

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 464**

51 Int. Cl.:

C07H 19/10 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2011 PCT/RU2011/000805**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13055252**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2011 E 11874106 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2767543**

54 Título: **Salas de ésteres del ácido carbamoil-fosfónico que actúan como inhibidores selectivos de la producción del virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.01.2018

73 Titular/es:

**AKTSIONERNOE OBSHCHESTVO
"PROIZVODSTVENNO-KOMMERCHESKAYA
ASSOTSIATSIYA AZT" (100.0%)
ul. 3-ya Cherepkovskaya 15-A
Moscow 121552, RU**

72 Inventor/es:

**GOLUBEVA, NATALYA ALEXANDROVNA;
YASKO, MAXIM VLADIMIROVICH;
TARUSOVA, NATALYA BORISOVNA;
BIBILASHVILI, ROBERT SHALVOVICH y
KONONOV, ALEXANDER VASILIEVICH**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 650 464 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

5 Sales de ésteres del ácido carbamoil-fosfónico que actúan como inhibidores selectivos de la producción del virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1

5 **Campo técnico**

10 La invención se refiere al campo de la biología molecular, la virología y la medicina y se refiere a nuevos compuestos bioactivos, concretamente a sales de carbamoil-fosfonato. Los compuestos novedosos pueden inhibir selectivamente la producción del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y pueden, por tanto, considerarse para su uso en el campo de la medicina para el tratamiento del sida.

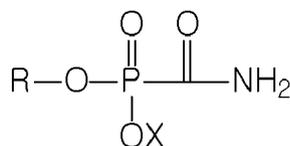
15 **Técnica anterior**

15 Se usan ampliamente nucleósidos modificados en el tratamiento y la prevención de muchas enfermedades víricas. El primer fármaco anti-VIH original ruso, 5'-H-fosfonato de 3'-azido-3'-desoxitimidina (Nikavir®), sirve como ejemplo de un compuesto de este tipo. Al ser una forma latente de 3'-azido-3'-desoxitimidina, Nikavir® ofrece varias ventajas respecto a este último: es menos tóxico para los pacientes y tiene una gama más reducida de efectos secundarios; su periodo de aclaramiento es dos veces más largo, lo que hace posible reducir la frecuencia de dosificación, y se desarrolla resistencia al mismo mucho más lentamente y a un nivel significativamente menor.

20 El éster [(2S,3S,5R)-3-azido-5-(5-metil-2,4-desoxitimidin-1-il)oxolan-2-il]metílico del ácido carbamoil-fosfónico, tal como Nikavir®, es una forma de depósito de 3'-azido-3'-desoxitimidina [documento RU 2322450 C2. Modified 5'-Phosphonates of AZT (3'-azido-3'-deoxythymidine) as Active Components for Potential Antiviral Drugs; M.V. Ias'ko, A.V. Shipitsin, A.L. Khandzhinskaya, *et al.* // New derivatives of alkyl- and aminocarbonylphosphonic acids containing 3'-azido-3'-deoxythymidine. // Bioorg Khim, 2006, 32(6), 603-608; A.L. Khandzhinskaya, D.V. Yanvarev, M.V. Jasko *et al.* // 5'-Aminocarbonyl phosphonates as new zidovudine depot forms: antiviral properties, intracellular transformations, and pharmacokinetic parameters.// Drug Metabolism and Disposition, 2009, 37(3), 494-501], sin embargo, es extremadamente difícil crear su forma de dosificación debido a su inestabilidad.

