



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00753**

(22) Data de depozit: **20.02.1992**

(30) Prioritate:

22.02.1991 US 659, 760

26.07.1991 US 736, 089

12.02.1992 US 831, 153

(41) Data publicării cererii:

30.04.2010

BOPI nr. 4/2010

(62) Divizată din cererea:

Nr. **a 2004 00584**

(71) Solicitant:

• **EMORY UNIVERSITY, 1380 SOUTH
OXFORD ROAD, ATLANTA, GA, US**

(72) Inventatori:

• **LIOTTA DENNIS, 793 POST ROAD WAY,
STONE MOUNTAIN, GA, US;**
• **SCHINAZI RAYMOND F., 1524 REGENCY
WALK DRIVE, DECATUR, GA, US;**
• **CHOI WOO BAEG, 1061 SCHMIDT LANE,
NORTH BRUNSWICK, NJ, US**

(74) Mandatar:

**ROMINVENT S.A.,
STR. ERMIL PANGRATTI, NR. 35,
SECTOR 1, BUCUREȘTI**

(54) **DERIVAȚI DE 1, 3-OXATIOLAN, COMPOZIȚIE
FARMACEUTICĂ CARE ÎI CONȚINE ȘI METODĂ PENTRU
TRATAREA INFECȚIEI CU HIV LA OM PRIN
ADMINISTRAREA ACESTORA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la derivați de *beta* (-)-D- 2-hidroxi-
metil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan. Derivații de 1,

3-oxatiolan se utilizează în tratamentul infecției cu
virusul imunodeficienței umane.

Revendicări: 14

Figuri: 12

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art. 23 alin.(1) - (3).



RO 125385 A2

174

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>a 2009 00753</u>
Data depozit <u>20.02.1992</u>

Invenția se referă un procedeu separare a unui amestec de derivați de 1,3-oxatiolan utilizați în tratamentul infecției cu HIV.

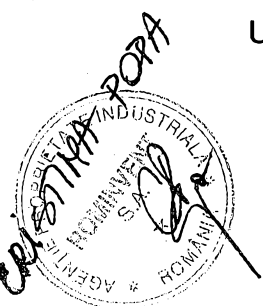
Este cunoscut încă din 1981, faptul că sindromul imunodeficienței dobândite (SIDA) este o boală care afectează sever sistemul imunitar uman și care aproape fără excepție, duce la deces. În 1983, cauza etiologică a sindromului imunodeficienței dobândite (SIDA) a fost determinată a fi virusul imunodeficienței umane (HIV). În decembrie 1990, Organizația Mondială a Sănătății a estimat că între 8 și 10 milioane de oameni din lumea întreagă sunt infectați cu virusul imunodeficienței umane (HIV), din care între 1000000 și 1400000 sunt din Statele Unite ale Americii.

În 1985, s-a raportat că nucleozida sintetică 3'-azido-3'-dezoxitimidina (AZT) inhibă replicarea virusului imunodeficienței umane. De atunci, s-au prezentat ~~demonstrat~~ și alte nucleozide sintetice eficiente față de virusul imunodeficienței umane (HIV) incluzând 2',3'-didezoxiinozina (DDI), 2',3'-didezoxicitidina (DDC), 3'-fluoro-3'-dezoxitimidina (FLT) și 2',3'-didezoxi-2',3'-didehidrotimidina (D4T).

S-a demonstrat, de asemenea, că și alte 2',3'-didezoxinucleozide inhibă dezvoltarea *in vitro* a unei varietăți din aceste virusuri. Se pare că, după fosforilare celulară la 5'-trifosfat cu ajutorul kinazelor celulare, aceste nucleozide sintetice sunt încorporate în filamentul de dezvoltare al acidului dezoxiribonucleic (ADN) viral producând astfel oprirea catenei datorită absenței grupării 3'-hidroxil.

Succesul diferitelor 2',3'-didezoxinucleozide în inhibarea replicării virusului imunodeficienței umane HIV *in vivo* sau *in vitro* a condus la un număr de teme de cercetare pentru găsirea și testarea nucleozidelor care substituie un heteroatom la atomul de carbon din poziția 3' a nucleozidei. Norbeck și colaboratorii, descriu faptul că $(\pm)$ -1-((2 β ,4 β)-2-(hidroximetil)-4-dioxolanil)timina (se referă la forma de $(\pm)$ -dioxolan-T) prezintă o activitate modestă față de virusul imunodeficienței HIV (EC_{50} de 20 μ m în celulele ATH 8) și nu este toxic față de celulele martor neinfectate, la o concentrație de 200 μ M, *Tetrahedron Letters* 30 (46), 6246, (1989). Cererea de brevet europeană cu publicația **WO/0337713** și brevetul **US 5041449** având ca titular IAF BioChem International, Inc., descriu 1,3-dioxolanii-2-substituiți-4-substituiți care prezintă o activitate antivirală.

US 5047407 și cererea de brevet european nr. **0382526** având, de asemenea,



ca titular IAF BioChem International, Inc., descriu un număr de nucleozide 1,3-oxatiolan 2-substituite-5-substituite, cu activitate antivirală și raportează, în mod specific, că amestecul racemic (aproximativ poziția C4') de izomer C1'- β al 2-hidroximetil-5-(citozin-1-il)-1,3-oxatiolanului (se referă, mai departe, la ($\pm$)-BCH-189) are aproximativ aceeași activitate față de virusul imunodeficienței ca AZT și nu este toxic la nivelurile testate. S-a descoperit, de asemenea, că ($\pm$)-BCH-189 inhibă replicarea virusului imunodeficienței HIV rezistent la AZT care se izolează *in vitro* de la pacienții care au fost tratați cu nucleozida sintetică 3'-azido-3'-dezoxitimidina (AZT) timp de mai mult de 36 de săptămâni.

Un alt virus care cauzează probleme serioase în sănătatea omului, este virusul hepatitei B (HBV). Virusul hepatitei B este inferior numai tutunului ca și cauză a cancerului uman. Mecanismul prin care virusul hepatitei B induce cancerul este necunoscut, așadar este postulat că acesta poate declanșa direct dezvoltarea tumorii sau poate declanșa dezvoltarea tumorii indirect prin inflamație cronică, ciroză și prin regenerarea celulară asociată cu infecția.

După o perioadă de incubare de două până la șase luni în care gazda este infectată cu virusul hepatitei B, evoluția bolii ajunge la stadiul de hepatită acută și la distrugerea ficatului, ceea ce produce dureri abdominale, icter și niveluri ridicate ale enzimelor în sânge. Virusul hepatitei B poate determina hepatita fulminantă, cu progresie rapidă, adesea fatală ca formă de boală, în care porțiuni masive din ficat sunt distruse.

Pacienții bolnavi de hepatită acută sunt, adesea, recuperați. La unii pacienți totuși, nivelurile ridicate de antigen viral persistă în sânge o perioadă îndelungată sau nedefinită, producând o infecție cronică. Infecțiile cronice pot duce la hepatite cronice persistente. Pacienții infectați cu virusul hepatitei B persistent, în majoritate se găsesc în țările dezvoltate. La mijlocul anului 1991, existau aproximativ 225 milioane de purtători cronici de virus al hepatitei B numai în Asia și aproape 300 milioane de purtători în lumea întreaga. Hepatita cronică persistentă poate cauza extenuare, ciroza ficatului și carcinomul hepatocelular, un cancer primar hepatic.

În țările industrializate occidentale, grupurile cu un risc mare de infectare cu virusul hepatitei B includ acele persoane care vin în contact cu purtătorii de virus al

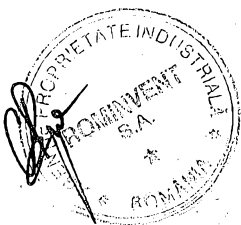


hepatitei B sau cu probe din sângele acestora. Epidemiologia virusului hepatitei B este foarte asemănătoare cu cea a sindromului imunodeficienței dobândite, ceea ce explică de ce infecția cu virusul hepatitei B este comună printre pacienții cu sindromul SIDA sau cu complexul legat de sindromul imunodeficienței dobândite (SIDA). Cu toate acestea, virusul hepatitei B este mult mai contagios decât virusul imunodeficienței umane (HIV).

Un vaccin derivat din serul uman a fost dezvoltat pentru imunizarea pacienților față de virusul hepatitei B. În timp ce acesta a fost găsit eficient, producerea vaccinului este complicată deoarece furnizarea serului uman de la purtătorii cronici este limitată și procesul de purificare este lung și costisitor. Mai mult decât atât, fiecare serie de vaccinuri preparate din diferite seruri trebuie să fie testată pe cimpanzei pentru o siguranță mai bună. Vaccinurile au fost așadar produse prin inginerie genetică. Tratamentele zilnice cu interferonul alfa, o proteina de inginerie genetică, s-au arătat a fi promițătoare. Cu toate acestea, pentru datare, nu există nici un agent farmaceutic cunoscut care să inhibe efectiv replicarea virusului.

Pentru a lansa pe piață o nucleozidă pentru scopuri farmaceutice, aceasta trebuie să fie nu numai eficientă, cu o toxicitate scăzută, dar trebuie, de asemenea, să aibă un cost convenabil pentru a fi fabricată. O temă însemnată de cercetare și dezvoltare a fost orientată către procedee noi, cu costuri scăzute pentru producția de nucleozide pe scară largă. 2',3'-dideoxinucleozidele sunt preparate, în mod curent printr-una din următoarele două căi: derivatizarea unei nucleozide intacte sau condensarea unui fragment de zahăr cu o bază heterociclică. Deși există numeroase dezavantaje asociate obținerii unor noi analogi de nucleozide prin modificarea unor nucleozide intacte, un avantaj major al acestui procedeu este acela că stereochimia absolută convenabilă a fost deja stabilită în mod natural. Cu toate acestea, procedeul nu poate fi utilizat în producerea de nucleozide care conțin fie baze care se produc în mod nenatural, fie fragmente de carbohidrați care se produc în mod nenatural (și care, pentru acest motiv, nu sunt preparate din nucleozide intacte), cum ar fi, de exemplu, 1,3-oxatiolan nucleozidele și 1,3-dioxolan nucleozidele.

În cazul în care se condensează un fragment carbohidrat sau un compus cu o structură asemănătoare unui carbohidrat cu o bază pentru a se forma o nucleozidă sintetică, nucleozida care se produce are două centre chirale (în pozițiile C1' și C4')



și astfel există ca pereche diastereomerică. Fiecare diastereomer există ca un set de enantiomeri. De aceea, produsul este un amestec de patru enantiomeri.

Adesea s-a găsit că nucleozidele cu stereochemie produsă în mod nenatural fie în poziția C1', fie în poziția C4', sunt mai puțin active decât aceleași nucleozide cu stereochemie stabilită în mod natural. De exemplu, Carter și colaboratorii au raportat că, concentrația de (-)-enantiomer de carbovir (2',3'-didehidro-2',3'-didezoxiguanozina) în cultura de celule necesară pentru reducerea activității revers transcriptazei cu 50% (EC_{50}) este de 0,8 μM , în timp ce EC_{50} pentru (+)-enantiomerul de carbovir este mai mare de 60 μM . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34: 6, 1297-1300 (June 1990).

WO 91/11186, descrie că 1,3-oxatiolan nucleozidele pot fi preparate cu o diastereoselectivitate superioară (procentaj superior de nucleozide cu configurație (3 la legătura dintre atomul de carbon C1' și baza heterociclică), printr-o selecționare minuțioasă a acidului Lewis utilizat în procedeul de condensare. S-a descoperit, de asemenea, că condensarea nucleozidei 1,3-oxatiolan cu o bază, se produce cu o (3-stereo specificitate aproape completă, atunci când clorura stanică este utilizată drept catalizator de condensare. Alți acizi Lewis determină o selectivitate C1'- β joasă (sau nulă) sau nu pot cataliza reacțiile.

Având în vedere faptul că sindromul imunodeficienței dobândite, complexul legat de SIDA și virusul hepatitei B au înregistrat în lumea întreagă nivele epidemice și au efecte tragice asupra pacienților infectați, apare o mare necesitate de a se furniza noi agenți farmaceutici eficienți pentru tratamentul acestor boli care să aibă o toxicitate scăzută față de organismul gazdă.

Apare, de asemenea, necesitatea de a se găsi un procedeu viabil comercial, având un cost rentabil, pentru a se produce nucleozide importante din punct de vedere farmaceutic și care să atingă o β -stereospecificitate în poziția C4' a nucleozidelor sintetice preparate prin condensarea unui fragment cu o structură asemănătoare unui carbohidrat cu o bază.

Problema pe care o rezolvă invenția este de a prezenta un procedeu de separare a derivaților de 1,3-oxatiolan.

Procedeul pentru separarea derivaților de 1,3 oxatiolan conform invenție, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că, amestecul racemic de 2 hidroximetil-5-(5-

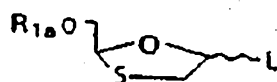


fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolan se supune unei etape de rezoluție sub acțiunea unei enzime selectată din grupul constând din esterază, lipază, subtilizină, α -chimotripsină, citidin-dezoxicitidin dezaminază, care catalizează preferențial o reacție într-unul dintre enantiomeri, urmată de expunerea produsului rezultat la acțiunea unei a doua enzime selectată din grupul esterază, lipază, subtilizină α -chemotripsină care intensifică rezoluția prin favorizarea reacției de legare a unuia dintre enantiomeri, recristalizarea produsului de rezoluție și tratarea acestuia cu un acid chiral ales dintr-un grup constând din acid malic, acid mandelic, acid 10-camforsulfonic, acid 3-bromocamfor-8-sulfonic, acid di-benzoil tartric și acid di-para-toluoiltartric.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

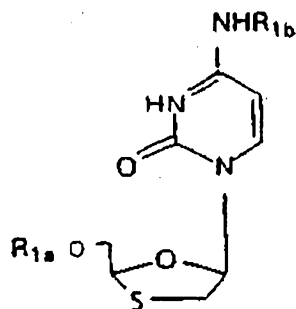
- se obțin derivați de 1,3-oxatiolan cu activitate antivirală mărită;
- prezenta metoda este regioselectivă.

Procedeul pentru prepararea 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan constă în reacția 5-fluorocitozinei, opțional protejată cu 1,3-oxatiolan având formula



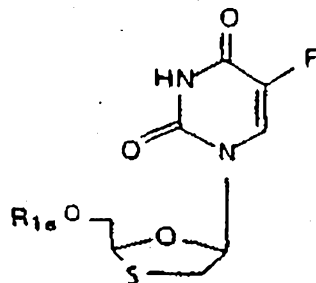
în care R_{1a} este un atom de hidrogen sau o grupare de protecție hidroxi, o grupare acil și L este o grupare labilă; și opțional se îndepărtează orice grupare de protecție a grupării hidroxi.

Un alt procedeu pentru prepararea 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan constă în reacția unui compus de formula următoare



în care R_{1a} este o grupare de protecție a grupării hidroxi și R_{1b} este o grupare de protecție a grupării amino, cu un agent de fluorurare care introduce atomul de fluor în poziția 5 a ciclului citozinei și apoi, opțional, se îndepărtează grupele de protecție.

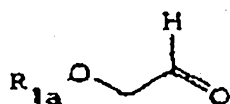
Un alt procedeu pentru prepararea 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan constă în reacția unui compus având formula



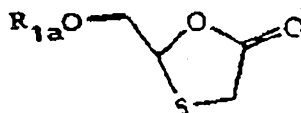
în care R_{1a} este o grupă de protecție hidroxi, cu un agent care convertește grupa oxo în poziția 4 a ciclului uracil în grupa amino și apoi se îndepărtează grupele de protecție.

Derivatul de 1,3-oxatiolan se prepară prin

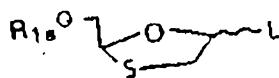
(i) ozonizarea compusului cu formula $CH_2=CH-CH_2-OR$ sau $ROCH_2-CH=CH-CH_2OR$, în care radicalul R este o grupă de protecție, obținându-se compusul cu formula



(ii) reacționarea compusului obținut în faza (I) cu acid mercaptoacetic pentru a forma compusul cu structura



(iii) reducerea compusului obținut în faza (ii) și apoi aducerea în reacție a acestuia cu anhidrida acidului carboxilic, cu un agent de alchilare sau agent de halogenare pentru a se obține compusul cu formula



în care L este o grupă labilă.

Un alt obiect al invenției de față constă în compoziție farmaceutică ce conține drept compus activ un derivat de 1,3-oxatiolan și un purtător pentru administrare orală și este condiționat sub formă de capsulă sau sub formă de tabletă.

7 (12.1990)

Deci, un obiect al prezentei invenții este o metodă și o compoziție pentru tratamentul pacienților umani infectați cu virusul imunodeficienței umane, HIV.

Un alt obiect al prezentei invenții este acela de a furniza o metodă și o compoziție pentru tratamentul pacienților umani sau a altor animale gazdă, infectate cu virusul hepatitei B, HBV.

Un alt obiect al prezentei invenții constă, de asemenea, în nucleozide îmbogățite enantiomeric în 1,3-oxatiolan.

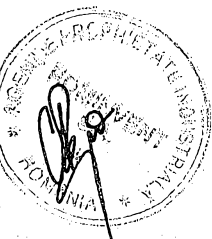
Prezenta invenție mai conține o metodă de descompunere a enantiomerilor C4' ai nucleozidelor 1,3-oxatiolan.

