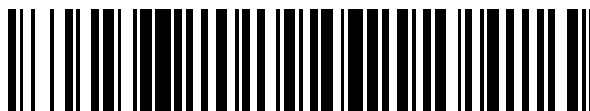


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 136**

51 Int. Cl.:

C07H 19/10 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2005 E 05763842 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1829885**

54 Título: **Preparaciones anti-víricas potenciales de 5'-fosfanato azidotimidina modificado**

30 Prioridad:

25.11.2004 RU 2004134388

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

04.11.2015

73 Titular/es:

KHOKHLOV, ALEXANDER FEDOROVICH (50.0%)
ul. Osennyaya, d. 4, korp. 1, kv. 172
Moscow, 121609, RU y
KONONOV, ALEXANDER VASILIEVICH (50.0%)

72 Inventor/es:

KUKHANOVA, MARINA KONSTANTINOVNA;
KHANDAJINSKAYA, ANASTASIYA LVOVNA;
YASKO, MAXIM VLADIMIROVICH;
SHIROKOVA, ELENA ANATOLIEVNA;
SHIPITSYN, ALEXANDER VALERIEVICH y
POKROVSKY, ANDREY GEORGIEVICH

74 Agente/Representante:

MIR PLAJA, Mireia

ES 2 550 136 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preparaciones anti-víricas potenciales de 5'-fosfanato azidotimidina modificado

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere al campo de la biología molecular, la virología y la medicina y, más específicamente, a derivados novedosos de nucleósidos, concretamente, a 5'-fosfanatos sustituidos de AZT. Estos compuestos poseen un efecto antivírico y se pueden usar para suprimir la reproducción del virus de la inmunodeficiencia humana.

Antecedentes de la invención

[0002] En la actualidad, en la medicina práctica se usa una amplia gama de compuestos que poseen actividad antivírica contra el VIH. Los mismos incluyen inhibidores nucleósidos y no nucleósidos. Los derivados nucleósidos utilizados con mayor frecuencia incluyen 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT, zidovudine[®]), 2',3'-didesoxicidina (ddC, Zalcitabine[®]), 2',3'-didesoxiinosina (ddl, Didanosine), 2',3'-didesoxi-2',3'-didehidrotimidina (d4T, Stavudine[®]) y 2',3'-didesoxi-3'-tiacidina (3TC, Lamivudine[®]) [De Clercq, E., 2002. *New development in anti-HIV chemotherapy. Biochim. Biophys. Acta*, 1587, 258-275].

[0003] El mecanismo de acción de los compuestos anteriores comprende su difusión hacia células infectadas, en donde experimentan una trifosforilación y específicamente inhiben la síntesis de ADN catalizada por transcriptasa inversa del VIH. La alta variabilidad del VIH da como resultado una aparición rápida de cepas resistentes del virus [Groschel, B., Cinatl, J.H., y Cinatl J. Jr., 1997. *Viral and cellular factors for resistance against anti-retroviral agents. Intervirology*, 40, 400-407; Antonelli, G., Turriziani, O., Verri, A., Narciso, P., Ferri, F., D'Offizi, G., y Dianzini, F., 1996. *Long-term exposure to zidovudine affects in vitro and in vivo the efficiency of thymidine kinase. AIDS Res Hum Retrovir.*, 12, 223-228] y, deriva por tanto en la necesidad de cambiar la medicación. Además, debido a la baja eficacia de las transformaciones intracelulares los fármacos utilizados en la actualidad se deben administrar en dosis elevadas lo cual conduce a efectos tóxicos pronunciados.

[0004] La toxicidad por AZT provoca la supresión de la actividad de células de la médula espinal, el deterioro de la función hepática y miopatía [Chariot, P., Drogou, I., De Lacroix-Szmania, I., Eliezer-Vanerot, M.C., Chazaud, B., Lombes, A., Schaeffer, A., y Zafrani, E.S., 1999. *Zidovudine-induced mitochondrial disorder with massive liver steatosis, myopathy, lactic acidosis, and mitochondrial DNA depletion. J. Hepatol.* 30, 156-160; Kellam, P., Boucher, C.A., y Larder, B.A., 1992. *Fifth mutations in HIV reverse transcriptase contributes to the development of high level resistance to zidovudine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 1934-1938; Ren, J., Esnouf, R.M., Hopkins, A.L., Jones, E.Y., Kirby, I., Keeling, J., Ross, C.K., Larder, B.A., Stuart, D.I., y Stammers, D.K., 1998. *3'-Azido-3'-deoxythymidine drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase can induce long range conformational changes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 9518-9523]. Una eliminación rápida de AZT del cuerpo requiere una administración frecuente. Además, durante un tratamiento de larga duración con AZT se desarrollan bastante pronto cepas resistentes del virus y la terapia pierde su eficacia. A pesar de todas las desventajas mencionadas, la AZT sigue siendo el fármaco anti-VIH más ampliamente utilizado.

