa promedio de producción de PMPA en 5 minutos pmol/min/mg HLM
1	Racemato configuración S	33,8
2	Racemato configuración S	46,8

(continuación)

Número de compuesto	Configuración	Tasa promedio de producción de PMPA en 5 minutos pmol/min/mg HLM
3	Racemato configuración S	22,2
4	Racemato configuración S	48,8
4- <i>cis</i>	Configuración S- <i>cis</i>	170
6- <i>cis</i>	Configuración S- <i>cis</i>	75,8
7	Racemato configuración S	27,5
9	Configuración S- <i>cis</i>	20,4

Notas: HLM es la abreviatura de microsomas de hígado humano.

Análisis de resultados: Los compuestos 1, 2, 3, 4 y 7 tienen cada uno una estructura de racemato en configuración S y los compuestos 4-*cis*, 6-*cis* y 9-*cis* cada uno tiene una estructura de configuración S-*cis*. Las tasas medias de producción de PMPA o PMEAs en 5 minutos a partir del metabolismo del microsoma hepático humano se muestran en la Tabla 3.

Puede verse en la Tabla 3 que en los compuestos de una estructura de racemato de configuración S, los compuestos 2 y 4 se metabolizaron a la molécula activa PMPA a las tasas más altas de 46,8 pmol/min/mg HLM y 48,8 pmol/min/mg HLM, respectivamente.

El compuesto 2 se resolvió para producir un compuesto en configuración S-*cis* (compuesto 6-*cis*), de los cuales la tasa metabólica para formar PMPA fue de 75,8 pmol/min/mg HLM, y la tasa fue mayor que la de su correspondiente racemato en configuración S (compuesto 2).

El compuesto 4 se resolvió para producir un compuesto en configuración S-*cis* (compuesto 4-*cis*), de los cuales la tasa metabólica para formar PMPA fue de 170 pmol/min/mg HLM, y la tasa fue mayor que la de su correspondiente racemato en configuración S (compuesto 4).

Como se muestra en los resultados anteriores, los compuestos 2 y 4 de la presente invención mostraron una mejor conversión a la molécula metabólica activa PMPA que otros compuestos de otras estructuras con la catálisis de microsomas hepáticos humanos. Los compuestos 2 y 4 se resolvieron para producir productos *cis*, es decir, compuesto 6-*cis* y compuesto 4-*cis*. Los compuestos en configuración S-*cis* obtenidos mediante la resolución mostraron una mejor eficiencia metabólica para formar la molécula activa en comparación con el compuesto Pradefovir del mismo tipo (compuesto 9, configuración S-*cis*) que se ha usado actualmente en la investigación clínica, y la eficiencia metabólica de compuestos 4-*cis* fue significativamente superior a la del compuesto 6-*cis*. Específicamente, la tasa metabólica del compuesto 4-*cis* para formar PMPA fue 2,2 veces mayor que el del compuesto 6-*cis* y 8,3 veces mayor que el del compuesto 9 para formar PMEAs.

Los resultados anteriores demostraron que el compuesto 4 del cual las posiciones 5 y 2 del resto del anillo de benceno estaban sustituidas con Cl y F, respectivamente, y el compuesto 2 en el que 5 y 3 posiciones del resto del anillo de benceno se sustituyeron con F y Cl, respectivamente, tenía una actividad metabólica superior a otros compuestos, que indicó que el compuesto con su anillo de benceno sustituido asimétricamente con halógenos en las posiciones 3 y 5 o en las posiciones 2 y 5 mejoró la velocidad de activación de los compuestos de administración específicos del hígado con la acción de los microsomas hepáticos humanos.