30 **Divulgación de la invención**

Las sales de carbamoil-fosfonato notificadas se describen usando la fórmula común:



35 en la que

40 R es [(2S,3S,5R)-3-azido-5-(5-metil-2,4-desoxipirimidin-1-il)oxolan-2-il]metil(3'-azido-3'-desoxitimidina); y

45 X es un ion de metal alcalino o alcalinotérreo, o un ion amonio sustituido con hidrógeno; o el ion amonio de alfa-aminoácidos naturales y sus ésteres; o el ion amonio de aminoácidos primarios, secundarios y terciarios y sus ésteres con grupos alifáticos, aromáticos, carbocíclicos y heterocíclicos; o el ion amonio de aminoalcoholes primarios, secundarios y terciarios con grupos alifáticos, aromáticos, carbocíclicos y heterocíclicos; o el ion amonio de aminas primarias, secundarias y terciarias y aminas poliméricas con grupos alifáticos, aromáticos, carbocíclicos y heterocíclicos, que son inhibidores selectivos de la reproducción del VIH-1.

50 Las sales notificadas son iguales a la forma de ácido éster [(2S,3S,5R)-3-azido-5-(5-metil-2,4-desoxipirimidin-1-il)oxolan-2-il]metílico del ácido carbamoil-fosfónico en cuanto a actividad y toxicidad pero, al mismo tiempo, son superiores en cuanto a capacidad de cristalización y estabilidad. Además, nuevas sales amplían la gama de compuestos con actividad inhibidora del VIH-1.

55 Las sustancias novedosas son sustancias cristalinas blancas, muy solubles en agua, parcialmente solubles en alcoholes y casi insolubles en cloroformo.

60 Se obtienen añadiendo la cantidad equimolar de amoníaco, el compuesto de amino apropiado o el hidróxido de metal alcalino o alcalinotérreo a la forma de ácido del carbamoil-fosfonato. Las disoluciones de sales resultantes se reducen por ebullición hasta pequeños volúmenes, a partir de los cuales empieza la cristalización espontánea, y se dejan a 4°C hasta que se completa la cristalización; se filtra el precipitado y se seca a vacío. El rendimiento del compuesto objetivo es del 95-98%.

La limpieza y la estructura de nuevos compuestos se han confirmado con datos de HPLC, espectroscopía de UV y

RMN.

5 Se llevó a cabo el análisis de estabilidad para los compuestos obtenidos en forma de disoluciones acuosas al 1% a temperatura ambiente. La forma de ácido del carbamoil-fosfonato y la sal de amoníaco se degradan en un 40% y un 2%, respectivamente, en el plazo de un mes; no se detectaron productos de destrucción para las demás sales en el plazo de un mes.

10 Los compuestos novedosos inhiben la reproducción del VIH-1 en el cultivo de linfocitos con pases MT-4, protegiendo a las células de la acción vírica citopatógena, y no demuestran toxicidad hacia células huésped, hasta concentraciones extremadamente altas (tabla 1). Los datos experimentales obtenidos sugieren que los compuestos estudiados, sin tener ninguna acción tóxica sobre las células en concentraciones eficaces (el 50% de la dosis tóxica supera el 50% de las dosis inhibitoras en un factor de 2-4), suprimen la reproducción del VIH-1 hasta un grado elevado en el cultivo de células MT-4, determinado como la razón de la dosis tóxica del fármaco con respecto a su dosis eficaz, siendo comparables con aquellos para la forma de ácido del carbamoil-fosfonato. Se llevan a cabo ensayos víricos según los protocolos descritos anteriormente.

Mejores opciones de implementación de la invención

A continuación se proporcionan los ejemplos que revelan la esencia de la invención.

20 Ejemplo 1

Síntesis de la sal de sodio del carbamoil-fosfonato.

25 Se añaden 100 ml (0,5 mol) de disolución de hidróxido de sodio 5 N a 187 g (0,5 mol) de disolución de la forma de ácido del carbamoil-fosfonato y se agita todo durante 20 minutos en 350 ml de agua destilada a 4°C. Se reduce por ebullición la disolución resultante en un evaporador rotatorio (temperatura de baño de 40°C) hasta 100 ml/ 150 ml de volumen y se deja a la temperatura de 4°C hasta que se completa la cristalización. Se separa el precipitado cristalino fino usando un filtro de vidrio, se lava con 20 ml de agua enfriada hasta 4°C y se seca a vacío. Rendimiento: 191,2 g (96,5%).