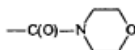
[0005] El H-fosfonato de AZN conocido (Nikavir[®]) aprobado para tratamiento del SIDA en Rusia es menos tóxico que la AZT [Intracellular metabolism and pharmacokinetics of 5'-hydrogenphosphonate of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, a prodrug of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine. *Antiviral Research* 63 (2004), 107-113]. El efecto del Nikavir se basa en su capacidad de liberar AZT lo cual, después de la transformación intracelular en trifosfato de AZT-5' inhibe la replicación del VIH. De acuerdo con los datos de investigación farmacocinéticos, las ventajas clínicas del Nikavir son debidas a un aumento más lento y gradual de la concentración de AZT en la sangre con respecto al caso de administración de la propia AZT; la C_{máx} de AZT por Nikavir es menor que la C_{máx} de AZT por Zidovudine, y el T_{1/2} de AZT por Nikavir es mayor que el T_{1/2} de AZT por Zidovudine [Y. Skoblov et al., *Antiviral Research* 63 (2004) 107-113]. Sin embargo, la toxicidad del Nikavir sigue siendo bastante alta. Otra de las desventajas consiste en el desarrollo de resistencia al Nikavir.

[0006] Se han sintetizado y evaluado algunos otros derivados de AZT como agente anti-VIH. Entre ellos se encuentran la AZT de 5'-alquilfosfonilo (alquil es C1 a C8) [A.A.Kraevsky et al WO91/19727 y N.S. Bodor WO92/00988], AZT de 5'-fluorometilfosfonilo, AZT de 5'-difluorometilfosfonilo, AZT de 5'-fluoroclorometilfosfonilo y AZT de 5'-trifluorometilfosfonilo [P.J.Casara et al. *Biorganic Med. Chem. Letter*, 2(2) (1992) 145-148].

[0007] Anteriormente, se habían publicado propiedades físicoquímicas de la AZT de 5'-hidroximetilo y de 5'-yodometilfosfonilo [V.M. Orlov et al., *Molekulyarnaya Biologia (Moscú)* 28(3) (1994) 708-713].

[0008] Además, se ha descrito [E.A.Shirokova et al, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 22(5-8) (2003) 981-985; E.A. Shirokova et al, *Russian Journal of Bioorganic Chem.* 30(3) (2004) 242-249; E.A.Shirokova et al, *J. Med. Chem.*

47(14) (2004) 3606-3614] una síntesis química de AZT de 5'-R-fosfonilo donde R = -H₂C(O)NH₂, -C(O)NH₂, -C(O)NHCN₃, -C(O)NHCH₂CH₂Ph,



no obstante, no se dio a conocer ninguna actividad biológica de dichos compuestos.

5

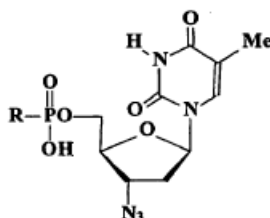
Descripción de la invención

[0009] La presente invención resuelve la tarea de los derivados de AZT de baja toxicidad y con capacidad de penetrar en la célula y liberar gradualmente el nucleósido activo (AZT). Esto posibilitará el mantenimiento de una concentración intracelular terapéuticamente suficiente del fármaco durante un periodo prolongado, y reducirá por lo tanto la dosis individual del fármaco y/o la frecuencia de administración y hará que remitan los efectos secundarios.

10

[0010] Esta tarea se resuelve creando compuestos de 5'-fosfonil-3'-azido-3'-desoxitimidina con la siguiente fórmula general:

15



en donde R se selecciona de ClCH₂-, ICH₂-, HOCH₂-, **CH₃OCH₂-** o H₂NC(O)-.

