

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 602**

51 Int. Cl.:

C07F 9/44 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10158740 .0**

96 Fecha de presentación: **29.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **2204374**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.2010**

54 Título: **Fosfonatos de nucleósidos y análogos de los mismos para el tratamiento de infecciones por el VPH**

30 Prioridad:
30.12.2003 US 533745 P
26.07.2004 US 590987 P
01.09.2004 US 606595 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2012

73 Titular/es:
GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)
333 LAKESIDE DRIVE FOSTER CITY
CALIFORNIA 94404, US

72 Inventor/es:
CHENG, XIAQIN;
COOK, GARY P.;
DESAI, MANOJ, C.;
DOERFFLER, EDWARD;
HE, GONG-XIN;
KIM, CHOUNG, U.;
LEE, WILLIAM, A.;
ROHLOFF, JOHN, C.;
WANG, JIANYING y
YANG, ZHENG-YU

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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).

ES 2 389 602 T3

DESCRIPCIÓN

Fosfonatos de nucleósidos y análogos de los mismos para el tratamiento de infecciones por el VPH

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a compuestos para su uso en el tratamiento de infecciones víricas, en particular virus del papiloma humano.

Antecedentes

10 El virus del papiloma humano (VPH) es una de las infecciones transmitidas sexualmente más prevalentes en el mundo. Existen más de 100 tipos diferentes del VPH, siendo inocuos la mayor parte de los mismos. No obstante, existen aproximadamente 30 tipos que se transmiten a través del contacto sexual. Algunos tipos del VPH provocan verrugas genitales que aparecen como protuberancias simples o múltiples en las áreas genitales de hombres y mujeres, incluidas la vagina, el cuello uterino, la vulva (superficie exterior de la vagina), el pene y el recto. Sin embargo, muchas personas infectadas por el VPH no tienen síntomas.

15 Aunque la mayor parte de los subtipos de VPH dan como resultado lesiones benignas, ciertos subtipos pueden conducir a lesiones más serias. Las infecciones anogenitales provocadas por el VPH-16 y el VPH-18, aunque son menos comunes que las del VPH-6 y del VPH-11, son las que están asociadas más frecuentemente con lesiones precancerosas en tejidos de cuello uterino y anal, llamadas displasias. Los pacientes con displasias son frecuentemente asintomáticos y pueden descubrir su lesión únicamente después de una exploración. Las displasias de alto grado, si se dejan sin tratar, pueden transformarse en tejidos cancerosos. Las lesiones de bajo grado pueden 20 revertirse espontáneamente, mientras que otras pueden progresar hasta lesiones de alto grado. El VPH-16 y el VPH-18 son los que están asociados más frecuentemente con displasias, aunque otros varios subtipos del VPH transformantes están también asociados con las displasias. Estudios recientes indican que hasta el 89 % de los varones homosexuales positivos al VIH pueden estar infectados con estos subtipos de alto riesgo del VPH. Es también más probable que los pacientes positivos al VIH estén infectados simultáneamente con múltiples subtipos 25 del VPH, lo que está asociado con un riesgo superior de progresión de la displasia.

Las verrugas genitales son la enfermedad transmitida sexualmente más común en el mundo, y son más prevalentes en personas de 17-33 años de edad. El VPH-6 y el VPH-11 son responsables de casi el 90 % de todas las verrugas genitales, pero están asociados raramente con crecimientos neoplásicos. De acuerdo con la American Social Health Association, al menos 20 millones de personas en los Estados Unidos están actualmente infectadas con el VPH, 30 teniendo lugar anualmente 5,5 millones de nuevos casos de infecciones de VPH transmitidas sexualmente. Las verrugas genitales producen generalmente protuberancias indoloras con picor situadas sobre o cerca de los genitales, pero sin tratamiento, pueden progresar desarrollándose en forma de coliflores más pronunciadas y más grandes. Aproximadamente dos tercios de personas que tienen contacto sexual con una persona infectada con verrugas desarrollarán verrugas en un periodo de tres meses después del contacto. La regresión espontánea de las 35 verrugas genitales ocurre en el 10-20 % de los casos de verrugas genitales. No obstante, incluso si una lesión se revierte, la recurrencia de verrugas genitales es común con un 50 % de recurrencia después de un año. Como resultado de las lesiones de aspecto desagradable, el tratamiento de las verrugas genitales es común.

La evidencia en las últimas dos décadas ha conducido a una amplia aceptación de que la infección por VPH es 40 necesaria, aunque no suficiente, para el desarrollo del cáncer de cuello uterino. La presencia del VPH en el cáncer de cuello uterino es estimada en un 99,7 %. Se piensa que el cáncer anal tiene una asociación similar entre la infección por el VPH y el desarrollo de la displasia anal y el cáncer anal, como es el caso con el cáncer de cuello uterino. En un estudio de pacientes negativos al VIH con cáncer anal, se encontró infección por el VPH en el 88 % de los cánceres anales. En los Estados Unidos en el año 2003, se pronostican 12.200 nuevos casos de cáncer de 45 cuello uterino y 4.100 muertes por cáncer de cuello uterino junto con 4.000 nuevos casos de cáncer anal y 500 muertes por cáncer anal. Aunque la incidencia de cáncer de cuello uterino ha disminuido en las últimas cuatro décadas debido a la generalización de los exámenes médicos, la incidencia del cáncer anal se está incrementado. El incremento en la incidencia del cáncer anal puede ser atribuido en parte a infección por el VIH ya que los pacientes positivos al VIH tienen una mayor incidencia de cáncer anal que la población general. Mientras que el cáncer anal 50 tiene una incidencia de 0,9 casos por 100.000 en la población general, el cáncer anal tiene una incidencia de 35 casos por 100.000 en la población masculina homosexual y 70-100 casos por 100.000 en la población masculina homosexual positiva al VIH. De hecho, debido a la alta prevalencia de la displasia anal entre pacientes infectados por el VIH y una tendencia creciente de los cánceres anales, las directrices de la USP/IDSA del 2003 para el tratamiento de enfermedades oportunistas en pacientes positivos al VIH incluirán las directrices de tratamiento para 55 pacientes diagnosticados con displasia anal.

No existe curación conocida para el VPH. Existen tratamientos para las verrugas genitales, aunque éstas 60 frecuentemente desaparecen incluso sin tratamiento. El procedimiento de tratamiento depende de factores tales como tamaño y la localización de las verrugas genitales. Entre los tratamientos usados están, la crema Imiquimod, solución antimicótica de podofilina al 20 por ciento, solución de podofilox al 0,5 por ciento, crema de 5-fluorouracilo al 5 por ciento y ácido tricloroacético. El uso de podofilina o podofilox no es recomendado para mujeres embarazadas, debido a que éstos son absorbidos por la piel y pueden provocar defectos de nacimiento. El uso de la 65 crema de 5-fluorouracilo tampoco está recomendado para mujeres embarazadas. Las verrugas genitales pequeñas pueden eliminarse físicamente mediante congelamiento (criocirugía), quemaduras (electrocauterización) o tratamiento con láser. Las verrugas grandes que no responden a otro tratamiento pueden tener que eliminarse mediante cirugía. Se ha sabido que las verrugas genitales regresan después de la eliminación física, en esos casos se ha usado el α -interferón para inyectarlo directamente en estas verrugas. No obstante, el α -interferón es caro y su uso no reduce la tasa de reaparición de las verrugas genitales.

R. Snoeck, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 3356-3361, evaluó la capacidad de inhibir el crecimiento de virus de la vacuna de una serie de derivados de fosfonatos de nucleósidos acíclicos en monocapas de células epiteliales y los derivados más potentes se analizaron en los cultivos organotípicos. K.A. Keith y col., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 2193-2198, evaluó la capacidad de inhibir la replicación de virus de la vacuna o de virus de la viruela bovina de una serie de fosfonatos de nucleósidos (análogos a cidofovir, adefovir y tenofovir) en células de cultivo de tejidos.

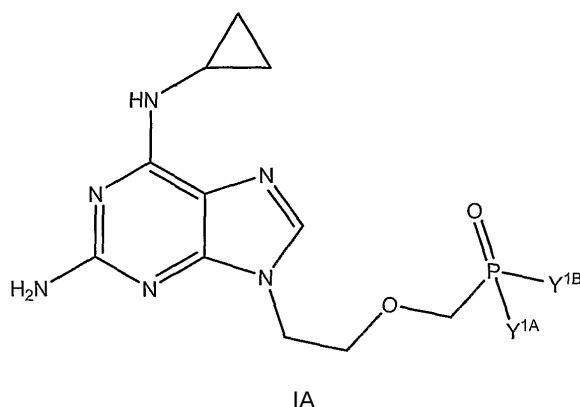
N.D. Christensen y col., Antiviral Research 48 (2000), 131-142, analizó la actividad en vivo contra el virus del papiloma de una serie de análogos de nucleósido y encontró que algunos de los mismos tienen una actividad potente.

El documento US 2003/0072814 divulga una composición farmacéutica tópica para el tratamiento de verrugas que contiene fosfonatos de nucleósidos y otros análogos de nucleósidos como compuestos activos, tales como ciclopropil-9-(2-fosfonilmetoxietil)-2,6-diaminopurina.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad no satisfecha de un tratamiento eficaz contra el VPH. Se han descubierto ahora, sorprendentemente, compuestos que satisfacen esta necesidad y que también proporcionan otros beneficios.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un compuesto de fórmula IA para su uso en el tratamiento de infecciones por el virus del papiloma (VPH)



en la que:

Y^{1A} e Y^{1B} son $-NH(R^x)$;

R^x es independientemente R^2 ;

R^2 es

(a) etilo sustituido con $C(=O)OR^4$, en la que R^4 es metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, i-butilo, s-butilo, t-butilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, 3,3-dimetil-2-butilo, vinilo, alilo, ciclopentenilo, 5-hexenilo, etinilo o propargilo;

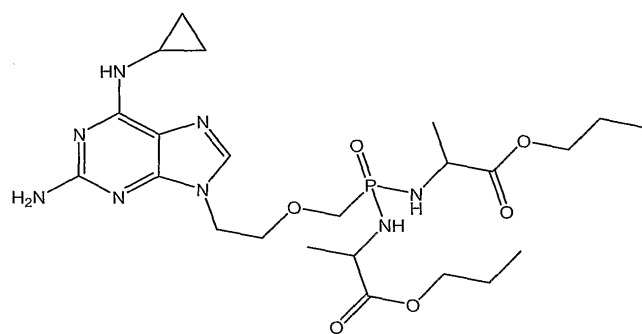
(b) propilo sustituido con $C(=O)OR^4$, en la que R^4 es un alquilo de 1 a 18 átomos de carbono, un alquenilo de 2 a 18 átomos de carbono o un alquinilo de 2 a 18 átomos de carbono; o

(c) metilo sustituido con 2 R^3 , en la que un R^3 es $-R^5W^3$ y el otro R^3 es $C(=O)OR^4$; R^4 es un alquilo de 1 a 18 átomos de carbono, un alquenilo de 2 a 18 átomos de carbono o un alquinilo de 2 a 18 átomos de carbono; R^5 es metileno; W^3 es fenilo;

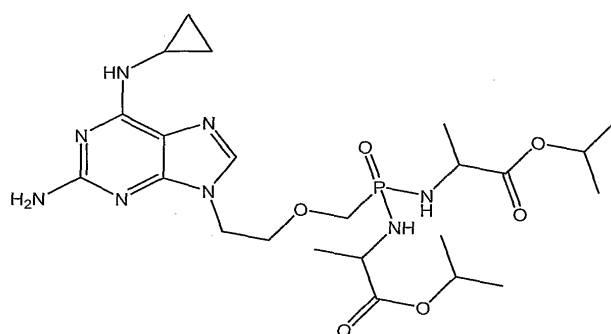
o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Descripción detallada de la invención

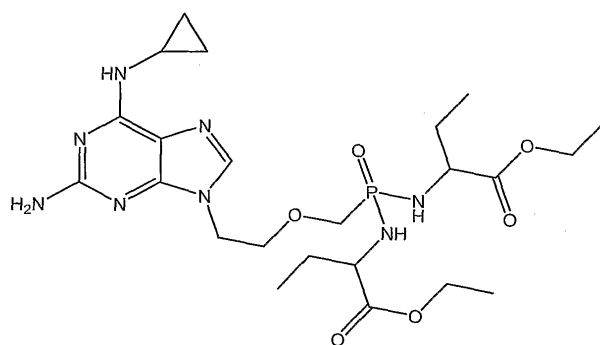
Una realización de la presente invención proporciona un compuesto para su uso de fórmula



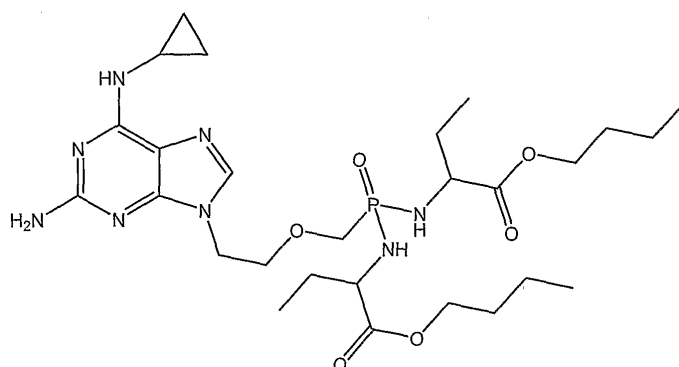
Una realización de la presente invención proporciona un compuesto para su uso de fórmula



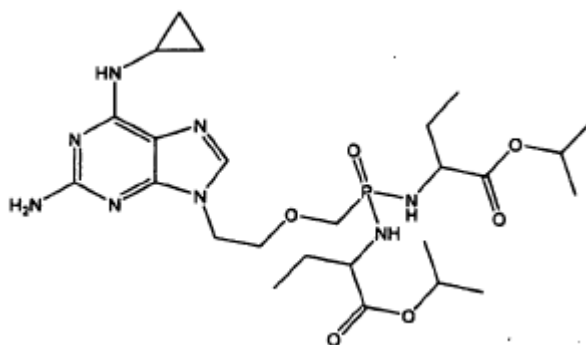
5 Una realización de la presente invención proporciona un compuesto para su uso de fórmula



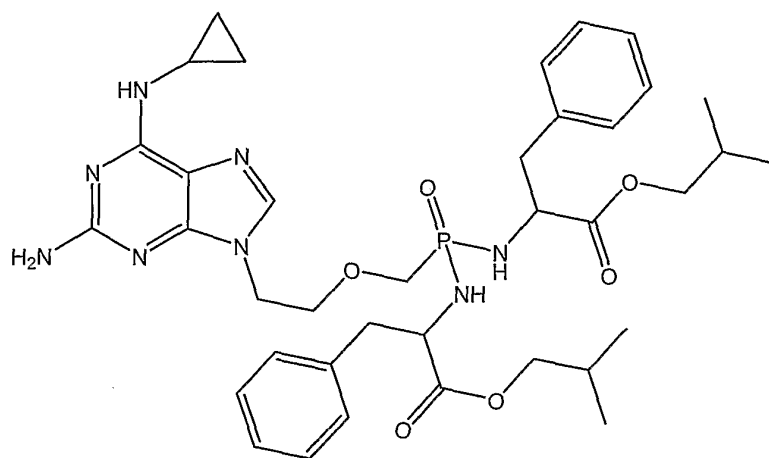
Una realización de la presente invención proporciona un compuesto para su uso de fórmula,