30 El tiempo de retención en la columna Luna 100 C18(2) de 150 mm x 4,6 mm: 2,4 min (fase móvil: disolución de acetato de amoníaco 0,05 M - acetonitrilo, con la razón 8:1, la temperatura de la columna es de 40°C, la velocidad de flujo es de 1 ml/min).

35 Espectro de UV (agua): $\lambda_{\text{máx}}$. 266,5 nm (ϵ 9.800).

40 ^1N -RMN (D₂O), ppm: 7,56 (1H, s, H₆), 6,12 (1H, t, J 6,7 Hz, H_{1'}), 4,38 (1H, m, H_{3'}), 4,17 (3H, m, H_{4'}, H_{5'}), 2,38 (2H, t, J 6,2 Hz, H_{2'}), 1,79 (3H, s, 5-CH₃).

^{31}R -RMN (D₂O), ppm: -1,42 (s).

Ejemplo 2

45 Síntesis de la sal de potasio del carbamoil-fosfonato.

50 Se añaden 100 ml (0,5 mol) de disolución de hidróxido de potasio 5 N a 187 g (0,5 mol) de disolución de la forma de ácido del carbamoil-fosfonato y se agita todo durante 20 minutos en 350 ml de agua destilada a 4°C. Se reduce por ebullición la disolución resultante en un evaporador rotatorio (temperatura de baño: 40°C) hasta el volumen de 100 ml/ 150 ml y se deja a 4°C hasta que se completa la cristalización. Se separa el precipitado cristalino fino usando un filtro de vidrio, se lava con 20 ml de agua enfriada hasta 4°C y se seca a vacío. Rendimiento: 200,6 g (97,3%).

55 El tiempo de retención en la columna Luna 100 C18(2) de 150 mm x 4,6 mm: 2,4 min (fase móvil: disolución de acetato de amoníaco 0,05 M - acetonitrilo, en la razón 8:1; la temperatura de la columna es de 40°C, la velocidad de flujo es de 1 ml/min). Espectro de UV (agua): $\lambda_{\text{máx}}$. 267,0 nm (ϵ 9.600).

60 ^1N -RMN (D₂O), ppm: 7,67 (1H, s, H₆), 6,21 (1H, t, J 6,6 Hz, H_{1'}), 4,50 (1H, m, H_{3'}), 4,19 (3H, m, H_{4'}, H_{5'}), 2,49 (2H, t, J 6,6 Hz, H_{2'}), 1,91 (3H, s, 5-CH₃).

^{31}R -RMN (D₂O), ppm: -1,59 (s).

Ejemplo 3

65 Síntesis de la sal de calcio del carbamoil-fosfonato.

ES 2 650 464 T3

Se añaden 1.000 ml (0,25 mol) de disolución de hidróxido de calcio filtrada previamente 0,5 N a 187 g (0,5 mol) de disolución de la forma de ácido de carbamoil-fosfonato y se agita todo durante 20 minutos en 350 ml de agua destilada a la temperatura de 4°C. Se reduce por ebullición la disolución resultante en un evaporador rotatorio (temperatura de baño: 40°C) hasta el volumen de 200 ml y se deja a 4°C hasta que se completa la cristalización. Se separa el precipitado cristalino fino usando un filtro de vidrio, se lava con 20 ml de agua enfriada hasta 4°C y se seca a vacío. Rendimiento: 192,9 g (98,1%).

El tiempo de retención en la columna Luna 100 C18(2) de 150 mm x 4,6 mm es de 2,4 minutos (fase móvil: disolución de acetato de amoníaco 0,05 M - acetonitrilo, en la razón 8:1; la temperatura de la columna es de 40°C, la velocidad de flujo es de 1 ml/min). Espectro de UV (agua): $\lambda_{\text{máx}}$. 266,8 nm (ϵ 9.400).

