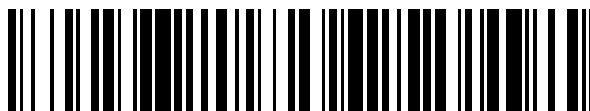


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 564**

51 Int. Cl.:

**C07F 9/6561** (2006.01)

**A61K 31/675** (2006.01)

**A61P 31/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2013 PCT/CN2013/079123**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14032481**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2013 E 13832227 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2891658**

54 Título: **Profármaco de tenofovir y usos farmacéuticos del mismo**

30 Prioridad:

**30.08.2012 CN 201210315565**

**01.02.2013 CN 201310041647**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.10.2017**

73 Titular/es:

**JIANGSU HANSOH PHARMACEUTICAL CO., LTD.**  
**(100.0%)**

**The 10th Industrial Sub-Zone of Development**  
**Zone**

**Lianyungang Jiangsu Province 222047, CN**

72 Inventor/es:

**ZHANG, FUYAO y**  
**WEI, DONG**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

ES 2 635 564 T3

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

## DESCRIPCIÓN

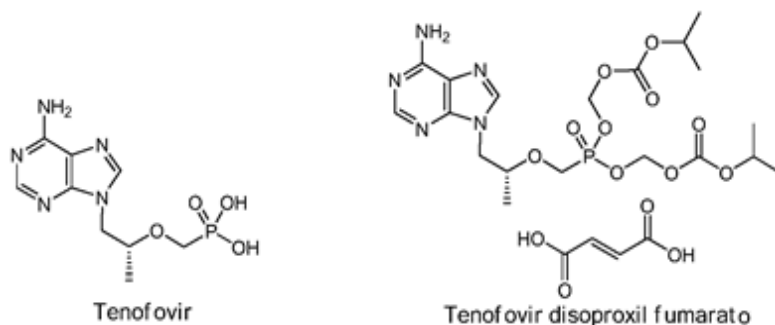
Profármaco de tenofovir y usos farmacéuticos del mismo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un profármaco de tenofovir y al estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, así como a su uso médico.

Antecedentes de la invención

10 El virus de la hepatitis B (VHB) es un tipo de virus del ADN que causa hepatitis aguda o crónica humana. La infección por el VHB es una causa directa de enfermedad hepática grave incluyendo cirrosis y carcinoma hepatocelular en seres humanos, por lo que la hepatitis B es una amenaza importante para la salud humana. El ADN (ácido desoxirribonucleico) del VHB es el núcleo del VHB y la base de la replicación del virus. Los nucleósidos pueden inhibir la polimerasa viral por enlaces competitivos directamente al sustrato natural de desoxirribosa y terminar la cadena de ADN insertando ADN. Por lo tanto, los nucleósidos como Cidofovir, Adefovir, Lamivudina y Tenofovir son el principal fármaco para el tratamiento de la hepatitis B. Tenofovir es un novedoso nucleótido inhibidor de la transcriptasa inversa que es eficaz contra una variedad de virus para el tratamiento de infecciones virales. Como dianión del grupo fosfato a pH fisiológico, el tenofovir tiene mala permeabilidad en la membrana celular, baja biodisponibilidad y toxicidad renal dependiente de la dosis, lo que limita su efecto terapéutico. Por tanto, el tenofovir debe prepararse en forma de profármaco fosfonato a través de diversos medios técnicos tales como esterificación y salificación para la aplicación clínica. Por ejemplo, el fumarato de disoproxilo de tenofovir desarrollado por Gilead Sciences Inc. es el profármaco de tenofovir activo oral de primera generación para el tratamiento de la infección por VIH y la hepatitis B.



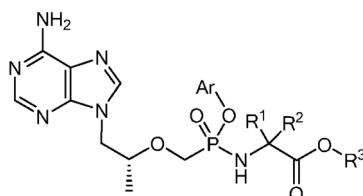
20 Dado que el fumarato de disoproxilo de Tenofovir es altamente sensible a la reacción de hidrólisis mediada por enzima en suero, su concentración de fármaco no puede aumentarse eficazmente en el sitio activo. Además, se liberan tras el metabolismo dos equivalentes de formaldehído potencialmente tóxicos y se han encontrado efectos secundarios tales como acidosis láctica, hepatomegalia grave y lipodistrofia durante el uso clínico. Con el fin de mejorar la estabilidad del profármaco tenofovir en el plasma y reducir la concentración de metabolito de tenofovir para reducir la toxicidad del fármaco, muchas compañías farmacéuticas están llevando a cabo la investigación y el desarrollo de la próxima generación de profármacos de tenofovir y han hecho algunos logros. Algunos nuevos profármacos han estado en estudios clínicos I/II. Por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional WO0208241 describe una clase de aminoácido natural (monosustituido) profármaco sintetizado de fosfamidato de tenofovir (por ejemplo, GS-7340) y la Solicitud de Patente Internacional WO2009105513 describe un tipo de profármaco innovador de fosfato bisamida de tenofovir. En comparación con el fosfodiéster de tenofovir, estos innovadores profármacos mejoran la estabilidad del plasma, aumentando así la concentración acumulativa del metabolito activo de tenofovir en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y el efecto terapéutico. Por ejemplo, la concentración total del ingrediente activo producido por GS-7340 en las PBMCs es 10 veces que el disoproxilo de tenofovir y 30 veces que el tenofovir. Sin embargo, GS-7340 tiene cierta degradación en plasma y 1-2% del metabolito de tenofovir se puede detectar en el plasma. Por lo tanto, es inevitable que GS-7340 tenga toxicidad como el efecto secundario generado por el disoproxilo de tenofovir, lo que resulta en el problema de seguridad de los fármacos. Por lo tanto, es importante desarrollar más el profármaco de tenofovir con alta eficacia y baja toxicidad. Con el propósito de mejorar aún más la estabilidad del disoproxilo de tenofovir en plasma, la presente invención sintetiza una serie de profármacos de fosfamidato de tenofovir con aminoácidos disustituidos. Se ha demostrado que este tipo de profármaco es muy estable en plasma y no se encuentra ningún metabolito de tenofovir en el plasma. Por otro lado, la concentración de metabolito activo de tenofovir en los PBMCs se incrementa significativamente en comparación con GS-7340. Por tanto, la presente invención hace posible proporcionar una nueva generación de profármacos de tenofovir con alta eficacia y baja toxicidad.

Resumen de la invención

45 Sorprendentemente, los inventores encontraron una serie de compuestos que tienen mayor eficacia y menor toxicidad que la técnica anterior. Comparando con GS-7340, los compuestos de acuerdo con la presente invención son lo

suficientemente estables en plasma y el metabolito de tenofovir es completamente indetectable en plasma. Por otra parte, la concentración de tenofovir se mejora mucho en las PBMCs. Tal resultado es totalmente inesperado para los expertos en la técnica.

5 La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) y al estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo,



(I)

en el que:

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son alquilo C<sub>1-6</sub> respectivamente, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con el átomo de carbono unido forman un cicloalquilo C<sub>3-7</sub>; R<sup>3</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> sustituido o no sustituido o heteroarilo dividido en 6 a 10 miembros;