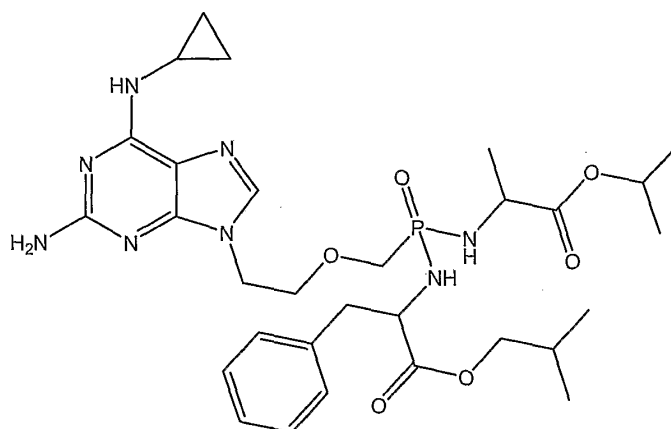
10 Una realización de la presente invención proporciona un compuesto para su uso de fórmula,



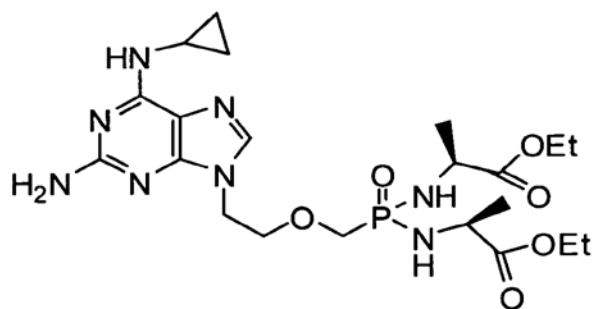
Una realización de la presente invención proporciona un compuesto para su uso de fórmula



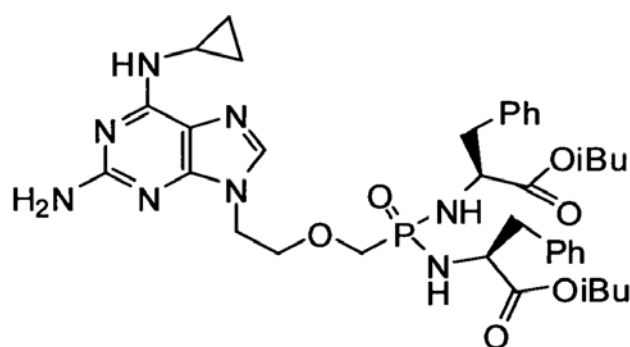
5 Una realización de la presente invención proporciona un compuesto para su uso de fórmula



Una realización de la presente invención proporciona un compuesto para su uso de fórmula



Una realización de la presente invención proporciona un compuesto para su uso de fórmula



Un aspecto de la presente invención proporciona un compuesto para su uso como agente anti-VPH tópico.

- 5 En una realización de la presente invención los compuestos están en forma de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula IA o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto de la presente realización proporciona una composición farmacéutica, siendo la composición una composición en gel.

- 10 Otro aspecto más de la presente realización proporciona una composición farmacéutica, siendo la composición una composición de ungüento.

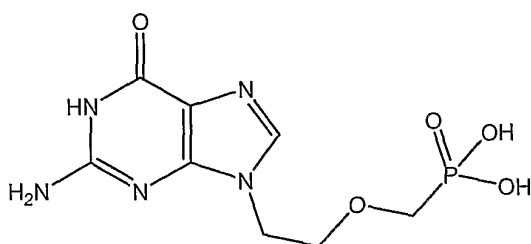
Una aspecto proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula IA o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad eficaz de al menos un agente antivírico y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 Un aspecto de la presente realización proporciona una composición farmacéutica, siendo la composición una composición en gel.

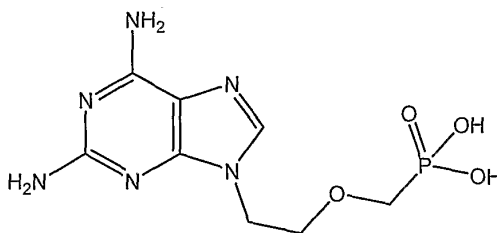
Otro aspecto de la presente realización proporciona una composición farmacéutica, siendo la composición una composición de ungüento.

Definiciones

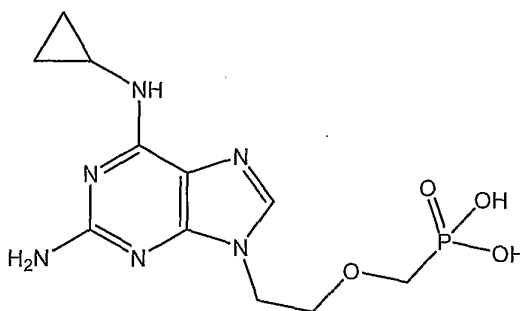
- 20 El término "PMEG" se refiere al compuesto 9-(2-fosfonilmetoxietil)guanina,



El término "PMEDAP" se refiere al compuesto 9-(2-fosfonilmetoxietil)-2,6-diaminopurina,



El término "cprPMEDAP" se refiere al compuesto 9-(2-fosfonilmetoxietil)-2-amino-6-(ciclopropil)purina,



- 5 "Biodisponibilidad" es el grado al que el agente farmacéuticamente activo se vuelve disponible para el tejido objetivo después de la introducción del agente en el organismo. El aumento de la biodisponibilidad de un agente farmacéuticamente activo puede provocar un tratamiento más eficaz y efectivo para pacientes debido a que, para una dosis dada, estará disponible en los sitios del tejido objetivo una cantidad superior del agente farmacéuticamente activo.
- 10 Los términos "fosfonato" y "grupo fosfonato" incluyen los grupos o restos funcionales de una molécula que comprenden un fósforo que está 1) unido por enlace sencillo a un carbono, 2) unido por doble enlace a un heteroátomo, 3) unido por enlace sencillo a un heteroátomo y 4) unido por enlace sencillo a otro heteroátomo, en los que cada heteroátomo puede ser el mismo o diferente. Los términos "fosfonato" y "grupo fosfonato" también incluyen los grupos o restos funcionales que comprenden un fósforo en el mismo estado de oxidación que el fósforo descrito anteriormente, así como los grupos o restos funcionales que comprenden un resto de profármaco que puede separarse de un compuesto, de tal modo que el compuesto conserva un fósforo que tiene las características descritas anteriormente. Por ejemplo, los términos "fosfonato" y "grupo fosfonato" incluyen grupos funcionales ácido fosfónico, monoéster fosfónico, diéster fosfónico, fosfonamido y fosfonotioato. En una realización específica de la invención, los términos "fosfonato" y "grupo fosfonato" incluyen grupos o restos funcionales dentro de una molécula que comprende un fósforo que está 1) unido por enlace sencillo a un carbono, 2) unido por enlace doble a un oxígeno, 3) unido por enlace sencillo a un oxígeno, y 4) unido por enlace sencillo a otro átomo de oxígeno, así como los grupos o restos funcionales que comprenden un resto de profármaco que puede separarse de un compuesto, de modo que el compuesto conserva un fósforo que tiene tales características. En otra realización específica de la invención, los términos "fosfonato" y "grupo fosfonato" incluyen los grupos o restos funcionales dentro de una molécula que comprenden un fósforo que está 1) unido por enlace sencillo a un carbono, 2) unido por doble enlace a un oxígeno, 3) unido por enlace sencillo a un oxígeno o nitrógeno y 4) unido por enlace sencillo a otro oxígeno o nitrógeno, así como los grupos o restos funcionales que comprenden un resto de profármaco que puede separarse de un compuesto, de modo que el compuesto conserva un fósforo que tiene tales características.
- 30 Las recetas y procedimientos para determinar la estabilidad de los compuestos en secreciones gastrointestinales sustitutas son conocidos. En el presente documento, los compuestos se definen como estables en el tracto gastrointestinal si menos de aproximadamente el 50 por ciento en moles de los grupos protegidos se encuentran desprotegidos en el jugo intestinal o gástrico sustituto después de una incubación durante 1 hora a 37 °C. Tales compuestos son adecuados para su uso en esta realización. Nótese que simplemente porque los compuestos sean estables al tracto gastrointestinal, eso no significa que no puedan ser hidrolizados in vivo. Los profármacos, típicamente, serán estables en el sistema digestivo, pero son sustancialmente hidrolizados al fármaco progenitor en el lumen digestivo, el hígado u otro órgano metabólico o dentro de las células en general.
- 35 Los compuestos de la invención pueden existir también como isómeros tautoméricos en ciertos casos. Por ejemplo, los tautómeros eno-amina pueden existir para el imidazol, guanidina, amidina y sistemas de tetrazol.
- 40 El término "profármaco", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que cuando se administra a un sistema biológico genera la sustancia farmacológica, es decir, el ingrediente activo, como resultado de una o varias reacciones químicas espontáneas; una o varias reacciones químicas catalizadas por enzimas, fotólisis y/o una o varias reacciones químicas metabólicas. Un profármaco es, de este modo, un análogo modificado covalentemente o una forma latente de un compuesto terapéuticamente activo.

Un "resto de profármaco" se refiere a un grupo funcional lábil que se separa del compuesto inhibitorio activo durante el metabolismo, sistémicamente, dentro de una célula, mediante hidrólisis, por escisión enzimática o mediante algún otro proceso (Bundgaard, Hans, "Design and Application of Prodrugs" en *A Textbook of Drug Design and Development* (1991), P. Krogsgaard-Larsen y H. Bundgaard, Ed. Harwood Academic Publishers, páginas 113-191).

Las enzimas que son capaces de realizar un mecanismo de activación enzimática con los compuestos profármacos de fosfonato de la invención incluyen, pero no están limitadas a, amidasas, esterases, enzimas microbianas, fosfolipasas, colinesterasas, y fosfasas. Los restos de profármaco pueden servir para aumentar la solubilidad, la absorción y la lipofilicidad, para optimizar la distribución de los fármacos, la biodisponibilidad y la eficacia. Un resto de profármaco puede incluir un metabolito activo o el fármaco mismo.

Los ejemplos de restos de profármaco incluyen los ésteres de aciloximetilo hidrolíticamente sensibles o lábiles – $\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{R}$ y los carbonatos de aciloximetilo – $\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{OR}$ en los que R en este caso es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono sustituido, arilo de 6 a 20 átomos de carbono o arilo sustituido de 6 a 20 átomos de carbono. El éster de aciloxialquilo se usó primeramente como estrategia de profármaco para los ácidos carboxílico, y después se aplicó a fosfatos y fosfonatos por Farquhar y col. (1983) *J. Pharm. Sci.* 72:324; también Patentes de los Estados Unidos N°. 4816570, 4968788, 5663159 y 5792756. Subsiguientemente, el éster de aciloxialquilo se usó para distribuir los ácidos fosfónicos a través de las membranas celulares y para aumentar la biodisponibilidad oral. Una variante cercana del éster de aciloxialquilo, el éster de alcóxicarboniloxialquilo (carbonato), también puede aumentar la biodisponibilidad oral como un resto de profármaco en los compuestos de las combinaciones de la invención. Un ejemplo de éster de aciloximetilo es el isopropilcarboniloximetoxi, $-\text{OCH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_2$. Un ejemplo de resto de profármaco de carbonato de aciloximetilo es el carbonato de isopropilcarboniloximetilo, $\text{HOC}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_2$.

El grupo fosfonato puede ser un resto de profármaco de fosfonato. El resto de profármaco puede ser sensible a la hidrólisis, tal como, pero no limitado a, un grupo isopropilcarbonil-oximetoxi o carbonato de isopropilcarboniloximetilo. Alternativamente, el resto de profármaco puede ser sensible a la escisión potenciada enzimática, tal como un éster de lactato o un grupo éster de fosfonamidato.

Se ha informado que los ésteres de arilo o grupos fósforo, especialmente ésteres de fenilo, aumentan la biodisponibilidad oral (De Lombaert y col. (1994) *J. Med. Chem.* 37:498). También se han descrito los ésteres de fenilo que contienen un éster carboxílico en posición orto respecto al fosfato (Khamnei y Torrence, (1996), *J. Med. Chem.* 39:4109-4115). Se ha informado que los ésteres de bencilo generan el ácido fosfónico progenitor. En algunos casos, los sustituyentes en la posición orto o para pueden acelerar la hidrólisis. Los análogos de bencilo con un fenol acilado o un fenol alquilado pueden generar el compuesto fenólico a través de la acción de enzimas, por ejemplo, esterases, oxidasas, etc., que a su vez sufren escisión del enlace C-O bencilico para generar el ácido fosfórico y el intermedio de metiluro de quinona. Los ejemplos de esta clase de profármacos se describen por Mitchel y col. (1992) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 2345; Glazier WO 91/19721. Incluso se han descrito otros profármacos bencilicos que contienen un grupo que contiene éster carboxílico enlazado al metileno bencilico (Glazier WO 91/19721). Se ha informado que los profármacos que contienen tio son útiles para la distribución intracelular de los fármacos de fosfonato. Estos proésteres contienen un grupo etilitio en el cual el grupo tiol está ya sea esterificado por un grupo acilo o combinado con otros grupos tiol para formar un disulfuro. La desesterificación o la reducción del disulfuro genera el intermediario tio libre el cual subsecuentemente se rompe dando ácido fosfórico y episulfuro (Puech y col. (1993) *Antiviral Res.* 22:155-174; Benzaria y col. (1996) *J. Med. Chem.* 39:4958). Los ésteres de fosfonato cíclicos han sido también descritos como profármacos de los compuestos que contienen fósforo (Erion y col., Patente de los Estados Unidos No. 6312662).

"Grupo protector" se refiere a un resto de un compuesto que enmascara o que altera las propiedades de un grupo funcional o las propiedades del compuesto como un todo. Los grupos protectores químicos y las estrategias para la protección/desprotección son bien conocidos en la técnica. Ver por ejemplo, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Teodora W. Greene, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1991. Los grupos protectores se usan frecuentemente para enmascarar la reactividad de ciertos grupos funcionales, para asistir en la eficiencia de las reacciones químicas deseadas, por ejemplo, realizando y rompiendo enlaces químicos en una manera ordenada y planeada. La protección de los grupos funcionales de un compuesto altera otras propiedades físicas además de la reactividad del grupo funcional protegido, tales como la polaridad, la lipofilicidad (hidrofobicidad) y otras propiedades que pueden medirse usando herramientas analíticas comunes. Los intermediarios químicamente protegidos pueden ser por sí mismos biológicamente activos o inactivos.

Los compuestos protegidos pueden también exhibir propiedades alteradas, y en algunos casos, optimizadas, in vitro o in vivo, tales como el paso a través de las membranas celulares y la resistencia a la degradación enzimática o al secuestro. En este papel, los compuestos protegidos con los efectos terapéuticos pretendidos, pueden ser denominados profármacos.

Otra función del grupo protector es convertir el fármaco progenitor en un profármaco, con lo cual el fármaco progenitor es liberado después de la conversión del profármaco in vivo. Debido a que los profármacos activos pueden ser absorbidos más eficazmente que el fármaco progenitor, los profármacos pueden poseer mayor potencia in vivo que el fármaco progenitor. Los grupos protectores se eliminan, ya sea in vitro, en el caso de los intermediarios químicos, o en vivo, en el caso de los profármacos. Con intermediarios químicos, no es particularmente importante que los productos resultantes después de la desprotección, por ejemplo, alcoholes, sean fisiológicamente aceptables, aunque en general es más deseable que los productos sean farmacológicamente inocuos.