Pentru tratamentul infecțiilor cu virusul imunodeficienței umane HIV și cu virusul hepatitei B, HBV, la oameni și la alte animale gazdă, conform prezentei invenții, pentru tratamentul menționat mai sus, se prevede administrarea unei cantități eficiente de 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan, un derivat al acestui compus acceptabil din punct de vedere farmaceutic, incluzând derivatul 5' sau N⁴ alchilat sau derivatul 5' sau N⁴ acilat sau o sare a acestui compus acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, într-un vehicol acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

De asemenea, s-a constatat că 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan ("FTC"), prezintă în mod surprinzător o activitate intensă față de virusul imunodeficienței umane, cu o toxicitate foarte redusă față de celula gazdă. De asemenea, s-a mai constatat că, compusul 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan (FTC), prezintă o activitate foarte semnificativă față de virusul hepatitei B, HBV și de aceea poate fi utilizat pentru tratamentul pacienților care au o varietate de maladii asociate infecției cu virusul hepatitei B, HBV.

Studiile de toxicitate și de farmacocinetică confirmă completa utilizare a compusului 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan (FTC), ca agent antiviral pentru administrarea farmaceutică. Compusul FTC și enantiomerii acestuia sunt netoxici față de celulele măduvei osoase umane, periferice, la concentrații de peste 50 μ M și alte linii celulare la concentrații de peste 200 μ M. Compusul FTC-TP este un metabolit intracelular major în PBMC și celulele HepG2. Compusul FTC-TP inhibă competitiv virusul imunodeficienței umane HIV-1 ca revers transcriptaza (RT) cu K1 pentru 0,2 μ M utilizându-se un poli(l)oligo(dC)templat-primer. Utilizându-se analize secvențiale,





L-2-hidroximetil-beta-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan.

Aşa cum se utilizează în prezenta invenție, termenul (+)-FTC se referă la (+)-beta-D-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan.

Aşa cum se utilizează în prezenta invenție, termenii FTC-MP, FTC-DP și FTC-TP se referă la monofosfatul FTC, difosfatul FTC și respectiv trifosfatul FTC.

Aşa cum se utilizează în prezenta invenție, termenul BCH-189 se referă la 2-hidroximetil-5-(5-citozin-1-il)-1,3-oxatiolan.

Aşa cum se utilizează în prezenta invenție, termenul de "cataliză enzimatică preferențială" se referă la cataliza cu ajutorul unei enzime a unui substrat în locul altui substrat.

Aşa cum se utilizează în prezenta invenție, o grupare mobilă reprezintă o grupare funcțională care se formează la o carbonatate incipientă, atunci când se separă de molecula de care este legată de această grupare.

În concluzie, în prezenta invenție se prezintă un procedeu de separare a unui amestec de derivați de 1,3 oxatiolan, iar prepararea compusului 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan, constă în:

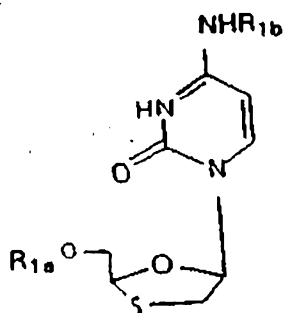
(i) reacția dintre 5-fluorocitozină, opțional protejată, cu 1,3-oxatiolan având formula A:



A

în care R_{1a} este hidrogen sau o grupare de protecție a grupării hidroxil, incluzând o grupare acil și L este o grupare mobilă; și opțional se îndepărtează orice grupare de protecție a grupării hidroxil.

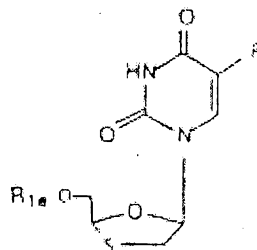
(ii) reacția compusului cu formula B:



B

Cod. I.L.A.

(în care R_{1a} este definit ca mai sus și R_{1b} este o grupare de protecție a grupării amino), cu un agent de fluorurare care participă la introducerea unui atom de fluor în poziția 5 a ciclului citozinic; sau (iii) reacția unui compus având formula C:



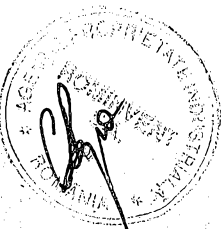
C

(în care radicalul R_{1a} este definit ca mai sus), cu un agent care participă la transformarea grupării oxo din poziția 4 a ciclului uracil, în grupare amino; orice grupare de protecție rămasă poate fi îndepărtată pentru a se obține compusul dorit.

f) un procedeu pentru separarea unui enantiomer (-) sau (+) al 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatolanului care constă în supunerea compusului sau derivatului (de exemplu a 5'-esterului) acestui compus sub forma unui amestec de enantiomeri (-) și (+) condițiile respective sau supunerea acțiunii reactivilor care servesc la separarea enantiomerilor și dacă este necesar, transformarea derivatului rezultat, în compusul de origine.

În procedeu, în etapa (i), gruparea de protecție a grupării hidroxi include grupările de protecție descrise în detaliu mai jos, incluzând grupările acil (de exemplu acetil), arilacil (de exemplu, benzoil sau benzoil substituit), tritil sau monometoxitritil, benzil sau benzil substituit, silil trisubstituit incluzând trialchilsilil (de exemplu, dimetil-t-butilsilil) sau difenilmetilsilil. Compusul 5-fluorocitozin poate fi, opțional, protejat cu grupări silil trisubstituite. Grupările de protecție pot fi îndepărtate prin orice metodă convențională. Gruparea mobilă L este o grupare mobilă tipică cunoscută în literatura de specialitate privind chimia nucleozidelor, de exemplu, un halogen cum ar fi clorul sau bromul, alcoxi cum ar fi, de exemplu, metoxi sau etoxi sau acil cum ar fi, de exemplu, acetil sau benzoil.

Reacția (i) poate fi efectuată într-un solvent organic (de exemplu, 1,2-diclorețan sau acetonitril) în prezența unui acid Lewis, de preferință clorura stanică sau trimetilsilil triflat.



Cod 31 1000 (12-10-1992)

Compușii cu formula A (în care L reprezintă o grupare acil, de exemplu, o grupare acetyl), pot fi obținuți prin reacția compusului cu formula D

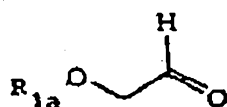


D

11

(în care R_{1a} este definit ca mai sus) cu un agent de reducere, de exemplu, hidrura de aluminiu-litiu, după care urmează tratarea cu un reactiv convențional potrivit, pentru a se obține compusul intermediar dorit, de exemplu, anhidrida acidului carboxilic, cum este anhidrida acetică, pentru acilare, reactivi de clorurare sau bromurare pentru halogenare sau reactivi de alchilare.

Compusul cu formula D poate fi preparat prin reacția compusului cu formula E



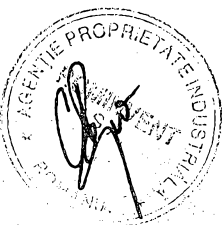
E

cu compusul $HSCH_2CO_2H$ la o temperatură ridicată.

Compusul cu formula E poate fi preparat prin ozonoliză plecând de la un alil eter sau alil ester având formula $CH_2=C-CH_2-OR$ sau un dieter sau un diester de 2-buten-1,3-diol având formula $RO-CH_2-CH=CH-CH_2-OR$, în care R este o grupare de protecție, cum ar fi, de exemplu, o grupare alchil, silil sau acil.

Cu privire la etapa (ii) din procedeu, substituentul 5-fluor poate fi introdus prin metode cunoscute în literatura de specialitate (M. J. Robins și colaboratorii, în *Nucleic Acid Chemistry*, Part 2, L. B. Townsend and R. S. Tipson, editors, J. Wiley and Sons, New York, 895-900 (1978) și referințele cuprinse; R. Duschinsky în *Nucleic Acid Chemistry*, Part 1, L. B. Townsend and R. S. Tipson, editors, J. Wiley and Sons, New York 43-46 (1978) și referințele cuprinse). Agentul de fluorurare poate fi, de exemplu, trimetilhipofluorit în fluortriclormetan.

Cu privire la etapa (iii) din procedeu, compusul cu formula C poate fi tratat cu 1,2,4-triazol, împreună cu 4-clorfenil diclorfosfat, pentru a forma compusul 4-(1,2,4-



1992 (1:19nm),

triazolil) corespunzător, care este apoi transformat în compusul 4-amino(citidină) dorit, de exemplu prin reacția cu metanol.

Materialele inițiale cu formulele B și C pot fi preparate, de exemplu, prin reacția unei baze corespunzătoare (opțional protejate), cu un compus cu formula A într-o manieră asemănătoare celei descrise în etapa de procedeu (i). Compușii 5-fluorouracil și 5-fluorocitozină sunt compuși comerciali furnizați de la firma Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI 53233, USA.

Rezoluția enantiomerilor ($\pm$) poate fi completată așa cum se va specifica în detaliu în continuare.

Compusul FTC poate fi transformat în esterul acceptabil din punct de vedere farmaceutic, prin reacția cu un agent de esterificare convenabil, de exemplu, o halogenură acidă sau o anhidridă. Compusul FTC sau derivatul acceptabil din punct de vedere farmaceutic al acestui compus, poate fi transformat într-o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, într-o manieră convenabilă, de exemplu, prin tratarea cu o bază corespunzătoare. Esterul sau sarea compusului FTC se pot transforma în compusul FTC, de exemplu prin hidroliză.

I. Prepararea compușilor activi.

Amestecul racemic al compusului FTC poate fi preparat conform metodei descrise în detaliu în publicarea cererii PCT, **WO 91/11186**, publicat pe 8 august 1991, având ca titular Emory University, sau prin procedeul descris în exemplul 1. În general, metoda include ozonizarea fie a unui eter alilic sau a unui ester alilic având formula $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OR}$ sau a unui dieter sau diester al 2-buten-1,3-diolului având formula $\text{RO}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OR}$, în care radicalul R este o grupare de protecție, cum ar fi de exemplu alchil, silii sau o grupare acil, pentru a forma o glicolaldehidă având formula $\text{OHC}-\text{CH}_2-\text{OR}$; adăugarea acidului tioglicolic la glicolaldehidă pentru a forma o lactonă cu formula 2-(R-oxi)-metil-5-oxo-1,3-oxatolan; reducerea lactonei la diferiți compuși conținând o grupare mobilă în poziția 5 a ciclului oxatolanic; cuplarea acestor compuși cu 5-fluorocitozin-siliat în prezența SnCl_4 pentru formarea izomerului beta al FTC; și opțional îndepărtarea grupelor de protecție.

Se dau în continuare exemplele de realizare a invenției în legătură cu figurile 1-12, care reprezintă:



- figura 1, o ilustrare a structurii chimice a compusului 2-hidroxiimetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan ("FTC");
- figura 2, o ilustrare a procedeeului pentru prepararea compusului 2-hidroxiimetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan;
- figura 3, o diagramă a fluxului specificității fosfatazei alcaline și a fosfodiesterazei din veninul de șarpe, pentru enantiomerii (+) și (-) ai compusului FTC;
- figura 4, un grafic indicând evoluția hidrolizei catalizate de lipază, a esterului 5'-butiril al compusului FTC în timp, utilizându-se enzimele Amano PS-800® (pătrat deschis) și PLE (cerc deschis punctat);
- figura 5, un grafic al efectului concentrației (μM) a compușilor racemici și enantiomerilor îmbogății ai FTC (preparați prin metoda din exemplul 4) față de procentul de inhibare al celulelor PBM umane infectate cu HIV-1 (cerc închis, ($\pm$)-FTC), (cerc deschis, (-)-FTC), (suprafață închisă, (+)-FTC);
- figura 6, un grafic al concentrației de compus FTC (μM) îmbogățit racemic și enantiomeric (preparat prin procedeul din exemplul 3) asupra procentului de inhibare a celulelor PBM umane infectate cu HIV-1 (cerc închis, ($\pm$)-FTC), (cerc deschis, (-)-FTC), (pătrat închis, (+)-FTC);
- figura 7, un grafic al absorbției compusului ($\pm$)-FTC saturat cu tritiu, în celulele PBM umane (media a două determinări) în timp (ore) față de celulele $\text{pmol}/10^6$;
- figura 8, un grafic al ieșirii compusului ($\pm$)-FTC radiomarcant din celulele PBM umane, măsurată în ore față de celulele $\text{pmol}/10^6$;
- figura 9, prezența compusului [^3H]($\pm$)-FTC și a derivaților fosforilați ai acestuia în celulele HepG-2 umane (media a două determinări), incubate într-un mediu care conține $10 \mu\text{M}$ [^3H]($\pm$)-FTC, măsurat în celulele $\text{pmol}/10^6$ în timp;
- figura 10, ieșirea compusului [^3H]($\pm$)-FTC și a derivaților fosforilați ai acestuia în celulele HepG-2 umane în $\text{pmol}/10^6$ celule față de celule depășite ca timp după impulsionarea celulelor cu $10 \mu\text{M}$ [^3H]($\pm$)-FTC ($700 \text{ DPM}/\text{pmol}$) pentru 24 de ore și evaluarea concentrației compusului la 24 de ore după eliminare;
- figura 11, descreșterea în concentrația combinată a [^3H]($\pm$)-FTC și în derivații fosforilați ai acestuia din celulele HepG-2 umane după incubare cu $10 \mu\text{M}$ [^3H]($\pm$)-FTC ($700 \text{ DPM}/\text{pmol}$) timp de 24 de ore, în $\text{pmol}/10^6$ celule depășite ca timp;



- figura 12, un grafic al efectului enantiomerilor FTC asupra formării coloniei de celule precursorare granulocitmacrofage, așa cum s-au măsurat, în procente de supraviețuire față de concentrația în μM (-)-FTC, cerc deschis; (+)-FTC cerc închis; AZT, pătrat închis.

Exemplul 1. *Prepararea compusului ($\pm$)-beta-D,L-2-hidroxitetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan*

Procedeul pentru prepararea amestecului racemic al compusului FTC este ilustrat în figura 2 și este descris în detaliu mai jos.

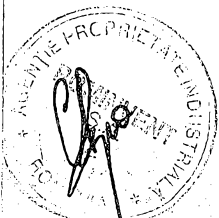
Protecția 2-buten-1,4-diolului

Într-un flacon de 2 litri, cu 3 gâturi, uscat, în atmosferă inertă, 100 grame (93,5 mililitri = 1,135 moli = 1,00 echivalenți) 2-buten-1,4-diol și 15 grame (aproximativ 0,1 echivalenți) de DMAP (4-dimetilaminopiridiă) se dizolvă în 800 mililitri de piridină uscată și se menține sub agitare în timp ce amestecul de reacție se răcește până la 0°C . Apoi se adaugă încet pentru prevenirea supraîncălzirii, clorura de butiril (260 mililitri = 2,2 echivalenți) și amestecul se mai lasă sub agitare timp de o oră. Reacția este terminată prin adăugarea în ulei de cantități mici de apă cu gheață. Lichidul este apoi decantat din sare și evaporat sub vid. Sarea care rămâne este dizolvată în apă și soluția apoasă este extrasă de două ori cu eter etilic. Celelalte straturi combinate sunt spălate odată cu o soluție saturată de CuSO_4 , de două ori cu o soluție saturată de NaHCO_3 conținând Norit® și apoi se filtrează sub vid printr-un filtru de celită®.

Amestecul de reacție concentrat este dizolvat în eter și spălat, urmând același procedeu ca mai sus pentru soluția de sare. Straturile organice combinate sunt concentrate pe evaporatorul rotativ și apoi sunt aduse sub vid. Pentru ca această reacție să decurgă cantitativ, este necesar mediul închis. Vidul poate fi crescut atât cât este necesar. Produsul, 1,4-dibutiril-2-buten-1,4-diol, este incolor până la ușor galben, sub forma unui lichid clar.

Ozonoliza diolului protejat

Compusul 1,4-dibutiril-2-buten-1,4-diol (1,365 moli) este dizolvat în 4 litri de clorură de metilen (CH_2Cl_2) uscată, într-un flacon uscat prevăzut cu 3 gâturi, de 5 litri capacitate, echipat cu un tub larg de uscare și un tub deschis pentru introducerea gazului. Tubul este un tub de barbotare a gazului, nefritat, care se va obtura prin



expunere la soluția concentrată. Soluția este apoi agitată și răcită până la temperatura de -70°C , în timp ce gazul inert este barbotat prin soluție. Orificiul de intrare a gazului este sigilat în timp ce soluția este răcită suficient și flaconul și aparatul de agitare este transferat la generatorul de ozon. Oxigenul este barbotat prin soluția menținută sub agitare, timp de cel puțin 20 de minute, în timp ce se menține pe o baie de gheață. Un aparat Cryocool este ideal pentru menținerea unei temperaturi scăzute pentru o reacție de durată îndelungată. Ozonul este apoi introdus la $0,56 \text{ kg/cm}^2$ - $0,60 \text{ kg/cm}^2$ (8 până la 8,5 psi). După completare, fluxul de ozon este oprit și oxigenul este barbotat prin soluție, timp de aproximativ o jumătate de oră, înainte de adăugarea a 3 echivalenți de Me_2S . Flaconul este apoi îndepărtat de pe baia de gheață și transportat într-o nișă, unde se menține sub agitare timp de aproximativ 2 zile pentru a obține o reducere completă. Soluția este apoi evaporată și adusă sub vid pentru mai multe ore.

Această reacție produce, în mod obișnuit, aproximativ 95% de aldehydă protejată (2-butiloxiacetaldehydă), un lichid clar, incolor până la galben.