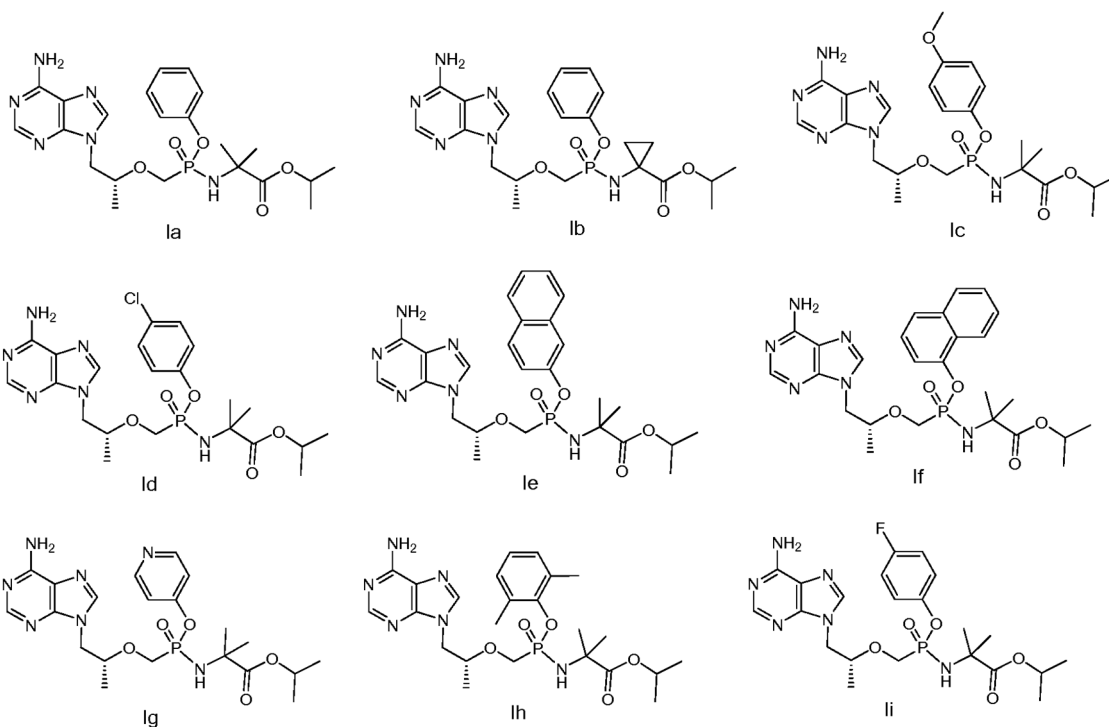
10 Ar es arilo C<sub>6-10</sub> sustituido o no sustituido o heteroarilo dividido en 6 a 10 miembros.

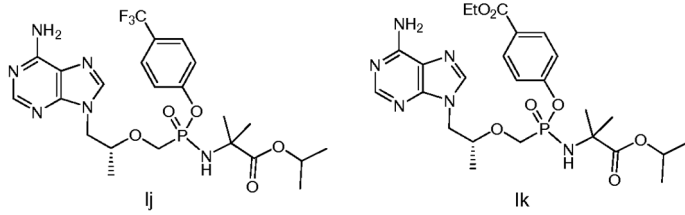
El compuesto de fórmula general (I) de acuerdo con la presente invención se puede usar como un profármaco de tenofovir. Este profármaco es estable en plasma y la concentración de metabolito activo de tenofovir en PBMCs se mejora significativamente en comparación con la de GS-7340.

15 En el compuesto de fórmula general (I) de acuerdo con la presente invención, el átomo de fósforo es quiral y la configuración es S o R, o una mezcla de R y S.

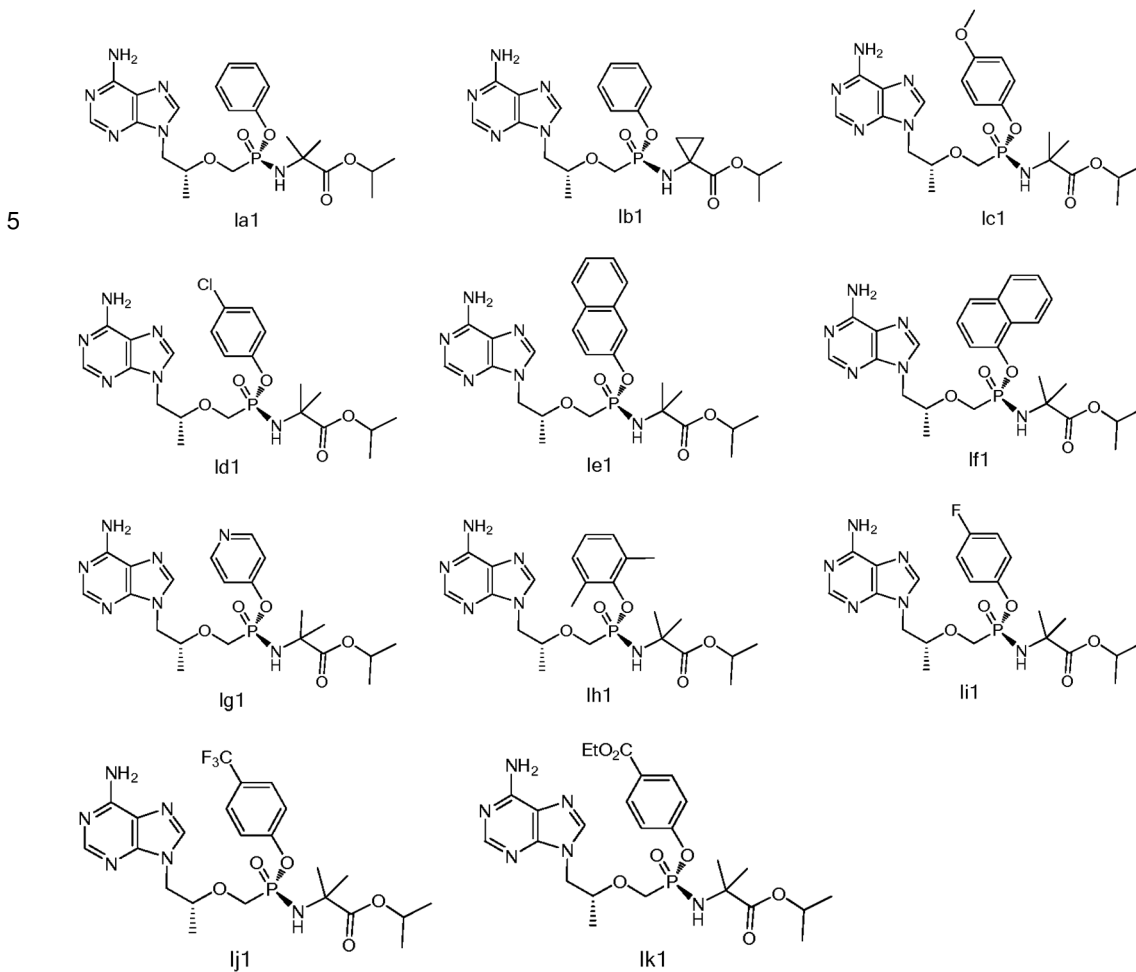
En una realización de la presente invención, el compuesto de fórmula general (I) y el estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el estereoisómero comprende un tautómero, isómero cis-trans, isómero conformacional, mesómero o isómero óptico enantiomérico o diastereomérico .

20 En una realización preferida de la presente invención, se proporcionan compuestos que tienen las siguientes estructuras, pero el compuesto de fórmula general (I) de acuerdo con la presente invención no se limita a la siguiente estructura:

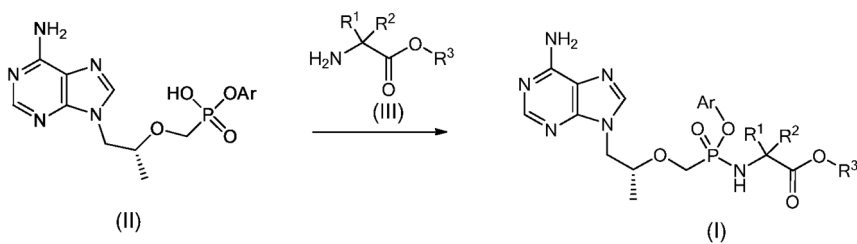




En otra realización preferida de la presente invención, se describen los compuestos quirales con las siguientes estructuras, pero el compuesto de fórmula general (I) de acuerdo con la presente invención no se limita a la siguiente estructura:

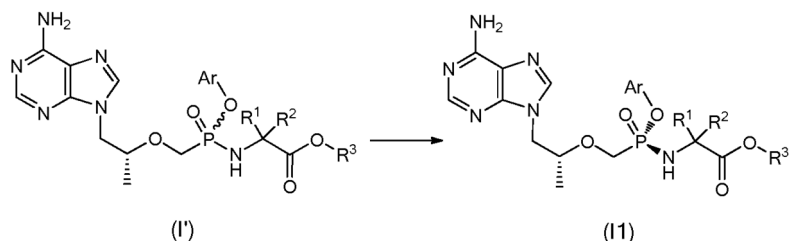


10 El Compuesto de fórmula general (I) de acuerdo con la presente invención se puede preparar de acuerdo con el siguiente método:



en el que el compuesto de fórmula general (II) se puede preparar a partir de tenofovir de acuerdo con el método de la patente china ZL01813161.1 así como otros métodos convencionales en la técnica.