^1N -RMN (D₂O), ppm: 7,59 (1H, s, H₆), 6,15 (1H, t, J 6,6 Hz, H_{1'}), 4,41 (1H, m, H_{3'}), 4,10 (3H, m, H_{4'}, H_{5'}), 2,41 (2H, t, J 5,9 Hz, H_{2'}), 1,82 (3H, s, 5-CH₃).

^{31}R -RMN (D₂O), ppm: -1,59 (s).

Ejemplo 4

Síntesis de la sal de bario del carbamoil-fosfonato.

Se añaden 1.000 ml (0,25 mol) de disolución de hidróxido de bario filtrada previamente 0,5 N a 187 g (0,5 mol) de la forma de ácido de carbamoil-fosfonato y se agita todo durante 20 minutos en 350 ml de agua destilada a 4°C. Se reduce por ebullición la disolución resultante en un evaporador rotatorio (temperatura de baño: 40°C) hasta 300 ml y se deja a 4°C hasta que se completa la cristalización. Se separa el precipitado cristalino fino usando un filtro de vidrio, se lava con 20 ml de agua enfriada hasta 4°C y se seca a vacío. Rendimiento: 216,3 g (97,9%).

El tiempo de retención en la columna Luna 100 C18(2) de 150 mm x 4,6 mm: 2,4 min (fase móvil: 0,05 M de acetato de amoníaco - acetonitrilo, en la razón 8:1; la temperatura de la columna es de 40°C, la velocidad de flujo es de 1 ml/min). Espectro de UV (agua): $\lambda_{\text{máx}}$. 266,7 nm (ϵ 9.400).

^1N -RMN (D₂O), ppm: 7,65 (1H, s, H₆), 6,20 (1H, t, J 6,6 Hz, H_{1'}), 4,47 (1H, m, H_{3'}), 4,16 (3H, m, H_{4'}, H_{5'}), 2,46 (2H, t, J 6,5 Hz, H_{2'}), 1,87 (3H, s, 5-CH₃).

^{31}R -RMN (D₂O), ppm: -1,56 (s).

Ejemplo 5

Síntesis de la sal de amonio del carbamoil-fosfonato.

Se añaden 100 ml (0,5 mol) de amoníaco acuoso 5 N a 187 g (0,5 mol) de disolución de la forma de ácido de carbamoil-fosfonato y se agita todo durante 20 minutos en 350 ml de agua destilada a 4°C. Se reduce por ebullición la disolución resultante en un evaporador rotatorio (temperatura de baño: 40°C) hasta 100 ml/ 150 ml y se deja a 4°C hasta que se completa la cristalización. Se separa el precipitado cristalino fino usando un filtro de vidrio, se lava con 20 ml de agua enfriada hasta 4°C y se seca a vacío. Rendimiento: 186,2 g (95,2%).

El tiempo de retención en la columna Luna 100 C18(2) de 150 mm x 4,6 mm: 2,4 minutos (fase móvil: 0,05 M de disolución de acetato de amoníaco - acetonitrilo, en la razón 8:1, la temperatura de la columna es de 40°C, la velocidad de flujo es de 1 ml/min). Espectro de UV (agua): $\lambda_{\text{máx}}$. 266,8 nm (ϵ 9.650).

^1N -RMN (D₂O), ppm: 7,65 (1H, s, H₆), 6,20 (1H, t, J 6,5 Hz, H_{1'}), 4,46 (1H, m, H_{3'}), 4,16 (3H, m, H_{4'}, H_{5'}), 2,46 (2H, t, J 5,9 Hz, H_{2'}), 1,87 (3H, s, 5-CH₃).

^{31}R -RMN (D₂O), ppm: -1,59 (s).

Ejemplo 6

Síntesis de la sal de L-alanina del carbamoil-fosfonato.