Los ejemplos de sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen las sales derivadas de una base apropiada, tal como un metal alcalino (por ejemplo, sodio), un metal alcalinotérreo (por ejemplo, magnesio), amonio y NX_4^+ (en donde X es alquilo de 1 a 4 átomos de carbono). Las sales fisiológicamente aceptables de un átomo de hidrógeno o un grupo amino incluyen sales de ácidos carboxílicos orgánicos tales como los ácidos acético, benzoico, láctico, fumárico, tartárico, maleico, malónico, málico, isetiónico, lactobiónico y succínico; ácidos sulfónicos orgánicos tales como los ácidos metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico y p-

toluenosulfónico; y ácidos inorgánicos tales como los ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico y sulfámico. Las sales fisiológicamente aceptables de un compuesto de un grupo hidroxilo incluyen el anión del compuesto en combinación con un catión adecuado tal como Na^+ y NX_4^+ (en el que X está independientemente seleccionado de hidrógeno o un grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono).

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "gel" se refiere a sistemas semisólidos constituidos por ya sea suspensiones compuestas por partículas inorgánicas pequeñas o moléculas orgánicas grandes que encierran y que están interpenetradas por un líquido. Si la masa de gel está constituida por flóculos de partículas pequeñas, el gel es clasificado como un sistema de dos fases y es algunas veces denominado magma. El gel de hidróxido de aluminio y el magma de bentonitas son ejemplos de sistemas de dos fases. Los geles de fase única están constituidos por
10 macromoléculas orgánicas uniformemente distribuidas a todo lo largo de un líquido, de una manera tal que no existen límites aparentes entre las macromoléculas dispersas y el líquido. Los ejemplos de tales geles son carboximetilcelulosa de sodio y tragacanto. Aunque los geles son comúnmente acuosos, pueden usarse alcoholes y aceites como fase continua.

15 Tal como se usa en la presente, el término "ungüento" se refiere a una preparación semisólida para la aplicación externa de una consistencia tal que pueda aplicarse fácilmente a la piel mediante unción. Deben ser de una composición tal que se reblandezcan pero no necesariamente se fundan cuando son aplicados al cuerpo. Sirven como vehículos para la aplicación tópica de sustancias medicinales y también funcionan como protectores y emolientes para la piel.

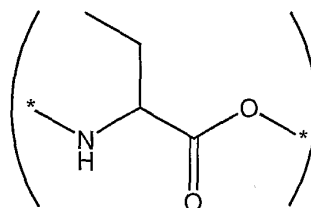
20 Para uso terapéutico, las sales de ingredientes activos de los compuestos de la invención serán fisiológicamente aceptables, es decir, serán sales derivadas de un ácido o una base fisiológicamente aceptable. No obstante, las sales de ácidos o bases que no sean fisiológicamente aceptables pueden también encontrar uso, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto fisiológicamente estable.

25 "Alquilo" es un hidrocarburo de 1 a 18 átomos de carbono que contiene átomos de carbono normales, secundarios o terciarios. Los ejemplos son metilo (Me, $-\text{CH}_3$), etilo (Et, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1-propilo (N-Pr, N-propilo, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-propilo (I-Pr, I-propilo, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1-butilo (N-Bu, N-butilo, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-metil-1-propilo (I-Bu, I-butilo, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-metil-2-propilo (T-Bu, T-butilo, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1-pentilo (n-pentilo, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-pentilo ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-pentilo ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2-metil-2-butilo ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-metil-2-butilo ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3-metil-1-butilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2-metil-1-butilo ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1-hexilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-hexilo ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-hexilo ($-\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-metil-2-pentilo ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-metil-2-pentilo ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4-metil-2-pentilo ($-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)$), 3-metil-3-pentilo ($-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2-metil-3-pentilo ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,3-dimetil-2-butilo ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,3-dimetil-2-butilo ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

35 "Alquenilo" es un hidrocarburo de 2 a 18 átomos de carbono que contiene átomos de carbono normales, secundarios o terciarios con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace, carbono-carbono sp^2 . Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, etileno o vinilo ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), alilo ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), ciclopentilo ($-\text{C}_5\text{H}_7$), y 5-hexenilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$).

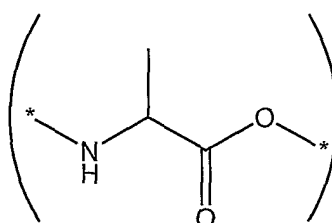
"Alquinilo" es un hidrocarburo de 2 a 18 átomos de carbono que contiene átomos de carbono, normales, secundarios o terciarios, con al menos un sitio de insaturación, por ejemplo, un triple enlace carbono-carbono sp . Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, acetilénico ($-\text{C}\equiv\text{CH}$) y propargilo ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$).

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "Aba" se refiere a un resto divalente del ácido 2-aminobutanoico,



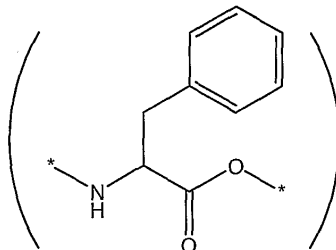
en el que los puntos de enlace están designados por "*".

Tal como se usa en el presente documento, el término "Ala" se refiere a un resto divalente de alanina,



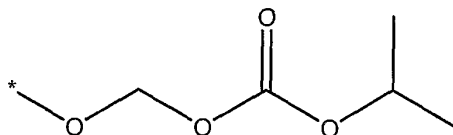
en la que los puntos de enlace están designados por “*”.

Tal como se usa en el presente documento, el término “Phe” se refiere a un resto divalente de la fenilalanina,



5 en la que los puntos de enlace están designados por “*”.

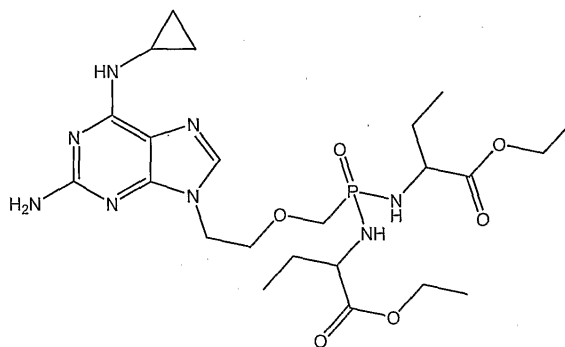
Tal como se usa en el presente documento, el término “POC” se refiere a un resto divalente del carbonato de hidroximetilisopropilo,



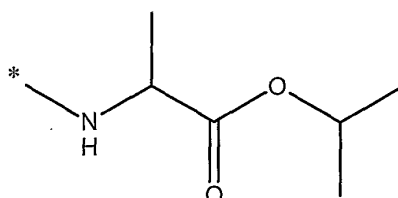
10 en la que el punto de enlace está designado por “*”.

Los grupos sustituyentes Y^{1A} e Y^{1B} pueden describirse usando la nomenclatura que incorpora los restos de aminoácidos divalentes y los restos alquilo, anteriormente mencionada, tal como en la Tabla 37-3.

Por ejemplo, el compuesto de fórmula,

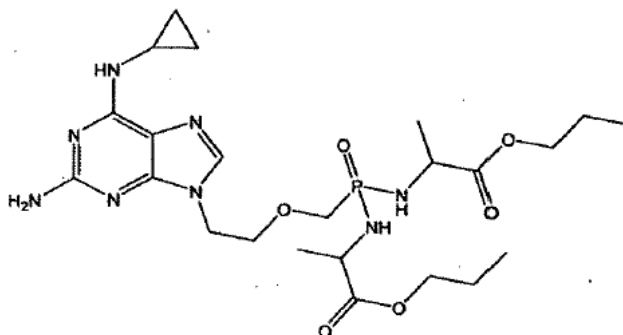


15 puede describirse usando la nomenclatura de la Fórmula I, en la que Y^{1A} e Y^{1B} son $-N(R^X)$, en la que R^X es R^2 , en la que R^2 es R^4 sustituido con R^{3d} , en la que R^4 es etilo sustituido con R^{3d} , además en la que R^{3d} es $-C(R^{3b})OW^{3d}$, en la que R^{3b} es $=O$, en la que W^3 es W^5 , en la que W^5 es un carbociclo, en la que R^4 es propilo sustituido con R^{3d} , en la que R^{3d} es $-C(R^{3b})OR^4$, en la que R^{3b} es $=O$ y en la que R^4 es etilo. Alternativamente, el compuesto puede describirse, como en la Tabla 37-3, como la Fórmula I en la que Y^{1A} e Y^{1B} son “Aba-Et” que describe el resto (en el que el “*” indica el punto de enlace),

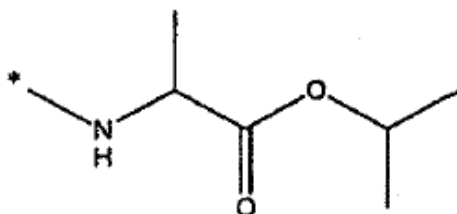


que es "Aba" enlazado a "Et" (etilo).

Por ejemplo el compuesto de fórmula,



- 5 puede describirse usando la nomenclatura de la Fórmula I, en la que Y^{1A} e Y^{1B} son $-N(R^x)$, en la que R^x es R^2 , en la que R^2 es 44^1 sustituido con Y^{R3d} , en la que R^1 es etilo sustituido con R^{3d} , en la que R^{3d} es $-C(R^{3b})OR^4$, en la que R^{3b} es $=O$ y en la que R^4 es n-propilo. Alternativamente, el compuesto puede describirse, como en la Tabla 37-3, como la Fórmula I en la que Y^{1A} e Y^{1B} son "Ala-nPr" que describe el resto (en el que el "*" indica el punto de enlace),



que es "Ala" enlazado a "nPr" (n-propilo).

- 10 El término "quiral" se refiere a las moléculas que tienen la propiedad de no superponibilidad del asociado imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a las moléculas que son superponibles sobre su imagen especular.

El término "estereoisómeros" se refiere a los compuestos que tienen constitución química, idéntica, pero que difieren con respecto a la disposición de los átomos o los grupos en el espacio.

- 15 "Diastereoisómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes en el espejo una de la otra. Los diastereoisómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereoisómeros pueden separarse por procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

- 20 "Enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes en el espejo no superponibles una de la otra.

El término "tratamiento" o "tratar" en la medida en que se refiera a una enfermedad o afección incluye prevenir que tenga lugar la enfermedad o afección, inhibir la enfermedad o afección, eliminar la enfermedad o afección y/o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad o afección.

- 25 El término "antiproliferativo" se refiere a las actividades usadas para, o que tienden a, inhibir el crecimiento celular, tales como los efectos antiproliferativos sobre células tumorales o efectos antiproliferativos sobre células infectadas víricamente.

- 30 El término "apoptosis" se refiere a uno de los principales tipos de muerte celular programada. Como tal, éste es un proceso de suicidio deliberado por una célula no deseada, en un organismo multicelular. En contraste con la necrosis, que es una forma de muerte celular que resulta del daño tisular agudo, la apoptosis se lleva a cabo en un proceso ordenado que, en general, confiere ventajas durante el ciclo de vida de un organismo. La apoptosis es un tipo de muerte celular en el cual la célula usa maquinaria celular especializada para matarse a sí misma; un mecanismo de suicidio celular que hace posible que los metazoarios controlen el número de células y eliminen células que amenazan la supervivencia del animal. La apoptosis puede tener lugar, por ejemplo, cuando una célula es dañada más allá de la reparación o infectada con un virus. Los estímulos para la apoptosis pueden venir de la célula misma, de su tejido circundante o de una célula que es parte del sistema inmunitario; puede ser química,
- 35

biológica o física. El término relacionado "apoptótico" se refiere al proceso de la apoptosis.

Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en el presente documento, siguen en general a S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Existen muchos compuestos orgánicos en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de girar el plano de luz polarizada en un plano. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L o R y S se usan para denotar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su o sus centros quirales. Los prefijos d y l o (+) o (-) se usan para designar el signo de rotación de la luz polarizada en el plano por el compuesto, donde (-) o l significa que el compuesto es levógiro. El compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos excepto que éstos son imágenes especulares uno del otro. Un estereoisómero específico puede denominarse también enantiómero, y una mezcla de tales isómeros se denomina frecuentemente una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros es denominada mezcla racémica o racemato, que puede aparecer donde no ha existido estereoselección o estereoespecificidad en un proceso o reacción química. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovistas de actividad óptica.

Grupos protectores

En el contexto de la presente invención, los grupos protectores incluyen los restos de profármacos y los grupos protectores químicos.

Los grupos protectores están disponibles, se conocen y se usan comúnmente, y se usan opcionalmente para prevenir reacciones colaterales con el grupo protegido durante los procedimientos sintéticos, es decir, las rutas o procedimientos para preparar los compuestos de la invención. La mayor parte de las decisiones respecto a que grupos proteger, cuándo realizarlo y la naturaleza del grupo protector químico "PG" dependerán de la química de la reacción contra la cual van a ser protegidos (por ejemplo, condiciones ácidas, alcalinas, oxidantes, reductoras u otras) y la dirección pretendida de la síntesis. Los grupos PG no necesitan ser, y en general no son, los mismos si el compuesto es sustituido con PG múltiples. En general, el PG se usará para proteger los grupos funcionales tales como los grupos carboxilo, hidroxilo, tio o amino y para prevenir de este modo las reacciones colaterales o para facilitar de otro modo la eficacia de la síntesis. El orden de la desprotección para producir grupos desprotegidos, libres, depende de la dirección pretendida de la síntesis y de las condiciones de reacción que van a encontrarse, y puede tener lugar en cualquier orden que determine un experto.

Pueden protegerse diversos grupos funcionales de los compuestos de la invención. Por ejemplo, los grupos protectores para los grupos -OH (ya sea hidroxilo, ácido carboxílico, ácido fosfónico u otros grupos funcionales) incluyen los "grupos formadores de éter o de éster". Los grupos formadores de éter o de éster son capaces de funcionar como grupos protectores químicos en los esquemas de síntesis descritos en el presente documento. No obstante, algunos grupos protectores de hidroxilo y de tio no son grupos formadores de éter ni de éster, como entenderán los expertos en la técnica, y se incluyen con las amidas, tratadas más adelante.

Una serie muy extensa de grupos protectores de hidroxilo y grupos formadores de amida y las reacciones de escisión química correspondientes se describen en Protective Groups in Organic Synthesis, Teodora W. Greene (John Wiley & Sons, Inc., Nueva Jersey, 1991, ISBN 0-471-62301-6) ("Greene"). Ver también Kocienski, Philip J.; Protecting Groups (Georg Thieme Verlag Stuttgart, Nueva York, 1994), la cual se incorpora por referencia al presente documento en su totalidad. En particular, Capítulo 1, Grupos Protectores: Una Revisión, páginas 1-20, Capítulo 2, Grupos protectores de hidroxilo, páginas 21-94, Capítulo 3, Grupos protectores de Diol, páginas 95-117, Capítulo 4, grupos protectores de carboxilo, páginas 118-154, Capítulo 5, grupos protectores de carbonilo, páginas 155-184. Para los grupos protectores para el ácido carboxílico, el ácido fosfónico, el fosfonato, el ácido sulfónico y otros grupos protectores para ácidos, ver Greene tal como se describe más adelante. Tales grupos incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, ésteres, amidas, hidrazidas y similares.

Grupos protectores formadores de éter y éster

Los grupos formadores de éster incluyen: (1) grupos formadores de éster de fosfonato, tales como ésteres de fosfonamidato, éteres de fosforotioato, ésteres de fosfonato y fosfon-bis-amidatos; (2) grupos formadores de éster de carboxilo; (3) grupos formadores de éster de azufre, tales como sulfonato, sulfato y sulfinato.