El isómero quiral (I1) se puede separar de una mezcla de isómeros (I') con columna de fase inversa o columna quiral.



La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula general (I) o el estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable, en el que el portador farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en agua para inyección, excipiente de polvo liofilizado o excipiente de preparación oral.

La presente invención se refiere también al uso del compuesto de fórmula general (I) o el estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo o dicha composición farmacéutica en la preparación de un medicamento para el tratamiento de infecciones virales, preferiblemente hepatitis B o enfermedades causadas por el virus de la hepatitis B.

A menos que se indique otra cosa, los artículos de la presente invención tienen los siguientes significados. El término "alquilo" significa grupos hidrocarburo alifáticos saturados que comprenden una cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de alquilo incluyen, pero no están limitados a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, sec-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, n-hexilo, 1-etil-2-metilpropilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2-etilbutilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2,3-dimetilbutilo y similares. Alquilo puede estar sustituido o no sustituido, cuando está sustituido el sustituyente puede estar sustituido en cualquier punto de unión posible y el sustituyente es preferiblemente uno o más grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alqueno, alquino, alcoxi, alquiltio, alquilamino, halógeno, tiol, hidroxilo, nitro, ciano, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalcoxi, heterocicloalcoxi, cicloalquiltio, heterocicloalquiltio y oxo.

El término "cicloalquilo" significa un sustituyente saturado o parcialmente insaturado hidrocarbonado monociclo o policiclo, que comprende de 3 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de cicloalquilo monocíclico incluyen, pero no son limitados a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, cicloheptatrienilo y similares. Los ejemplos de cicloalquilo policíclico incluyen, pero no son limitados a, cicloalquilo espiroanillo, cicloalquilo de anillo fusionado y cicloalquilo de anillo con puente. El cicloalquilo puede estar sustituido o no sustituido, cuando está sustituido el sustituyente es preferiblemente uno o más grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alcoxi, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo.

El término "arilo" significa 6 a 10 monociclos de carbono completo o policiclo fusionado (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono) y policiclo que tiene un sistema de electrones  $\pi$  conjugado (es decir, anillos que tienen pares adyacentes de átomos de carbono), tales como fenilo y naftilo. El arilo puede estar sustituido o no sustituido, cuando está sustituido, el sustituyente es preferiblemente uno o más grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alqueno, alquino, alcoxi, alquiltio, alquilamino, halógeno, tiol, hidroxilo, nitro, ciano, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalcoxi, heterocicloalcoxi, cicloalquiltio, heterocicloalquiltio.

El término "heteroarilo" significa un sistema heteroaromático de 6 a 10 átomos de anillo, preferiblemente de 5 a 6 átomos de anillo que comprenden uno, dos, tres o cuatro heteroátomos incluyendo O, S o N, tales como piridinilo, pirimidinilo. "Heteroarilo" puede estar opcionalmente sustituido o no sustituido, cuando está sustituido el sustituyente es preferiblemente uno o más grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alqueno, alquino, alcoxi, alquiltio, alquilamino, halógeno, tiol, hidroxilo, nitro, ciano, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalcoxi, heterocicloalcoxi, cicloalquiltio, heterocicloalquiltio.

#### Descripción detallada de la invención

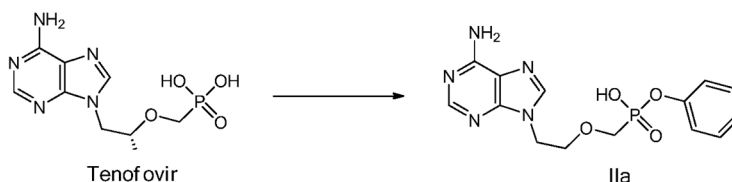
La presente invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos que permiten a los experimentados en la técnica entender la presente invención más claramente. Los ejemplos sirven simplemente para ilustrar las soluciones técnicas de la presente invención y no deben considerarse como la limitación del alcance de la invención.

#### Ejemplo 1

##### Paso 1:

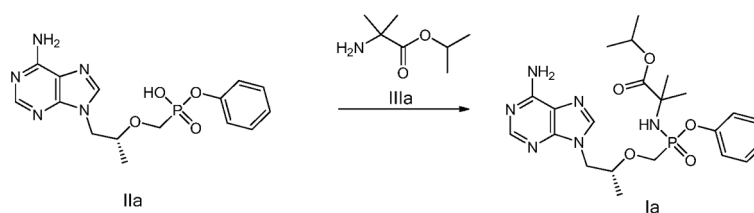
Se añadió gota a gota trimetilclorosilano (6,0 g) a una solución de fenol (5 g) y trietilamina (10,1 mL) en diclorometano (150 mL) a 0 °C. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 18 horas después de elevar la temperatura a 20 °C. El sólido blanco se retiró y se lavó con diclorometano. El filtrado se combinó y el disolvente se evaporó para dar fenoxi trimetilsilano (4,2 g) en forma de aceite incoloro.

5 Paso 2:



10 Se añadieron DMF (0,1 mL) y diclorosulfóxido (0,73 g) a una suspensión de tenofovir (1 g, adquirida de Suzhou Henderson Pharmaceutical Co., Ltd.) en sulfolano (2,5 mL) a 70 °C y luego la temperatura se elevó hasta 100 °C. La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 1,5 horas hasta que se obtuvo una solución transparente. A continuación, se añadió fenoxitrimetilsilano (0,70 g) rápidamente y la mezcla se continuó agitando a 100 °C durante otra 1,5 horas. Después, el disolvente se evaporó para dar un aceite amarillo viscoso. El aceite se disolvió en metanol y se ajustó a pH 3 con hidróxido de potasio acuoso al 45%. El precipitado se filtró y se secó para dar un sólido en polvo blanco IIa (0,7 g). MS (m/z) 363,96 (MH<sup>+</sup>).

Paso 3:



15 Se añadieron DMF (0,1 mL) y diclorosulfóxido (343 mg) a una mezcla del compuesto IIa (600 mg) en sulfolano (1 mL) a 60 °C. La mezcla se agitó luego a 60 °C durante 30 minutos hasta que se obtuvo una solución transparente. La solución resultante se añadió a una solución de éster de aminoácido IIIa (750 mg, adquirida de Shanghai Darui Fine Chemicals Co., Ltd.) y diisopropilamina (452 mg) en diclorometano (7 mL) a 0 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 20 2 horas, y después se lavó con dihidrogenofosfato de sodio acuoso al 5% y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se evaporó para dar un producto crudo de aceite amarillo que se purificó por cromatografía en columna para dar un producto de aceite Ia (150 mg).

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.34 (m, 1H), 8.05 (m, 1H), 7.36~6.95 (m, 5H), 6.49 (b, 2H), 6.22~5.84 (m, 1H), 5.01 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.40~3.60 (m, 3H), 1.52~1.18 (m, 15H). MS (m/z) 491.13 (MH<sup>+</sup>).

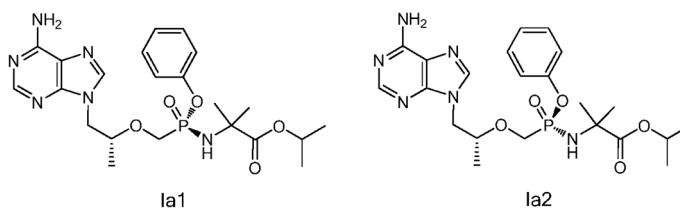
25 La preparación de los compuestos quirales Ia1 e Ia2:

Método 1: Preparación de la columna no quiral

El producto crudo Ia (150 mg) se separó mediante HPLC preparativa (columna preparativa: Waters Symmetry C18, fase móvil: A: ácido fosfórico acuoso al 0,02%, B: metanol) para dar el compuesto Ia1 (50 mg, tiempo de retención: 50,65 minutos): MS (m/z) 491,17 (MH<sup>+</sup>) y el compuesto Ia2 (61 mg, tiempo de retención: 47,57 min): MS (m/z) 491,10 (MH<sup>+</sup>).