Se añaden 200 ml (0,5 mol) de disolución de L-alanina 2,5 N a 187 g (0,5 mol) de disolución de la forma de ácido de carbamoil-fosfonato, y se agita todo durante 20 minutos en 350 ml de agua destilada a 4°C. Se reduce por ebullición la disolución resultante en un evaporador rotatorio (temperatura de baño: 40°C) hasta 100 ml/ 150 ml y se deja a 4°C hasta que se completa la cristalización. Se separa el precipitado cristalino fino usando un filtro de vidrio, se lava con 20 ml de agua enfriada hasta 4°C y se seca a vacío. Rendimiento: 221,5 g (95,8%).

El tiempo de retención en la columna Luna 100 C18(2) de 150 mm x 4,6 mm: 2,4 min (fase móvil: 0,05 M de disolución de acetato de amoníaco - acetonitrilo, en la razón 8:1, la temperatura de la columna es de 40°C, la

velocidad de flujo es de 1 ml/min). Espectro de UV (agua): $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$. 266,8 nm (ϵ 9.600).

^1N -RMN (D₂O), ppm: 7,63 (1H, s, H₆), 6,21 (1H, t, J 6,7 Hz, H_{1'}), 4,43 (1H, m, H_{3'}), 4,25 (1H, q, J 6,5 Hz, CH (alanina)), 4,10 (3H, m, H_{4'}, H_{5'}), 2,45 (2H, t, J 6,0 Hz, H_{2'}), 1,84 (3H, s, 5-CH₃), 1,33 (3H, d, J 6,5 Hz, CH₃ (alanina)).

^{31}R -RMN (D₂O), ppm: -1,57 (s).

Ejemplo 7

Síntesis de la sal de etanolamonio del carbamoil-fosfonato.

Se añaden 100 ml (0,5 mol) de disolución de etanolamina 5 N a 187 g (0,5 mol) de disolución de la forma de ácido de carbamoil-fosfonato, y se agita todo durante 20 minutos en 350 ml de agua destilada a 4°C. Se reduce por ebullición la disolución resultante en un evaporador rotatorio (temperatura de baño: 40°C) hasta 100 ml/ 150 ml y se deja a 4°C hasta que se completa la cristalización. Se separa el precipitado cristalino fino usando un filtro de vidrio, se lava con 20 ml de agua enfriada hasta 4°C y se seca a vacío. Rendimiento: 208,3 g (95,9%).

El tiempo de retención en la columna Luna 100 C18(2) de 150 mm x 4,6 mm: 2,4 min (la fase móvil: 0,05 M de disolución de acetato de amoníaco - acetonitrilo, en la razón 8:1, la temperatura de la columna es de 40°C, la velocidad de flujo es de 1 ml/min). Espectro de UV (agua): $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$. 266,8 nm (ϵ 9.900).

^1N -RMN (D₂O), ppm: 7,61 (1H, s, H₆), 6,17 (1H, t, J 6,7 Hz, H_{1'}), 4,48 (1H, m, H_{3'}), 4,18 (3H, m, H_{4'}, H_{5'}), 3,61 (2H, t, J 5,0 Hz, CH₂O (etanolamina)), 3,19 (2H, t, J 5,0 Hz, CH₂N (etanolamina)), 2,45 (2H, t, J 6,1 Hz, H_{2'}), 1,86 (3H, s, 5-CH₃).

^{31}R -RMN (D₂O), ppm: -1,55 (s).

Ejemplo 8

Síntesis de la sal de trietanolamonio del carbamoil-fosfonato.

Se añaden 100 ml (0,5 mol) de disolución de trietanolamina 5 N a 187 g (0,5 mol) de disolución de la forma de ácido de carbamoil-fosfonato, y se agita todo durante 20 minutos en 350 ml de agua destilada a 4°C. Se reduce por ebullición la disolución resultante en un evaporador rotatorio (temperatura de baño: 40°C) hasta 100 ml/ 150 ml y se deja a 4°C hasta que se completa la cristalización. Se separa el precipitado cristalino fino usando un filtro de vidrio, se lava con 20 ml de agua enfriada hasta 4°C y se seca a vacío. Rendimiento: 255,5 g (97,8%).