Ciclizarea aldehydei cu acid mercaptoacetic

Aldehydă (1,0 echivalenți) este dizolvată în toluen pentru a se obține o soluție de 0,80 până la 0,85 M, care se aduce într-un flacon prevăzut cu un dispozitiv separator de tip Dean Stark. Se adaugă acidul tioglicolic (1,1 echivalenți) și amestecul este încălzit la temperatura de reflux. Apa este îndepărtată azeotropic cu ajutorul separatorului. Reacția este completă în 3 ore și amestecul este menținut la rece la temperatura camerei. Soluția organică este spălată de două ori cu volume egale de soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu NaHCO_3 și apoi este spălată o dată cu apă, uscată pe sulfat de magneziu MgSO_4 și Norit, după care se filtrează sub vid prin celită, înainte de a fi evaporată sub vid. Prima soluție apoasă de bicarbonat de sodiu NaHCO_3 este extrasă o dată cu eter; eterul este spălat o dată cu apă, uscat pe sulfat de magneziu MgSO_4 și Norit®, filtrat prin celită® sub vid și evaporat la un loc cu alte materiale organice, din soluția de toluen. Materialul combinat este plasat sub vid până a doua zi.

În mod uzual, prin reacție se obține un randament de 90% din compusul 2-(butiloxi)-metil-5-oxo-1,3-oxatiolan.

Reducerea lactonei și conversia în acetat

Compusul 2-butiloxi-metil-5-oxo-1,3-oxatiolan (1,00 echivalent) se dizolvă în



tetrahidrofuran (THF) uscat, pentru a se obține o soluție 0,23 M care se aduce într-un flacon uscat prevăzut cu 3 gâturi și echipat cu un agitator mecanic și se menține în atmosferă inertă. Soluția este agitată și răcită până la temperatura de 0°C, după ce s-a adăugat, prin canulă, un echivalent de 1,0 M Li (t-BuO)₃AlH în tetrahidrofuran (THF). Reducerea este completă în aproximativ trei ore, așa cum este observat prin cromatografie în strat subțire TLC, utilizându-se ca sistem de solvenți, 2 părți eter și 1 parte hexan și anisaldehydă drept colorant.

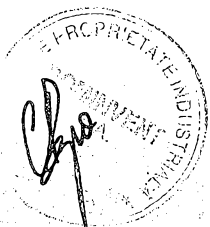
Aproximativ 10 echivalenți de Ac₂O proaspăt distilat se adaugă apoi și se ține sub agitare timp de 2 zile, pentru a se obține produsul acetilat. Reacția este finalizată prin adăugarea soluției saturate de bicarbonat de sodiu NaHCO₃, care se menține sub agitare până a doua zi. Soluția este apoi evaporată și supusă agitării cu mai multă soluție de bicarbonat de sodiu NaHCO₃ până a doua zi. Această soluție este apoi extrasă cu eterul care este apoi spălat (cu atenție) de două ori cu soluție saturată de bicarbonat de sodiu NaHCO₃ și o dată cu apă, apoi este uscată pe sulfat de magneziu MgSO₄ și Norit®, după care se filtrează prin celită® sub vid și se evaporă. Produsul este un lichid clar, de culoare galben închis. Analiza gaz-cromatografică (Temperatura inițială - 80°C; Timp inițial = 5 minute; Gradul de progresie - 10/minut; Temperatura finală = 240°C) indică o puritate tipică de aproximativ 70%.

Sililarea compusului 5-fluorocitozină

5-fluorocitozina (1,05 echivalenți pe baza cantității de lactol acetilat obținut în faza precedentă utilizându-se metoda gaz-cromatografică pentru indicarea purității) este sililată prin refluxare în cel puțin 10 echivalenți de hexametildisilazan conținând o cantitate catalitică de sulfat de amoniu pur (0,05 până la 0,10 echivalenți) timp de două ore, după care soluția devine clară. Flaconul este apoi sigilat strâns și solventul este îndepărtat, utilizându-se o pompă de vacuum cu un separator auxiliar. Produsul, în formă solidă de culoare albă este lăsat sub vid până a doua zi până ce este gata de utilizare în următoarea fază de reacție de cuplare.

Cuplarea compusului 5-fluorocitozină sililată, cu lactol acetilat

Compusul 5-fluorocitozină sililată (33,86 grame, 0,124 moli), în diclormetan uscat (350 mililitri) formează o soluție la care se adaugă o soluție de tetraclorură de staniu SnCl₄ (135,6 mililitri o soluție 1 molară în clorură de metilen CH₂Cl₂) în atmosferă de



Cod. 77

azot. Soluția este agitată timp de 15 minute la temperatura camerei. Această soluție este adăugată la soluția de lactol acetat printr-un tub subțire (38 grame, 0,113 moli) în diclormetan (400 mililitri) sub atmosferă de azot, timp de peste 30 de minute.

Soluția de reacție este agitată timp de 2 ore, punct în care reacția este completă, așa cum s-a indicat prin analiza cromatografică în strat subțire. Soluția de reacție este apoi diluată cu diclormetan (500 mililitri) și reacția este oprită la adăugarea soluției de hidroxid de amoniu. Soluția de hidroxid de amoniu (100 de mililitri) se adaugă lent menținând temperatura de reacție sub 30°C, având ca rezultat formarea unui precipitat alb. Amestecul este apoi ținut sub agitare pentru încă 30 de minute și apoi se trece printr-o coloană sub formă de dop de silica gel (7 inchi 17,78 cm diametru și 2 inchi 5,08 înălțime). Coloana este eluată secvențial cu diclormetan (2 litri), acetat de etil (2 litri) și amestec format din 9 părți acetat de etil și 1 parte etanol (4 litri). Eluentul acetat de etil și amestecul de acetat de etil și etanol conțin produsul dorit. Aceste soluții sunt combinate și evaporate la presiune redusă. Produsul solid lipicios rezidual este apoi spălat cu eter uscat (20 mililitri) pentru a se obține un produs solid alb (25,35 grame; 71%), de FTC-5'-butirat.

Produsul FTC-5'-butirat (8,74 grame; 0,026 moli) este dizolvat în 250 mililitri de metanol. Metoxidul de sodiu (2,85 grame; 0,052 moli) se adaugă la temperatura camerei. Amestecul de reacție este menținut sub agitare timp de 1 oră, punct în care reacția este completă, așa cum s-a confirmat prin analiza cromatografică în strat subțire TLC. Soluția de clorură de amoniu NH_4Cl (10 mililitri) se adaugă pentru oprirea reacției și apoi solventul este îndepărtat sub presiune redusă. Reziduul este apoi absorbit pe gel de silice (5 grame) și trecut pe o coloană îngustă, utilizându-se ca eluant un amestec format din 9 părți acetat de etil și 1 parte etanol. Frațiunile care conțin produsul sunt combinate și evaporate, când se obține un produs solid lipicios care este spălat cu eter uscat, când se formează un produs solid de culoare albă FTC (6 grame, 88%).

Analiza de rezonanță magnetică nucleară are următoarele rezultate:

(^1H RMN: (DMSO- d_6) 8,18 (1H, d, H_6 , $J = 8,4$ Hz), 7,81 & 7,57 (2H, extins, NH_2), 6,12 (1H, dd, H_1 , $J = 5,7$ & $4,2$ Hz), 5,40 (1H, t, OH, $J = 5,7$ Hz), 5,17 (1H, t, H_4 , $J = 3-6$ Hz), 3,74 (2H, m, 2H_5), 3,41 (1H, dd, H_2 , $J = 5,7$ & $11,7$ Hz), 3,11 (1H, dd, H_2 , $J = 4,2$ & $11,7$ Hz);



August 6, 2000 (m)

^{13}C RMN: (DMSO- d_6) 157,85 (d, $J = 13,4$ Hz), 153,28, 136,12 (d, $J = 241$ Hz), 126,01 (d, $J = 32,6$ Hz), 86, 90, 86, 84, 62, 48, 37, 07; punct de topire 195-196°C.

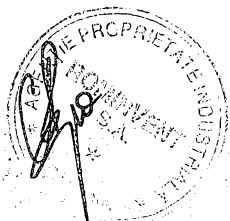
II. Rezoluția enantiomerilor nucleozidei

O metodă este prezentată în prezenta invenție, pentru rezoluția amestecurilor racemice a enantiomerilor nucleozidei, incluzând fără a se limita la aceasta, enantiomerii FTC (+) și (-). Metoda poate fi utilizată așadar, pentru separarea amestecurilor racemice de carbohidrați sau porțiuni cu structură asemănătoare carbohidraților, cum ar fi, de exemplu, derivații de 1,3-oxatiolan și 1,3-dioxolan. Metoda constă în utilizarea unei enzime care catalizează preferențial o reacție a unui enantiomer într-un amestec racemic. Enantiomerul reacționat este separat de enantiomerul nereacționat pe baza unei noi diferențe în structura fizică. Prin descrierea dată și din literatura de specialitate apare posibilitatea de a se alege o enzimă care este selectivă pentru enantiomerul nucleozidei la alegere (sau selectivă pentru enantiomerul nedorit, ca o metodă de eliminare a acestuia), prin selectarea uneia din enzimele care se vor discuta mai jos sau prin evaluarea sistematică a altor enzime cunoscute. Din literatura de specialitate, se cunoaște așadar modul în care se modifică substratul atât cât este necesar pentru a se ajunge la rezoluția dorită. Prin utilizarea agenților de deplasare prin rezonanță magnetică nucleară chirală, prin polarimetrie sau cromatografie lichidă de înaltă performanță chirală, se poate determina înnobilarea optică a esterului separat. Următoarele exemple ilustrează, în continuare, utilizarea enzimelor pentru separarea amestecurilor racemice a enantiomerilor. Alte metode cunoscute de rezoluție a amestecurilor racemice, se pot utiliza în combinație cu metoda de rezoluție descrisă în prezenta invenție. Toate aceste modificări sunt considerate ca făcând parte din scopul acestei invenții.

Rezoluția bazată pe hidroliza esterilor nucleozidei C5'

Metoda include reacția grupării C5'-hidroxil a amestecului racemaților nucleozidei cu un compus acil pentru a forma esterii C5' în care nucleozida este la capătul "carbinol" al esterului. Amestecul racemic al esterilor C5' de nucleozida este apoi tratat cu enzima care taie sau hidrolizează preferențial la unul din enantiomeri și nu în celălalt, într-o perioadă de timp dată.

Un avantaj al acestei metode este acela că, metoda poate fi utilizată pentru



Cod.

separarea unei varietăți largi de nucleozide, incluzând pirimidin nucleozida și purin nucleozida care sunt, în mod opțional, substituite în partea de carbohidrat sau în partea de bază. Metoda poate fi, așadar, utilizată pentru separarea derivaților nucleozidici care conțin heteroatomi adiționali în partea de carbohidrat, de exemplu FTC și BCH-189. Aplicabilitatea largă a acestor metode rezidă parțial în faptul că, deși porțiunea de carbinol a esterului joacă un rol în abilitatea unei enzime de diferențiere a enantiomerilor, porțiunea de recunoaștere majoră pentru aceste enzime este porțiunea acidului carboxilic al esterului. Mai mult decât atât, se poate extrapola cu succes rezultatul obținut de la o enzimă față de studiul pe substratul altei enzime în sistem aparent diferit, asigurând că porțiunile acidului carboxilic ale celor două substraturi sunt aceleași sau substanțial similare.

Un alt avantaj al acestei metode este acela că metoda aceasta este regioselectivă. Enzimele care în mod tipic hidrolizează esterii, nu catalizează reacțiile străine în alte porțiuni ale moleculei. De exemplu, enzima lipază, catalizează hidroliza esterului de 2-hidroximetil-5-oxo-1,3-oxatiolan fără să hidrolizeze lactona internă. Aceasta contrastează marcant cu metodele "chimice" de hidroliză a esterului.

Încă un avantaj al acestei metode este acela că separarea enantiomerul nehidrolizat și a enantiomerului hidrolizat din amestecul de reacție, este foarte simplă. Enantiomerul nehidrolizat este mai lipofilic decât enantiomerul hidrolizat și poate fi recuperat eficient prin simpla extracție cu unul dintr-o largă varietate de solvenți organici nepolari sau din amestecuri de solvenți, incluzând hexanul și amestecul de hexan și ester. Enantiomerul hidrolizat, mai polar, cel mai puțin lipofilic, poate fi obținut apoi prin extracție cu solvenți organici mult mai polari, de exemplu, acetatul de etil, sau prin liofilizare, după care urmează extracția cu etanol sau metanol. Alcoolul trebuie să fie evitat în timpul hidrolizei, deoarece acesta poate denatura enzimele în anumite condiții.

Enzimele și substraturile

Cu o combinaire potrivită a enzimei și substratului, condițiile pot fi stabilite pentru izolarea oricărui enantiomer de nucleozidă. Enantiomerul dorit poate fi izolat prin tratamentul amestecului racemic cu o enzimă care hidrolizează enantiomerul dorit (după care urmează extracția hidrolizatului polar cu solvent polar) sau prin tratamentul cu o enzimă care hidrolizează enantiomerul nedorit (după care urmează îndepărtarea



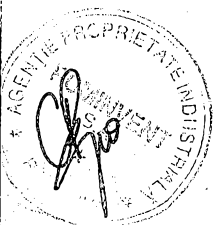
enantiomerului nedorit cu un solvent nepolar).

Enzimele care catalizează hidroliza esterilor, includ esterazele, de exemplu esteraza din ficat de porc, lipazele incluzând lipaza pancreatică de porcine și Amano PS-Boo, lipaza, subtilisin și alfa-chimotripsina.

Figura 3 reprezintă diagrama fluxului specificității fosfatazei alcaline și fosfodiesterazei din veninul de șarpe, pentru enantiomerii (+) și (-) ai compusului FTC. Așa cum este indicat, fosfataza alcalină hidrolizează trifosfatul ambilor enantiomeri la compusul FTC și de aceea nu este eficientă ca un mijloc de separare. Fosfodiesteraza I, hidrolizează preferențial izomerul (+) al compusului FTC în monoesterul acestuia, care apoi poate fi expus la 5'-nucleotidază pentru a obține compusul (+)-FTC.

Gruparea acil cea mai eficientă pentru esterificarea în poziția C5' a nucleozidei, poate fi determinată fără o experimentare nepotrivită, prin evaluarea unui număr de omologi, utilizându-se un sistem de enzime selectate. De exemplu, când 1,3-oxatiolan nucleozidele sunt esterificate cu acidul butiric, rezoluțiile atât cu esteraza din ficat de porc cât și cu esteraza Amano PS-800, se procedează cu o enantioselectivitate superioară (94-100% exces enantiomeric) și selectivitate opusă. Esteraza în ficatul de porc hidrolizează preferențial enantiomerul (+) al compusului FTC și enzimă Amano-800 hidrolizează preferențial enantiomerul (-) al compusului FTC. Procentul de exces enantiomeric raportat la tabelul 1 este cantitatea de ester butiric purificată, care rămâne în amestecul tratat enzimatic (de exemplu, esterul butiric al enantiomerului (-) al compusului FTC în cazul esterazei din ficatul de porc și esterul butiric al enantiomerului (+) al compusului FTC în cazul Amano PS-800).

Exemplele nelimitate de grupări acil care pot fi evaluate pentru utilizare cu un amestec enantimeric de nucleozide și în special enzime, include acizii alchil carboxilici și acizii carboxilici alchilați substituiți, incluzând acidul acetic, acidul propionic, acidul butiric și acidul pentanoic. Împreună cu anumite enzime, se preferă să se utilizeze un compus acil care este lipsit, în mod semnificativ, de electroni liberi pentru a facilita hidroliza prin slăbirea legăturii esterice. Exemplele de grupări acil lipsite semnificativ de electroni liberi includ alfa-haloesterii cum ar fi acidul 2-cloropropionic, acidul 2-clorobutiric și acidul 2-cloropentanoic. Alfa-haloesterii sunt substraturi excelente pentru lipaze.



Condițiile de rezoluție

Hidrolizele enzimatică sunt efectuate, în mod obișnuit, cu o cantitate catalitică de enzimă într-o soluție apoasă de tampon care are pH-ul optim apropiat de enzima discutată. Așa cum se desfășoară reacția, valorile pH rezultă din eliberarea acidului carboxilic. Baza apoasă se va adăuga pentru menținerea valorii de pH aproape de valoarea optimă pentru enzimă. Procesul reacției poate fi ușor determinat prin monitorizarea schimbării de pH și prin cantitatea de bază necesară pentru menținerea pH-ului. Esterul hidrofobic (enantiomerul nehidrolizat) și alcoolul mult mai polar (enantiomerul hidrolizat) pot fi secvențial și selectivi extrași din soluție printr-o alegere judicioasă a solventilor organici. În mod alternativ, materialul care trebuie separat, poate fi trecut printr-o coloană care conține enzima imobilizată pe un suport solid. Hidrolizele enzimatică realizate în condiții heterogene pot suferi de o reproductibilitate redusă. De aceea, este de preferat ca hidroliza să se efectueze în condiții omogene. Solvenții alcoolici nu sunt preferați, deoarece aceștia pot denatura enzimele. Omogenitatea poate fi obținută prin utilizarea unor agenți tensioactivi neionici, ca de exemplu Triton X-100. Cu toate acestea, adăugarea acestor agenți tensioactivi nu ajută numai la dizolvarea materialului inițial, ci ei contribuie, de asemenea, la solubilitatea în apă a produsului. De aceea, reacția enzimatică poate să aibă loc mult mai eficient prin adăugarea unui agent tensioactiv neionic decât în condiții heterogene, izolarea atât a materiei prime cât și a produsului rezultat, putând fi efectuată mult mai dificil. Produsul poate fi izolat prin procedee chimice și cromatografice mult mai convenabil (de exemplu, formarea sării selective). Nucleozidele diacilate pot fi utilizate, dar adesea sunt foarte lipofile și tari, pentru a putea fi dizolvată în mediul utilizat.