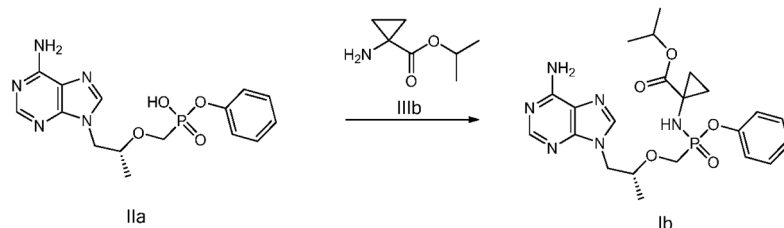
Método 2: preparación de columna quiral

El producto crudo Ia (150 mg) se separó mediante HPLC preparativa (columna preparativa: Chiralpak AS-H, fase móvil: A: n-hexano, B: etanol) para dar el compuesto Ia1 (62 mg, tiempo de retención: 6,53 min) y compuesto Ia2 (78 mg, tiempo de retención: 6,11 minutos).



35

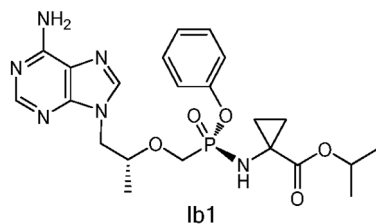
## Ejemplo 2



Se añadieron DMF (0,1 mL) y diclorosulfóxido (343 mg) a una mezcla del compuesto IIa (600 mg) en sulfolano (1 mL) a 60 °C. La mezcla se agitó entonces a 60 °C durante 30 minutos hasta que se obtuvo una solución transparente. La solución resultante se añadió a una solución de éster de aminoácido IIIb (760 mg, adquirida de Shanghai Darui Fine Chemicals Co., Ltd.) y diisopropilamina (452 mg) en diclorometano (7 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 2 horas, y después se lavó con dihidrogenofosfato de sodio acuoso al 5% y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se evaporó para dar un producto crudo de aceite amarillo que se purificó por cromatografía en columna para dar un producto de aceite Ib (221 mg).

5  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.38 (m, 1H), 8.01 (m, 1H), 7.34~6.95 (m, 5H), 6.48~6.18 (m, 1H), 5.84 (b, 2H), 5.01~4.82 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.20~3.60 (m, 5H), 2.68 (m, 1H), 1.41~1.10 (m, 12H).

El producto crudo Ib (100 mg) se separó mediante HPLC preparativa (columna preparativa: Chiralpak AS-H, fase móvil: A: n-hexano, B: etanol) para dar el compuesto Ib1 (35 mg). MS (m/z) 489,26 ( $\text{MH}^+$ ).



15

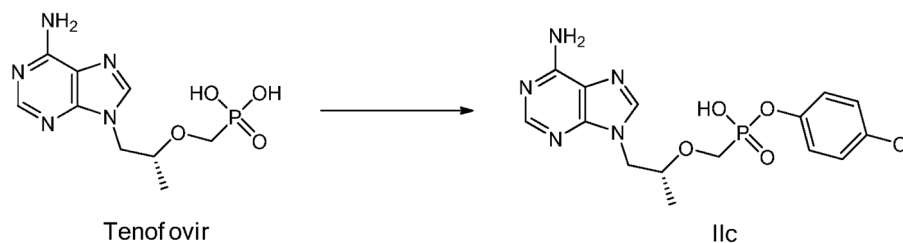
## Ejemplo 3

## Paso 1:

Se añadió gota a gota trimetilclorosilano (6,3 g) a una solución de p-clorofenol (5 g) y trietilamina (10,8 mL) en diclorometano (150 mL) a 0 °C. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 18 horas después de elevar la temperatura a 20 °C. El disolvente se evaporó para dar p-clorofenoxi trimetilsilano (5,1 g) como aceite incoloro.

20

## Paso 2:

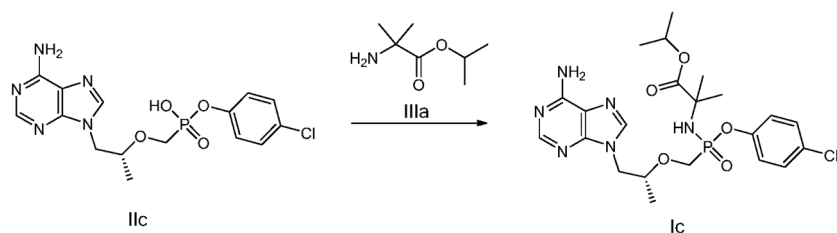


Se añadieron DMF (0,1 mL) y diclorosulfóxido (0,73 g) a una suspensión de tenofovir (1 g) en sulfolano (2,5 mL) a 70 °C y luego se elevó la temperatura a 100 °C. La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 1,5 horas hasta que se obtuvo una solución transparente. Después se añadió rápidamente p-clorofenoxi trimetilsilano (0,77 g) y la mezcla se continuó agitando a 100 °C durante 1,5 horas. El disolvente se evaporó para dar un aceite amarillo viscoso. El aceite se disolvió en metanol y luego se ajustó a pH 3 con hidróxido de potasio acuoso al 45%. El precipitado se filtró y se secó para dar un sólido en polvo blanco IIc (800 mg). MS (m/z) 398,05 ( $\text{MH}^+$ ).

25

## Paso 3:

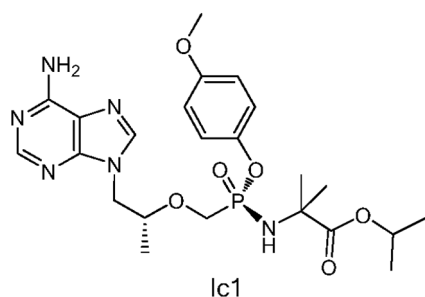
30



Se añadieron DMF (0,1 mL) y diclorosulfóxido (343 mg) a una mezcla del compuesto IIc (600 mg) en sulfolano (1 mL) a 60 °C. La mezcla se agitó entonces a 60 °C durante 30 minutos hasta que se obtuvo una solución transparente. La solución resultante se añadió a una solución del éster de aminoácido IIIa (731 mg) y diisopropilamina (452 mg) en diclorometano (7 mL) a 0 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 2 horas, y después se lavó con fosfato dihidrógeno de sodio acuoso al 5 % y salmuera saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se evaporó para dar un producto crudo de aceite amarillo que se purificó por cromatografía en columna para dar un producto de aceite Ic (121 mg).

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.35 (m, 1H), 8.01 (m, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.22 (m, 1H), 7.15~7.13 (m, 1H), 6.94 (m, 1H), 5.88 (b, 2H), 5.07 (m, 2H), 4.42 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 3.90~3.81 (m, 2H), 3.71~3.54 (m, 1H), 1.56~1.24 (m, 15H).

El producto crudo Ic (70 mg) se separó mediante HPLC preparativa (columna preparativa: Chiralpak AS-H, fase móvil: A: n-hexano, B: etanol) para dar el compuesto Ic1 (21 mg). MS (m/z) 525,26 (MH<sup>+</sup>).

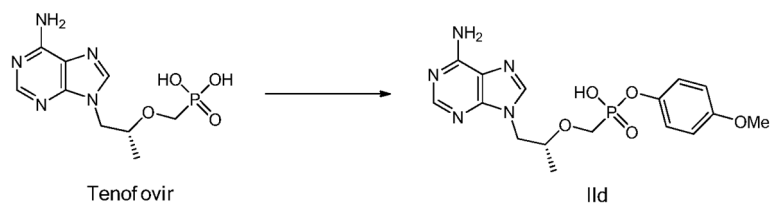


#### Ejemplo 4

15 Paso 1:

Se añadió gota a gota trimetilclorosilano (6,3 g) a una solución de p-metoxifenol (5 g) y trietilamina (10,8 mL) en diclorometano (150 mL) a 0 °C. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 18 horas después de elevar la temperatura a 20 °C. El disolvente se evaporó para dar p-metoxifenoxi trimetilsilano (4,7 g) en forma de un aceite incoloro.