Los restos fosfonato de los compuestos de la invención pueden o no ser los restos de profármacos, es decir, pueden o no ser susceptibles a la escisión o modificación hidrolítica o enzimática. Determinados restos fosfonato son estables en la mayoría o casi todas las condiciones metabólicas. Por ejemplo, un dialquilfosfonato, donde los grupos alquilo son dos o más carbonos, pueden tener estabilidad apreciable in vivo debido a la velocidad lenta de hidrólisis.

Salas e hidratos

Las composiciones de la presente invención comprenden opcionalmente sales de los compuestos del presente documento, especialmente sales no tóxicas farmacéuticamente aceptables que contienen por ejemplo, Na^+ , Li^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} . Tales sales pueden incluir las derivadas por combinación de cationes apropiados tales como iones de metal alcalino y alcalinotérreo o iones amonio y amino cuaternario, con un resto de anión ácido. Las sales monovalentes son preferentes y se desea una sal soluble en agua.

Las sales se preparan típicamente haciendo reaccionar un compuesto de la presente invención con un hidróxido metálico. Los ejemplos de sales metálicas que se preparan de esta manera son sales que contienen Li^+ , Na^+ , y K^{++} . Puede precipitarse una sal metálica menos soluble en agua a partir de la solución de una sal más soluble mediante la adición del compuesto metálico adecuado.

Además, las sales pueden formarse a partir de la adición de ácido de ciertos ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo, HCl, HBr, H₂SO₄, o ácidos sulfónicos orgánicos, a los centros básicos, o a los centros ácidos. Finalmente, se debe entender que las composiciones del presente documento comprenden los compuestos de la invención en su forma no ionizada, así como iónica anfótera, y combinaciones con cantidades estequiométricas de agua como los hidratos.

También están incluidas dentro del alcance de la invención las sales de los compuestos progenitores con uno o más aminoácidos. Cualquiera de los aminoácidos descritos anteriormente son adecuados, especialmente los aminoácidos de origen natural encontrados como componentes proteicos, aunque el aminoácido típicamente es uno que posee una cadena lateral con un grupo básico o ácido, por ejemplo, lisina, arginina, o ácido glutámico, o un grupo neutro tal como glicina, serina, treonina, alanina, isoleucina, o leucina.

Procedimientos de inhibición de VPH

Otro aspecto de la invención se refiere a los compuestos de la invención para usar en procedimientos para inhibir la actividad de VPH que comprenden la etapa de tratar una muestra sospechosa de contener VPH con un compuesto de la invención.

Las composiciones de la invención actúan como inhibidores de VPH, como intermedios para tales inhibidores o tienen otros usos tal como se describe más adelante.

La etapa de tratamiento de la invención comprende la adición de la composición de la invención a la muestra o comprende la adición de un precursor de la composición a la muestra. La etapa de adición comprende cualquier procedimiento de administración tal como se describe anteriormente.

Si se desea, la actividad de VPH después de la aplicación de la composición puede analizarse mediante cualquier procedimiento, incluidos procedimientos directos e indirectos de detección de VPH. Se contemplan todos los procedimientos cuantitativos, cualitativos y semicuantitativos para determinar la actividad de VPH. Típicamente, se aplica uno de los procedimientos de análisis descritos anteriormente, no obstante, son también aplicables cualesquiera otros procedimientos tales como la observación de las propiedades físicas de un organismo vivo.

Análisis de inhibidores VPH

Se analiza la utilidad terapéutica de compuestos y composiciones de la invención mediante la medición de la CE₅₀, que es la concentración del compuesto que logra un 50 % de inhibición del crecimiento celular. La relación de CE₅₀ en las células no infectadas e infectadas por el VPH proporciona una medición de la selectividad del compuesto para las células infectadas con virus. Los protocolos usados para obtener estas medidas se muestran en los ejemplos.

Formulaciones farmacéuticas y vías de administración

Los compuestos de la presente invención se formulan con vehículos y excipientes convencionales, que se seleccionan de acuerdo con la práctica ordinaria. Los comprimidos contendrán excipientes, lubricantes, cargas, aglutinantes y similares. Las formulaciones acuosas se preparan en forma estéril y cuando están destinadas a una administración diferente a la administración oral, serán en general isotónicas. Todas las formulaciones contendrán opcionalmente excipientes tales como los descritos en the "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (1986). Los excipientes incluyen ácido ascórbico y otros antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA, carbohidratos tales como dextrina, hidroxialquilcelulosa, hidroxialquilmethylcelulosa, ácido esteárico y similares. El pH de las formulaciones está en el intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 11, pero es ordinariamente de aproximadamente 7 a 10.

Uno o más compuestos de la invención (denominados en el presente contexto como ingredientes activos) se administran mediante cualquier vía apropiada para el trastorno que va a ser tratado. Las vías adecuadas incluyen la vía oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural), y similares. Se apreciará que la vía preferida puede variar con la afección del paciente. Una ventaja de los compuestos de esta invención es que éstos son oralmente biodisponibles y pueden ser dosificados oralmente.

Mientras que sea posible que los ingredientes activos se administren solos puede ser preferible presentarlos como formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones, para uso veterinario y para uso humano de la invención comprenden al menos un ingrediente activo, tal como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables para los mismos, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El o los vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y fisiológicamente inocuos para el receptor de los mismos.

Las formulaciones incluyen las adecuadas para las vías de administración anteriormente mencionadas. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Las técnicas y formulaciones se encuentran, en general, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Tales procedimientos incluyen la etapa de poner en asociación el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, conformando el producto.

Las formulaciones de la invención adecuadas para la administración oral se preparan como unidades discretas tales como cápsulas, sacos o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo; en forma de polvo o gránulo; en forma de solución o de suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso, o como emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo puede presentarse también en forma de bolo, electuario o pasta.

Un comprimido se fabrica mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos prensados pueden prepararse prensando en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma de flujo libre, tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse mediante el moldeo, en una máquina adecuada, de una mezcla del ingrediente activo en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden ser opcionalmente recubiertos o amuescados y opcionalmente se formulan para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo a partir de los mismos.

Para infecciones de los ojos u otros tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, se aplican preferentemente formulaciones en forma de ungüento tópico o crema que contiene el o los ingredientes activos en una cantidad de, por ejemplo, el 0,075 al 20 % p/p (incluyendo el o los ingredientes activos en un intervalo de entre el 0,1 % y el 20 % en incrementos del 0,1 % p/p tal como 0,6 % p/p, 0,7 % p/p, etc.), preferentemente del 0,2 al 15 % p/p y lo más preferentemente del 0,5 al 10 % p/p. Cuando se formula en un ungüento, los ingredientes activos pueden usarse en una base de parafínica o ungüento miscible en agua. Alternativamente, los ingredientes activos pueden formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua.

Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos el 30 % p/p de un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tales como propilenglicol, butan-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG 400) y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir de manera deseable un compuesto que aumenta la absorción o penetración del ingrediente activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Los ejemplos de tales aumentadores de la penetración dérmica incluyen sulfóxido de dimetil y análogos relacionados.

La fase oleosa de las emulsiones de la presente invención puede estar constituida de otros ingredientes conocidos de una manera conocida. Mientras que la fase puede comprender meramente un emulsionante (también conocido como emulgente), ésta comprende deseablemente una mezcla de al menos un emulsionante con un aceite o una grasa, o con una grasa y un aceite. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipofílico que actúa como estabilizante. También es preferente incluir un aceite y una grasa. Conjuntamente, el o los emulsionantes con o sin estabilizante(s) constituyen la denominada cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y la grasa constituyen la denominada base de ungüento emulsionante que forman la fase dispersa oleosa de las formulaciones en crema.

Los emulgentes y estabilizantes de la emulsión adecuados para el uso en la formulación de la invención incluyen Tween® 60, Span® 80, alcohol cetosteárico, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio.

La elección de aceites o grasas adecuadas para la formulación está basada en lograr las propiedades cosméticas deseadas. La crema debe ser preferentemente un producto no grasiento, que no manche y lavable, con consistencia adecuada para evitar la fuga desde los tubos u otros recipientes. Pueden usarse ésteres de alquilo mono- o dibásicos, de cadena lineal o ramificados, tales como el di-isoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP, siendo los últimos tres los ésteres preferidos. Estos pueden usarse solos o en combinación, dependiendo de las propiedades requeridas. Alternativamente, se usan también lípidos de alto punto de fusión tales como la parafina blanda blanca y/o la parafina líquida u otros aceites minerales.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en el ojo también incluyen gotas oftálmicas en las que se disuelve o suspende el ingrediente activo en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el ingrediente activo. El ingrediente activo está preferentemente presente en tales formulaciones en una concentración del 0,5 al 20 %, ventajosamente del 0,5 al 10 %, particularmente aproximadamente el 1,5 % p/p.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen tabletas que comprenden el ingrediente activo en una base saborizada, usualmente sucrosa y acacia y tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicina, o sucrosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

Las formulaciones para la administración rectal pueden ser presentadas como un supositorio en una base adecuada que comprende por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

Las formulaciones adecuadas para la administración intrapulmonar o nasal tienen un tamaño de partícula por ejemplo en el intervalo de 0,1 a 500 micrómetros (incluyendo los tamaños de partículas en un intervalo entre 0,1 y 500 micrómetros en incrementos de micrómetros tales como 0,5, 1, 30 micrómetros, 35 micrómetros, etc.), que se administran mediante inhalación rápida a través de las vías nasales o mediante inhalación a través de la boca, para llegar a los sacos alveolares. Las formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para la administración de aerosol de polvo seco pueden prepararse de acuerdo con procedimientos convencionales y pueden distribuirse con otros agentes terapéuticos tales como compuestos usados hasta ahora en el tratamiento o profilaxis de infecciones por gripe A ó B tal como se describirá más adelante.

Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal pueden ser presentadas en forma de pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen además del ingrediente activo, vehículos tales como los que se sabe que son apropiados en la técnica.

- 5 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones para inyecciones estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacterioestáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del recipiente pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes.

- 10 Las formulaciones se presentan en recipientes de dosis unitarias o de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en una condición secada por congelamiento (lío-filizadas) requiriendo únicamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas se preparan a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito. Las formulaciones de dosis unitaria preferentes son las que contienen una dosis diaria o subdosis diaria unitaria, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de las mismas, del ingrediente activo.

- 15 Se debe entender que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica, con respecto al tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, aquellos adecuados para la administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

- 20 La invención proporciona además composiciones de uso veterinario que comprenden al menos un ingrediente activo como se definió anteriormente, junto con un vehículo de uso veterinario para el mismo.

Los vehículos de uso veterinario son materiales útiles para el propósito de administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que son de otro modo inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el ingrediente activo. Estas composiciones veterinarias pueden administrarse oralmente, parenteralmente o mediante cualquier otra vía deseada.

- 25 Los compuestos de la invención pueden usarse para proporcionar formulaciones farmacéuticas de liberación controlada que contienen como ingrediente activo uno o más compuestos de la invención ("formulaciones de liberación controlada") en las cuales la liberación del ingrediente activo está controlada y regulada para permitir una dosificación menos frecuente, o para mejorar el perfil farmacocinético o de toxicidad de un ingrediente activo dado.

- 30 La dosis eficaz depende al menos de la naturaleza de la afección que se trate, de la toxicidad, de si el compuesto está siendo usado profilácticamente (dosis más bajas) o contra una infección de gripe activa, del procedimiento de administración, y de la formulación farmacéutica, y se administrarán por el médico usando estudios convencionales de escala de dosis. Se puede esperar que ésta sea de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día; típicamente, de aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día; más típicamente, de aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por día; más típicamente, de aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal por día. Por ejemplo, para la inhalación la dosis diaria candidata para un adulto humano de aproximadamente 70 kg de peso corporal, estará en el intervalo de 1 mg a 1000 mg, preferentemente entre 5 mg y 500 mg, y puede tomar la forma de dosis única o dosis múltiples.

- 40 Los ingredientes activos de la invención se usan también en combinación con otros ingredientes activos. Tales combinaciones se seleccionan con base en la condición que se trate, las reactividades cruzadas de los ingredientes y las propiedades farmacocinéticas de la combinación. Por ejemplo, cuando se trata de infecciones víricas del sistema respiratorio, en particular infección por gripe, las composiciones de la invención son combinadas con antivirales (tales como amantidina, rimantadina y ribavirina), mucolíticos, expectorantes, broncodilatadores, antibióticos, antipiréticos o analgésicos. Ordinariamente, se administran antibióticos, antipiréticos y analgésicos junto con los compuestos de la presente invención.

Usos adicionales para los compuestos de la presente invención

- 50 Los compuestos de la presente invención, o las sustancias biológicamente activas producidas a partir de los compuestos mediante hidrólisis o metabolitos in vivo, se usan como inmunógenos o para la conjugación a proteínas, mediante lo cual éstos sirven como componentes de composiciones inmunogénicas para preparar anticuerpos capaces de enlazarse específicamente a la proteína, a los compuestos o a sus productos metabólicos que conservan epitopos inmunológicamente reconocidos (sitios de unión al anticuerpo). Las composiciones inmunogénicas, por lo tanto, son útiles como intermediarios en la preparación de anticuerpos para el uso en el diagnóstico, control de calidad o similares, procedimientos o en análisis de los compuestos o sus productos metabólicos nuevos. Los compuestos son útiles para producir anticuerpos contra polipéptidos de otro modo no inmunogénicos, ya que los compuestos sirven como sitios haptenicos que estimulan una respuesta inmunitaria que reacciona cruzadamente con la proteína conjugada no modificada.

- 60 Los productos de hidrólisis de interés incluyen productos de la hidrólisis de los grupos ácidos y básicos protegidos y discutidos anteriormente. Como se indicó anteriormente, las amidas ácidas o básicas que comprenden los polipéptidos inmunogénicos tales como albúmina o la hemocianina de lapa en forma de agujero de cerradura, son en general útiles como inmunógenos. Los productos metabólicos descritos anteriormente pueden conservar un grado sustancial de reactividad inmunológica cruzada con los compuestos de la presente invención. De este modo, los anticuerpos de esta invención serán capaces de enlazarse a los compuestos no protegidos de la invención, sin enlazarse a los compuestos protegidos; alternativamente, los productos metabólicos, serán capaces de enlazarse a los compuestos protegidos y/o a los productos metabólicos sin enlazarse a los compuestos protegidos de la invención, o serán capaces de enlazarse específicamente a uno o a los tres de ellos. Los anticuerpos de manera

deseable no reaccionarán sustancialmente de manera cruzada con los materiales de origen natural. La reactividad cruzada sustancial es la reactividad bajo las condiciones necesarias específicas para analitos específicos, suficientes para interferir con los resultados de ensayo.

Los inmunógenos de la presente invención contienen el compuesto de esta invención que presenta el epitopo deseado en asociación con una sustancia inmunogénica. Dentro del contexto de la invención, tal asociación significa el enlace covalente para formar un conjugado inmunogénico (cuando es aplicable) o una mezcla de materiales no covalentemente enlazados, o una combinación de los anteriores. Las sustancias inmunogénicas incluyen coadyuvantes tales como coadyuvantes de Freund, proteínas inmunogénicas tales como polipéptidos víricos, bacterianos, de levadura, vegetales y animales, en particular la hemocianina de lapa de cerradura, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soya y polisacáridos inmunogénicos. Típicamente, el compuesto que tiene la estructura del epitopo deseado es covalentemente conjugado a un polipéptido o polisacárido inmunogénico mediante el uso de un agente de reticulación polifuncional (ordinariamente bifuncional). Los procedimientos para la fabricación de los inmunógenos haptenos son convencionales *per se*, y cualquiera de los procedimientos usados hasta ahora para conjugar haptenos a los polipéptidos inmunogénicos o similares, se usa adecuadamente también aquí, teniendo en cuenta los grupos funcionales sobre los precursores o sobre los productos hidrolíticos que están disponibles para la reticulación, y la probabilidad de producir anticuerpos específicos para el epitopo en cuestión, en oposición a la sustancia inmunogénica.