Exemplul 2: *Hidroliza enantioselectivă a compusului FTC, catalizată de lipază*

Un număr de derivați 5'-O-acil ai compusului FTC sunt preparați prin O-acilare selectivă a sării N-clorhidrat (vezi tabelul 1 și Figura 4) a compusului ($\pm$)-FTC. A fost investigată eficiența hidrolizei derivaților prin lipaze. Așa cum se arată în tabelul 1, esteraza din ficatul de porc (PLE) prezintă un nivel superior de selectivitate pentru hidroliza esterului enantiomerului (+) al compusului FTC, prin eliminarea predominantă a butiratului enantiomerului (-) al compusului FTC în amestecul analizat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță. Din contra, enzima PS-800 hidrolizează



... (m)

esterul enantiomerului (-) al compusului FTC preferențial, prin eliminarea predominantă a butiratului compusului enantiomerului (+) al FTC în amestecul analizat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță. Gradul de hidroliză s-a găsit a fi dependent de natura grupării acil; derivatul acetil este semnificativ mai inactiv decât derivatul butiril. S-a descoperit acum că, gradul de hidroliză a esterului acidului propionic al compusului FTC este chiar mai rapid decât cel observat pentru derivatul butirat. Procentul de separare și procentul de exces enantiomeric se determină, ambele, utilizându-se cromatografia lichidă de înaltă performanță HPLC. Așadar, enantioselectivitatea este excelentă când se utilizează esteraza din ficatul de porc (PLE) (în mod obișnuit este de 97%, ^{ee} sau mai mare), îmbogățirea adițională poate fi însoțită de reacții de hidroliză enzimatică secvențiale, în care butiratul enantiomeric îmbogățit de hidroliza catalizată de enzima din ficatul de porc PLE, este supus la o hidroliza enzimatică cu PS-800.

Tabelul 1

Compararea efectului esterului asupra hidrolizei enzimatică

Substratul	%Separare	%E.E. (s.m.)
Esteri de FTC cu PLE:		
		(-)-FTC (butirat)
acetat	32,68	N.D.
propionat	39,87	N.D.
butirat	48,00	98
butirat	45,71	98,6
Esteri de FTC cu PS-800:		
		(+)-FTC (butirat)
acetat	73,17	N.D.
propionat	52,67	N.D.
butirat	58,34	N.D.
butirat	41,50	94



C

1)

Exemplul 3: *Procedeu de preparare a (+)- și (-)-FTC prin hidroliza enantioselectivă a butiratului de FTC, catalizată de lipază*

5'-O-butiratul compusului (±)-FTC (0,47 mmoli, 149 miligrame) se dizolvă în 16 mililitri de soluție formată din 4 părți soluție tampon și 1 parte CH_3CN la $\text{pH}=8$. Soluția clară este agitată și tratată cu 26 miligrame de esterază din ficatul de porc (PLE-A). Evoluția reacției este monitorizat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) (Figura 4). După 20 de ore (conversie 52%), amestecul de reacție este extras de două ori cu câte 80 mililitri de CHCl_3 cloroform și apoi cu 80 de mililitri de acetat de etil. Stratul organic al extractelor este combinat, uscat pe sulfat de magneziu anhidru MgSO_4 , apoi este filtrat și concentrat prin evaporare la rotavapor. Reziduul astfel rezultat este eluat pe discuri 2x1000 m pTLC utilizându-se acetatul de etil ca eluant (eluție dublă) pentru a se obține după izolare 53 miligrame (36% pe baza materialului inițial) de butirat FTC care este determinat prin analiza cromatografică lichidă de înaltă performanță HPLC ca având un exces enantiomeric de 98%. Butiratul enantiomeric îmbogățit este apoi tratat cu 1,6 mililitri de metanol și apoi cu 0,38 mmoli (20 miligrame) de metoxid de sodiu. Amestecul care rezultă este agitat la temperatura camerei și evoluția reacției este monitorizată prin cromatografie lichidă de înaltă performanță, HPLC. Reacția este completă în 30 de minute. Solventul este îndepărtat prin evaporare la rotavapor pentru a se obține un produs brut solid, de culoare albă (76 miligrame) care este eluat pe 1000 m pTLC utilizând ca eluant un amestec format din 5 părți de acetat de etil și 1 parte de etanol. Enantiomerul (-) al FTC este izolat ca produs solid de culoare albă (33 miligrame; 82% randament). Prin analiza cromatografică de înaltă performanță HPLC a compusului FTC ca derivat 5'-O-acetat, arată 97% exces enantiomeric (e.e.): $[\alpha]^{(20, \text{D})}_{\text{D}} -120, 5^\circ$ ($c=0,88$; în etanol absolut). Emulsiile în fază de prelucrare trebuie să fie evitate prin adăugare de cloroform HCCl_3 la amestecul de reacție pentru completare (care servește așadar pentru denaturarea enzimei), urmând apoi striparea solventilor sub vid și apoi extragerea cu cloroform HCCl_3 .

În mod similar, 1,2 mmoli (375 miligrame) de 5'-O-butirat de (±)-FTC se dizolvă în 40 mililitri de amestec format din 4 părți soluție tampon $\text{pH}=8$ și 1 parte CH_3CN . Soluția clară este agitată și tratată cu 58 miligrame de esterază de ficat de porc (PLE-A). Evoluția reacției este monitorizat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță



HPLC. După 90 de minute (38% conversie), amestecul de reacție este adăugat la 150 mililitri de cloroform HCCl_3 . Straturile sunt separate și stratul apos este liofilizat pentru îndepărtarea solventului. Reziduul alb de la liofilizare este extras de 3 ori cu câte 10 mililitri de etanol absolut. Extractele sunt filtrate, combinate și concentrate în vacuum pentru a se obține 179 miligrame de ulei brut. Materialul brut este apoi eluat pe o coloană de silica gel de 45 x 30 milimetri utilizându-se ca eluant un amestec format din 3 x 75 mililitri de acetat de etil și 5 părți acetatul de etil cu 1 parte etanol. Produsul (+)-FTC este izolat sub formă de solid alb (109 miligrame; 37% pe baza butiratului inițial). Analiza cromatografică de înaltă performanță HPLC a compusului (+)-FTC ca derivat 5'-O-acetat, arată 97,4% exces enantiomeric; $[\alpha]_D^{20} + 113,4^\circ (c=2,53; \text{etanol absolut})$.

O reacție similară este efectuată utilizând 0,12 mmoli (37 miligrame) de 5'-O-butirat de FTC și 7 miligrame de PS-800 în 4,0 mililitri amestec format din 4 părți soluție tampon $\text{pH}=8$ și 1 parte metilcian CH_3CN . Reacția este considerabil mai slabă decât cea cu esterază din ficatul de porc PLE-A și necesită 74 de ore pentru 59% conversie. Butiratul separat (11,4 miligrame; 31% din cantitatea inițială) prezintă 94% exces enantiomeric e.e., prin cromatografie lichidă de înaltă performanță HPLC.

Rezoluția enantiomerilor nucleozidei, cu citidin-dezoxicitidin dezaminaza

În mod alternativ, citidin-dezoxicitidin dezaminaza este utilizată pentru separarea amestecurilor racemice de 2-hidroximetil-5-(citozin-1-il)-1,3-oxatiolan și derivații acestui compus, incluzând 2-hidroximetil-5-(5-fluor-citozin-1-il)-1,3-oxatiolan.

Enzima catalizează dezaminarea jumătății de citozină, la un uracil. S-a descoperit că unul din enantiomerii 1,3-oxatiolan nucleozidei este substrat preferat pentru citidin-dezoxicitidin dezaminaza. Enantiomerul care nu este convertit în derivatul de uracil (și de aceea este încă bazic), este extras din soluție cu o soluție acidă. Se va avea grijă să se evite soluțiile puternic acide (pH -ul sub 3,0), care pot desface ciclul oxatiolanic. Citidin-dezoxicitidin dezaminaza poate fi izolată din ficatul de șobolan sau din ficatul uman, sau pot fi exprimată din secvențe recombinat într-un sistem procariot, cum ar fi, de exemplu, *Escherichia Coli*.

Metoda de rezoluție a enantiomerilor citidin nucleozidei utilizând citidin-dezoxicitidin dezaminaza, poate fi utilizată ca unică metodă de rezoluție sau poate fi



utilizată în combinație cu alte metode de rezoluție, incluzând rezoluția prin hidroliză enzimatică a esterilor 5'-O-nucleozidei, așa cum s-a descris mai sus.

Combinația dintre rezoluția enzimatică și metodele clasice de rezoluție

Procedeul descris mai sus pentru separarea amestecurilor racemice ale enantiomerilor nucleozidei poate fi combinat cu alte metode clasice de separare enantiomerică, pentru creșterea purității optice a produsului finit.

Metodele clasice de separare includ o varietate de tehnici fizice și chimice. Adesea tehnica mult mai eficientă și cea mai simplă este recristalizarea, bazată pe principiul că, racemații sunt adesea mult mai solubili decât enantiomerii individuali corespunzători. Recristalizarea poate fi efectuată în orice fază, incluzând compușii acilați sau produsul enantiomeric finit. Dacă rezultatul este cu succes deplin, această cale simplă reprezintă o metodă care merită aleasă.

Atunci când prin recristalizare nu se ajunge la obținerea unui material cu o puritate optică acceptabilă, pot fi evaluate alte metode. Dacă nucleozida este bazică, (de exemplu, o citidină) se pot utiliza acizi chirali care formează amestecuri diastereomerice care pot avea proprietăți de solubilitate diferite semnificativ. Exemplele nelimitative de acizi chirali includ acidul malic, acidul mandelic, acidul dibenzoil tartric, acidul 3-bromcamfor-8-sulfonic, acidul 10-camforsulfonic și acidul di-para-toluiltartric. În mod asemănător, acilarea grupării hidroxil libere cu un derivat acid chiral are ca rezultat așadar, formarea amestecurilor diastereomerice ale căror proprietăți fizice pot fi diferite suficient pentru a permite separarea.

Cantități mici de nucleozide îmbogățite enantiomeric pot fi obținute sau purificate prin tratarea amestecului racemic printr-o coloană HPLC care a fost desemnată pentru separări chirale, incluzând coloanele cu legături de ciclodextrină, comercializate de Rainin Corporation.

Exemplul 4: *Separarea amestecurilor racemice de nucleozide prin cromatografie lichidă de înaltă performanță HPLC.*

Rezoluțiile enantiomerilor C4' ai (±)-FTC sunt efectuate utilizând o coloană chirală cu legături de ciclodextrină (ciclolegătura AC-I), obținută de la Rainin Corporation (Woburn, MA). Condițiile sunt următoarele: metanol 0,5% izocratic, în apă; debitul fluidului de 1 mililitru pe minut, detecție în ultraviolet la 262 nm. Metanol de puritate



HPLC este obținut de la J.T.Baker (Phillipsburg, N J). Amestecurile racemice sunt injectate și fracțiunile sunt colectate. Fracțiunile conținând fiecare dintre enantiomerii menționați sunt colectate, congelate și apoi liofilizate. Compușii sunt caracterizați prin spectroscopie în ultraviolet și prin timpii lor de retenție, prin cromatografie lichidă de înaltă performanță HPLC. În general enantiomerii (-) au timp de retenție mai scăzut decât enantiomerii (+) (vezi *J. Liquid Chromatography*, 7: 353-376, 1984). Concentrațiile de compuși sunt determinate prin spectroscopie în ultraviolet, utilizând o soluție stoc de concentrație cunoscută (15 μ M) preparată în apă pentru evaluare biologică. Timpii de retenție pentru enantiomerii separați sunt prezentați în tabelul 2.

Tabelul 2

Timpii de retenție ai enantiomerilor compusului FTC

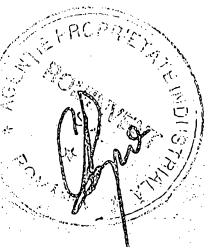
Compusul	R _t (minute)
(-)-FTC	8,3
(+)-FTC	8,7

Exemplul 5. Metode alternative pentru separarea enantiomerilor FTC utilizând o coloană chirală.

Utilizând o coloană Cyclobond I-Ac (cu legătură ciclică) (5 μ m, 25 centimetri x 4,6 milimetri, Rainin Corporation, Wobum, MA, Catalog no. AST-41049) cu un debit al fluidului de 0,6 mililitri pe minut de metanol izocratic 0,5% (Fisher Scientific, Inc. HPLC grade catalog nr. A-452-4 în apă) și detecția în ultraviolet la 262 nm, enantiomerii FTC prezintă timp de retenție de 12,68 minute ((-)-FTC) și 13,20 minute ((+)-FTC).

Utilizând o coloană Chiralpak AS (10 μ m, 25 centimetri x 4,6 milimetri J.T.Baker Inc., Phillipsburg, NJ, catalogul nr. 7406-00, serial nr. 09-29-10320) cu un debit de fluid de 0,8 mililitri pe minut de alcool izopropilic (grad pentru cromatografiere lichidă de înaltă performanță HPLC, Fisher Scientific, Inc. cat nr. A-451-4) și detecția în ultraviolet la 262 nm, enantiomerii compusului FTC prezintă timp de retenție de 5,9 minute ((-)-FTC) și 9,8 minute ((+)-FTC)

III. Abilitatea compusului 2-hidroxi-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolan



("FTC") de a inhiba replicarea virusului HIV

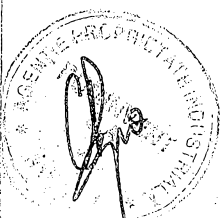
Deseori este de dorit efectuarea screening-ului unui număr de amestecuri racemice de nucleozide ca o fază preliminară pentru determinarea dacă se justifică în continuare separarea ulterioară în componentele îmbogățite enantiomeric și o evaluare ulterioară a activității antivirale. Capacitatea nucleozidelor de a inhiba virusul imunodeficienței uman HIV poate fi măsurată prin tehnici experimentale diverse. Tehnicile utilizate în prezenta invenție și care sunt descrise în detaliu în continuare, măsoară inhibarea replicării virale în fitohemaglutinină (PHA) în celulele mononucleare sanguine periferice umane stimulate (PBM) cu fitohematoglutinină (PHA) infectate cu HIV-1 (tulpina LAV). Cantitatea de virus produsă este determinată prin măsurarea enzimei revers transcriptază pe virusul codificat. Cantitatea de enzimă produsă este proporțională cu cantitatea de virus produs. Tabelul 3 prezintă valorile EC_{50} (concentrația nucleozidei care inhibă replicarea virusului la 50% din celulele mononucleare sanguine periferice umane stimulate (PBM) estimate cu un factor de eroare de 10%) și valorile IC_{50} (concentrația nucleozidei care inhibă 50% dezvoltarea celulelor mononucleare sanguine periferice umane mitogen-stimulate (PBM) neinfectate) a unui număr de ($\pm$)-1,3-oxatiolan și nucleozide.

Exemplul 6: Activitatea anti-HIV a ($\pm$)-1,3-oxatiolan nucleozidelor.

A. Celulele PBM fitohemaglutinin stimulate, de 3 zile ca vârstă (10^6 celule per mililitru) de la donori sănătoși seronegativi față de HIV-1 și față de virusul B al hepatitei, sunt infectate cu HIV-1 (tulpina LAV) la o concentrație de aproximativ 100 ori doza care infectează 50% cultura tisulară (TICD) per mililitru și acestea se cultivă în prezența și absența diferitelor concentrații ale compușilor antivirali.

B. La aproximativ o oră după infectare, mediul cu compusul care trebuie testat (de 2 ori concentrația finală în mediu) sau fără compus, se adaugă în flacoane (5 mililitri, având volumul final de 10 mililitri). Se utilizează AZT ca un martor pozitiv.

C. Celulele sunt expuse virusului (aproximativ 2×10^5 dpm/mililitru, așa cum s-a determinat prin analiza revers transcriptazei) și apoi sunt plasate într-un incubator cu CO_2 . HIV-1 (tulpina LAV) se obține de la Centrul de Control al Bolilor din Atlanta, Georgia. Metodele utilizate pentru cultivarea celulelor PBM, recoltarea virusului și determinarea activității revers transcriptazei, sunt cele descrise de către Mc Dougal și



colab., (*J. Immun. Meth.* 76, 171-183, 1985) și Spira și colab., (*J. Clin. Meth.* 25, 97-99, 1987) exceptând faptul că fungizona nu s-a inclus în mediu (vezi Schinazi și colab., *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1784-1787 (1988); Id 34: 1061-1067 (1990)).

D. În ziua a 6-a, celulele și supernatantul sunt transferate într-un tub de 15 mililitri și centrifugate la aproximativ 900 g, timp de 10 minute. Cinci mililitri de supernatant sunt îndepărtați și virusul este concentrat prin centrifugare la 40000 rotații pe minut timp de 30 de minute (Beckman 70, 1 Ti rotor). Peleta cu virus solubilizat, este prelucrată pentru determinarea nivelelor de revers transcriptază. Rezultatele sunt exprimate în dpm/mililitru de probă de supernatant. Virusul din volumele mai mici de supernatant (1 mililitru) poate fi așadar concentrat prin centrifugare înainte de solubilizare și determinarea nivelelor revers transcriptazei.