Ejemplo 13 Experimento de un compuesto de administración específico para el hígado

1. Método

1.1 Experimento en animales

Las ratas SD macho que pesaban 180-300 g fueron proporcionadas por Shanghai Sippr-BK Laboratory Animals Co., Ltd. Los animales machos se adaptaron al medio ambiente durante más de 3 días y se mantuvieron en ayunas durante 12 horas pero sin privación de agua la noche anterior al experimento. PA1010 (compuesto 4-*cis*), PA1007 (compuesto 6-*cis*), TAF y TDF se disolvieron respectivamente en una solución salina normal para preparar sus soluciones correspondientes. Antes de la administración, se comprobó si el peso corporal del animal cumplía los requisitos experimentales. Se seleccionaron 12 ratas para el agrupamiento, 2 ratas en cada grupo, y se les administró por vía intragástrica una solución de fármaco a 30 mg/kg. Las ratas se sacrificaron con gas dióxido de carbono a las 0,5, 1, 3, 6, 12 y 24 h, respectivamente. Se recogieron muestras de sangre del corazón y se almacenaron en un tubo de anticoagulación con heparina. Después las muestras se centrifugaron a 4 °C y 6.000 rpm durante 5 minutos y el

sobrenadante de plasma se almacenó en hielo. Se recogieron los tejidos de riñón e hígado de las ratas y se enjuagaron con solución salina normal preenfriada a 4 °C y después se almacenaron en hielo después de drenar el agua. Después del experimento, las muestras se almacenaron a -80 °C en un refrigerador.

5 1.2 Determinación del metabolito monofosfato tenofovir (PMPA) de PA1010, PA1007, TAF y TDF en muestras biológicas

Pretratamiento de la muestra

10 Los tejidos de riñón e hígado se rompieron y se mezclaron a fondo en solución salina normal 5 veces el volumen de los tejidos de riñón e hígado para obtener una muestra de homogeneizado de tejido. Se mezclaron uniformemente 100 µl de la muestra de homogeneizado de tejido o plasma de rata con 100 µl de precipitante de ácido tricloroacético al 10 % que contenía 50 ng/ml de adefovir (patrón interno) y el disolvente del mismo se preparó con metanol y acetonitrilo en una proporción de volumen de 50:50. La mezcla se centrifugó a 4 °C y 6000 rpm durante 5 minutos, y 15 todo el sobrenadante se trató con una placa de microextracción SPE (Placa MCX µElution 30 µm, Waters). Finalmente, la placa de microextracción se eluyó con una solución de metanol que contenía amoníaco al 5 % y se transfirieron 75 µl del eluyente obtenido a una placa de muestra de 384 pocillos para su análisis con un volumen de inyección de 1 µl.

20 Condiciones de cromatografía de gases-espectrometría de masas

Se usó CL-EM/EM-AJ (Triple Quad 5500, AB SCIEX) para el análisis de muestras. Las condiciones cromatográficas se mostraron como sigue: columna cromatográfica: Acquity UPLC HSS T3 (2,1x50 mm, 1,8 µm); temperatura de la columna: 40 °C; caudal: 0,5 ml/min; fase móvil A: solución acuosa de ácido fórmico al 0,1 % y fase móvil B: una 25 solución de acetonitrilo. La muestra se separó mediante elución en gradiente y el programa se muestra en la Tabla 4. Las condiciones de espectrometría de masas correspondientes al patrón interno se muestran a continuación: ionización por electropulverización (ESI): modo de ion positivo; par de iones m/z monitorizado por monitorización de reacción múltiple (MRM): 288/176 (PMPA), 274/162 (PMEA); voltaje capilar: 3,0 kV; temperatura: 500 °C; flujo de gas de desolvatación: 1000 l/h; tiempo de barrido: 0,025 segundos; y energía de colisión: 25 V.