El tiempo de retención en la columna Luna 100 C18(2) de 150 mm x 4,6 mm: 2,4 min (la fase móvil: 0,05 M de disolución de acetato de amoníaco - acetonitrilo, en la razón 8:1, la temperatura de la columna es de 40°C, la velocidad de flujo es de 1 ml/min). Espectro de UV (agua): $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$. 266,9 nm (ϵ 9.700).

^1N -RMN (D₂O), ppm: 7,58 (1H, s, H₆), 6,15 (1H, t, J 6,5 Hz, H_{1'}), 4,39 (1H, m, H_{3'}), 4,09 (3H, m, H_{4'}, H_{5'}), 3,88 (6H, t, J 5,0 Hz, 3CH₂O (trietanolamina)), 3,22 (6H, t, J 5,0 Hz, 3CH₂N (trietanolamina)), 2,41 (2H, t, J 6,0 Hz, H_{2'}), 1,80 (3H, s, 5-CH₃).

^{31}R -RMN (D₂O), ppm: -1,53 (s).

Ejemplo 9

Síntesis de la sal de ácido 6-aminocaproico del carbamoil-fosfonato.

Se añaden 200 ml (0,5 mol) de disolución de ácido 6-aminocaproico 2,5 N a 187 g (0,5 mol) de disolución de la forma de ácido de carbamoil-fosfonato, y se agita todo durante 20 minutos en 350 ml de agua destilada a 4°C. Se reduce por ebullición la disolución resultante en un evaporador rotatorio (temperatura de baño: 40°C) hasta 100 ml/ 150 ml y se deja a 4°C hasta que se completa la cristalización. Se separa el precipitado cristalino fino usando un filtro de vidrio, se lava con 20 ml de agua enfriada hasta 4°C y se seca a vacío. Rendimiento: 232,7 g (94,9%).

El tiempo de retención en la columna Luna 100 C18(2) de 150 mm x 4,6 mm: 2,4 min (la fase móvil: 0,05 M de disolución de acetato de amoníaco - acetonitrilo, en la razón 8:1, la temperatura de la columna es de 40°C, la velocidad de flujo es de 1 ml/min). Espectro de UV (agua): $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$. 266,6 nm (ϵ 9.900).

^1N -RMN (D₂O), ppm: 7,64 (1H, s, H₆), 6,20 (1H, t, J 6,7 Hz, H_{1'}), 4,46 (1H, m, H_{3'}), 4,46 (3H, m, H_{4'}, H_{5'}), 3,02 (2H, t, J 7,1 Hz, CH₂N (ácido aminocaproico)), 2,45 (2H, t, J 6,1 Hz, H_{2'}), 2,34 (2H, t, J 7,1 Hz, CH₂COOH (ácido aminocaproico)), 1,87 (3H, s, 5-CH₃), 1,52 (6H, m, 3CH₂ (ácido aminocaproico)).

³¹R-RMN (D2O), ppm: -1,57 (s).

Ejemplo 10

5 Síntesis de la sal de ácido de piridoxilamonio del carbamoil-fosfonato

Se añaden 250 ml (0,5 mol) de disolución piridoxilamina 2 N a 187 g (0,5 mol) de disolución de la forma de ácido de carbamoil-fosfonato, y se agita todo durante 20 minutos en 350 ml de agua destilada a 4°C. Se reduce por ebullición la disolución resultante en un evaporador rotatorio (temperatura de baño: 40°C) hasta 100 ml/ 150 ml y se deja a 4°C hasta que se completa la cristalización. Se separa el precipitado cristalino fino usando un filtro de vidrio, se lava con 20 ml de agua enfriada hasta 4°C y se seca a vacío. Rendimiento: 261,2 g (96,5%).

El tiempo de retención en la columna Luna 100 C18(2) de 150 mm x 4,6 mm: 2,4 min (la fase móvil: 0,05 M de disolución de acetato de amoníaco - acetonitrilo, en la razón 8:1, la temperatura de la columna es de 40°C, la velocidad de flujo es de 1 ml/min). Espectro de UV (agua): λ_{máx.} 266,8 nm (ε 14.100).