Concentrația mediană eficientă (EC_{50}) este determinată prin metoda efectului median (*Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 491-498 (1986)). Pe scurt, procentul de inhibiție al virusului așa cum a fost determinat din măsurătorile revers transcriptazei, este reprezentat grafic față de concentrația micromolară a compusului. EC_{50} este concentrația compusului la care există o inhibare de 50% a dezvoltării virale.

E. Celulele PBM umane neinfectate stimulate mitogen ($3,8 \times 10^5$ celule per mililitru), sunt cultivate în prezența și în absența medicamentului în condiții similare cu cele utilizate pentru analiza antivirală descrisă mai sus. Celulele sunt numărate după 6 zile, utilizându-se un hemacitometru și metoda de excluziune cu Trypan Blue, așa cum s-a descris de către Schinazi și colab., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 22 (3), 499 (1982). Valoarea IC_{50} este concentrația compusului care inhibă 50% din creșterea normală a celulelor.

Tabelul 3

EC_{50} și IC_{50} la diferiții analogi de 1,3-oxatiolan nucleozide în celulele umane PBM

Cod	X sau Y	R	Citotoxicitate antivirală	
			EC_{50} , μM	IC_{50} , μM
DLS-009	X=O	H	>100	>100
DLS-010	X=O	Me	64,4	>100

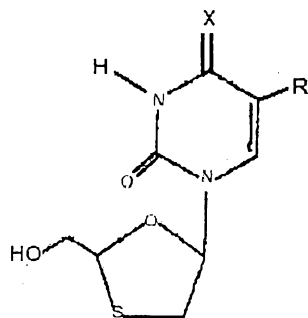


DLS-027	X=O	F	>100	>100
DLS-028	X=O	Cl	60,8	>100
DLS-044	X=O	Br	>100	>100
DLS-029	X=O	I	>100	>100
DLS-020	Y=NH ₂	H	0,02	>100
DLS-011	Y=NH ₂	Me	>10	>100
DLS-022	Y=NH ₂	F	0,1	>100
DLS-023	Y=NH ₂	Cl	38,7	>100
DLS-021	Y=NH ₂	Br	77,4	>100
DLS-026	Y=NH ₂	I	0,72	>100
DLS-058(-)	Y=NH ₂	F	0,008	>100
DLS-059(+)	Y=NH ₂	F	0,84	>100
DLS-053	Y=NH ₂	CF ₃	60,7	>100

Aşa cum s-a indicat în tabelul 3, în general, nucleozidele citozin 1,3-oxatiolan substituite sunt mult mai active decât nucleozidele uracil corespunzătoare. Erorile în măsurătorile EC₅₀ şi IC₅₀ sunt estimate la ±10%.

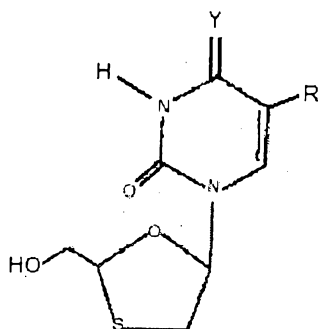
Unul dintre compuşi (±)-FTC (menţionat ca compusul 8 "DLS 022") prezintă nu numai o activitate excepţională (de aproximativ 10 nM în celule PBM), ci şi o toxicitate foarte scăzută (>100 µm în celule PBM, Vero şi CEM).

IC₅₀ ale (±)-FTC sunt peste 100 µM, indicând că, compusul nu este toxic în celulele PBM neinfectate evaluate până la 100 µm.



sau

Cod. 12. 58. 5. 4. 1)



Exemplul 7: Activitatea antivirală a enantiomerilor compusului FTC, separat prin HPLC.

Enantiomerii compusului FTC sunt izolați prin metoda din exemplul 4 și activitatea antivirală este evaluată prin metoda din exemplul 6. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4 și ilustrate în figura 5.

Tabelul 4

Activitatea antivirală a enantiomerilor (+) și (-) ai FTC

Concentrația de tratament μM		DPM/ml	%Inhibiție (corectată)	EC_{50} μM
FTC (+)	0,0001	73,755	26,6	0,018
	0,005	83,005	16,3	
	0,01	60,465	41,3	
	0,05	34,120	70,4	
	0,1	14,160	92,4	
	0,5	18,095	88,1	
	1	7,555	99,7	
	5	7,940	99,3	
FTC (-)	10	5,810	101,7	
	0,001	76,275	23,8	0,02
	0,005	58,590	43,3	
	0,01	75,350	24,8	
	0,05	28,890	76,20	

Cc

	0,1	13,175	93,5	
	0,5	9,485	97,6	
FTC(+)	0,001	94,340	3,8	0,28
	0,005	107,430	-10,6	
	0,01	99,465	-1,8	
	0,05	87,120	11,8	
	0,1	86,340	12,7	
	0,5	33,225	71,4	

Aşa cum este indicat în tabelul 4, în acest experiment enantiomerul (-) al compusului FTC pare să fie mai activ cu aproximativ un ordin de mărime decât enantiomerul (+) al compusului FTC și are aproximativ aceeași activitate anti-HIV ca a amestecului racemic. Nici enantiomerii și nici amestecul racemic nu au toxicitate, până la 100 μM așa cum s-a măsurat prin metoda de excluziune Trypan Blue în celulele umane PBM.

Exemplul 8: Activitatea antivirală a enantiomerilor FTC separați prin metoda din exemplul 3.

Enantiomerii ($\pm$)-FTC sunt așadar separați prin metoda din exemplul 3 și activitatea antivirală este evaluată prin metoda din exemplul 6. Rezultatele sunt ilustrate în figura 6. Așa cum s-a indicat în figura 6, EC_{50} a amestecului racemic al compusului FTC are valoarea de 0,017 μM , EC_{50} a compusului (-)-FTC la 0,0077 μM și EC_{50} a compusului (+)-FTC la 0,84 μM .

Exemplul 9: Absorbția (+)-FTC în celulele PBM umane.

Au fost efectuate studii utilizând compusul FTC radiomarcant, pe următoarele profile intracelulare ale medicamentului de origine și pe metaboliții detectați în celule. Toate studiile au fost conduse în duplicat. Celulele mononucleare sanguine periferice umane (celulele PBM) au fost suspendate în RPML1640 mediul conținând 10% ser de vițel fetal și antibiotice (2×10^6 celule pe mililitru), 10 mililitri per timpul fixat și incubate cu adăugare de 10 μM FTC (activitate specifică de aproximativ 700 dpm/pmol) Celulele sunt expuse apoi medicamentului timp de 2, 6, 12 și 24 ore. La acești timpi fixați, mediul este



separat și celulele sunt spălate de două ori cu o soluție de sare, răcită, Hank, echilibrată. Extracția este efectuată cu adădire de 0,2 mililitri de 60% metanol/apă rece și se menține până a doua zi la temperatura de -70°C . În următoarea dimineață, suspensiile sunt centrifugate și extracțiile sunt repetate de două ori, timp de 0,5 ore la temperatura de -70°C . Supernatanții totali (0,6 mililitri) sunt liofilizați până la sec. Reziduurile sunt resuspendate în 250 microlitri de apă și părțile alicote cuprinse între 50 și 100 microlitri sunt analizate prin cromatografie lichidă de înaltă performanță HPLC. Analiza cantitativă a medicamentului de origine intracelular și a derivaților metabolici este condusă prin cromatografie lichidă de înaltă performanță HPLC. Deoarece unii dintre acești compuși au o labilitate acidă potențială, sistemul tampon apropiat de pH-ul fiziologic este utilizat pentru separarea metaboliților.

Figura 7 reprezintă un grafic al prezenței (consum) compușilor ($\pm$)-FTC tritiați în celule PBM umane (media a două determinări) în timp (ore) față de $\text{pmol}/10^6$ celule. Studiile de consum indică faptul că, compusul FTC radiomarcant este deja absorbit în limfocitele umane, care produc cantități foarte mari de derivat 5'-trifosfat al compusului FTC.

Exemplul 10. Activitatea antiretrovirală a compusului FTC în diferite linii celulare

Activitatea antiretrovirală a compusului FTC este măsurată într-un număr de linii celulare utilizându-se proceduri asemănătoare, dar nu identice cu cele menționate în exemplul 6. Liniile celulare sunt obținute fie de la donori umani, fie de la AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH, Rockville, Maryland, ATCC sau Red Cross. Celulele deficiente în timidin kinază CEM sunt preparate prin trecerea secvențială a celulelor CEM în prezența 5-brom-2'-dezoxiuridinei. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 5.

Tabelul 5

Activitatea antiretrovirală a FTC, în diferite sisteme celulare

Sistemul celular (tulpina de virus)	EC_{50} (μM (+) - FTC
HIV-1	
PBMC (LAV-1)	0,027
MT2 (HTLV ₁₁₁₈)	0,89



C

CEM (LAV-1)	0,08
CEM-TK ⁽⁺⁾ (LAV-1)	0,026
CEM (HTLV ₁₁₁₈) NTH	0,09
HIV-2	
PBMC (ROD2)	0,0038(±)-FTC 0,0007(-)-FTC 0,026(+)-FTC
SIV	
AA-2 (SIV251)	4,6
C-8166 (SIV251)	<8,0
FIV	
CrFK (61E)	≤1

Exemplul 11: *leşirea compuşilor (±)-FTC din celulele PBM umane.*

Au fost efectuate studii care au utilizat compusul FTC radiomarcant, pentru a urmări profilele intracelulare ale medicamentului de origine şi metaboliţii detectaţi în celulă după incubare în mediul cu medicament timp de 24 ore, după care se îndepărtează medicamentul. Acest studiu măsoară timpul necesar pentru ca nivelele intracelulare ale trifosfaţilor, să scadă. Studiile sunt realizate în duplicat. Celulele neinfectate (2×10^6 mililitri), sunt suspendate într-un mediu corespunzător suplimentat cu ser (10 mililitri per timpul fixat) şi incubate la temperatura de 37°C în incubatorul cu 5% CO₂. Concentraţia compusului FTC radiomarcant este de 10 µM. După pulsaţia celulelor cu compusul marcat un timp de 24 ore, celulele sunt spălate temeinic şi apoi sunt umplute cu mediu proaspăt fără medicamente antivirale (0 ore). La 0, 2, 4, 6, 12, 24 şi 48 de ore (timpul de incubare secundar), celulele sunt îndepărtate şi apoi sunt imediat extrase cu un amestec rece de metanol/apă de 60%. Extractele sunt obţinute prin centrifugarea şi îndepărtarea peletelor celulare. Extractele sunt liofilizate şi apoi sunt păstrate la temperatura de -70°C. Înainte de analiză, materialul este resuspendat în 250 microlitri de amestec tampon pentru HPLC. Analiza cantitativă a medicamentului de origine intracelular şi a derivaţilor metabolici este efectuată prin cromatografie lichidă



de înaltă performanță FPLC, utilizându-se fie un Micrometrics, sau un sistem HPLC 1090 model Hewlett-Packard, cu o coloană de schimbători anionici de tip Partisil 10 SAX (Whatman Inc.) cu un debit al fluidului de 1 mililitru per minut, la o presiune de 0,07 kg/cm² (1 kpsi), cu o detecție în ultraviolet la 262 nm. Faza mobilă constă din apa neionozată (A), 2 mM NaH₂PO₄/16 mM NaOAc (pH=6,6) (B), 15 mM NaH₂PO₄/120,2 mM NaOAc (pH=6,6) (C) și 100 mM NaH₂PO₄/800 mM NaOAc (pH=6,6) (D).

Metoda de separare: izocratic pentru 5 minute cu A, urmat de gradient linear 15 minute până la 100% B, urmat de gradient linear 20 de minute până la 100% C, urmat de gradient linear 10 minute până la 100% D, urmat de izocratic 30 de minute cu 100% D.

Timpii de retenție (minute) în celulele umane

Compusul	Neschimbat	Monofosfat	Difosfat	Trifosfat
(±)-FTC	5,0	39,0	55,0	68,0

Figura 8 este o reprezentare grafică a ieșirii compuşilor (±)-FTC marcat din celulele PBM umane, măsurată în ore după îndepărtarea medicamentului față de concentrația (pmol/10⁶ celule). Așa cum este indicat în această figură, FTC-trifosfatul are o perioadă de înjumătățire intracelulară de aproximativ 12 ore și poate fi ușor detectat intracelular la concentrațiile de 1-5 μM la 48 ore după îndepărtarea medicamentului extracelular care este valoarea de mai sus EC₅₀ pentru acest compus. În continuare, afinitatea (K¹) pentru (±)-FTC trifosfat utilizând HIV RT este de 0,2 μM, care este sub nivelul concentrației la 48 de ore.

Exemplu 12. Activitatea anti-HIV a derivaților acceptabili farmaceutic a compuşilor (±)-FTC.

a. Numărul de derivați acceptabili din punct de vedere farmaceutic ai compusului (±)-FTC preparați prin derivatizarea pozițiilor 5' și N⁴ se evaluează pentru activitatea anti-HIV în celulele PBM, utilizând un procedeu asemănător cu cel descris în exemplul 6. Rezultatele sunt după cum urmează. Esterul 5'-O-butirat al compusului (±)-FTC prezintă o valoare a EC₅₀ de 0,0017. Derivatul N⁴-acetil al compusului (±)-FTC prezintă o valoare a EC₅₀ de 0,0028. N⁴-esterul 5'-O-butirat al compusului (±)-FTC prezintă o valoare a EC₅₀ de 0,0058.



b. Activitatea anti-HIV a esterului 5'-O-butirat al compusului ($\pm$)-FTC în sistemul MT4(EC_{50}) este de 0,04 μ M. În aceeași analiză compusul neacilat ($\pm$)-FTC prezintă o valoare a IC_{50} de 0,52 μ M. Valoarea IC_{50} pentru AZT în acest sistem este de 0,09 μ M.

V. Abilitatea compusului FTC de inhibare a replicării HBV.

Exemplul 13. *Evaluarea activității enantiomerilor (+) și (-) ai FTC în culturile celulare 2.2.15.*

Abilitatea enantiomerilor compusului FTC de inhibare a dezvoltării virusului în culturile celulare 2.2.15 (celulele HepG2 transformate cu virionul hepatitei) este descrisă în detaliu mai jos. Au fost descrise un sumar și o descriere a analizei pentru efectele antivirale în acest sistem de cultură și analiza acidului dezoxiribonucleic ADN în virusul hepatitei B (Korba și Milman, 1991, *Antiviral Res.*, 15:217). Evaluările antivirale sunt efectuate pe două pasaje separate de celule. Toate godeurile din toate plăcile sunt însămânțate cu aceeași densitate și în același timp.

Parametrii de analiză. Datorită variațiilor inerente în nivelele de HBV DNA intracelular și extracelular, numai depresiunile mai mari de 3,5 ori (pentru acidul dezoxiribonucleic ADN al virionului HBV) sau de 3,0 ori (pentru intermediarii de replicare ai acidului dezoxiribonucleic ADN la HBV) de la nivelele medii pentru aceste forme de ADN la HBV, care se formează în celulele netratate, sunt considerate a fi semnificativ statistic. ($P < 0,05$). Nivelele de acid dezoxiribonucleic ADN integrat la virusul hepatitei B HBV la fiecare preparare de acid dezoxiribonucleic ADN celular (care rămâne constant, raportat la o pereche celule, în aceste experimente), se utilizează pentru calcularea nivelelor formelor de acid dezoxiribonucleic ADN intracelular al HBV, asigurându-se astfel că între probele separate au fost comparate cantități egale de acid dezoxiribonucleic ADN celular.

Valorile tipice pentru acidul dezoxiribonucleic ADN al virionului HBV extracelular în celulele netratate, sunt cuprinse între 50 și 150 pg/mililitru de mediu de cultură (media a aproximativ 76 pg/mililitru). Intermediarii de replicare ai acidului dezoxiribonucleic ADN la virusul HBV intracelular în celulele netratate sunt cuprinse între 50 și 100 pg/ μ g de acid dezoxiribonucleic ADN celular (media a aproximativ 74 pg/ μ g de acid dezoxiribonucleic ADN celular). În general, scăderile în nivelele de acid dezoxiribonucleic ADN al virusului HBV intracelular datorită tratamentului cu compuși



antivirali sunt mai puțin pronunțate și se produc mult mai încet decât scăderile în nivelele de acid dezoxiribonucleic ADN la virionul HBV (Korba și Milman, 1991, *Antiviral Res.*, 15:217).

Maniera în care analizele de hibridizare sunt realizate pentru aceste experimente a avut ca rezultat echivalența a aproximativ 1,0 pg de acid dezoxiribonucleic ADN HBV intracelular până la 2-3 copii genomice per celulă și 1,0 pg/mililitru de acid dezoxiribonucleic ADN la HBV extracelular până la 3×10^5 particule virale per mililitru.

Analiza toxicității. Analizele de toxicitate sunt realizate pentru a se stabili dacă efectele antivirale observate se datorează unui efect general privind viabilitatea celulară. Metoda utilizată în prezenta invenție a fost măsurarea absorbției colorației roșie naturală, o analiză standard și utilizată pe scară largă pentru viabilitatea celulară într-o varietate de sisteme gazdă pentru virusuri, incluzând HSV și HIV. Analizele de toxicitate sunt efectuate pe plăci de culturi de țesuturi plate la partea inferioară cu 96 de godeuri. Celulele pentru analizele de toxicitate sunt cultivate și tratate cu compușii de testat cu aceeași schemă descrisă mai jos pentru evaluările antivirale. Fiecare compus este testat la 4 concentrații, fiecare în culturi triplicat (godeuri "A", "B" și "C"). Absorbția colorantului roșu natural este utilizată pentru determinarea nivelului relativ al toxicității. Absorbanta colorantului internalizat la 510 nm (A_{sin}) este utilizată pentru analiza cantitativă. Valorile sunt prezentate ca procent al mediei valorilor A_{sin} în 9 culturi separate ale celulelor netratate menținute pe aceeași placă cu 96 de godeuri, ca și compușii de testat. Absorbția colorantului în cele 9 culturi de control pe placa 5 este cuprinsă între 91,6% până la 110,4% și pe placa 6 de la 96,6% până la 109%. Rezultatele sunt date în tabelul 6.