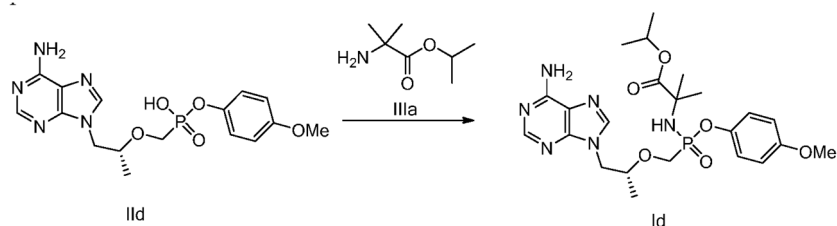
20 Paso 2:



Se añadieron DMF (0,1 mL) y diclorosulfóxido (0,73 g) a una suspensión de tenofovir (1 g) en sulfolano (2,5 mL) a 70 °C y luego se elevó la temperatura a 100 °C. La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 1,5 horas hasta que se obtuvo una solución transparente. A continuación se añadió rápidamente p-metoxifenoxi trimetilsilano (0,75 g) y la mezcla se continuó agitando a 100 °C durante 1,5 horas. El disolvente se evaporó para dar un aceite amarillo viscoso. El aceite se disolvió en metanol y luego se ajustó a pH 3 con hidróxido de potasio acuoso al 45%. El precipitado se filtró y se secó para dar un sólido en polvo blanco IId (600 mg). MS (m/z) 394,11 (MH<sup>+</sup>).

Paso 3:

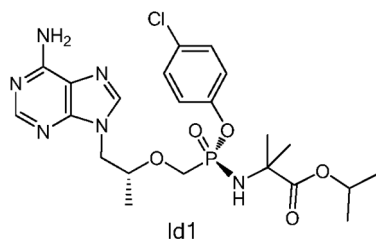




Se añadieron DMF (0,1 mL) y diclorosulfóxido (181 mg, 1,52 mmoles) a una mezcla del compuesto IId (300 mg) en sulfolano (1 mL) a 60 °C. La mezcla se agitó entonces a 60 °C durante 30 minutos hasta que se obtuvo una solución transparente. La solución resultante se añadió a una solución de éster de aminoácido IIIa (386 mg) y diisopropilamina (343 mg) en diclorometano (5 mL) a 0 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 2 horas, y después se lavó con dihidrógenofosfato de sodio acuoso al 5% y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se evaporó para dar un producto bruto de aceite amarillo y después se purificó por cromatografía en columna para dar un producto de aceite Id (40 mg).

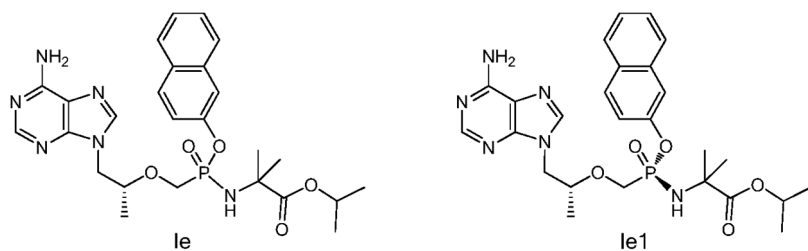
<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.35 (m, 1H), 8.04 (m, 1H), 7.12~6.85 (m, 4H), 5.86 (b, 2H), 5.06 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.08~3.94 (m, 3H), 3.82 (m, 3H), 3.77~3.61 (m, 1H), 1.55~1.17 (m, 15H).

El producto crudo Id (30 mg) se separó mediante HPLC preparativa (columna preparativa: Chiralpak AS-H, fase móvil: A: n-hexano, B: etanol) para dar 12 mg del compuesto Id1. MS (m/z) 521,23 (MH<sup>+</sup>).



#### Ejemplo 5

Los compuestos Ie y Ie1 se prepararon de acuerdo con un método de preparación similar al de los compuestos Ic e Ic1.

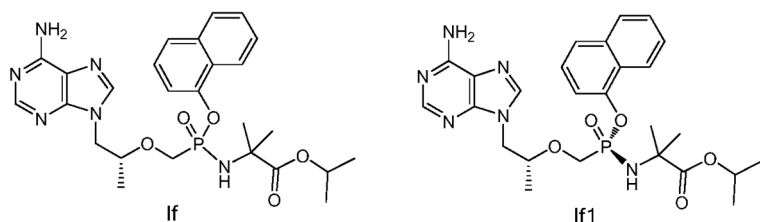


Ie: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.27 (m, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.96 (m, 1H), 7.84 (m, 1H), 7.62 (m, 1H), 7.52~7.33 (m, 4H), 5.78 (b, 2H), 5.04~4.98 (m, 1H), 4.38~3.71 (m, 6H), 1.57~1.06 (m, 15H).

Ie1: MS (m/z) 541.11.

#### Ejemplo 6

Los compuestos If y If1 se prepararon de acuerdo con un método de preparación similar al de los compuestos Ic e Ic1.

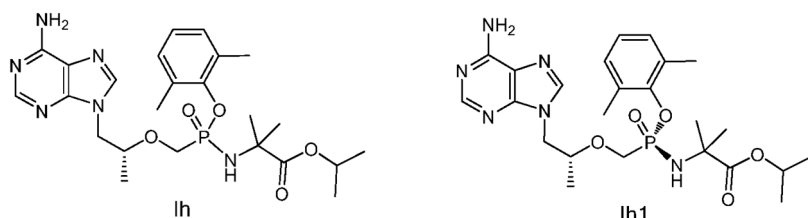


If: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.33 (m, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.81~7.66 (m, 4H), 7.49~7.41 (m, 2H), 7.31~7.06 (m, 1H), 5.72 (b, 2H), 5.06~4.99 (m, 1H), 4.43~4.35 (m, 1H), 4.19~3.91 (m, 4H), 3.74~3.65 (m, 1H), 1.57~1.20 (m, 15H).

If1: MS (m/z) 541.10.

Ejemplo 7

- 5 Los compuestos lh e lh1 se prepararon de acuerdo con el método de preparación similar al de los compuestos lc e lc1.

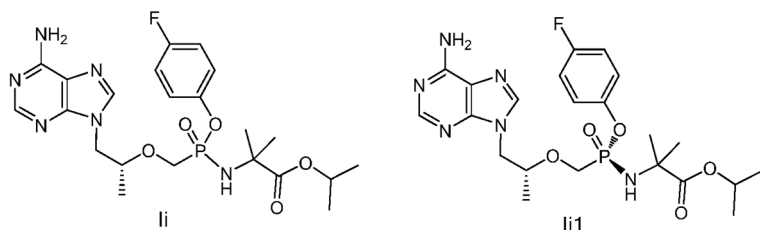


10 lh: <sup>1</sup>H-RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.33 (m, 1H), 7.95 (m, 1H), 7.00~6.95 (m, 3H), 5.83 (b, 2H), 5.05~4.99 (m, 2H), 4.35~4.31 (m, 1H), 4.23~4.17 (m, 1H), 4.01~3.83 (m, 3H), 3.80~3.77 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 1.33~1.19 (m, 15H).

lh1: MS (m/z) 519.15.

Ejemplo 8

Los compuestos li e li1 se prepararon de acuerdo con el método de preparación similar al de los compuestos lc e lc1.

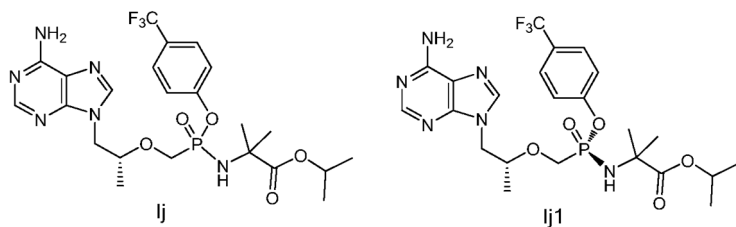


- 15 li: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.36 (m, 1H), 8.00 (m, 1H), 7.17 (m, 1H), 7.02 (m, 1H), 6.97 (m, 2H), 5.71 (b, 2H), 5.06 (m, 1H), 4.43 (m, 1H), 4.20 (m, 1H), 4.06~3.84 (m, 3H), 3.72~3.61 (m, 1H), 1.56~1.22 (m, 15H).

li1: MS (m/z) 509.25.

Ejemplo 9

Los compuestos lj e lj1 se prepararon de acuerdo con el método de preparación similar al de los compuestos lc e lc1.



- 20 lj: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.32 (m, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.58 (m, 2H), 7.52 (m, 2H), 5.89 (b, 2H), 5.02~4.96 (m, 1H), 4.43~4.36 (m, 2H), 4.04~3.91 (m, 4H), 1.58~1.23 (m, 15H).

lj1: MS (m/z) 559.08.