Típicamente, el polipéptido está conjugado a un sitio del compuesto de la invención distante del epitopo que va a ser reconocido.

Los conjugados se preparan de una manera convencional. Por ejemplo, los agentes de reticulación N-hidroxisuccinimida, anhídrido succínico o alqN-C-Nalq son útiles en la preparación de los conjugados de esta invención. Los conjugados comprenden un compuesto de la invención unido por un enlace o grupo enlazador de 1-100, típicamente de 1-25, más típicamente de 1-10 átomos de carbono a la sustancia inmunogénica. Los conjugados son separados de los materiales iniciales y subproductos usando cromatografía o similar, y luego se esterilizan por filtración y se disponen en frascos para su almacenamiento.

Los animales están inmunizados típicamente contra los conjugados o derivados inmunogénicos y los antisueros o anticuerpos monoclonales preparados de una manera convencional.

Los compuestos de la presente invención son útiles como enlazadores o espaciadores en la preparación de matrices de absorción de afinidad, enzimas inmovilizadas para control de proceso o reactivos de inmunoensayo. Los compuestos del presente documento contienen una pluralidad de grupos funcionales que son adecuados como sitios para reticular sustancias deseadas. Por ejemplo, es convencional enlazar los reactivos de afinidad tales como hormonas, péptidos, anticuerpos, fármacos y similares, a sustratos insolubles. Estos reactivos insolubilizados son empleados de una manera conocida para absorber asociados de enlace para los reactivos de afinidad a partir de preparaciones fabricadas, muestras de diagnóstico y otras mezclas impuras. Similarmente, se usan enzimas inmovilizadas para realizar conversiones catalíticas con recuperación fácil de la enzima. Los compuestos bifuncionales se usan comúnmente para enlazar los analitos a grupos detectables en la preparación de reactivos de diagnóstico.

Los ensayos de cribado usan preferentemente células de los tejidos particulares que son susceptibles a la infección por el VPH. Los ensayos conocidos en la técnica son adecuados para determinar la biodisponibilidad *in vivo*, incluyendo la estabilidad de lumen intestinal, la permeación celular, la estabilidad de los homogenatos hepáticos y los ensayos de estabilidad en plasma. No obstante, incluso si el éster, la amida u otros derivados protegidos no son convertidos *in vivo* en los grupos carboxilo, amino o hidroxilo libres, éstos permanecen siendo útiles como intermediarios clínicos.

La utilidad de la presente invención se mostró usando ensayos de antiproliferación. Los ensayos de antiproliferación miden el efecto de los compuestos sobre la proliferación de las células cultivadas. Las células se cultivan durante 7 días en presencia de diversas concentraciones de los compuestos. En el 7° día, las células se tiñen con colorante, y la intensidad de la tinción (proporcional al número de células) se mide con un espectrofotómetro. Los datos se trazan gráficamente frente a las concentraciones del compuesto, ajustados a la curva de respuesta de dosis sigmoidal, de la cual se determina la concentración del compuesto que reduce la velocidad de proliferación celular en un 50 % (concentración eficaz al 50 % o CE₅₀). Los compuestos activos en los ensayos de antiproliferación pueden ser citostáticos (inhiben la división celular) y/o citocidas (matan las células). Mediante la realización de ensayos de proliferación en células cancerosas positivas al VPH y células normales, identificamos compuestos que inhiben la proliferación de las células cancerosas positivas al VPH más eficazmente que las células de tejidos humanos normales.

Procedimientos ejemplares de preparación de los compuestos de la invención

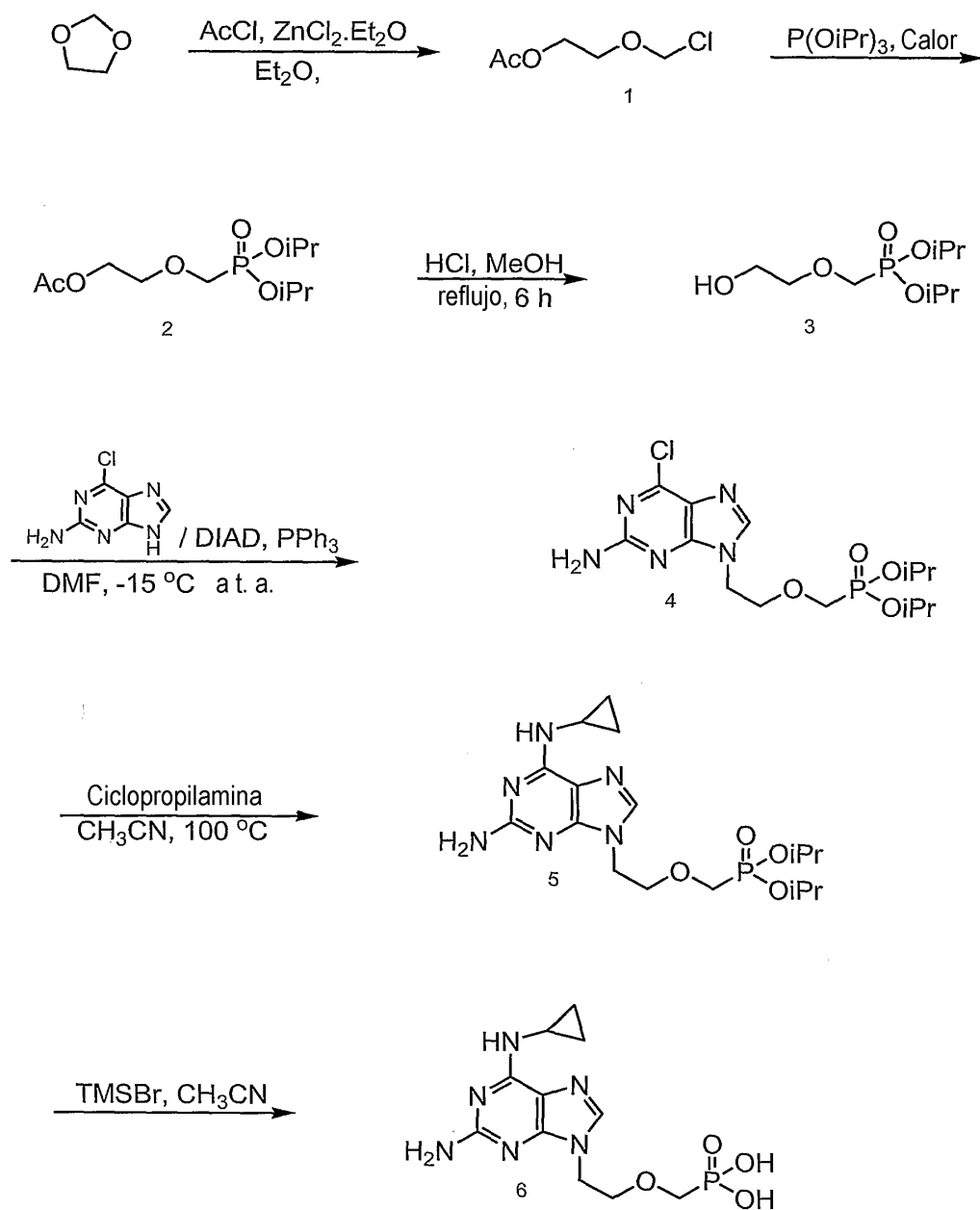
La invención también considera los procedimientos de fabricación y a las composiciones de la invención. Las composiciones se preparan usando cualquiera de las técnicas aplicables de síntesis orgánica. Muchas de dichas técnicas son bien conocidas en la técnica. No obstante, muchas de las técnicas conocidas son elaboradas en "Compendium of Organic Synthetic Methods" (John Wiley & Sons, Nueva York), Vol. 1, Ian T. Harrison y Shuyen Harrison, 1971; Vol. 2, Ian T. Harrison y Shuyen Harrison, 1974; Vol. 3, Louis S. Hegedus y Leroy Wade, 1977; vol. 4, Leroy G. Wade, Jr., 1980; Vol. 5, Leroy G. Wade, Jr., 1984; y Vol. 6, Michael B. Smith, así como March, J., "Advanced Organic Chemistry, Third Edition", (John Wiley & Sons, Nueva York, 1985), "Comprehensive Organic Synthesis. Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry. In 9 Volumes", Barry M. Trost, Editor-in-Chief (Pergamon Press, Nueva York, ed1993).

Se proporcionan más adelante una serie de ejemplos de procedimientos para la preparación de las composiciones de la invención. Estos procedimientos están destinados a ilustrar la naturaleza de tales preparaciones y no se pretende que limiten el alcance de los procedimientos aplicables.

- 5 En general, las condiciones de reacción tales como la temperatura, el tiempo de reacción, los disolventes, los procedimientos de tratamiento y similares, serán aquellos comunes en la técnica para la reacción particular que va a ser realizada. El material de referencia citado, junto con el material citado en el presente documento, contiene descripciones detalladas de tales condiciones. Típicamente, la temperatura será de -100 °C a 200 °C, los disolventes serán apróticos o próticos, y los tiempos de reacción serán de 10 segundos a 10 días. El tratamiento consiste esencialmente en desactivar cualesquiera reactivos sin reaccionar, seguido por la división entre un sistema de capa agua/orgánico (extracción) y separando la capa que contiene el producto.
- 10 Las reacciones de oxidación y reducción se llevan a cabo típicamente a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), aunque para reacciones de hidruro metálico frecuentemente la temperatura se reduce a de 0 °C a -100 °C, los solventes son típicamente apróticos para las reducciones, y pueden ser bien próticos o bien apróticos para las oxidaciones. Los tiempos de reacción se ajustan para lograr las conversiones deseadas.
- 15 Las reacciones de condensación se llevan a cabo típicamente a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente, aunque para las condensaciones cinéticamente controladas, no en equilibrio, son también comunes a temperaturas reducidas (0 °C a -100 °C). Los disolventes pueden ser o próticos (comunes en las reacciones en equilibrio) o apróticos (comunes en reacciones cinéticamente controladas).
- Las técnicas sintéticas estándar tales como la eliminación azeotrópica de los subproductos de reacción y el uso de las condiciones de reacción anhidras (por ejemplo, ambientes de gas inerte) son comunes en la técnica, y se aplicarán cuando sean aplicables.
- 20 Los ejemplos de procedimientos para preparar los compuestos de la invención se muestran en los esquemas de reacción siguientes. Las descripciones detalladas de los procedimientos se encuentran en la sección experimental más adelante, y se refieren a los esquemas de reacción específicos.

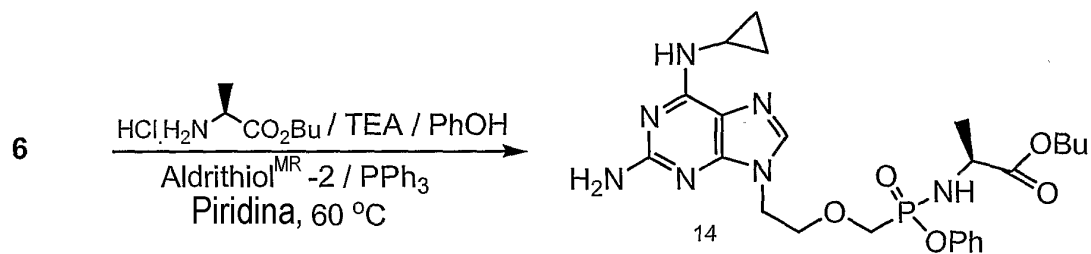
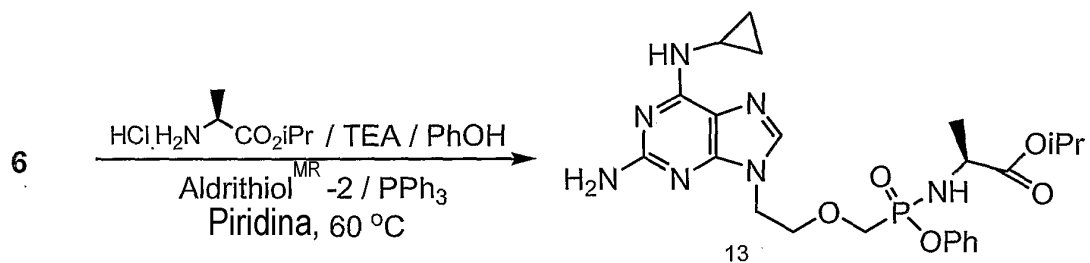
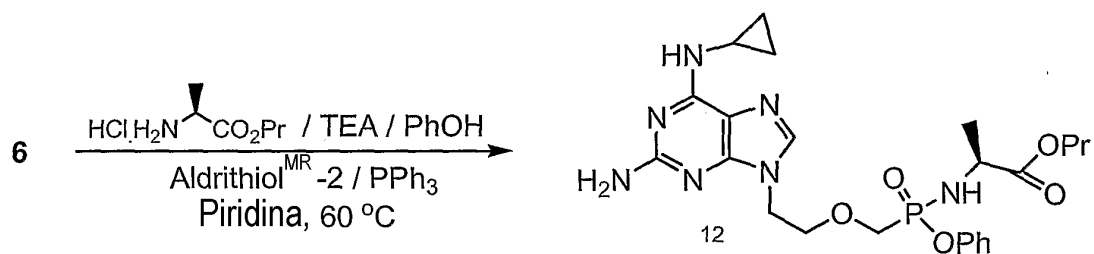
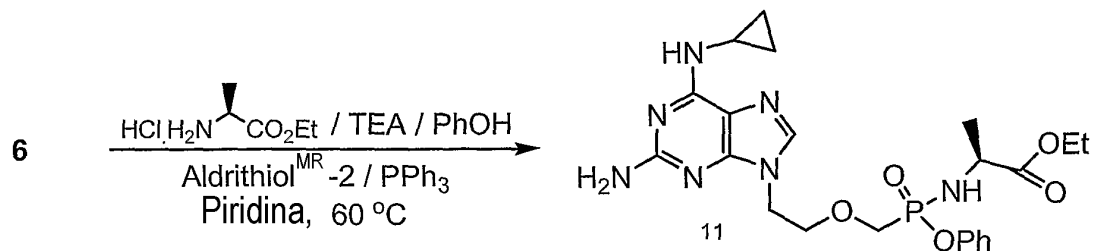
Esquemas