Tabelul 6

Analiza toxicității compușilor de testare în celulele 2.2.15

Discul	Compus	Conc. (μM)	Absorbția colorantului (% din control)		
			Godeu A	Godeu B	Godeu C
5	DMSO	10,0*	0,7	1,6	0,9
		3,3	55,9	68,7	61,7



		1,0	91,2	96,4	106,8
		0,3	98,7	102,9	93,5
6	(-)-FTC	300	53,0	51,1	51,5
		100	64,1	66,6	77,6
		30	98,7	94,3	96,4
		10	94,3	94,9	92,2
6	(+) -FTC	300	43,4	56,7	58,5
		100	77,7	66,3	72,1
		30	81,1	88,3	88,1
		10	90,9	99,4	90,5

* pentru DMSO, concentrațiile sunt prezentate ca procente de soluție originală stoc.

Evaluarea toxicității. Așa cum s-a indicat în tabelul 6 nu s-a observat nici o toxicitate semnificativă (mai mare decât scăderea 50% a nivelelor de absorbție observate în celulele netratate) pentru compușii de testat la concentrațiile utilizate pentru evaluările antivirale. Ambii compuși de testat, (-)-FTC și (+)-FTC apar a fi toxici la concentrații mai ridicate utilizate pentru testele de toxicitate (330 μ M).

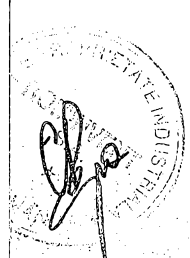
Evaluările antivirale.

Control.

În cadrul variațiilor normale, nivelele de acid dezoxiribonucleic ADN pentru virionul HBV și intermediarii de replicare HBV intracelular (HBV RI) rămân constante la celulele netratate peste perioada testată. DMSO la o concentrație de 1% nu afectează nivelele replicării HBV în culturile celulare 2.2.15.

Compușii de testare.

Așa cum s-a indicat în tabelul 7, ambii compuși (-)-FTC și (+)-FTC inhibă semnificativ replicarea HBV la nivelele de testare. Așa cum este indicat în tabelul 8, compusul (-)-FTC inhibă încă semnificativ sinteza acidului dezoxiribonucleic ADN la virionul HBV și sinteza acidului dezoxiribonucleic ADN la HBV intracelular la concentrațiile de 4,1 și 0,25 μ M.



Tabelul 7

Efectul compușilor de testat asupra producerii HBV în culturile celulare 2.2.15.

Godeu	Tratamentul	ADN la virion HBV* (pg/ml mediu de cultură)			ADN la HBV intracelu- lar (pg/μg ADN celular)	
		Ziua 0	Ziua 4	Ziua 9	MONO	RI
7A	Celule netratate	59	75	94	2,7	93
7B	Celule netratate	47	64	88	2,5	93
8A	Celule netratate	65	100	71	2,2	97
8B	Celule netratate	77	65	110	2,4	62
7K	DMSO @ 1,00%	100	50	48	1,9	95
7L	DMSO @ 1,00%	48	96	54	2,8	98
8K	DMSO @ 1,00%	93	63	68	2,2	86
8L	DMSO @ 1,00%	66	57	59	1,6	97
9U	(-)-FTC @ 10 μM	120	36	1	1,1	14
9V	(-)-FTC @ 10 μM	89	48	1	1,5	19
10U	(-)-FTC @ 10 μM	58	41	0,1	1,9	13
10V	(-)-FTC @ 10 μM	110	32	0,1	1,2	16
9W	(+)-FTC @ 10 μM	88	42	0,1	0,8	14
9X	(+)-FTC @ 10 μM	58	57	0,2	0,4	19
10W	(+)-FTC @ 10 μM	69	55	0,1	0,7	17
10X	(+)-FTC @ 10 μM	45	39	0,1	0,4	15

*Senzitivitatea de separare pentru ADN la virionul HBV este de 0,1 pg/ml.

@ ADN HBV intracelular a fost analizat 24 de ore urmând după a 9-a zi de tratament. Nivelele de ADN HBV integrat în fiecare preparare a ADN celular sunt utilizate pentru calcularea nivelelor genomelor HBV episomale 3,2 kb (MONO.) și a intermediarilor (RI) de replicare a acidului dezoxiribonucleic ADN în cazul virusului HBV.



Tabelul 8

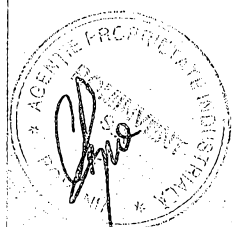
Efectul compuşilor de testat asupra producerii HBV în culturile celulare 2.2.15.

Go-deu	Tratamentul	ADN la virion HBV* (pg/ml mediu de cultură)			ADN la HBV intracelu-lar* (pg/µg ADN celular)	
		Ziua 0	Ziua 4	Ziua 9	MONO.	RI
31A	Celule netratate	64	54	65	2,8	65
31B	Celule netratate	51	54	77	2,0	53
32A	Celule netratate	100	76	56	3,5	81
32B	Celule netratate	53	97	83	3,1	68
35A	(-)-FTC @ 4 µM	74	27	>0,1	1,4	1
35B	(-)-FTC @ 4 µM	87	28	>0,1	0,5	1
36A	(-)-FTC @ 4 µM	120	20	1	0,9	1
36B-	(-)-FTC @ 4 µM	59	16	0,2	0,2	2
35C	(-)-FTC @ 1 µM	70	13	>0,1	1,7	2
35D	(-)-FTC @ 1 µM	62	15	>0,1	1,2	3
36C	(-)-FTC @ 1 µM	60	22	1	1,4	2
36D	(-)-FTC @ 1 µM	89	28	0,3	1,5	4
35E	(-)-FTC @ 0,25 µM	84	15	>0,1	1,5	4
35F	(-)-FTC @ 0,25 µM	89	16	4	2,2	4
36E	(-)-FTC @ 0,25 µM	66	13	1	1,8	8
36F	(-)-FTC @ 0,25 µM	49	19	0,1	0,3	9

*Senzitivitatea de separare pentru acidul dezoxiribonucleic ADN la virionul HBV este de 0,1 pg/ml.

+ Analiza ADN HBV intracelular a fost la 24 de ore urmând după a 9-a zi de tratament. Nivelele de ADN HBV integrat în fiecare preparare a ADN celular sunt utilizate pentru calcularea nivelelor genomelor HBV episomale 3,2 kb (MONO) şi a intermediarilor (RI) de replicăţie a acidului dezoxiribonucleic ADN în cazul virusului HBV.

Exemplul 14: Absorbţia (±)-FTC în celulele ficatului uman: activitatea HBV asupra compusului FTC.



Procedeul din exemplul 9 este repetat cu celulele din ficatul uman (celulele HepG2, disponibile de la ATCC) pentru determinarea absorbției și metabolismului compusului FTC în aceste celule. Așa cum s-a arătat în figura 9, compusul (±)-FTC este absorbit de către celulele HepG2 în cantități mari. Aceste celule din ficatul uman metabolizează un procentaj mare de (±)-FTC până la (±)-FTC trifosfat.

Aceste date, în conjuncție cu alte date prevăzute în prezenta invenție, arată că (±)-FTC ca și enantiomerii (-) și (+) ai acestui compus, sunt fosforilați în celulele din ficat. Aceste celule pot fi transformate cu virusul hepatitei B.

Exemplul 15: *Ieșirea compusului FTC din celulele umane HepG2.*

Figura 10 ilustrează ieșirea compusului [^3H]- (±)-FTC și a derivaților fosforilați ai acestuia în HepG2 uman în pmol/ 10^6 celule în timp, după pulsarea celulelor cu $10\text{ }\mu\text{M}$ [^3H]- (±)-FTC (700 DPM/pmol) pentru 24 de ore și evaluarea concentrației compusului la 24 ore după separare.

Figura 11 ilustrează descreșterea în concentrație combinată a [^3H]- (±)-FTC și a derivaților fosforilați ai acestui compus, din celulele umane HepG2 după incubare cu $10\text{ }\mu\text{M}$ [^3H]- (±)-FTC (700 DPM/pmol) timp de 24 de ore, în celule pmol/ 10^6 în timp.

Așa cum se ilustrează, chiar la 48 de ore, mai mult decât $1\text{ }\mu\text{M}$ din compusul activ (care este semnificativ mai mare decât EC_{50} pentru compus) este încă prezent în celule.

V. Toxicitatea în celulele precursorare granulocit-macrofage.

Exemplul 16: *Efectul compusului FTC asupra formării coloniei de celule precursorare granulocit-macrofage.*

Figura numărul 12 este o reprezentare grafică a efectului enantiomerilor (+) și (-) ai compusului FTC asupra formării coloniei de celule precursorare granulocite-macrofage, așa cum s-a măsurat în procente de supraviețuire în raport cu concentrația în μM de (-)-FTC în cerc deschis; (+)-FTC în cerc închis; AZT pătrat închis. Așa cum s-a indicat, enantiomerul (-) al compusului FTC pare să fie mai puțin toxic, de exemplu acesta are o valoare mai mare pentru IC_{50} , fie decât enantiomerul (+) sau AZT în această linie celulară.

VI. Farmacocinetica compusului FTC.

Exemplul 17: *Metabolismul compusului FTC la administrarea la șobolani.*



Cö

Compusul ($\pm$)-FTC este administrat intravenos în doze de 10,50 și 100 miligrame per kilogram la șobolani. Au fost evaluate suprafața sub curba concentrația medicamentului în plasmă în raport cu timpul (AUC), clearance total (CL_T), volumul în regim staționar al distribuției (V_{ss}), timpul mediu de staționare (MRT) și perioada de înjumătățire ($t_{1/2}$). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 9.

Tabelul 9

Parametrii farmacocinetici ai FTC după administrarea intravenoasă a 10, 50, 100 miligrame per kilogram la șobolani

Doza	AUC	CL_T	V_{ss}	MRT	$t_{1/2}$
mg/kg	mg h/L	L/h/kg	L/kg	h	h
10	9,65	0,988	0,758	0,768	0,757
50	57,11	0,874	0,699	0,800	0,815
100	120,72	0,830	0,663	0,798	0,969

*AUC = suprafața sub curba concentrație medicament în plasmă în raport cu timpul; CL = eliberare totală; V_{ss} = volum în regim staționar a distribuției; MRT = timp mediu de staționare (clearance) și $t_{1/2}$ = perioadă de înjumătățire.

Exemplul 18. Parametrii farmacocinetici pentru FTC după administrarea orală și intravenoasă a compusului FTC.

Parametrii farmacocinetici cu model independent sunt derivați pentru ($\pm$)-FTC prin administrarea (intravenoasă (i.v.) și orală (p.o.)) a 33,3 miligrame/kilogram la maimuțe rhesus. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 10. Important este că biodisponibilitatea medie a compusului la maimuțe este de 73% ($\pm$ 6%).

Tabelul 10

Parametrii farmacocinetici cu model independent derivați pentru FTC după administrarea intravenoasă (i.v.) sau orală (p.o.) a 33,3 miligrame/kilogram la maimuțele rhesus*

Maimuța	AUC mg h/L	CL _T L/h/kg	V _{ss} L/kg	MRT h	t _{1/2} h	K _a h ⁻¹	F %
I.V.							
Ruh	19,14	1,74	2,71	1,56	1,28		
Rmi	26,31	1,26	1,97	1,56	1,22		
RJd	22,51	1,48	2,00	1,36	1,47		
Media	22,65	1,49	2,23	1,49	1,32		
±S.D.	3,59	0,24	0,42	0,12	0,13		
P.O.							
Ruh	13,21			2,07	1,58	0,48	71
Rmi	21,11			2,32	1,08	0,43	80
Rjd	15,29			3,23	1,47	0,31	68
Media	16,54			2,54	1,38	0,41	73,00(±6)
S.D.	4,09			0,61	0,26	0,09	6,24

*AUC = suprafața sub curba concentrației de medicament în plasmă în timp; CL = eliberare totală; Vss = volum în regim staționar a distribuției; MRT = timp mediu de staționare și t_{1/2} = perioadă de înjumătățire; F = biodisponibilitate; și K_a = constanta de ordin întâi a vitezei de absorbție.

Tabelul 11

Raportul CSF/ser al compusului FTC și metabolitul dezaminat al acestui compus la 1 oră după tratament

Maimuța	Calea	FTC	Metabolitul (FTU)
RUh	I.V.	0,076	0,024
RMi	I.V.	0,062	0,032

2000 (12.10mm)

RJd	I.V.	0,162	0,052
Media		0,100	0,036
±S.D.		0,054	0,014
RUh	P.O.	0,048	0,026
RMi	P.O.	0,039	0,037
RJd	P.O.	0,117	0,055
Media		0,068	0,039
±S.D.		0,043	0,015

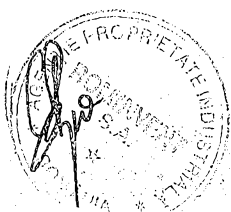
Exemplul 19. Raportul CSF/ser al compusului FTC și metaboliții acestuia la maimuțele rhesus.

Capacitatea compușilor (±)-FTC de a traversa bariera hematoencefalică a fost evaluată prin administrarea a 33,3 miligrame per kilogram din compusul activ la maimuțele Rhesus și prin măsurarea cantității de compus (±)-FTC în fluidul cerebrospinal (CSF) și în ser sanguin la o oră după administrare. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 11. Datele arată că, o cantitate semnificativă din compusul activ trece bariera hematoencefalică la acest mamifer.

VII. Prepararea compozițiilor farmaceutice.

Oamenii care suferă de boli cauzate de o infecție cu virusul hepatitei B HBV sau cu virusul imunodeficienței HIV, pot fi tratați prin administrarea la pacient a unei cantități eficiente din compusul (±)-FTC sau enantiomerii (-) sau (+) ai acestui, compus, sau dintr-un derivat sau o sare a acestui compus acceptabili din punct de vedere farmaceutic, în prezența unui vehicul sau a unui diluant acceptabil din punct de vedere farmaceutic. Materialele active pot fi administrate pe orice cale convenabilă, ca de exemplu pe cale orală, parenterală, intravenoasă, intradermală, subcutanată sau topică, sub formă lichidă sau solidă.

Compusul activ este inclus într-un vehicul sau un diluant acceptabil din punct de vedere farmaceutic, într-o cantitate suficientă pentru a se elibera către pacient o cantitate eficientă terapeutic din compusul care inhibă replicare virală *in vivo*, în special în cazul replicării virusurilor HIV și HBV, fără să cauzeze efecte toxice serioase la



pacientul tratat. Prin "cantitate inhibitoare" se înțelege cantitatea de ingredient activ care este suficientă pentru a exercita un efect de inhibare, așa cum s-a măsurat, de exemplu, prin analiza efectuată așa cum s-a menționat mai înainte.

O doză preferată de (-), (+) sau ($\pm$)-FTC pentru toate condițiile menționate mai înainte, se va situa în intervalul de la aproximativ 1 la 50 miligrame per kilogram, de preferință 1 până la 20 miligrame per kilogram greutate corporală pe zi, mult mai general 0,1 până la aproximativ 100 miligrame per kilogram greutate corporală a organismului care primește doza, pe zi. Intervalul de dozaj efectiv al derivaților acceptabili din punct de vedere farmaceutic, poate fi calculat pe baza greutății nucleozidei de origine care trebuie să fie eliberată. Dacă derivatul prezintă el însuși activitate, dozajul efectiv poate fi estimat ca mai sus, utilizând greutatea derivatului sau prin alte mijloace cunoscute în literatura de specialitate.

Compusul este administrat în mod convențional în unități de orice formă de dozaj convenabilă, incluzând dar fără a se limita la acestea, de la 7 până la 3000 miligrame, de preferință de la 70 până la 1400 miligrame de ingredient activ per unitate de formă de dozare unitară. O dozare orală de la 50 la 1000 miligrame este convenabilă de obicei. În mod ideal, ingredientul activ va fi administrat astfel încât să se obțină vârful de concentrații ale compusului activ în plasmă de la aproximativ 0,2 până la 70 μ M, preferabil de la aproximativ 1,0 la 10 μ M. Aceasta poate fi obținută de exemplu, prin injectarea intravenoasă a unei soluții 0,1% până la 5% din compusul activ, opțional în soluție salină sau se administrează ca un bolus de ingredient activ.