Ejemplo 10 Preparación de fumarato del compuesto la1

- 25 El compuesto la1 (480 mg), ácido fumárico (120 mg) y acetonitrilo se añadieron secuencialmente a un matraz de un solo cuello a 20 °C. La mezcla se calentó a 60 °C y se agitó a esta temperatura hasta que el sólido se disolvió

completamente. La agitación se continuó durante otros 5 minutos, y después la solución se enfrió a 20 °C y se filtró para obtener el fumarato del compuesto la1 en forma de sólido granular blanco (490 mg).

<sup>1</sup>H RMN (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.21 (m, 2H), 7.11 (m, 1H), 6.67 (m, 2H), 6.57 (s, 2H), 4.77 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.17 (m, 1H), 4.06 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 1.07 (m, 6H), 1.21 (m, 9H).

## 5 Ejemplo 11 Experimento antiviral

### 1. Estudio de la actividad in vitro antiviral de hepatitis B

La célula HepG 2.2.15 se usó como vehículo del virus de la hepatitis B para determinar el efecto inhibitor de los compuestos sobre la replicación del ADN del VHB.

10 Método de prueba: Las células HepG 2.2.15 se sembraron en una placa de cultivo de 96 pozos. Se añadieron varias diluciones de las muestras de prueba y control positivo respectivamente después de 24 horas, en las que se fijó un pozo de control celular. El medio se reemplazó por un cultivo que contenía varias diluciones de muestras de prueba después de 72 horas. Los sobrenadantes y las células HepG 2.2.15 se recolectaron después de 6 días de cultivo. La replicación del ADN del VHB se realizó mediante el método de inmunoprecipitación y se calculó la IC<sub>50</sub> (los resultados se muestran en la Tabla 1).

### 15 2. Prueba de citotoxicidad

Método de prueba: Las células HepG 2.2.15 se sembraron en una placa de cultivo de 96 pozos y se añadieron varias diluciones de muestras de prueba y control positivo, respectivamente. Se añadió CellTiter-Blue (Promega, número de catálogo G8081) durante 6 días de cultivo. La lectura de fluorescencia se contó con Flexstation 3 para calcular CC<sub>50</sub> (los resultados se muestran en la Tabla 1).

### 20 Tabla 1. Índice de inhibición del VHB y resultados de citotoxicidad de los compuestos

Compuesto	IC <sub>50</sub> (nM)	Toxicidad CC <sub>50</sub> (nM)
control positivo GS-7171 (Mezcla)	35	>10000
control positivo GS-7340 (Quiral)	14	>10000
la (Mezcla)	21	>10000
la1 (Quiral)	5,0	>10000
la2 (Quiral)	32	>10000
lb1 (Quiral)	15	>10000
lc1 (Quiral)	5,3	>10000
ld1 (Quiral)	6,2	>10000
le1 (Quiral)	5,7	>10000
lf1 (Quiral)	7,5	>10000
lh1 (Quiral)	5,9	>10000
li1 (Quiral)	8,3	>10000
lj1 (Quiral)	7,0	>10000

25 El control positivo es GS-7171 y GS-7340 que se describen en los ejemplos 2 y 3 de la patente china ZL01813161.1. GS-7171 se puede resolver en diastereómeros GS-7340 y GS-7339 en los que GS7340 tiene la mejor eficacia.

### 3.Conclusión

## ES 2 635 564 T3

Los resultados experimentales muestran que los compuestos la1, lb1, lc1, ld1, le1, lf1, lh1, li1 e lj1 tienen un efecto de inhibición significativo sobre la replicación del VHB-ADN sin citotoxicidad, en el que los efectos inhibidores sobre la replicación del VHB-ADN de los compuestos la1, lc1, ld1, le1, lf1, lh1, li1 e lj1 son mejores que el del control positivo GS7340.

### 5 Ejemplo 12 Prueba de estabilidad en medio ácido y jugo gástrico simulado

#### 1. Materiales, reactivos y fabricantes

Nombre	Contenido	Fabricante
Pepsina	1:3000	Shanghai Runjie Chemical Reagent Co., Ltd.
HCl	36%	Jiangsu Qiangsheng Chemical Co., Ltd.
Acetato de Amonio	98,0%	Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.
GS-7340	98,7%	UniTris Biopharma Co. Ltd.
la1	98,7%	UniTris Biopharma Co. Ltd.

#### 2. Preparación de reactivos

##### 10 2.1 Solución de ácido clorhídrico (pH 2,0)

Se transfirieron 4,5 mL de ácido clorhídrico al 36% a un matraz de aforación de 1 L y se diluyó con agua hasta 1 L para preparar una solución madre. Después, 10 mL de la solución anterior se transfirieron a un matraz de aforación de 50 mL y se diluyó con agua hasta 50 mL para preparar la solución de ácido clorhídrico con pH 2,0.

##### 2.2 Jugo gástrico simulado (pH 2,0)

15 10 mL de la solución madre y 500,0 mg de pepsina se transfirieron a un matraz de aforación de 50 mL y se diluyó con agua hasta 50 mL que se sometió a ultrasonido para disolver la pepsina (la solución no estaba clara ahora) y luego se filtró para dar una solución transparente como jugo gástrico simulado.

#### 2.3 Preparación de la solución de muestra

##### 2.3.1 Solución de ácido clorhídrico de GS-7340

20 Se transfirieron 5,0 mg de GS-7340 a un matraz de aforación de 5 mL y se añadieron 2,5 mL de alcohol isopropílico para disolver GS-7340, y después se añadió la solución de ácido clorhídrico (pH 2,0) hasta 5 mL. La solución se agitó bien y se filtró para su uso.

##### 2.3.2 Jugo gástrico simulado de GS-7340

25 Se transfirieron 5,0 mg de GS-7340 a un matraz de aforación de 5 ml y se añadieron 2,5 mL de alcohol isopropílico para disolver GS-7340, y después se añadió el jugo gástrico simulado hasta 5 mL. La solución se agitó bien y se filtró para su uso.

##### 2.3.3 Solución de ácido clorhídrico del compuesto la1

30 5,0 mg del compuesto la1 se transfirieron a un matraz de aforación de 5 mL y se añadieron 2,5 mL de alcohol isopropílico para disolver el compuesto la1, y después se añadió la solución de ácido clorhídrico (pH 2,0) hasta 5 ml. La solución se agitó bien y se filtró para su uso.

##### 2.3.4 Jugo gástrico simulado del compuesto la1

5,0 mg del compuesto la1 se transfirieron a un matraz de aforación de 5 mL y se añadieron 2,5 mL de alcohol isopropílico para disolver el compuesto la1 y luego se añadió el jugo gástrico simulado hasta 5 mL. La solución se agitó bien y se filtró para su uso.

##### 35 2.4 Muestreo

La muestra preparada se introdujo en el frasco de cromatografía como la muestra inicial y se inyectó inmediatamente. Mientras tanto, el resto de las muestras se pusieron en un termostato a 37 °C y se inyectaron en el sistema de HPLC después de 6 horas.

5 Los resultados de estabilidad del compuesto la1 y GS-7340 en un medio ácido y jugo gástrico simulado se mostraron en la Tabla 2

Tabla 2 Los resultados de estabilidad del compuesto la1 y GS-7340 en un medio ácido y jugo gástrico simulado

Muestra	Medio ácido (pH=2)			Jugo gástrico simulado		
	Pureza Inicial	Pureza después de 6 horas	Valor del cambio	Pureza Inicial	Pureza después de 6 horas	Valor del cambio
GS-7340	98,7%	95,5%	3,2%	98,7%	94,4%	4,3%
la1	98,7%	98,1%	0,6%	98,7%	98,2%	0,5%

### 3. Conclusión

10 Los resultados experimentales muestran que la estabilidad del profármaco de fosfamidato de tenofovir (la1) disustituido por aminoácido mejora significativamente en comparación con el profármaco de fosfamidato de tenofovir (GS-7340) sustituido por un único aminoácido.