Esquema 1

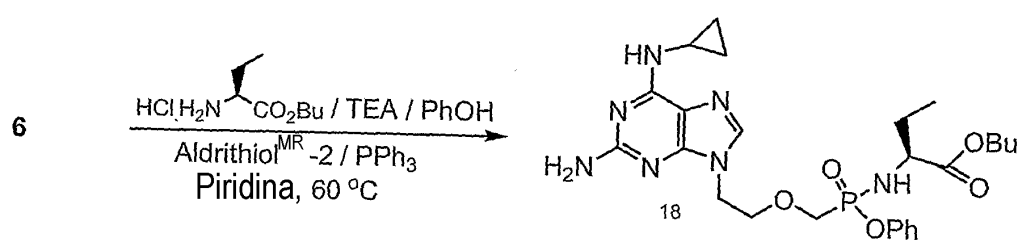
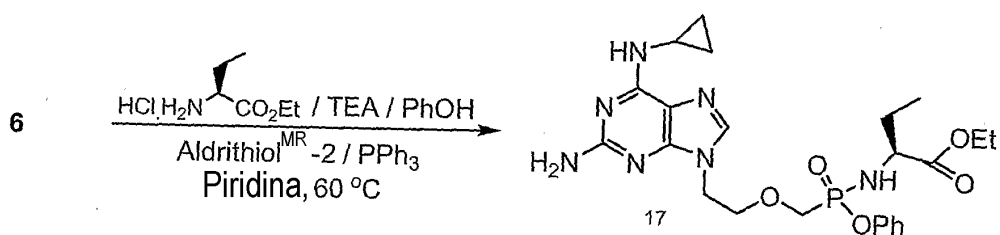
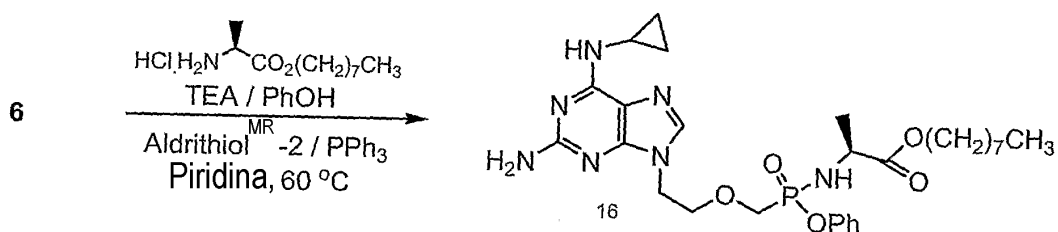
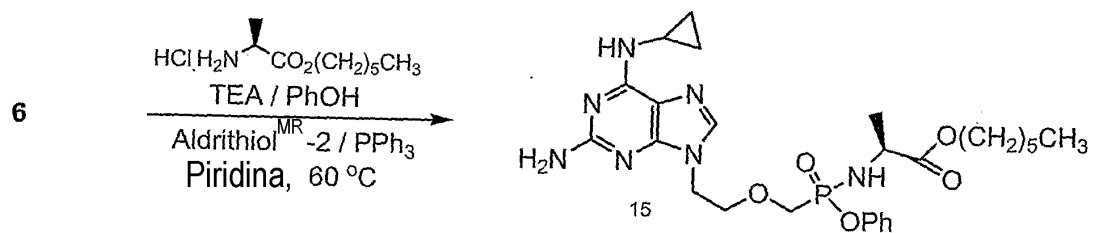




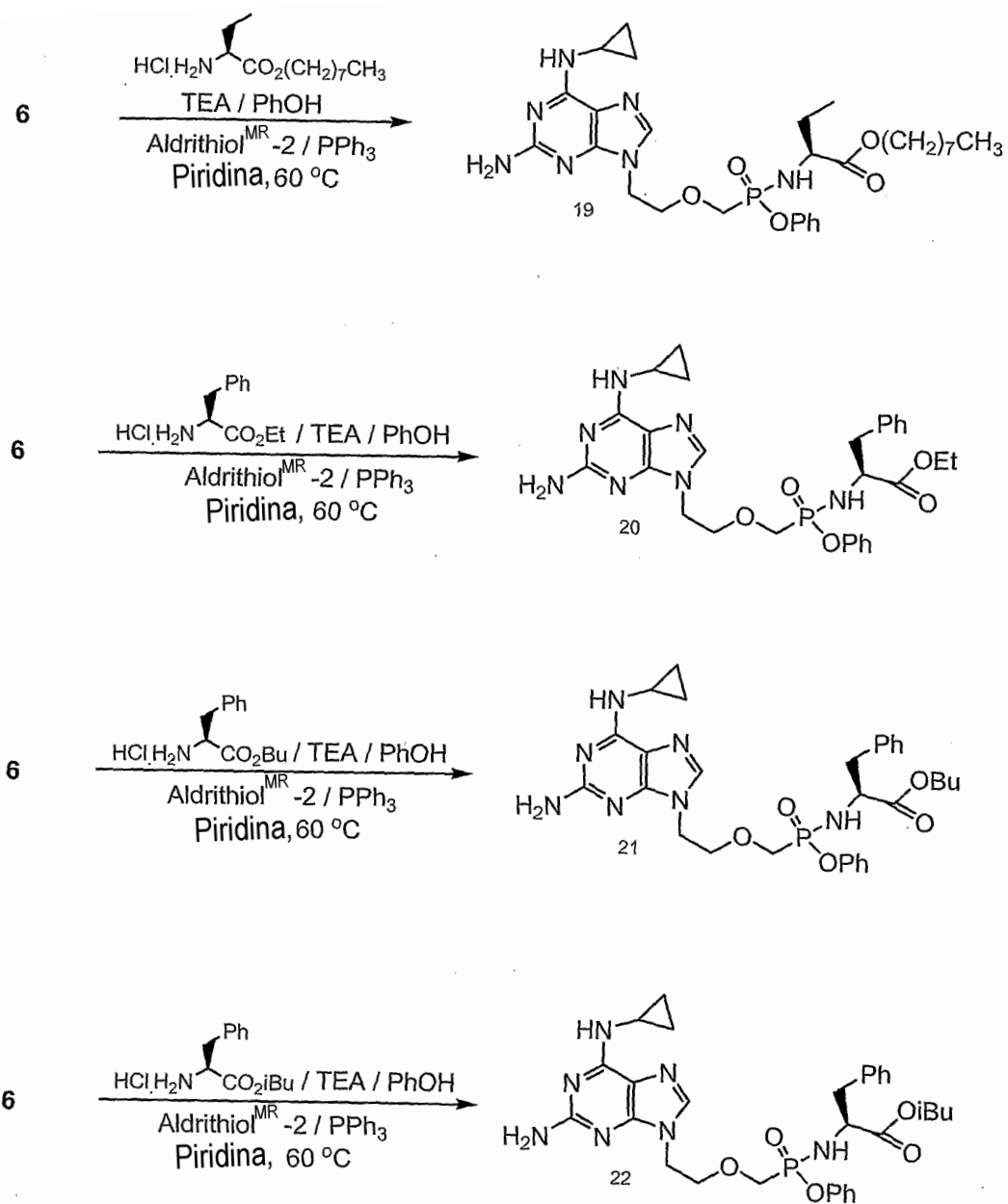
Esquema 3



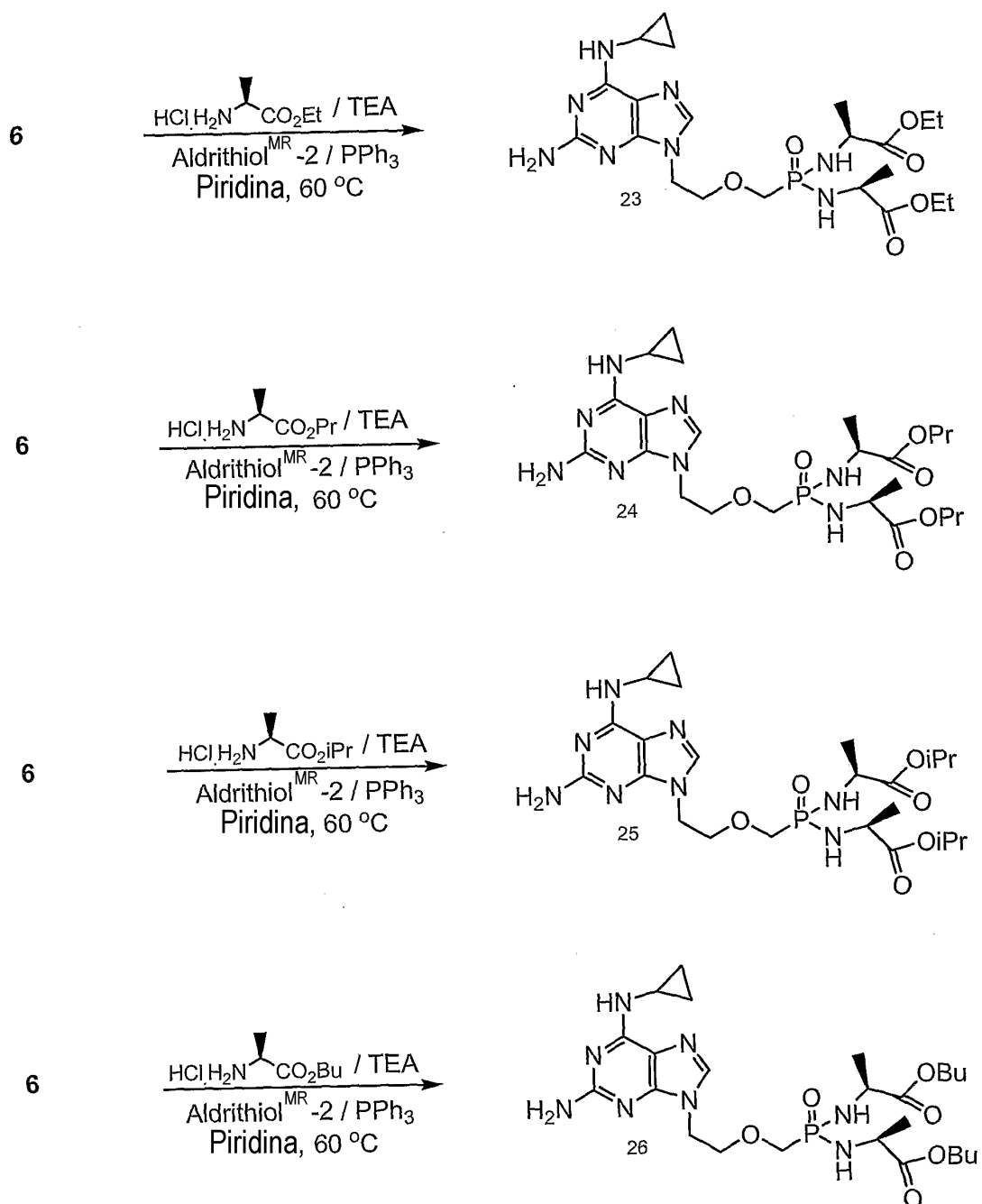
Esquema 4



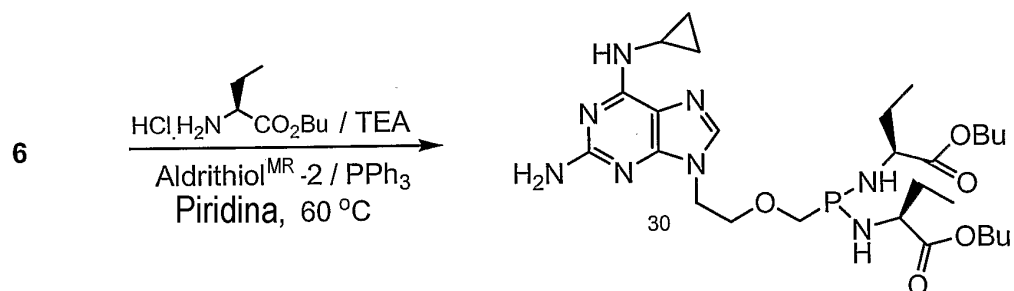
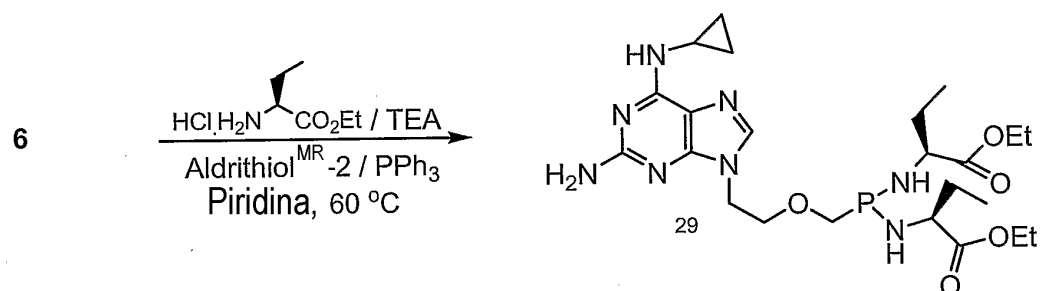
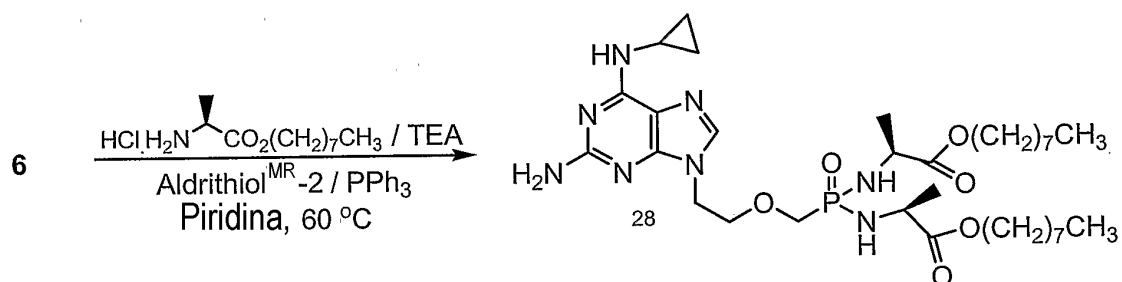
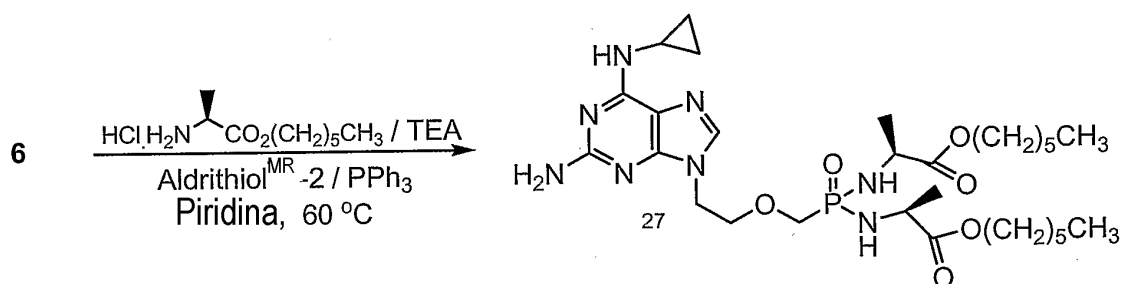
Esquema 5