Concentrația de compus activ în compoziția de medicament va depinde de vitezele de absorbție, inactivare și excreția medicamentului, ca și de alți factori cunoscuți în literatura de specialitate. Este de notat că, valorile de dozare vor varia și cu gradul de severitate a afecțiunii care trebuie să fie înlăturată. Trebuie în continuare să se înțeleagă că pentru oricare subiect particular, regimurile de dozaj specifice trebuie ajustate în timp conform nevoilor individuale și a judecății profesionale a persoanei care administrează sau supraveghează administrarea compozițiilor și ca intervalele de dozare stabilite în prezenta invenție să fie date numai ca exemple, fără a se intenționa limitarea la scopul sau la practica compoziției revendicate. Ingredientul activ poate fi administrat deodată sau poate fi divizat într-un număr de doze mai mici care să fie



Cc

st

administrare la diferite intervale de timp. Un mod preferat de administrare a compusului activ este calea orală. Compozițiile farmaceutice care pot fi administrate oral vor include în general un diluant inert sau un vehicul comestibil. Aceste compoziții pot fi incluse în capsule gelatinoase sau pot fi comprimate în tablete. Pentru scopul administrării terapeutice pe cale orală, compusul activ poate fi încorporat cu excipienții și utilizat sub formă de tablete, pastile sau capsule. Agenții lianți compatibili farmaceutic și/sau materialele adjuvante pot fi incluse ca o parte a compoziției. Tabletele, pilulele, capsulele, pastilele și alte forme asemănătoare pot conține oricare dintre ingredientele următoare sau compuși având o natură asemănătoare: un agent liant ca de exemplu celuloza microcristalină, guma tragacant sau gelatina; un excipient cum ar fi de exemplu amidonul sau lactoza, un agent de dezintegrare cum ar fi acidul alginic, primogelul sau amidonul de porumb; un lubrifiant cum ar fi de exemplu stearatul de magneziu sau Steroții; un glidant cum ar fi de exemplu dioxidul de siliciu coloidal; un agent de edulcorare cum ar fi de exemplu zaharoza sau zaharina sau un agent aromatizant, cum ar fi, de exemplu, menta, salicilatul de metil sau aromele de portocale. Când forma unității de dozare este capsula, aceasta poate conține în plus față de tipul de materiale menționate mai sus, un vehicul lichid cum ar fi de exemplu un ulei gras. În plus, formele unitare de dozare pot conține diferite alte materiale care să modifice forma fizică a unității de dozare, ca de exemplu acoperirile de zahăr, shellacul pentru drajefiere sau alte substanțe cu rol de agenți enterici.

(±)-FTC sau enantiomerii (-) sau (+) ai acestuia sau derivații sau sărurile acestuia acceptabili din punct de vedere farmaceutic pot fi administrate ca un component de elixir, suspensie, sirop, pișcot, gumă de mestecat sau alte forme asemănătoare. Un sirop poate conține în plus față de compușii activi, zaharoză sau un agent edulcorant și anumite substanțe cu rol de conservare, coloranți, vopsele și substanțe de aromatizare.

(±)-FTC sau enantiomerii (-) sau (+) sau derivații sau sărurile acestui compus acceptabile din punct de vedere farmaceutic, pot fi amestecate de asemenea cu alte materiale active care să nu stânjenească activitatea dorită sau cu alte materiale care să suplimenteze acțiunea dorită, cum ar fi antibioticele, substanțele antifungice, antiinflamatoare sau alte substanțe antivirale, incluzând alți compuși de nucleozide anti-

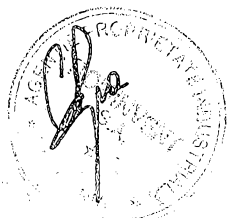


HIV.

Soluțiile sau suspensiile utilizate pentru aplicare parenterală, intradermică, subcutanată sau topică, pot include următoarele componente: un diluant steril cum ar fi apa pentru injecții, o soluție salină, uleiurile fixe, polietilen glicolii, glicerina, propilenglicolul sau alți solvenți sintetici; agenții antibacterieni cum ar fi, de exemplu, alcoolul benzilic sau metil parabenii; anti-oxidanții cum ar fi acidul ascorbic sau bisulfitul de sodiu; agenți de chelare ca, de exemplu, acidul etilendiaminotetraacetic, agenți de tamponare ca acetatii, citrații sau fosfații, agenți pentru redarea tonicității ca de exemplu clorura de sodiu sau dextroza. Preparatul original poate fi inclus în fiole, seringi dispozabile sau flacoane cu doze multiple fabricate din sticlă sau din material plastic.

Dacă administrarea este intravenoasă, se preferă vehicule din soluție fiziologică salină sau soluție salină tamponată cu fosfat (PBS). Într-o realizare preferată, compușii activi sunt preparați cu vehicule care vor proteja compusul față de eliminarea rapidă din organism, cum ar fi o formulare cu eliberare controlată, incluzând implantele și sistemele de eliberare microîncapsulate. Polimerii biocompatibili, biodegradabili pot fi utilizați de asemenea, cum ar fi, de exemplu, etilen vinil acetatul, polianhidridele, acidul poliglicolic, colagenul, poliortoesterii și acidul polilactic. Metodele pentru prepararea acestor formulări sunt evidente pentru persoanele de specialitate. Materialele pot fi și obținute comercial de la Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc.

Suspensiile lipozomale (incluzând lipozomii țintiți la celulele infectate cu anticorpi monoclonali, până la antigeni virali) sunt de asemeni preferați ca vehicule acceptabile din punct de vedere farmaceutic. Aceste suspensii pot fi preparate conform unor metode cunoscute persoanelor de specialitate, cum sunt de exemplu cele descrise în brevetul **US 4522811** (care sunt încorporate în întregime ca referințe, în prezenta invenție). De exemplu, formulările cu lipozomi pot fi preparate prin dizolvarea de lipide corespunzătoare (ca de exemplu stearoil fosfatidil etanolamina, stearoil fosfatidil colina, arachadoil fosfatidil colina, și colesterolul) într-un solvent anorganic care este apoi evaporat și care lasă în urmă un fir subțire de lipidă uscată pe suprafața containerului. O soluție apoasă din compusul activ sau derivații lui monofosfat, difosfat și/sau trifosfat sunt apoi introduși în container. Containerul este apoi răsucit manual, pentru a se elibera materialul lipidic de pe părțile laterale ale containerului și pentru a dispersa



agregatele lipide, obținându-se astfel o suspensie lipozomală.

Derivații monofosfați, difosfați și trifosfați ai compusului FTC pot fi preparați, așa cum se va descrie mai jos.

Monofosfatul, poate fi preparat conform procedeului dat de Imai și colaboratorii, din *J. Org. Chem.* 34 (6), 1547-1550 (June 1969). De exemplu, aproximativ 100 miligrame din compusul FTC și aproximativ 280 μ l de clorură de fosforil reacționează sub agitare în aproximativ 8 mililitri de acetat de etil uscat la aproximativ 0°C, timp de aproximativ patru ore. Reacția este oprită cu gheață. Faza apoasă este purificată pe o coloană de cărbune activ, iar eluarea se efectuează cu 5% hidroxid de amoniu într-un amestec de părți egale de etanol și apă. Prin evaporarea eluantului se obține FTC-5'-monofosfatul de amoniu.

Difosfatul poate fi preparat conform procedeului descris de către Davisson și colaboratorii în *J. Org. Chem.* 52 (9), 1794-1801 (1987). Difosfatul compusului FTC poate fi preparat din tosilatul corespunzător, care poate fi preparat, de exemplu, prin reacția nucleozidei cu clorura de tosil în piridină la temperatura camerei timp de aproximativ 24 de ore, prelucrând apoi produsul într-o manieră obișnuită (de exemplu prin spălare, uscare și cristalizarea produsului).

Trifosfatul poate fi preparat conform procedeului lui Hoard și colaboratorii, din *J. Am. Chem. Soc.* 87(8), 1785-1788 (1965). Compusul FTC este activat (fiind transformat în imidazolidă conform unor metode cunoscute în literatura de specialitate) și tratat cu tributil amoniu pirofosfat în dimetilformamidă DMF. Reacția duce în primul rând la formarea trifosfatului de nucleozidă, alături de cantități mici de monofosfaț și difosfat nereacționate. Purificarea prin cromatografie schimbătoare de anioni pe o coloană DEAE este urmată de izolarea trifosfatului, ca de exemplu sare tetrasodică.

Rețetă

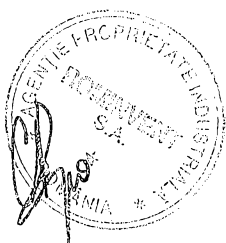
1. Procede

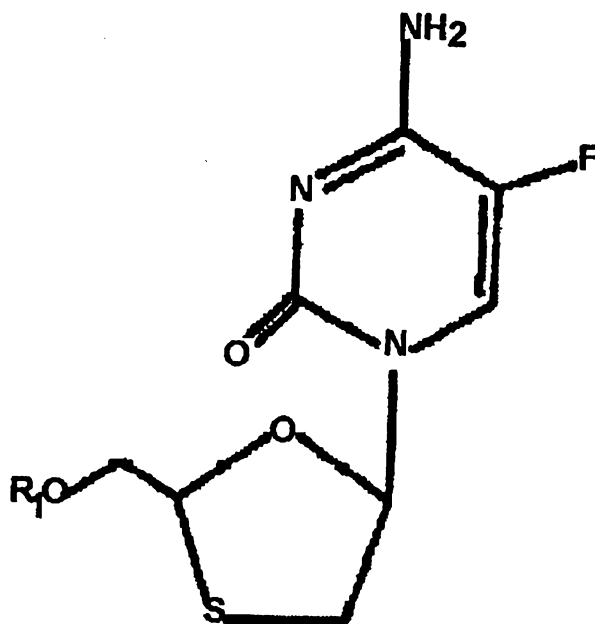
d



REVENDICĂRI

1. Derivați de 1,3-oxatiolan **caracterizați prin aceea că** ei sunt reprezentați de (-)-β-D-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan sau derivatul său acceptabil fiziologic, sau sarea lui acceptabilă fiziologic.
2. Derivați de 1,3-oxatiolan **caracterizați prin aceea că** ei sunt reprezentați de (-)-β-D-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan ca enantiomer izolat sau derivatul său acceptabil fiziologic, sau sarea lui acceptabilă fiziologic.
3. Derivați de 1,3-oxatiolan **caracterizați prin aceea că** ei sunt reprezentați de (-)-β-D-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan într-o formă îmbogățită enantiomeric, sau derivatul său acceptabil fiziologic, sau sarea lui acceptabilă fiziologic.
4. Derivați de 1,3-oxatiolan, conform cu revendicarea 1, **caracterizați prin aceea că** ei au următoarea formulă chimică structurală generală:





în care R_1 și R_2 sunt în mod independent, alchil, un ester de acid carboxilic în care fragmentul necarbonilic al grupării esterice este selectat din grupa constând din alchil linear, ramificat sau ciclic; alcoxialchil; aralchil; ariloxialchil; aril incluzând fenil opțional substituit cu halogen; alchil C_1 - C_4 sau alcoxi C_1 - C_4 ; ester sulfonat; alchil sau aralchil sulfonil; mono, di sau trifosfat ester sau ester de aminoacid; și unul dintre R_1 sau R_2 poate fi hidrogen.

5. Derivați de 1,3-oxatiolan, conform cu revendicarea 4, **caracterizați prin aceea că** R_1 și R_2 sunt în mod independent selectați din grupul constând din metil, etil, propil, butil, pentil, hexil, izopropil, izobutil, sec-butil, t-butil, izopentil, amil, t-pentil, 3-metilbutiril, hidrogen succinat, 3-clorobenzoat, ciclopentil, ciclohexil, benzoil, acetil, pivaloil, mesilat, propionil, butiril, valeril, caproic, caprilic, capric, lauric, miristic, palmitic, stearic, oleic, aminoacizi

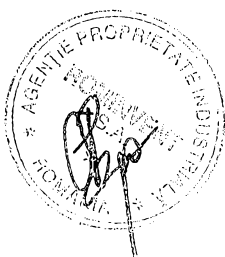
incluzând, dar fără a se limita la alanil, valinil, leucinil, izoleucinil, prolinil, fenilalaninil, triptofanil, metioninil, glicinil, serinil, treoninil, cisteinil, tirozinil, asparaginil, glutaminil, aspartoil, glutaoil, lizinil, argininil și histidinil, și unul dintre R_1 și R_2 poate fi hidrogen.

6. Derivați de 1,3-oxatiolan, conform cu revendicarea 5, **caracterizați prin aceea că** R_1 este n-propil și R_2 este hidrogen.
7. Compoziție farmaceutică, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde (-)- β -D-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan sau derivatul său acceptabil fiziologic, sau sarea lui acceptabilă fiziologic și un purtător acceptabil farmaceutic.
8. Compoziție farmaceutică, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde (-)- β -D-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan ca enantiomer izolat sau derivatul său acceptabil fiziologic, sau sarea lui acceptabilă fiziologic și un purtător acceptabil farmaceutic.
9. Compoziție farmaceutică, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde (-)- β -D-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan într-o formă îmbogățită enantiomeric, sau derivatul său acceptabil fiziologic, sau sarea lui acceptabilă fiziologic și un purtător acceptabil farmaceutic.
10. Compoziție farmaceutică conform revendicărilor 7 – 9, **caracterizată prin aceea că** purtătorul este adecvat pentru administrare orală.
11. Compoziție farmaceutică conform revendicărilor 7 – 9, **caracterizată prin aceea că** aceasta este sub formă de capsulă sau tabletă.
12. Metodă pentru tratarea infecției cu HIV la om, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde administrarea compusului (-)- β -D-2-hidroximetil-5-(5-



fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan sau derivatul său acceptabil fiziologic, sau sarea lui acceptabilă fiziologic într-o cantitate eficientă terapeutic.

13. Metodă pentru tratarea infecției cu HIV la om, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde administrarea compusului $(-)\text{-}\beta\text{-D-2-hidroxitetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan}$ ca enantiomer izolat sau derivatul său acceptabil fiziologic, sau sarea lui acceptabilă fiziologic într-o cantitate eficientă terapeutic.
14. Metodă pentru tratarea infecției cu HIV la om, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde administrarea compusului $(-)\text{-}\beta\text{-D-2-hidroxitetil-5-(5-fluorocitozin-1-il)-1,3-oxatiolan}$ într-o formă îmbogățită enantiomeric, sau derivatul său acceptabil fiziologic, sau sarea lui acceptabilă fiziologic într-o cantitate eficientă terapeutic.



()a. 1000. 51 10 2000 1000

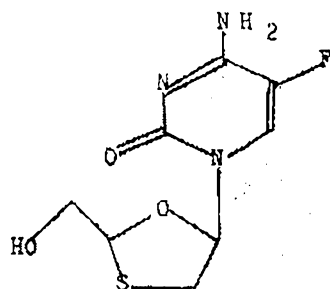


Fig. 1

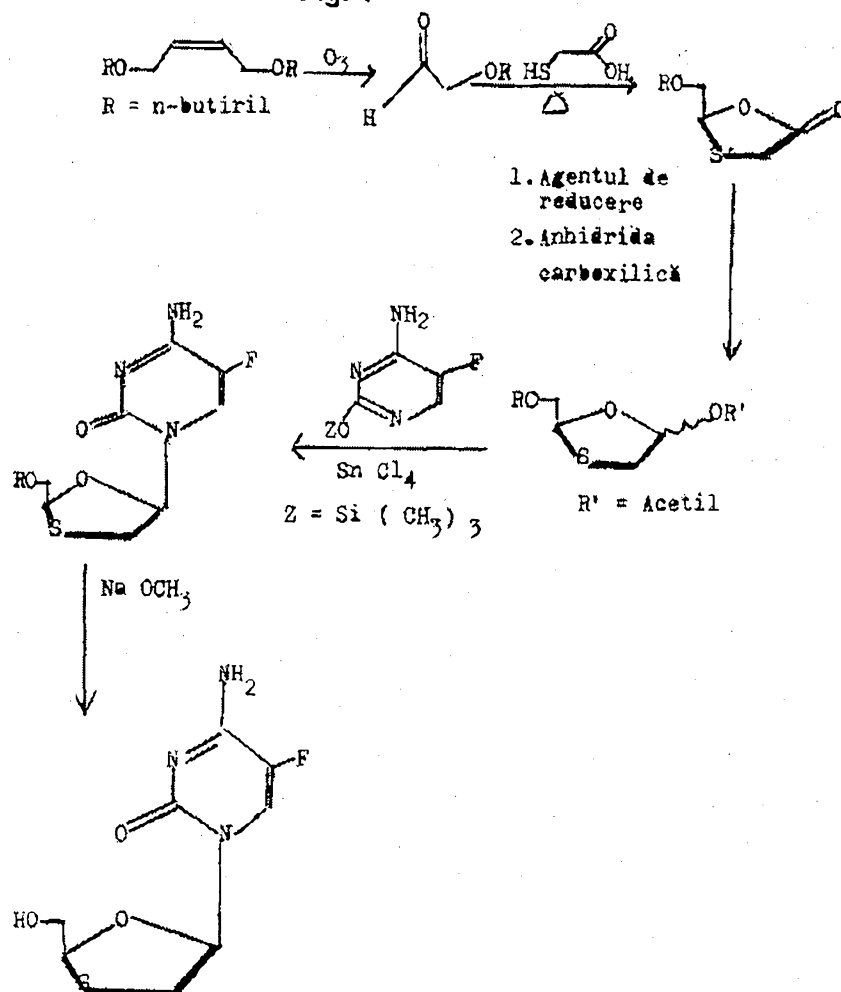
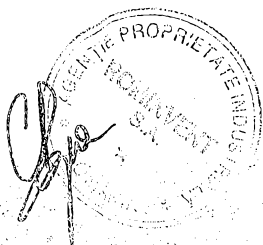