30

Tabla 4 Condiciones de elución de gradiente de CL de PMPA

Tiempo (min)	Fase móvil B (%)
0	1
1,1	10
1,5	80
2,5	1

1.3 Análisis de datos

35 Se representaron gráficos de barras de la concentración de PMPA en plasma, hígado y riñón respectivamente correspondientes al tiempo. El área (AUC_{0-t}) bajo la curva de concentración tisular-tiempo de PMPA se ajustó usando el método trapezoidal log-lineal en un modelo no compartimental de WinNonLin 6.2.1 (Pharsight, CA). Las relaciones de hígado a riñón y de hígado a plasma de PMPA se obtuvieron calculando la proporción de su correspondiente AUC_{0-t}.

40

2. Resultados

Después de que a las ratas se les administró por vía intragástrica la solución de fármaco de 30 mg/kg, los resultados de la distribución en los tejidos hepáticos indicaron que el nivel de PMPA de la molécula activa liberado a través del 45 metabolismo de PA1010 fue significativamente mayor que el liberado a través del metabolismo de TAF y TDF en los puntos de tiempo correspondientes ($p < 0,01$, Figuras 4, 6 y 7). El área bajo la curva de concentración de fármaco-tiempo se ajustó usando WinNonLin 6.2.1. Con referencia a la Tabla 5, se compararon los niveles de exposición de PMPA en el hígado liberados por cada fármaco de prueba: PA1010 > TAF > PA1007 > TDF y el nivel de exposición de PMPA en el hígado liberado por PA1010 fue 1,5 y 2,9 veces mayor que el liberado por TAF (222692 h-ng/g a 148407 h-ng/g) y TDF (222692 h-ng/g a 78050 h-ng/g), respectivamente. Los resultados indicaron que para lograr la 50 misma efectividad clínica, PA1010 puede usarse en una dosis más baja en comparación con TDF y TAF. Además, los niveles de exposición de PMPA en el riñón *in vivo* producidos a partir de PA1010 y PA1007 fueron significativamente más bajos que los liberados por TAF y TDF (Tabla 5). En resumen, PA1010 y PA1007 exhibieron una mayor proporción de hígado a riñón que TAF y TDF a la misma dosis (Figuras 4-7 y Tabla 5). La nefrotoxicidad clínica estuvo provocada 55 principalmente por el enriquecimiento de PMPA liberado de TDF y TAF en el riñón, que indicó que a la misma dosis, PA1010 y PA1007 pueden aliviar significativamente la nefrotoxicidad clínica provocada por TDF y TAF.

Tabla 5 Exposición (área bajo la curva concentración-tiempo (AUC_{0-t})(h*ng/g)) de la molécula activa (PMPA) liberada de metabolismo *in vivo* en plasma, hígado y riñón después de administrar a las ratas 30 mg/kg de PA1010, PA1007, TAF y TDF, respectivamente

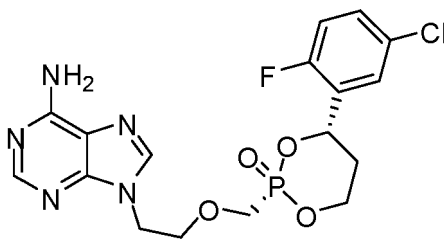
	PA1010	PA1007	TAF	TDF
Hígado	222692	76075	148407	78050
Riñón	234298	65393	297233	319562
Plasma	4332	1272	4892	3097
Relación hígado-riñón	1,0	1,2	0,5	0,2
Relación hígado-plasma	51,4	59,8	30,3	25,2

- 5 Los resultados anteriores indicaron que debido a una actividad más alta y administración específica hepática, el compuesto de fórmula (I) o (III) de la presente invención puede usarse para el tratamiento a una dosis menor. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención tuvieron una seguridad más alta o menores efectos tóxicos y secundarios, mejorando de esta manera en gran medida el índice terapéutico clínico de PMPA.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la siguiente fórmula estructural en configuración *S-cis*, una sal farmacéuticamente aceptable, un hidrato o un solvato del mismo

5



2. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la reivindicación 1, una sal farmacéuticamente aceptable, un hidrato o un solvato del mismo y un adyuvante, un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptables.