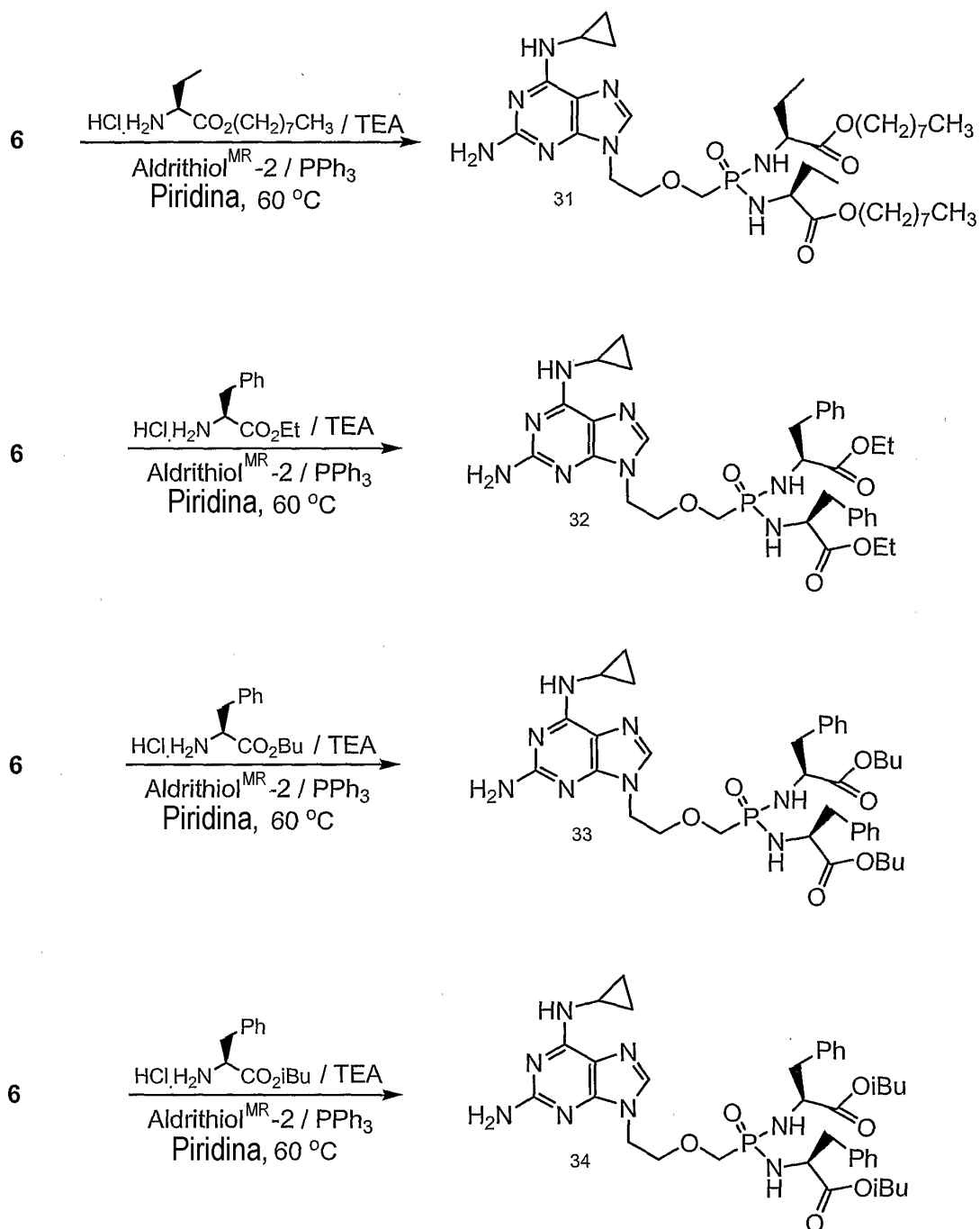
Esquema 6



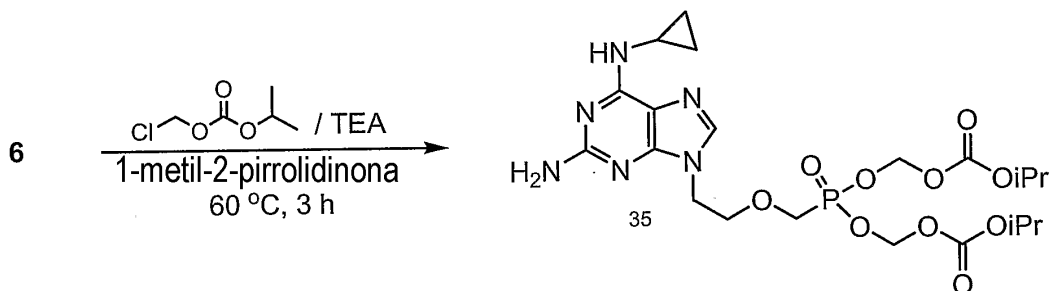
Esquema 7



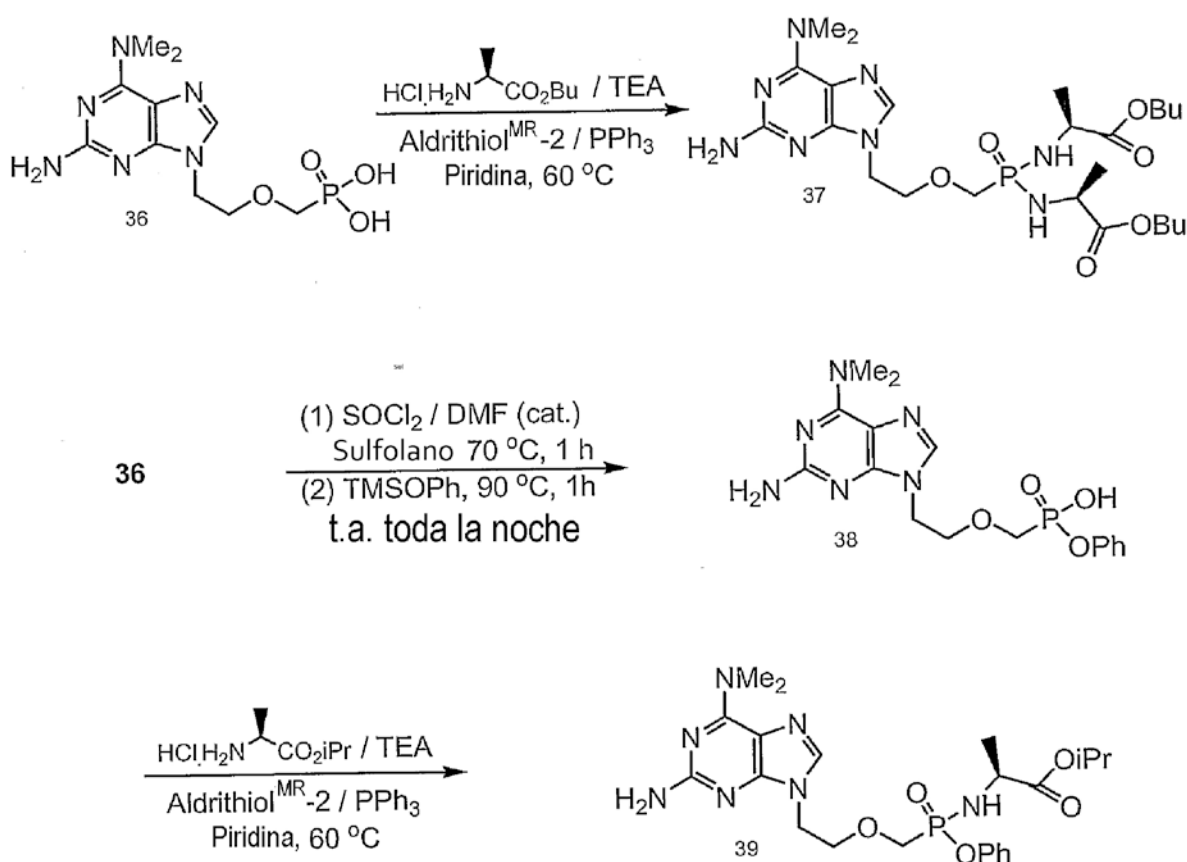
Esquema 8



Esquema 9



Esquema 10



- 5 Cada uno de los productos de los siguientes procesos es opcionalmente separado, aislado y purificado antes de su uso en procesos subsiguientes.

Los términos “tratados”, “tratar”, “tratamiento” y similares, como se usan en el contexto de un proceso químico, protocolo o preparación, significa poner en contacto, mezclar, hacer reaccionar, permitir que reaccione, hacer contactar, u otros términos comunes en la técnica para indicar que una o más entidades químicas son tratadas de una manera tal como para convertirla a una o más de otras entidades químicas. Esto significa que el “tratamiento del compuesto uno con el compuesto dos” es sinónimo con “permitir que el compuesto uno reaccione con el compuesto dos”, “poner en contacto el compuesto uno o el compuesto dos”, “hacer reaccionar el compuesto uno con el compuesto dos”, y otras expresiones comunes en la técnica de la síntesis orgánica para indicar razonablemente que el compuesto uno se “trató”, se “hizo reaccionar”, se “permitió reaccionar”, etc., con el compuesto dos.

En el contexto de un proceso químico, protocolo, o preparación, “tratar” indica la manera razonable y usual en la cual los productos químicos orgánicos se dejan reaccionar. Se pretenden concentraciones normales (0,01 M a 10 M, típicamente 0,1 M a 1 M), temperaturas (-100 °C a 250 °C, típicamente -78 °C a 150 °C, más típicamente -78 °C a 100 °C, todavía más típicamente 0 °C a 100 °C), recipientes de reacción (típicamente vidrio, plástico, metal), disolventes, presiones, atmósferas (típicamente aire para reacciones insensibles al oxígeno y al agua o nitrógeno o argón para reacciones sensibles al oxígeno o al agua), etc., a no ser que se indique de otro modo. El conocimiento de reacciones similares conocidas en la técnica de la síntesis orgánica se usa en la selección de las condiciones y

aparatos para “tratar” en un proceso dado. En particular, una persona de experiencia ordinaria en la técnica de la síntesis orgánica, selecciona las condiciones de aparatos esperados razonablemente para llevar a cabo exitosamente las reacciones químicas de los procesos descritos, con base en el conocimiento en la técnica.

5 Las modificaciones de cada uno de los esquemas de reacción anteriores conducen a diversos análogos de los materiales ejemplares específicos producidos anteriormente. Las citas anteriormente referidas que describen los procedimientos adecuados de síntesis orgánica son aplicables a tales modificaciones.

10 En cada uno de los esquemas ejemplares anteriores puede ser ventajoso separar los productos de reacción uno del otro y de los materiales iniciales. Los productos deseados de cada paso o serie de pasos se separan y/o se purifican (de aquí en adelante se separan) al grado deseado de homogeneidad por la técnica común en la materia. Típicamente, tales separaciones involucran la extracción de fases múltiples, cristalización a partir de un solvente o mezcla de solvente, destilación, sublimación o cromatografía. La cromatografía puede involucrar cualquier número de procedimientos que incluyen, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico, cromatografía líquida de presión alta, media o baja, cromatografía a escala pequeña y en capa delgada o gruesa preparativa, así como técnicas de cromatografía a escala pequeña en capa delgada y cromatografía instantánea.

15 Otra clase de procedimiento de separación involucra tratamientos de una mezcla con un reactivo seleccionado para enlazarse a o a ser de otro modo separable de un producto deseado, material inicial sin reaccionar, reacción por producto o similar. Tales reactivos incluyen adsorbentes o absorbentes tales como carbón activado, tamices moleculares, medios de intercambio iónico, o similares. Alternativamente, los reactivos pueden ser ácidos en el caso de un material básico, bases en el caso de un material ácido, reactivos tales como anticuerpos, proteínas de enlace, quelantes selectivos tales como éteres corona, reacciones de extracción de iones líquido/líquido (LIX) o similares.

20 La selección de los procedimientos apropiados de separación depende de la naturaleza de los materiales involucrados, por ejemplo, el punto de ebullición y el peso molecular en destilación y sublimación, la presencia o ausencia de grupos funcionales polares en cromatografía, estabilidad de materiales en medios ácidos y básicos en extracción de fase múltiples, y similares. Una persona experta en la técnica aplicará las técnicas más probables para lograr la separación deseada.

La invención se ha descrito con detalle suficiente para permitir que una persona de experiencia ordinaria en la técnica elabore y utilice el objeto de las reivindicaciones siguientes. Los ejemplos siguientes se proporcionan para ejemplificar la presente invención, y de ningún modo pueden ser considerados como limitantes de la presente invención.

30 Ejemplos

General

Algunos ejemplos han sido realizados múltiples veces. En ejemplos repetidos, las condiciones de reacción, tales como el tiempo, temperatura, concentración y similares, y los rendimientos, estuvieron dentro de los intervalos experimentales normales. En ejemplos repetidos en los que se realizaron modificaciones significativas, éstas se notaron en los casos en que los resultados variaron significativamente de aquellos descritos. En los ejemplos donde se usaron diferentes materiales iniciales, éstos se indican. Cuando los ejemplos repetidos se refieren a un análogo “correspondiente” de un compuesto, tal como un “éster de etilo correspondiente”, se pretende que un grupo de otro modo presente, en este caso típicamente un éster de metilo, sea tomado para ser el mismo grupo modificado tal como se indica. Los ejemplos 1 a 35 se refieren a los esquemas 1 al 9 anteriores.

40 Ejemplo 1

Cloruro de acetoxietiloximetilo 1: Un matraz de tres bocas de 5 litros se equipó con un agitador mecánico, termómetro, embudo de adición de 500 ml y purgado con argón. Se añadió 1,3-dioxolano (140 ml, 2,00 mol) en Et₂O anhidro (800 ml) y ZnCl₂/Et₂O 1 M (7,5 ml, 0,007 mol). Se añadió gota a gota una solución de cloruro de acetilo (157 ml, 2,20 mmol) en Et₂O (200 ml) a través de un embudo de adición en 20 minutos. Se usó un baño de agua fría para mantener la temperatura entre 19-27 °C a lo largo de toda la reacción. Se continuó con la agitación sin enfriamiento externo durante 4 horas, calentándose la reacción por sí misma a 20-25 °C durante aproximadamente 1 hora. La solución incolora clara se mantuvo en atmósfera de argón toda la noche. Se dejó reposar 3 días y se formó una solución anaranjada. Se retiró el Et₂O en un evaporador rotatorio (aspirador de agua) hasta que ya no se destiló más en un baño a 35 °C. Se obtuvo un rendimiento cuantitativo del producto de 318 g (rendimiento teórico 306 g).

50 Ejemplo 2

Fosfonato de isopropilo 2: Se cargó un matraz de tres bocas a 500 ml con el éter clorometílico 1 bruto (317 g, 2,00 mol). Se añadió gota a gota fosfito de triisopropilo (494 ml) a través de un embudo de adición, mientras que se calentaba en un baño de aceite a 125 °C y se agitaba vigorosamente. El destilado de 2-cloropropano se recogió por medio de una cabeza de trayectoria corta en un receptor enfriado con hielo seco, atmósfera de argón, y se recolectaron 140 g del destilado (157 g teóricos). El fosfito blanqueó la reacción hasta un color amarillo, se continuó el calentamiento durante otras 2 horas a 125 °C en un baño de aceite, luego se dispuso para la destilación a vacío usando una bomba de vacío. Se destiló un corte frontal amarillo (140 g, cabeza a 135 °C, cola a 190 °C), luego se cambió a un receptor limpio. La fracción principal fue recolectada a la temperatura de la cabeza de 178-187 °C (principalmente 185-187 °C) con vacío desconocido a temperatura del baño de 222-228 °C. Se obtuvieron 258 g del producto 2 (rendimiento de 47 % a partir de 1,3-dioxolano).

Ejemplo 3

Alcohol 3: Una solución del compuesto 2 (125 g, 0,443 mol) en MeOH absoluto (400 ml) se trató con HCl concentrado (11,2 ml, 0,112 mmol) y se calentó a reflujo por 6 horas en atmósfera de argón. Se eliminó el metanol

en un evaporador rotatorio (aspirador de agua) a 55 °C, dejando 115 g del aceite claro que se coevaporó con tolueno (2 x 200 ml). El producto bruto se secó luego a vacío para dar un aceite (102 g, 96 %).

Ejemplo 4

5 Fosfonato de diisopropilo 4: Una solución de trifenilfosfina (25,57 g, 97,5 mmol) y alcohol 3 (18 g, 75 mmol) en DMF (120 ml) se trató con 6-cloropurina (12,72 g, 75 mmol) y se enfrió a -15 °C. Se añadió gota a gota una solución de azodicarboxilato de diisopropilo (16,68 g, 82,5 mmol) en DMF (50 ml) a través de un embudo de adición en 80 minutos. La mezcla de reacción se mantuvo a -15 °C durante 2 horas y luego se calentó a la temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas adicionales. Una mezcla de reacción turbia se tornó en una solución amarilla brillante. El disolvente de reacción se evaporó a presión reducida, se coevaporó con 3 porciones de tolueno, y se secó a vacío toda la noche antes de la purificación. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (5 % MeOH/CH₂Cl₂) para dar el fosfonato de diisopropilo (18,52 g, 63 %) como un sólido blanco: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,95 (s, 1H), 4,70 (m, 2H), 4,31 (m, 2H), 3,93 (m, 2H), 3,73 (m, 2H), 1,29 (m, 12H); RMN ³¹P (CDCl₃) δ 18,42.