¹N-RMN (D2O), ppm: 8,08 (1H, s, Ar (piridoxilamina)), 7,65 (1H, s, H6), 6,20 (1H, t, J 6,7 Hz, H1') 4,84 (2H, s, CH2OH (piridoxilamina)), 4,48 (1H, m, H3'), 4,21 (2H, s, CH2NH2 (piridoxilamina)), 4,09 (3H, m, H4', H5'), 2,77 (3H, s, CH3 (piridoxilamina)), 2,47 (2H, t, J 6,1 Hz, H2'), 1,89 (3H, s, 5-CH3).

³¹R-RMN (D2O), ppm: -1,51 (s).

Ejemplo 11

25 Síntesis de la sal de carbamoil-fosfonato y dimetilaminoetanolato

Se añaden 100 ml (0,5 mol) de dimetilaminoetanol 5 N a 187 g (0,5 mol) de disolución de la forma de ácido de carbamoil-fosfonato, y se agita todo durante 20 minutos en 350 ml de agua destilada a 4°C. Se reduce por ebullición la disolución resultante en un evaporador rotatorio (temperatura de baño: 40°C) hasta 100 ml/ 150 ml y se deja a 4°C hasta que se completa la cristalización. Se separa el precipitado cristalino fino usando un filtro de vidrio, se lava con 20 ml de agua enfriada hasta 4°C y se seca a vacío. Rendimiento: 221,2 g (95,7%).

El tiempo de retención en la columna Luna 100 C18(2) de 150 mm x 4,6 mm: 2,4 min (la fase móvil: 0,05 M de disolución de acetato de amoníaco - acetonitrilo, en la razón 8:1, la temperatura de la columna es de 40°C, la velocidad de flujo es de 1 ml/min). Espectro de UV (agua): λ_{máx.} 266,7 nm (ε 9.800).

¹N-RMN (D2O), ppm: 7,67 (1H, s, H6), 6,24 (1H, t, J 6,7 Hz, H1') 4,49 (1H, m, H3'), 4,18 (3H, m, H4', H5'), 3,93 (2H, t, J 5,0 Hz, CH2O (dimetilaminoetanol)), 3,21 (2H, t, J 5,0 Hz, CH2N (dimetilaminoetanol)), 2,51 (6H, s, CH3 (dimetilaminoetanol)), 2,41 (2H, m, H2'), 1,89 (3H, s, 5-CH3).

³¹R-RMN (D2O), ppm: -1,50 (s).

Ejemplo 12

45 El estudio de inhibición del VIH incluye el cultivo de células linfoides de la línea MT-4 infecciosas primarias sobre los compuestos estudiados, cuyas concentraciones finales en el medio de cultivo oscilan entre 0,001 µg/ml y 100 µg/ml, durante un pase, en el plazo de 4 días.

50 La inhibición de la reproducción del VIH en el cultivo celular sensible se determina mediante la reducción en la acumulación de proteína específica del virus p24 (según el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) y por el aumento en la vitalidad celular sobre el fármaco en comparación con las células de referencia, en el día 4 del cultivo, usando tinción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Evaluación de la citotoxicidad del compuesto

55 La citotoxicidad de un fármaco se estima añadiendo su dilución en medio libre de suero RPMI-1640 a una suspensión de células MT-4 colocada en las cavidades del panel de 96 cavidades (Cel-Cult, Inglaterra), hasta las concentraciones finales de 0,001-100 µg/ml (tres cavidades por dosis), con posterior cultivo a 37°C en el plazo de 4 días. La concentración de inoculación es de 0,5x10⁶ partículas celulares en 1 mm. Las células, 100 µg/ml (tres cavidades por dosis), con posterior cultivo a 37°C en el plazo de 4 días. La concentración de inoculación es de 0,5x10⁶ partículas celulares en 1 mm. Las células, a las que no se les añadió el fármaco y se sustituyó por la misma cantidad de medio libre de suero, sirven como referencia. Se cuenta la vitalidad celular en el día 4 de cultivo, usando el método de formazán (tinción intravital de células MTT). Se determina la toxicidad de diferentes dosis de fármaco mediante la vitalidad celular en comparación con las células de referencia; se construye la curva dependiente de la dosis usando los datos obtenidos, y se determina la concentración que reduce la vitalidad celular en un 50% (CD50).