[0011] Los compuestos novedosos inhiben la reproducción del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 en línea celular de linfocitos MT-4, protegen las células contra la acción citopática del virus y no muestran toxicidad hacia células hospedadoras hasta concentraciones extremadamente altas (Tabla 1). Los datos experimentales confirman que aunque no producen ningún efecto tóxico sobre las células en concentraciones eficaces (las dosis tóxicas en el 50% son entre 2 y 4 órdenes mayores que las dosis inhibitoras en el 50%), los compuestos bajo investigación muestran un alto grado de supresión de la reproducción del virus de la inmunodeficiencia de tipo 1 en un cultivo celular MT-4. Los índices terapéuticos de los compuestos bajo investigación, calculados como la relación de la dosis terapéutica del fármaco con respecto a su dosis eficaz, son comparables a los correspondientes de H-fosfonato de AZT. Se llevaron a cabo pruebas virológicas de acuerdo con protocolos previamente descritos.

20

25

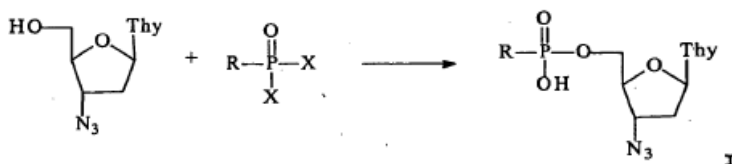
[0012] Se ha demostrado que, en los perros, los fosfonatos de AZT liberan lentamente AZT, representando así formas latentes de AZT (Ejemplo 7, Tabla 2). Los estudios demuestran que, para todos los fosfonatos que abarca esta solicitud, el único metabolito detectable en sangre animal es AZT. Los parámetros farmacocinéticos incluidos en la Tabla 2 se determinaron sobre la base de AZR generada y dependían de la estructura del fosfonato.

30

Mejores ejemplos de implementación de la invención

35

[0013] Los fosfonatos buscados se produjeron utilizando el siguiente esquema:



[0014] Donde X = Cl u OH.

40

- 1a: R = ClCH₂
- 1b: R = ICH₂
- 1c: R = HOCH₂
- 1d: R = CH₃OCH₂
- 1e: R = H₂NC(O)

45

[0015] Los siguientes ejemplos específicos dan a conocer la esencia de la invención.

Ejemplo 1.

5'-clorometilfosfonil-3'-azido-3'-desoxitimidina (la).

5 [0016] Se adicionó dicloruro de clorometil fosfonidilo (0,92 ml, 9 mM) a la solución de 3'-azido-3'-desoxitimidina (0,8 g, 3 mM) en fosfato de trietilo (10 ml) enfriado a 0°C. La mezcla se agitó durante 18 horas a 18°C, se diluyó con una mezcla
 10 enfriada de piridina (10 ml) y agua (10 ml), se agitó durante 30 minutos y se adicionó a agua (700 ml). La solución se inyectó en una columna con DEAE celulosa y se eluyó en un gradiente lineal de NH₄HCO₃ (0 → 15 mM, pH 7,5). Las fracciones buscadas se evaporaron, el residuo se diluyó con agua (3 ml) y se purificó adicionalmente en una columna LiChroprep RP-18 utilizando agua como diluyente. La fracción buscada se liofilizó obteniendo 1 g (90%) de fosfonato (la). ¹H NMR (D₂O) : 7,72 q (1H, J=0,5 Hz, H-6), 6,27 t (1H, J=6 Hz, H-1'), 4,55 m (1H, H-3'), 4,21 m (3H, H-4', H-5'), 3,58 d (2H, J=8,5 Hz, CH₂-P), 2,54 m (2H, H-2'), 1,95 d (3H, J=0,5 Hz, CH₃). ³¹P NMR: 16,03 s.

Ejemplo 2.**5'-yodometilfosfonil-3'-azido-3'-desoxitimidina (lb).**

15 [0017] Se sintetizó 5'-yodometilfosfonil-3'-azido-3'-desoxitimidina (lb) a partir de 3'-azido-3'-desoxitimidina y ácido yodometil-fosfónico utilizando el método que se describe para el compuesto la.

20 [0018] El rendimiento fue del 54%. ¹H NMR (D₂O): 7,55 s (1H, H-6), 6,07 t (1H, J=6 Hz, H-1'), 4,37 m (1H, H-3'), 4,00 m (3H, H-4', H-5'), 2,89 (2H, J=9 Hz, CH₂-P), 2,34 m (2H, H-2'), 1,75 s (3H, CH₃). ³¹P NMR: 17,00 s.