10

3. El compuesto de la reivindicación 1, una sal farmacéuticamente aceptable, un hidrato o un solvato del mismo, o la composición farmacéutica de la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de una enfermedad aguda o crónica asociada a una infección por el virus de la hepatitis B (VHB), por el virus de la hepatitis D (VHD) o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

15

4. El compuesto o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** la enfermedad aguda o crónica asociada a la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis D (VHD) o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se selecciona del grupo que consiste en hepatitis B, hepatitis D o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

20

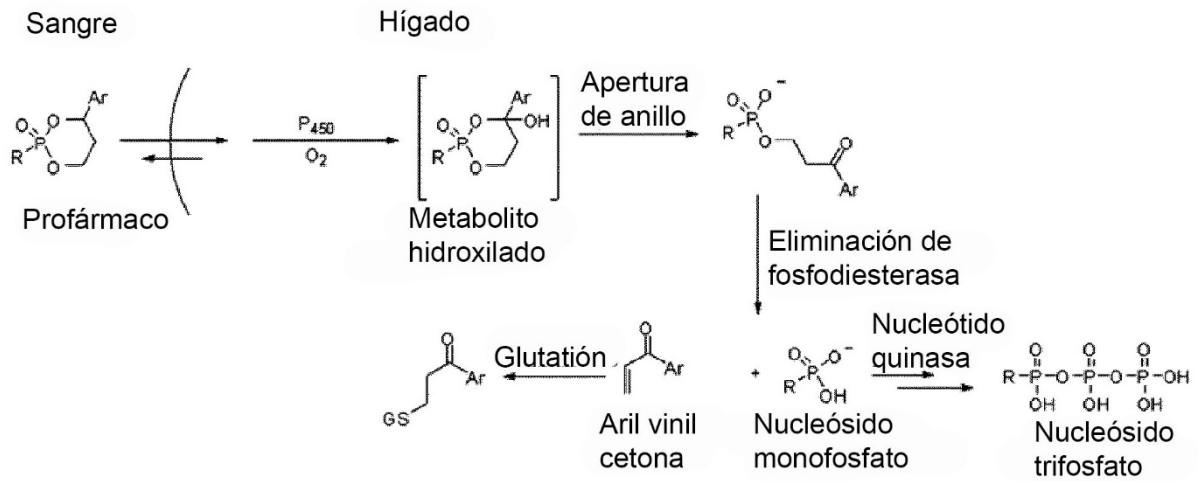


FIG. 1

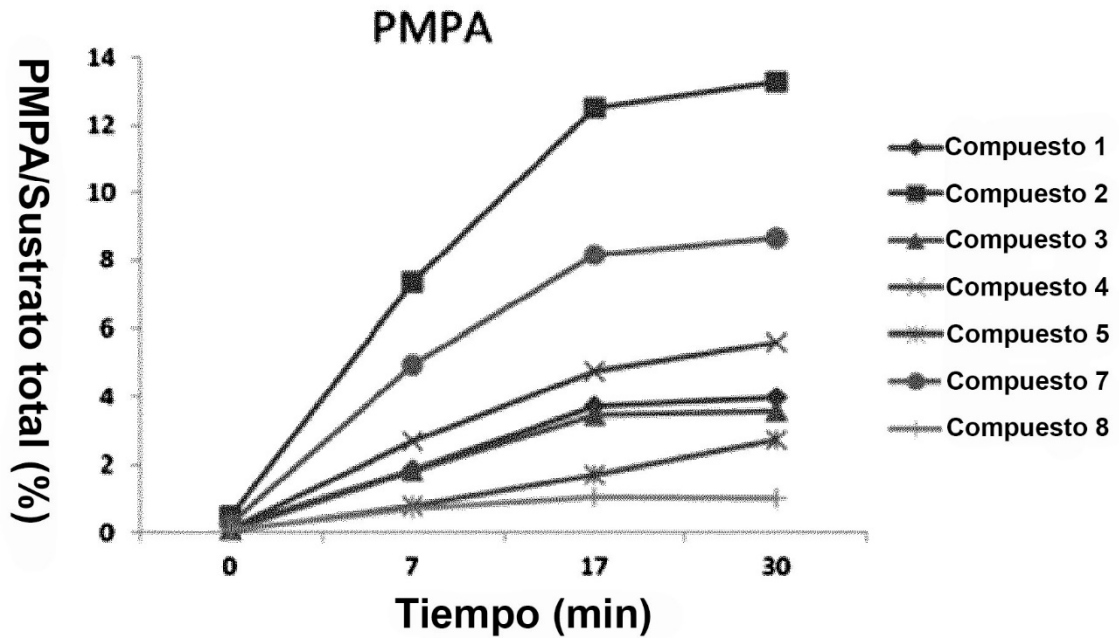