Los compuestos en uso no tienen ningún impacto tóxico en las células MT-4 en concentraciones eficaces. También es significativo que las dosis tóxicas del 50% superaban las dosis eficaces de VIH-1 en un factor de 2-4 (véase la tabla 1).

- 5 El impacto de los compuestos estudiados sobre la reproducción del VIH-1 en cultivo de células MT-4 se estudia usando una técnica bien conocida.

- 10 El índice terapéutico, o el índice selectivo (IS), se calcula como la razón de la concentración tóxica del 50% del compuesto con respecto a su dosis eficaz del 50% (los resultados se muestran en la tabla 1). Basándose en estos indicadores cuantitativos de inhibición, puede juzgarse la eficacia de la acción antivírica de los compuestos notificados, que consiste en una alta supresión de la replicación del VIH-1 en cultivo de células MT-4, comparable con la eficacia de la forma de ácido del carbamoil-fosfonato.

15 Tabla 1. Actividad antivírica de sales de carbamoil-fosfonato frente a VIH-1, GVK4046.

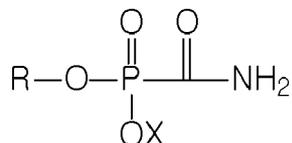
Compuesto	CD ₅₀ , μM	ID ₅₀ , μM	IS
X = Na	2,7	1,2	2.250
X = K	2,5	0,9	2.778
X = Ca	1,9	1	1.900
X = Ba	3,5	1,3	2.692
X = NH ₄	2,7	0,8	3.375
X = NH ₂ CH(CH ₃)COOH	2,9	0,9	3.222
X = NH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	2,8	1,1	2.545
X = N(CH ₂ CH ₂ OH) ₃	3	0,9	3.333
X = NH ₂ (CH ₂) ₅ COOH	3,2	0,8	4.000
X = piridoxilamina	2,1	1	2.100
X = N(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₂ OH	2,7	0,9	3.000
Forma de ácido (referencia)	2,6	0,8	3.250

Aplicabilidad industrial

- 20 Por tanto, las sustancias novedosas, sales de carbamoil-fosfonato, inhiben la reproducción del VIH-1 en cultivos de linfocitos, y con aproximadamente la misma actividad que la observada para la forma de ácido de carbamoil-fosfonato. La toxicidad de las sales notificadas también se encuentra dentro de la toxicidad de la forma de ácido de carbamoil-fosfonato. Al mismo tiempo, los compuestos novedosos son más estables, lo que facilita la creación de fármacos basándose en los mismos.

REIVINDICACIONES

1. Sales de carbamoil-fosfonato de fórmula general:



5

en la que

10

R es [(2S,3S,5R)-3-azido-5-(5-metil-2,4-desoxipirimidin-1-il)oxolan-2-il]metil(3'-azido-3'-desoxitimidina); y

15

X es un ion de metal alcalino o alcalinotérreo, o un ion amonio sustituido con hidrógeno; o el ion amonio de alfa-aminoácidos naturales y sus ésteres; o el ion amonio de aminoácidos primarios, secundarios y terciarios y sus ésteres con grupos alifáticos, aromáticos, carbocíclicos y heterocíclicos; o el ion amonio de aminoalcoholes primarios, secundarios y terciarios con grupos alifáticos, aromáticos, carbocíclicos y heterocíclicos; o el ion amonio de aminas primarias, secundarias y terciarias y aminas poliméricas con grupos alifáticos, aromáticos, carbocíclicos y heterocíclicos, que son inhibidores selectivos de la reproducción del VIH-1.