Fig. 2



119

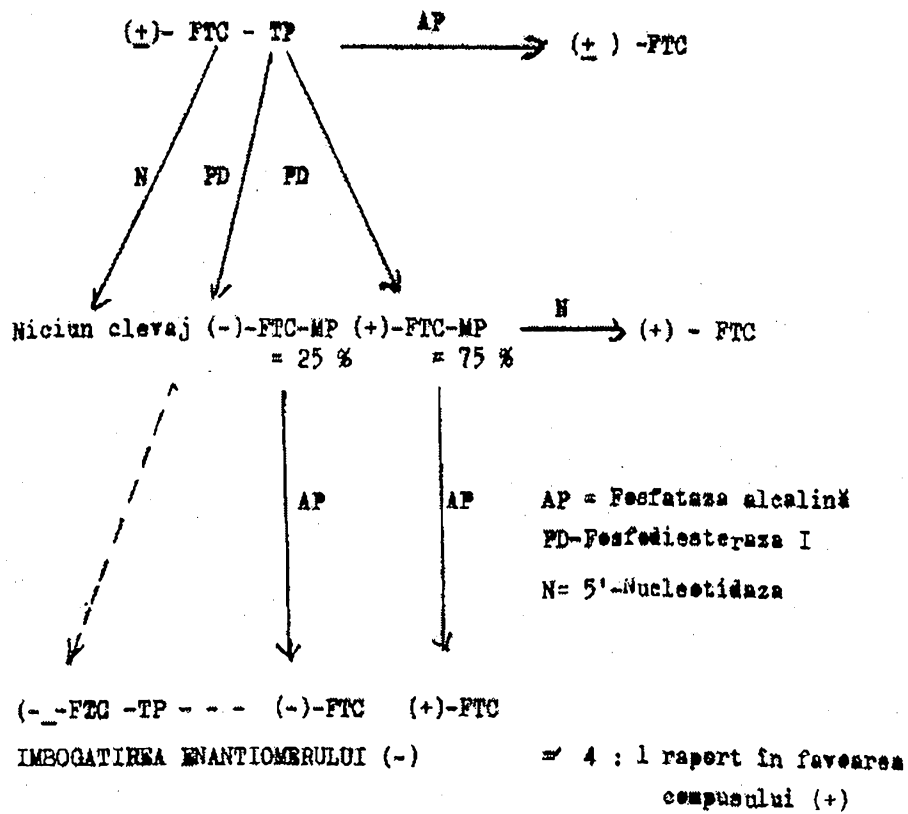


Fig. 3

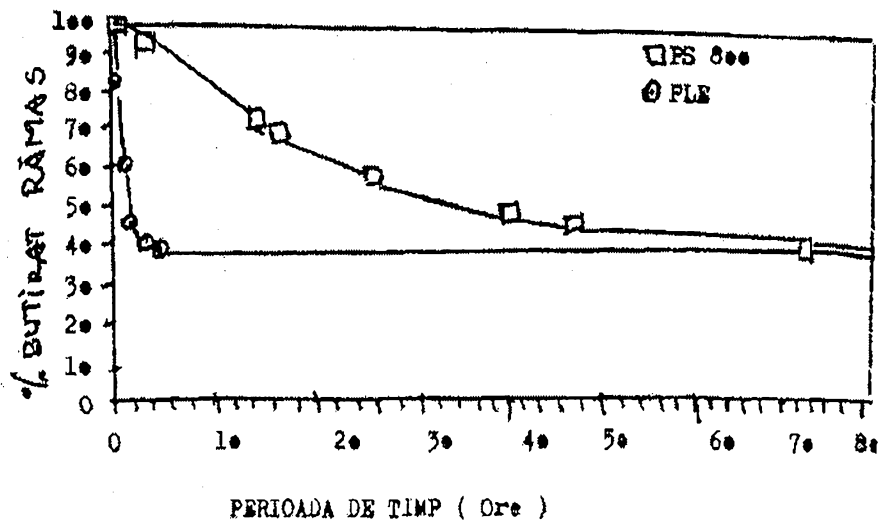
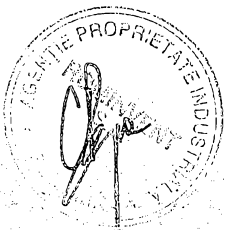


Fig. 4



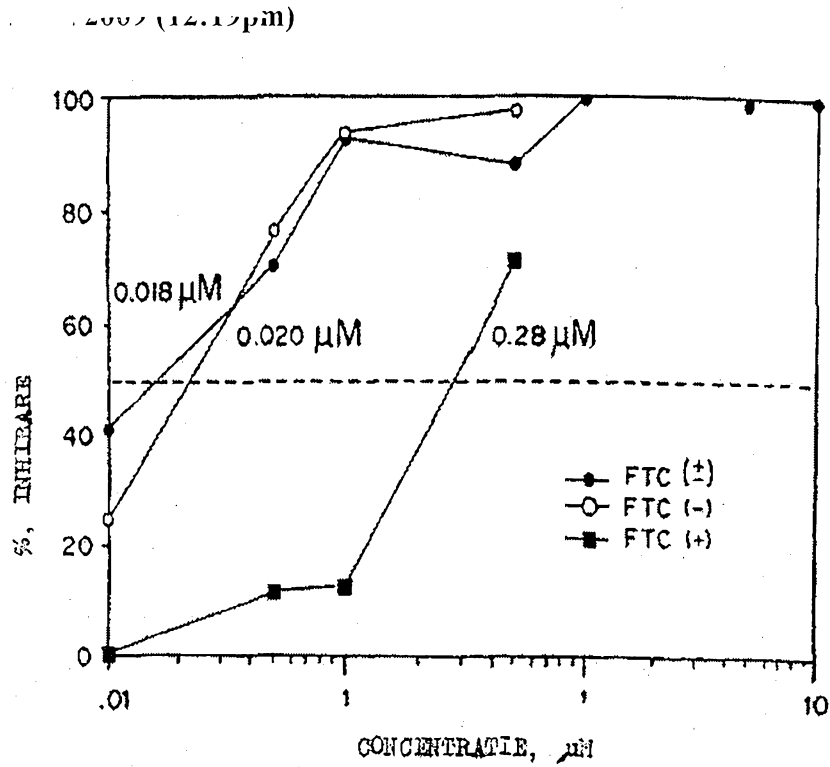


Fig. 5

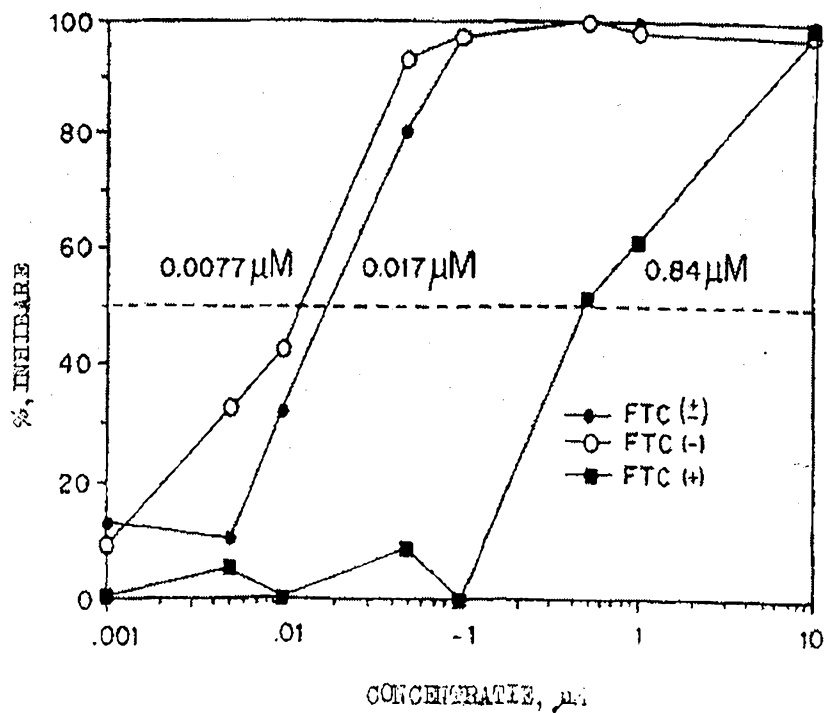
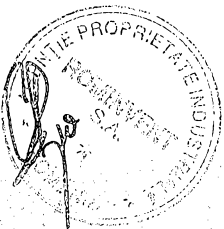


Fig. 6



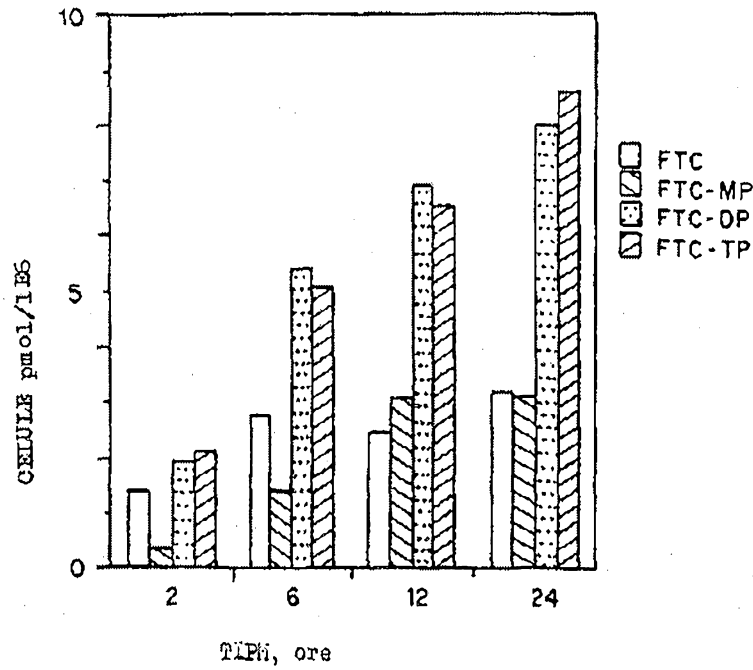


Fig. 7

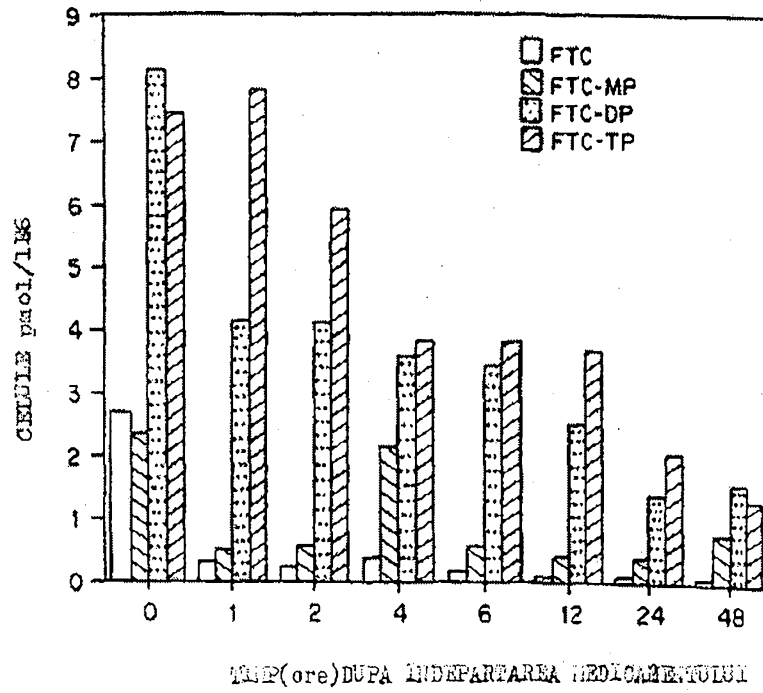


Fig. 8



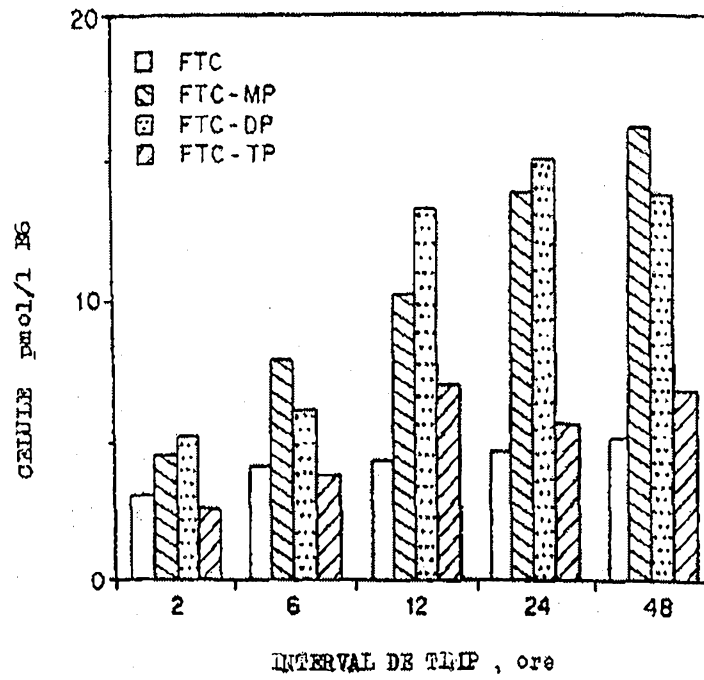


Fig. 9

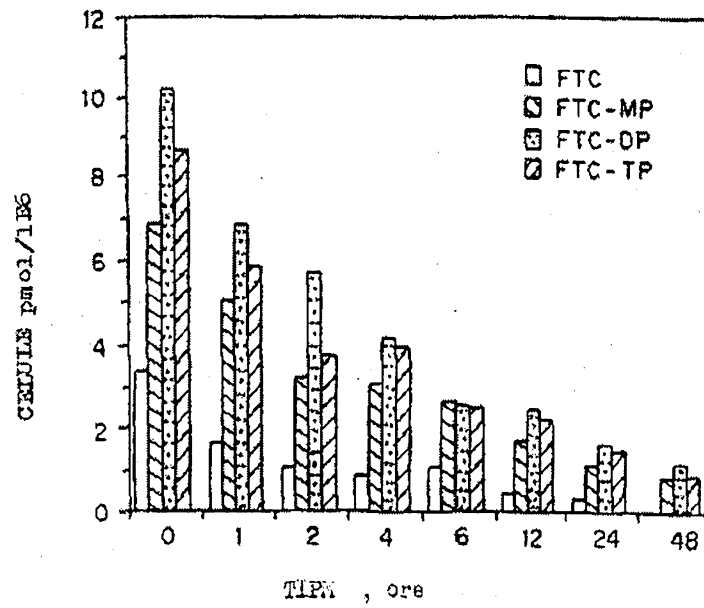
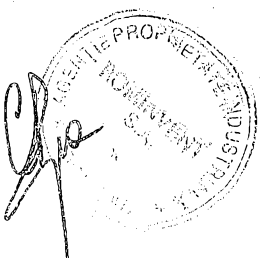


Fig. 10



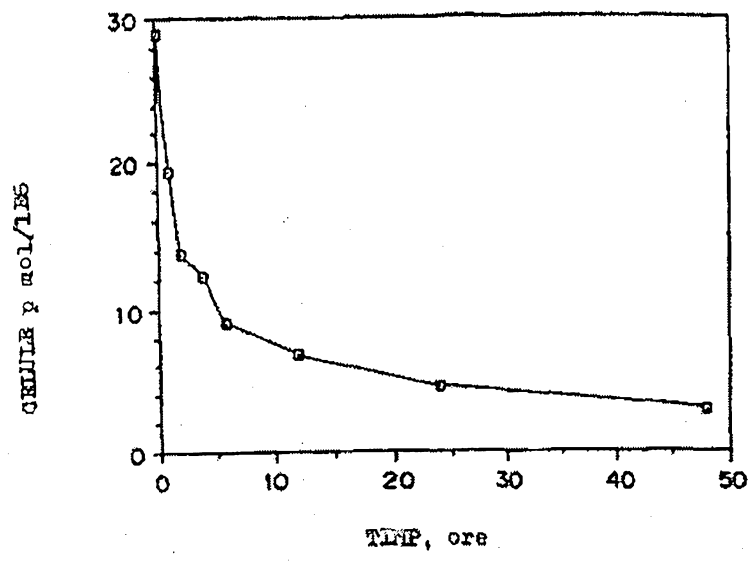


Fig. 11

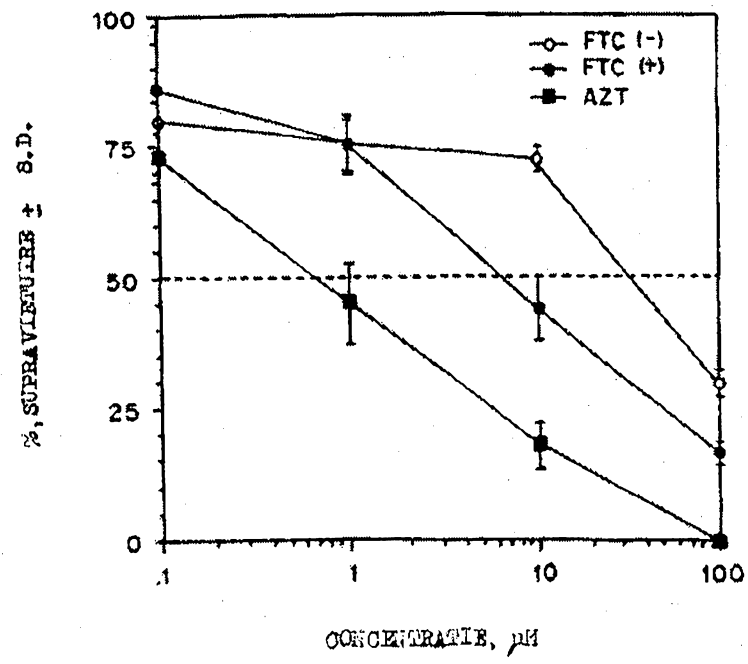


Fig. 12