FIG. 2

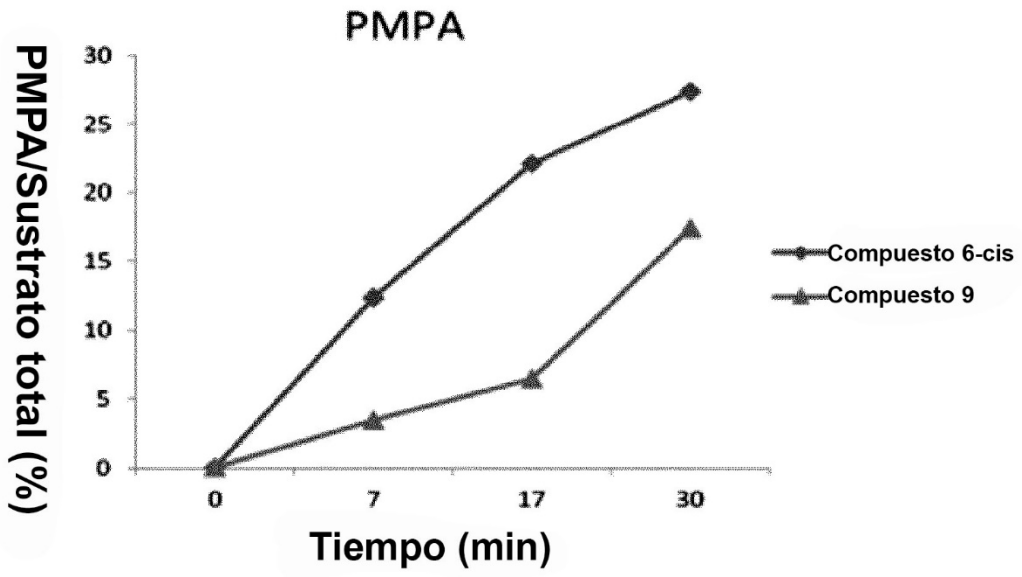


FIG. 3

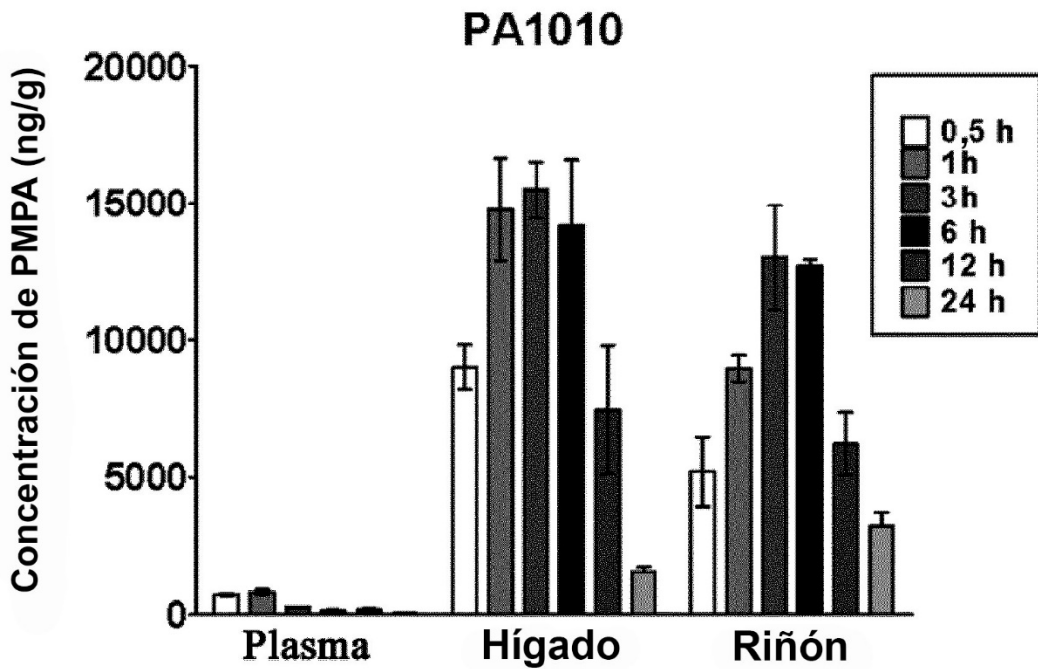


FIG. 4

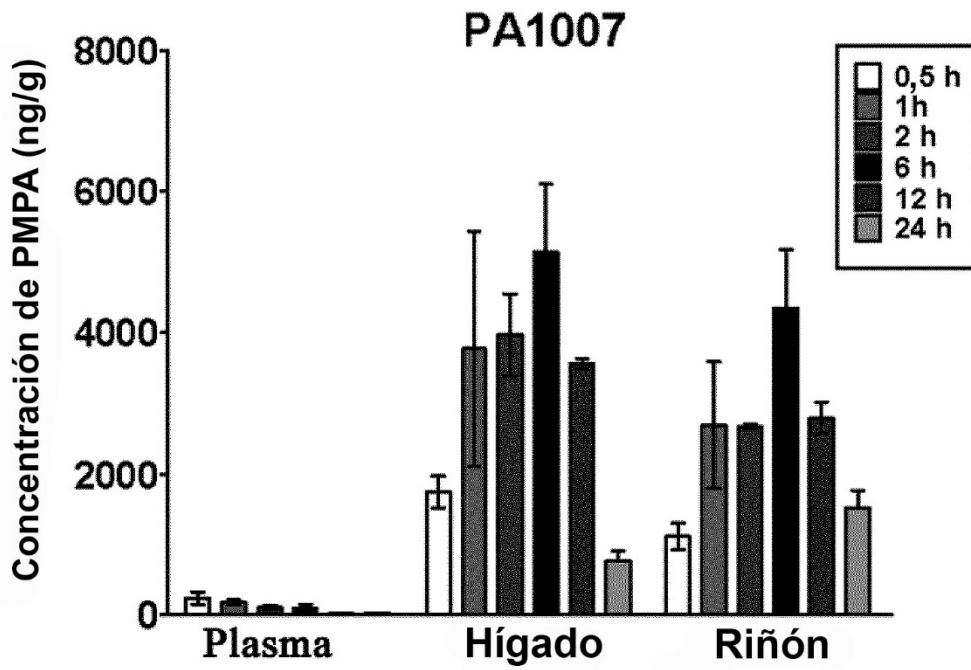


FIG. 5

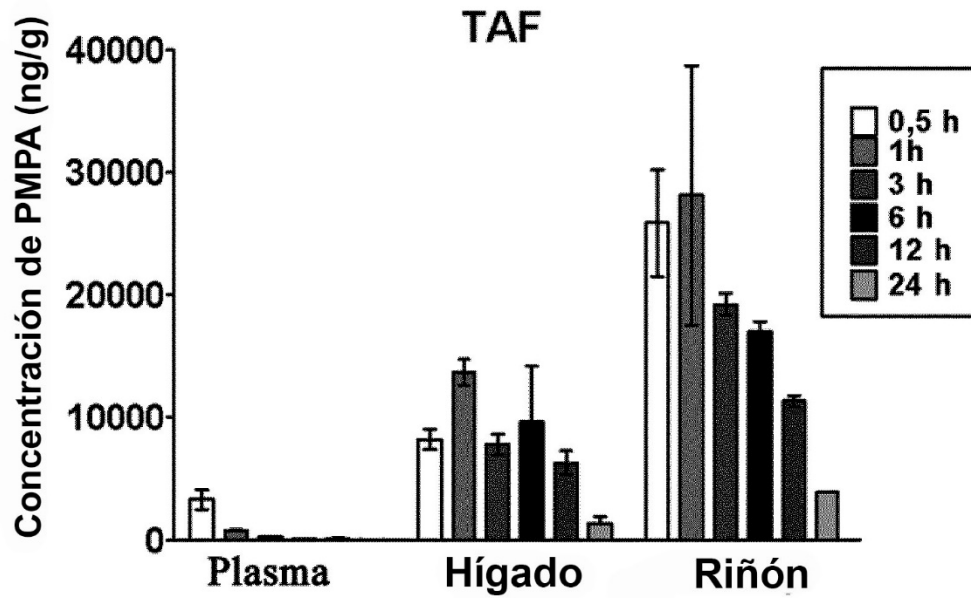


FIG. 6

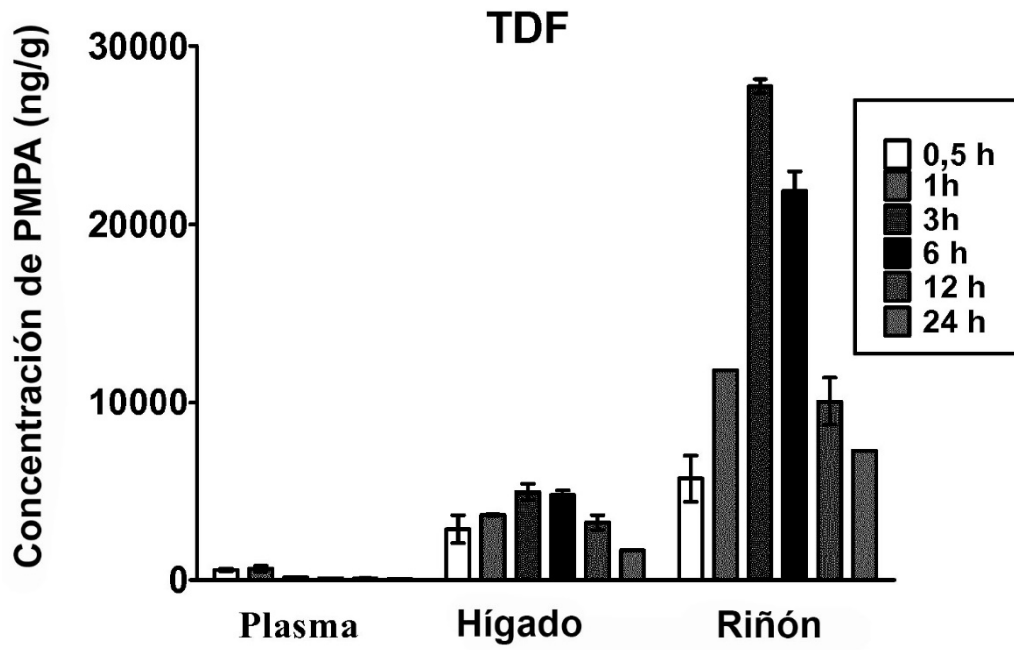


FIG. 7