Ejemplo 3.**5'-hidroximetilfosfonil-3'-azido-3'-desoxitimidina (lc).**

25 [0019] Solución de sal piridínica de ácido acetoximetilfosfónico (1,2 mM) en piridina (3 ml) se adicionó a la solución de 3'-azido-3'-desoxitimidina (267 g, 1 mM) en piridina, se adicionó dicitclohexil carbodiimida (520 mg, 2,5 mM) mientras se agitaba, la mezcla de la reacción se agitó durante 10 horas a temperatura ambiente y se diluyó con agua (5 ml).
 30 Después de agitar durante 30 minutos más, el sedimento se separó y la solución se evaporó, el residuo se disolvió en KOH 1 M (5 ml) y se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. La solución se evaporó y el residuo se disolvió en agua (100 ml). La solución se inyectó en una columna con DEAE celulosa en la forma HCO₃ y se eluyó en un gradiente lineal de NH₄HCO₃ (0 → 15 mM, pH 7,5). Las fracciones buscadas se evaporaron, y se volvieron a evaporar con agua (3 x 5 ml), el residuo se diluyó con agua (3 ml) y se cromatógrafió en una columna LiChroprep RP-18 usando agua como eluyente. La fracción buscada se liofilizó obteniendo 238 mg (66%) de fosfonato (lc).

35 [0020] ¹H NMR (D₂O) : 7,68 q (1H, J=0,5 Hz, H-6), 6,22 t (1H, J=6 Hz, H-1'), 4,48 m (1H, H-3'), 4,16 m (3H, H-4', H-5'), 3,77 d (2H, J= 7 Hz, CH₂-P), 2,51 t (2H, J=6 Hz, H-2'), 1,93 d (3H, J=0,5 Hz, CH₃). ³¹P NMR: 16,03 s.

Ejemplo 4.**5'-metoximetilfosfonil-3'-azido-3'-desoxitimidina (ld).**

40 [0021] Se sintetizó 5'-metoximetilfosfonil-3'-azido-3'-desoxitimidina a partir de 3'-azido-3'-desoxitimidina y ácido metoximetilfosfónico utilizando el método descrito para compuesto lc. ¹H NMR (D₂O) : 7,66 q (1H, J=0,5 Hz, H-6), 6,21 t (1H, J=6 Hz, H-1'), 4,48 m (1H, H-3'), 4,15 m (3H, H-4', H-5'), 3,68 q (2H, J=8 Hz, CH₂-P), 2,52 t (2H, J=6 Hz, H-2'), 1,94 d (3H, J =0,5 Hz, CH₃). ³¹P NMR: 16,03 s.

Ejemplo 5.**5'-aminocarbonilfosfonil-3'-azido-3'-desoxitimidina (le).**

50 [0022] Se sintetizó 5'-aminocarbonilfosfonil-3'-azido-3'-desoxitimidina (le) a partir de 3'-azido-3'-desoxitimidina y ácido amino-carbonilfosfónico utilizando el método que se describe para el compuesto lc y se obtuvieron 70 mg (94%) del compuesto le. ¹H NMR (DMSO-d₆) : 7,82 s (1H, H6), 7,17 s, 7,13 s (2H, NH₂), 6,12 t (1H, J 6,9, H1'), 4,5 m (1H, H3'), 3,95 m (3H, H4', H5'), 2,30 m (2H, H2'), 1,81 s (3H, CH₃). ³¹P NMR: (DMSO-d₆): -1.56 s. Espectro de masas: m/e 374,3 [M⁺].

Ejemplo 6.

60 [0023] La inhibición de la replicación del VIH se estudió cultivando células linfoides pre-infectadas de la línea celular MT-4 en presencia de los compuestos bajo investigación, en la concentración de entre 0,001 y 100 µg por 1 ml de medio de cultivo durante un pase, es decir 4 días.

[0024] La inhibición de la replicación del HIV en un cultivo celular sensible se evalúa mediante la reducción de la acumulación de proteínas específicas del virus p24 (de acuerdo con un ensayo inmunoenzimático) así como mediante el aumento de la viabilidad celular en presencia del fármaco en comparación con el control el 4º día de cultivo utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

5

Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos.