Ejemplo 13: Estabilidad metabólica en sangre total humana fresca y prueba de distribución en células PBMCs de profármaco de tenofovir

#### 1. Materiales

Compuesto: la1 y GS-7340

#### 15 2. Método de prueba

Diferentes profármacos de tenofovir se incubaron junto con sangre total humana fresca a 37 °C. Las células de plasma y PBMCs se separaron respectivamente de la sangre total (método de centrifugación de gradiente de densidad de Ficoll) después de 1 hora y 2 horas de incubación para determinar las concentraciones de fármaco prototipo y metabolito de tenofovir en plasma y PBMCs. Las células PBMCs se contaron mediante un contador de células y cada célula de PBMCs se trató como 200fL para calcular la concentración de fármaco intracelular.

#### 3. Tratamiento de la muestra de plasma/PBMC

25 Se añadieron 20 µL de solución estándar interna (400 ng/mL de solución de SN-38), 5,0 µL de metanol-agua (50:50, v/v) y 200 µL de acetonitrilo a 100 µL de muestra de plasma o muestra de PBMC, respectivamente. La mezcla se mezcló mediante vórtice durante 1 min y se centrifugó durante 5 min (14000 rpm). 20 µL de sobrenadante y 180 µL de fase móvil se mezclaron mediante vórtice durante 1 minuto y 10 µL de la mezcla anterior se inyectaron en LC/MS/MS para análisis.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la estabilidad metabólica en la sangre total humana fresca y la prueba de distribución en células PBMCs de profármacos de tenofovir.

30 Tabla 3 Los resultados de la estabilidad metabólica en la sangre total humana fresca y la prueba de distribución en células PBMCs del profármaco de tenofovir

periodo de incubación	Analito	GS-7340		la1	
		Concentración del prototipo (µM)	del PAMA* concentración (µM)	Concentración del prototipo (µM)	del PAMA* concentración (µM)
0 hora	Concentración Inicial	16,9	0	12,4	0
	En Plasma	14,5	0,71	12,3	0

1 hora	En PBMCs	2448	199	1528	320
	En Plasma	13,0	1,37	12,2	0
2 horas	En PBMCs	2357	207	1282	546

PAMA es el metabolito activo del profármaco de tenofovir

#### 4. Conclusión

5 Como puede verse en la tabla 3, se detectó en plasma cierto metabolito activo de tenofovir para el control positivo GS-7340 después de incubación con sangre total humana fresca y el metabolito activo de tenofovir liberado en plasma aumentó multiplicándose con el tiempo de incubación; sin embargo, no se detectó ningún metabolito activo de tenofovir en el plasma para el compuesto la1 de la presente invención después de incubarse con sangre total humana fresca y el metabolito activo de tenofovir no se detectó siempre durante el tiempo de incubación, lo que ilustró que la estabilidad del compuesto la1 en el plasma fue significativamente mejor que el control positivo GS-7340. Por lo tanto, el compuesto la1 de la presente invención tiene una ventaja significativa en la reducción de los efectos secundarios tóxicos derivados del tenofovir en plasma en comparación con el control positivo GS-7340.

15 También puede verse en la tabla 3 que la concentración del metabolito activo de tenofovir en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) para el compuesto la1 de la presente invención aumentó significativamente durante el tiempo de incubación; mientras que la concentración del metabolito activo de tenofovir en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) para el compuesto GS-7340 casi no se incrementó. La concentración de metabolito activo de tenofovir en PBMCs para el compuesto la1 fue aproximadamente tres veces mayor que para el control positivo de GS-7340 después de la incubación durante 2 horas. De este modo, el compuesto la1 de la presente invención tiene una ventaja significativa en términos de efecto terapéutico comparado con el control positivo GS-7340

Ejemplo 14: Prueba anti virus del SIDA (VIH)

1. Objetivo: Evaluar la actividad anti-VIH y la citotoxicidad y el valor de EC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> de tres compuestos

20 2. Materiales y Método

##### 2.1 Materiales

Compuesto: Compuesto la1, GS-7340 y disoproxilo de tenofovir

medio de RPMI (Invitrogen 21969-035)

medio de DMEM (Invitrogen 21969-035)

25 ácido glutámico 200mM (Invitrogen 25030)

suero fetal bovino ((Invitrogen 16000-044)

penicilina/streptomina ((Invitrogen 15140-122)

regulador DPBS (Invitrogen 14190-094)

tripsina -EDTA (Invitrogen 25200)

30 azul trypan Sigma T8154

DMSO Sigma D2650

MUG Biochemika 69590

##### 2.2 Método de prueba

35 1) Las células MT-2 fueron infectadas con HIV-1 (IIIb) para formar multiplicidad de infección (MOI) 0,01TCID<sub>50</sub> por célula

2) La mezcla de virus y células se incubó en una placa de 384 pozos durante 3 días

3) Las células para la detección citotóxica se incubaron en una placa de 384 pozos durante 3 días

## ES 2 635 564 T3

4) El sobrenadante se transfirió a una nueva placa y se incubó con células reporteras (Hela) durante 24 horas.

5) Detección de la actividad beta-GAL para evaluar la actividad anti-VIH

6) Se detectó una señal luminiscente de las células libres de virus para evaluar la citotoxicidad después de la incubación durante 3 días

5 7) La actividad antiviral y la citotoxicidad se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación

Actividad antiviral (%) =  $100 - (\text{valor de detección} - \text{valor máximo}) / (\text{valor mínimo} - \text{valor máximo}) * 100$

Citotoxicidad (%) =  $100 - (\text{valor de detección} - \text{valor máximo}) / (\text{valor mínimo} - \text{valor máximo}) * 100$

8) EC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> se calcularon con Fit Curve de Graphpad Prism 5 (los resultados se muestran en la Tabla 4)

Tabla 4 Los resultados de la actividad anti-VIH y citotoxicidad

Compuestos	EC <sub>50</sub> (nM)	Toxicidad CC <sub>50</sub> (mM)
control positivo (GS-7340)	12	>150
control positivo (Tenofovir de Disoproxil)	11	16,9
la1 (quiral)	8	>150

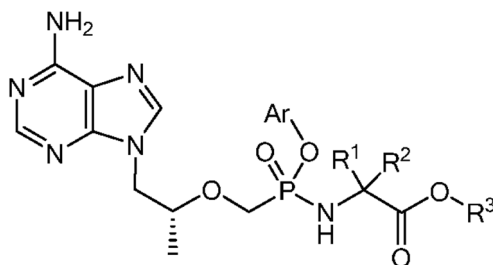
10

### 3. Conclusión

Los resultados anteriores muestran que el compuesto la1 tiene un fuerte efecto inhibitor sobre el virus de VIH sin citotoxicidad.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general (I) o el estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo,



(I)

5 en el que:

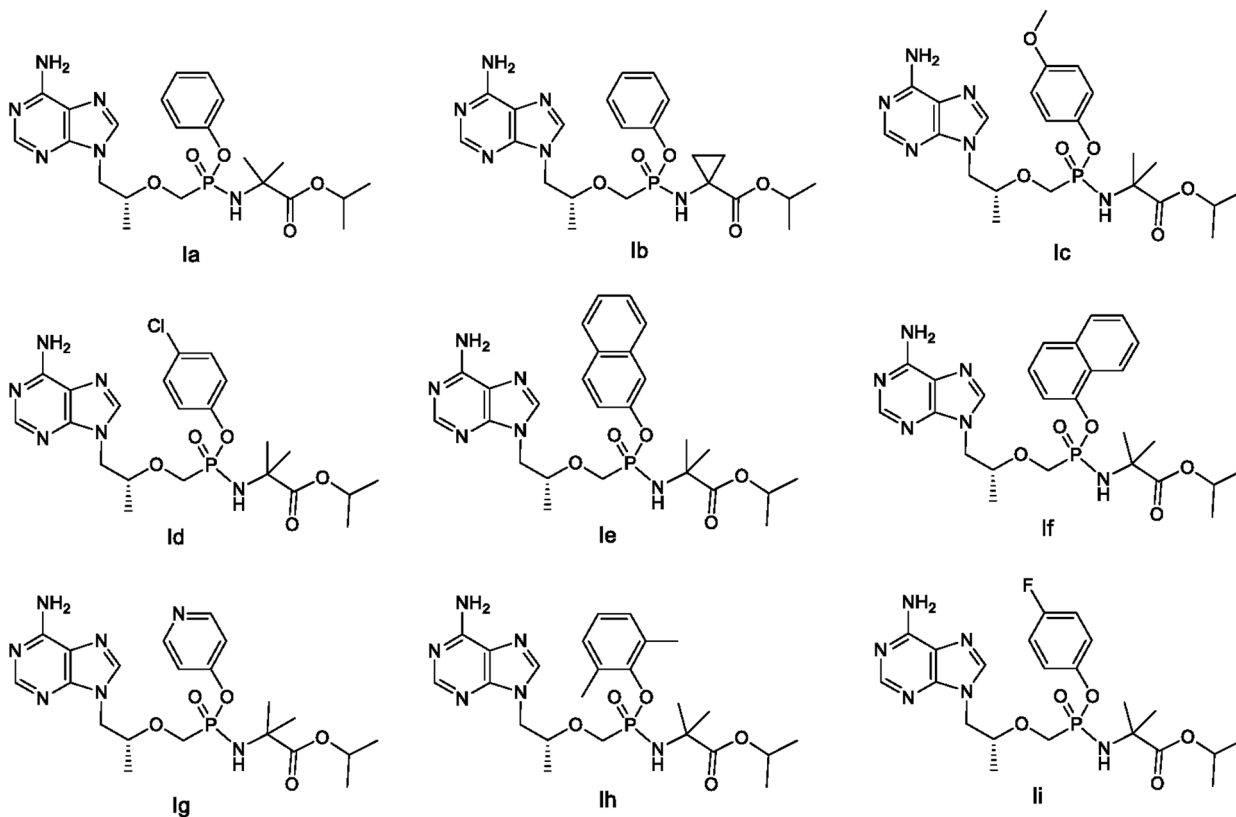
R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son alquilo C<sub>1-6</sub> respectivamente, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con el átomo de carbono unido forman un cicloalquilo C<sub>3-7</sub>; R<sup>3</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> sustituido o no sustituido o heteroarilo dividido en 6 a 10 miembros;

Ar es arilo C<sub>6-10</sub> sustituido o no sustituido o heteroarilo dividido en 6 a 10 miembros.

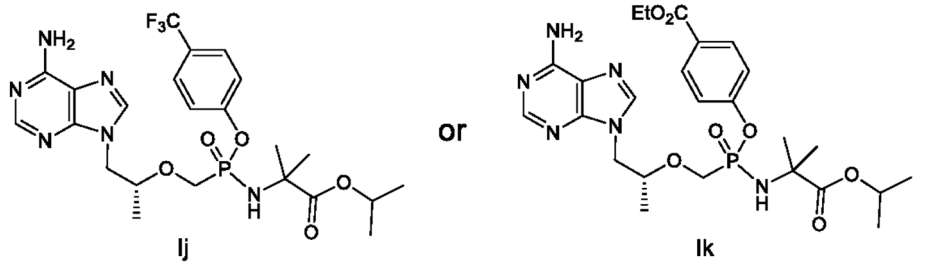
10 2. El compuesto de la fórmula general (I) de acuerdo con la reivindicación 1 o el estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, caracterizado porque el átomo de fósforo es quiral y la configuración es S o R, o una mezcla de R y S

3. El compuesto de la fórmula general (I) de acuerdo con la reivindicación 1 o el estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, caracterizado porque el estereoisómero comprende tautómero, isómero cis-trans, isómero conformacional, mesómero o isómero óptico enantiomérico o diastereomérico.

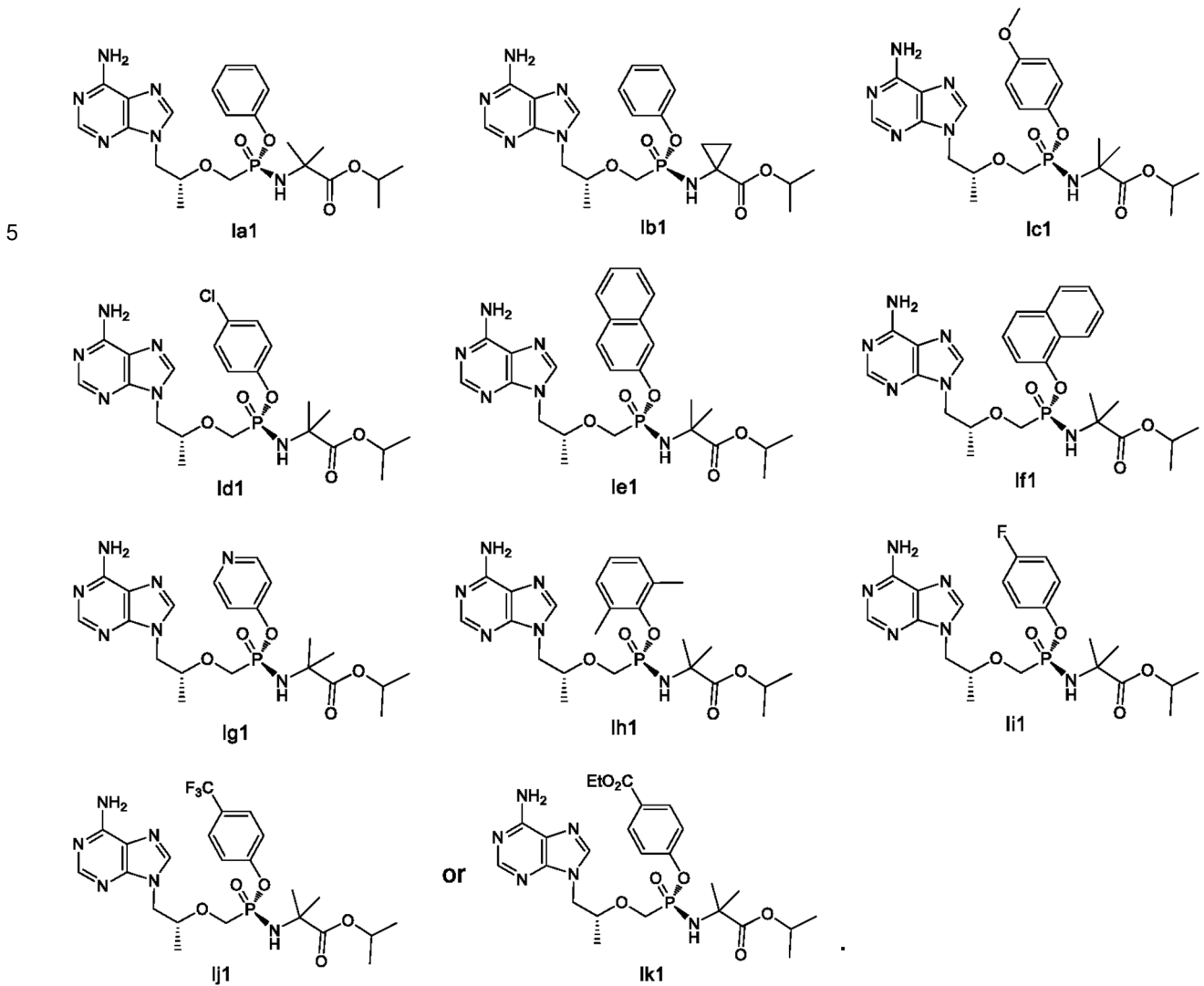
15 4. El compuesto de la fórmula general (I) de acuerdo con la reivindicación 1 o el estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



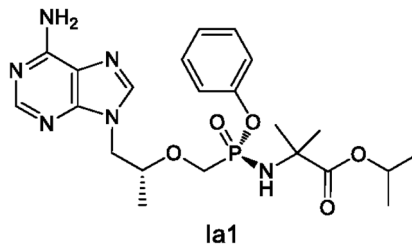




5. El compuesto de la fórmula general (I) de acuerdo con la reivindicación 1 o el estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



10 6. El compuesto de la fórmula general (I) de acuerdo con la reivindicación 1 o el estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el compuesto es:



7. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o el estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 5 8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en agua para inyección, excipiente de polvo liofilizado o excipiente de preparación oral.
9. Uso del compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el estereoisómero, sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de infecciones virales, preferiblemente infección por VIH, hepatitis B o enfermedades causadas por virus de la hepatitis B.
- 10 10. Uso de la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de infecciones virales, preferiblemente infección por VIH, hepatitis B o enfermedades causadas por el virus de la hepatitis B.