[0025] La citotoxicidad de los fármacos se evalúa adicionando sus diluciones en medio RPMI-1640 libre de suero a una suspensión celular de MT-4 (concentración inicial en los pocillos de una placa de 96 pocillos (Cel-Cult, RU) a concentraciones finales de 0,001-100 µg/ml (3 pocillos por dosis) y cultivando a 37 °C durante 4 días. Se usa una concentración de inóculo de $0,5 \times 10^6$ células/ml. Como control se usan células en el medio libre de suero del mismo volumen sin ningún fármaco. Las células viables se cuentan el 4º día de cultivo utilizando el método del formazán (tinción de células vivas con MTT). La toxicidad de varias dosis del fármaco se evalúa comparando la viabilidad celular con el control, los resultados se usan para representar la curva dependiente de la dosis y determinar la concentración que reduce la viabilidad celular en un 50% (C_{50}). Las concentraciones eficaces de los compuestos bajo investigación no producen ningún efecto tóxico sobre células MT-4. Debe señalarse que las dosis tóxicas en el 50% son entre 5 y 6 órdenes mayores que dosis eficaces con respecto al VIH-1 (tabla 1).

[0026] El efecto, de los compuestos bajo investigación, de la replicación del VIH-1 en un cultivo celular MT-4 se estudió utilizando un método conocido.

[0027] El índice terapéutico, o el índice de selectividad (IS), se calcula como la relación de la concentración tóxica en el 50%, de un compuesto, con respecto a su dosis eficaz en el 50% (los resultados se presentan en la tabla 1). Sobre la base de estos índices de inhibición cuantitativos es posible valorar la eficacia antivírica de los compuestos de acuerdo con esta solicitud, la cual consiste en un alto grado de supresión de la replicación del VIH-1 en un cultivo celular MT-4, comparable al del Nikavir.

Ejemplo 7.

[0028] A un perro que pesaba 12 kg se le administraron oralmente 250 mg del compuesto bajo investigación (mezclado con cuajada). Se extrajeron muestras sanguíneas (1 ml) a intervalos definidos, de la vena femoral. Las muestras se centrifugaron (10 minutos a 2.000 rpm) y el sobrenadante se separó. Se adicionaron oxetano (patrón interno, 0,25 µg) y metanol (0,75 ml) a alícuotas del sobrenadante (0,25 ml). La mezcla resultante se centrifugó durante 3 minutos al 5.000 rpm. El sobrenadante se separó y se evaporó en flujo de aire a 40 °C, y se adicionó agua (1 ml) al residuo. Se analizaron alícuotas (20 µl) por HPLC en un cromatógrafo Gynkotec (Alemania) usando una columna analítica Ultrasphere ODC Beckman (Estados Unidos). Eluyente: 6% acetonitrilo en 0,1% H_3PO_4 (pH 2,1) en presencia de 0,15% trietilamina; detección a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 265 nm a 30°C. En la tabla 2 se presentan los parámetros farmacocinéticos obtenidos en un resultado de análisis de los datos.

40

Tabla 1. Actividad antivírica de fosfonatos de AZT con respecto al HVI-1 GKV-4046:

Compuesto	CD_{50} , µM	ID_{50} , µM	IS
la	300	0,05-0,1	>3.000
lb	>500	1-5	>100
lc	>500	0,08-0,3	>1.600
ld	>500	1-5	>100
le	>300	0,05-0,1	>3.000
Nikavir	260	0,13	2.015

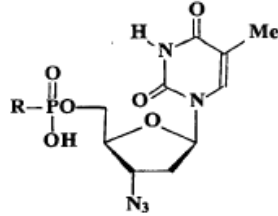
Tabla 2: Parámetros farmacocinéticos de azidotimidina después de la administración oral de 250 mg de sustancias de AZT, Nikavir, y compuestos la y le en la cantidad equivalente a 250 mg de AZT.

Compuesto	$T_{1/2}$ horas	AUC, mg x h/litro	MRT, horas	Cl, litro/hora	T máx, horas	$C_{m\acute{a}x}$, mg/litro
le	9,6	9,24	13,9	27,0	5,0	0,74
Nikavir	7,2	16,6	10,4	15,0	4,0	1,89
AZT	5,2	58,8	7,5	4,2	2,5	9,77

[0029] Así, se ha demostrado que los compuestos incluidos en la solicitud presentan una toxicidad baja y pueden inhibir eficazmente la replicación del virus de inmunodeficiencia de tipo 1 en cultivo celular MT-4 y generar AZT en mamíferos garantizando un aumento gradual de su concentración en la sangre.

REIVINDICACIONES

1. 5'-Fosfonatos de AZT con la siguiente fórmula general:



- 5 en donde R se selecciona de ClCH₂-, ICH₂-, HOCH₂-, CH₃OCH₂- o H₂NC(O)-, para su uso en métodos para tratar el VIH.