Ejemplo 5

15 Fosfonato de diisopropilo 5: Una mezcla del compuesto 4 (11,00 g, 28,08 mmol) y ciclopropilamina (4,86 g, 85,16 mmol) en 80 ml de CH₃CN se colocó en una bomba de reacción y se calentó a 100 °C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El producto se dividió entre MeOH/CH₂Cl₂ al 15 % (3 x) y salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (5 % MeOH/CH₂Cl₂) para dar el compuesto 5 (10,42 g, 90 %) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,59 (s, 1H), 5,83 (s ancho, 1H), 4,88 (s ancho, 2H), 4,70 (m, 2H), 4,21 (m, 2H), 3,88 (m, 2H), 3,72 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 3,03 (s ancho, 1H), 1,28 (m, 12H), 0,84 (m, 2H), 0,60 (m, 2H); RMN ³¹P (CDCl₃) δ 18,63.

Ejemplo 6

25 cPrPMEDAP 6: Una solución del compuesto 5 (11,00 g, 26,67 mmol) en CH₃CN anhidro (120 ml) se trató con bromotrimetilsilano (21,1 ml, 160,02 mmol). La reacción se protegió de la luz envolviendo el matraz con papel aluminio. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Los materiales volátiles se evaporaron a presión reducida. El residuo se disolvió en 250 ml de H₂O y el pH se ajustó a 9 con hidróxido de amonio. La mezcla de reacción se concentró y se obtuvo un sólido amarillo. El sólido se disolvió en 30 ml de agua y el pH se ajustó a 2 con HCl al 10 %. El sólido fino se recogió y se secó a vacío para dar el compuesto 6 (7,88 g, 90 %) como un sólido blanco.

Ejemplo 7

35 Clorhidrato del ácido monofosfónico 7: Una mezcla del ácido 6 (3,00 g, 9,15 mmol) y 0,1 ml de DMF en 9,2 ml de sulfolano se calentó a 70 °C. Se añadió cloruro de tionilo (1,66 ml, 22,76 mmol) gota a gota en un periodo de 1 hora. La temperatura se incrementó hasta 90 °C y se añadió TMSOPh (1,74 ml, 9,61 mmol) y se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a 100 ml de acetona enfriada con hielo bien agitada. El producto se precipitó. El sólido se filtró bajo una atmósfera de argón, se lavó con 100 ml de acetona helada, se secó a vacío para dar el clorhidrato del ácido monofosfónico (3,70 g, 92 %) como un sólido.

Ejemplo 8

40 Monofosfonamidato 8: Una mezcla del ácido monofosfónico 7 (0,22 g, 0,50 mmol), clorhidrato del éster metílico de L-alanina (0,14 g, 1,00 mmol), y trietilamina (0,21 ml, 1,50 mmol) en 3 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,39 g, 1,75 mmol) y trifenilfosfina (0,46 g, 1,75 mmol) en 2 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre acetato de etilo y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (7 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (97 mg, 39 %, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma blanquecina.

Ejemplo 9

50 Monofosfonamidato 9: Una mezcla del ácido monofosfónico 7 (0,88 g, 2,00 mmol), clorhidrato del éster metílico de D-alanina (0,84 g, 6,00 mmol), y trietilamina (0,84 ml, 6,00 mmol) en 8 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (1,56 g, 7,00 mmol) y trifenilfosfina (1,84 g, 7,00 mmol) en 8 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (7 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato 0,40 g, 41 %, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma blanquecina.

Ejemplo 10

60 Monofosfonamidato 10: Una mezcla de ácido monofosfónico 7 (0,88 g, 2,00 mmol), clorhidrato del éster de L-alanina (1,31 g, 6,00 mmol) y trietilamina (0,84 ml, 6,00 mmol) en 8 ml de piridina, se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (1,54 g, 7,00 mmol) y trifenilfosfina (1,84 g, 7,00 mmol) en 8 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente, y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se

purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (7 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (0,38 g, 36 %, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma anaranjada pálida.

Ejemplo 11

Monofosfonamidato 11: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), clorhidrato del éster etílico de L-alanina (94 mg, 0,60 mmol), fenol (0,14 g, 1,52 mmol) y trietilamina (0,51 ml, 3,60 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,47 g, 2,13 mmol) y trifenilfosfina (0,56 g, 2,13 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (7 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (74 mg, 48 %, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H δ 7,61 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 7,26-7,08 (m, 5H), 4,23 (m, 2H), 4,13 (m, 2H), 4,09 (m, 1H), 3,92-3,85 (m, 4H), 3,03 (s ancho, 1H), 1,30-1,26 (m, 3H), 1,24 (m, 3H), 0,88 (m, 2H), 0,63 (m, 2H); RMN ³¹P (CDCl₃) δ 21,94, 20,68.

Ejemplo 12

Monofosfonamidato 12: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (1,50 g, 4,56 mmol), clorhidrato de éster n-propílico de L-alanina (1,59 g, 9,49 mmol), fenol (2,25 g, 22,80 mmol) y trietilamina (10,50 ml, 54,72 mmol) en 8,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (6,54 g, 31,92 mmol) y trifenilfosfina (7,32 g, 31,92 mmol) en 8,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente, y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (7 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (0,43 g, 18 %, Compuesto E, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,61 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,27-7,09 (m, 5H), 4,27-4,20 (m, 2H), 4,16-4,00 (m, 3H), 3,93-3,82 (m, 4H), 3,04 (s ancho, 1H), 1,63 (m, 2H), 1,30 (dd, 3H), 0,92 (m, 3H), 0,89 (m, 2H), 0,63 (m, 2H); RMN ³¹P (CDCl₃) δ 21,89, 20,66.

Ejemplo 13

Monofosfonamidato 13: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), clorhidrato del éster isopropílico de L-alanina (0,10 g, 0,60 mmol), fenol (0,14 g, 1,52 mmol) y trietilamina (0,51 ml, 3,60 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,47 g, 2,13 mmol) y trifenilfosfina (0,56 g, 2,13 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (7 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (87 mg, 55 %, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma amarilla: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,60 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,26-7,09 (m, 5H), 4,98 (m, 1H), 4,23 (m, 2H), 4,06 (m, 1H), 3,91-3,83 (m, 4H), 3,04 (s ancho, 1H), 1,29-1,21 (m, 9H), 0,89 (m, 2H), 0,63 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 21,85, 20,68.

Ejemplo 14

Monofosfonamidato 14: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), clorhidrato del éster de L-alanina (0,11 g, 0,60 mmol), fenol (0,14 g, 1,52 mmol) y trietilamina (0,51 ml, 3,60 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,47 g, 2,13 mmol) y trifenilfosfina (0,56 g, 2,13 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente, y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (7 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (80 mg, 50 %, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,61 (d, J = 4,20 Hz, 1H), 7,27-7,08 (m, 5H); 5,93 (s ancho, 4,97 (s ancho, 2H), 4,23 (m, 2H), 4,10-4,08 (m, 3H), 3,91-3,84 (m, 4H), 3,03 (s ancho, 1H), 1,58 (m, 2H), 1,34-1,27 (m, 5H), 0,92-0,89 (m, 5H), 0,63 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 21,94, 20,68.

Ejemplo 15

Monofosfonamidato 15: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), clorhidrato del éster n-hexílico de L-alanina (0,13 g, 0,60 mmol), fenol (0,14 g, 1,52 mmol) y trietilamina (0,51 ml, 3,60 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,47 g, 2,13 mmol) y trifenilfosfina (0,56 g, 2,13 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía sobre ISCO (2-propanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (0,10 g, 59 %, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,59 (d, J = 4,20 Hz, 7,26-7,08 (m, 5H), 4,22 (m, 2H), 4,11 (m, 4,06 (m, 2H), 3,91-3,84 (m, 4H), 3,01 (s ancho, 1H), 1,59 (m, 2H), 1,31-1,27 (m, 9H), 0,89 (m, 3H), 0,86 (m, 2H), 0,62 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 21,94, 20,68.

Ejemplo 16

Monofosfonamidato 16: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), clorhidrato del éster de L-alanina (0,15 g, 0,60 mmol), fenol (0,14 g, 1,52 mmol) y trietilamina (0,51 ml, 3,60 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a

60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,47 g, 2,13 mmol) y trifetilfosfina (0,56 g, 2,13 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía sobre ISCO (2-propanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (0,13 g, 73 % mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,59 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 7,25-7,07 (m, 5H), 4,22 (m, 2H), 4,10 (m, 1H), 4,07 (m, 2H), 3,90-3,84 (m, 4H), 3,02 (s ancho, 1H), 1,59 (m, 2H), 1,29-1,26 (m, 13H), 0,88 (m, 3H), 0,85 (m, 0,60 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 21,96, 20,69.

Ejemplo 17

Monofosfonamidato 17: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (70 mg, 0,21 mmol), clorhidrato del éster etílico del ácido L-2-aminobutírico (72 mg, 0,42 mmol), fenol (0,10 g, 1,05 mmol) y trietilamina (0,36 ml, 2,52 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,33 g, 1,47 mmol) y trifetilfosfina (0,39 g, 1,47 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (7 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (66 mg, 60 %, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,61 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,26-7,08 (m, 5H), 5,91 (s ancho, 1H), 4,97 (s ancho, 2H), 4,22-4,12 (m, 4H), 4,01-3,81 (m, 5H), 3,03 (s ancho, 1H), 1,71-1,60 (m, 2H), 1,24 (m, 3H), 0,89 (m, 2H), 0,84-0,76 (m, 3H), 0,63 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 22,15, 20,93.

Ejemplo 18

Monofosfonamidato 18: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (1,00 g, 3,05 mmol), clorhidrato del éster n-butílico del ácido L-2-aminobutírico (1,19 g, 6,09 mmol), fenol (1,43 g, 15,23 mmol) y trietilamina (5,10 ml, 36,60 mmol) en 5,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (4,70 g, 21,32 mmol) y trifetilfosfina (5,59 g, 21,32 mmol) en 5,00 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente, y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (5 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (0,7 g, 42 %, Compuesto G, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma blanquecina: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,60 (d, J = 6,60 Hz, 1H), 7,27-7,04 (m, 5H), 5,89 (s ancho, 1H), 4,94 (s ancho, 2H), 4,22 (m, 2H), 4,07-3,99 (m, 3H), 3,91-3,84 (m, 4H), 3,03 (s ancho, 1H), 1,70-1,57 (m, 4H), 1,35 (m, 2H), 0,92-0,75 (m, 8H), 0,63 (2H) RMN ¹³P (CDCl₃) δ 22,21, 20,95.

Ejemplo 19

Monofosfonamidato 19: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), clorhidrato del éster del ácido n-octanílico de L-2-aminobutírico (0,15 g, 0,60 mmol), fenol (0,14 g, 1,52 mmol) y trietilamina (0,51 ml, 3,60 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,47 g, 2,13 mmol) y trifetilfosfina (0,56 g, 2,13 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía sobre ISCO (2-propanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (0,12 g, 64 %, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,62 (d, J = 6,60 Hz, 1H), 7,25-7,08 (m, 5H), 4,24-4,21 (m, 2H), 4,09-4,04 (m, 2H), 4,00 (m, 1H), 3,91-3,83 (m, 4H), 3,01 (s ancho, 1H), 1,70-1,58 (m, 4H), 1,27 (m, 10H), 0,89-0,76 (m, 8H), 0,62 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 22,22, 20,92.

Ejemplo 20

Monofosfonamidato 20: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (1,5 g, 4,57 mmol), clorhidrato del éster etílico de L-fenilalanina (2,10 g, 9,14 mmol), fenol (2,15 g, 22,85 mmol) y trietilamina (7,64 ml, 54,84 mmol) en 8,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (7,05 g, 31,99 mmol) y trifetilfosfina (8,39 g, 31,99 mmol) en 7,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (5 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar un sólido amarillo pálido 1,32 g, que contenía aproximadamente el 10 % de impurezas. El sólido amarillo (1,32 g, 2,28 mmol) se disolvió en 10 ml de iPrOH y se transfirió a una solución caliente de 30 ml de iPrOH de ácido fumárico (0,27 g, 2,28 mmol) y se agitó a 80 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió gradualmente hasta la temperatura ambiente y la sal de fumarato se recogió a 0°C. La sal de fumarato resultante fue neutralizada mediante división a partir de NaHCO₃ (2 veces) y acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, agua, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El producto se secó a vacío para dar el monofosfonamidato (0,70 g, 26 %, Compuesto A, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma blanca: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,54 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,27-6,98 (m, 10H), 4,35 (m, 1H), 4,16 (m, 2H), 4,08 (m, 2H), 3,84-3,61 (m, 3H), 3,33 (m, 1H), 3,02 (s ancho, 1H), 2,95-2,87 (m, 2H), 1,17 (m, 3H), 0,87 (m, 2H), 0,61 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 21,88, 21,07.

Ejemplo 21

Monofosfonamidato 21: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (70 mg, 0,21 mmol), clorhidrato del éster de n-butílico de L-fenilalanina (0,11 g, 0,42 mmol), fenol (0,10 g, 1,05 mmol) y trietilamina (0,36 ml, 2,52 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,33 g,

1,47 mmol) y trifenilfosfina (0,39 g, 1,47 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente, y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (7 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (30 mg, 23 %, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,55 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 7,25-6,98 (m, 10H), 4,36 (m, 1H), 4,17 (m, 2H), 4,02 (m, 2H), 3,83-3,35 (m, 4H), 3,02 (s ancho, 1H), 2,94-2,86 (m, 2H), 1,52 (m, 2H), 1,29 (m, 2H), 0,90 (m, 3H), 0,88 (m, 2H), 0,62 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 21,85, 21,05.

Ejemplo 22

Monofosfonamidato 22: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (70 mg, 0,21 mmol), clorhidrato del éster isobutílico de L-fenilalanina (0,11 g, 0,42 mmol), fenol (0,10 g, 1,05 mmol) y trietilamina (0,36 ml, 2,52 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,33 g, 1,47 mmol) y trifenilfosfina (0,39 g, mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente, y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (7 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el monofosfonamidato (65 mg, 50 %, mezcla diastereoisomérica 1:1) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,56 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 7,26-6,98 (m, 10H), 4,40 (m, 1H), 4,17 (m, 2H), 3,82 (m, 2H), 3,75-3,62 (m, 3H), 3,35 (m, 1H), 3,04 (s ancho, 1H), 2,96-2,87 (m, 2H), 1,83 (m, 1H), 0,90 (m, 2H), 0,86 (m, 6H), 0,63 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 21,82, 21,03.

Ejemplo 23

Bisfosfonamidato 23: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), clorhidrato del éster etílico de L-alanina (0,28 g, 1,80 mmol), y trietilamina (0,51 ml, 3,60 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,47 g, 2,10 mmol) y trifenilfosfina (0,56 g, 2,10 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (10 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el bisfosfonamidato (80 mg, 50 %) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,63 (s, 1H), 5,88 (s ancho, 1H), 4,96 (s ancho, 2H), 4,24-4,16 (m, 6H), 4,00 (m, 2H), 3,86 (m, 2H), 3,72 (m, 2H), 3,01 (s ancho, 1H), 1,36 (m, 6H), 1,26 (m, 6H), 0,86 (m, 2H), 0,61 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 20,63.

Ejemplo 24

Bisfosfonamidato 24: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (1,00 g, 3,05 mmol), clorhidrato del éster n-propílico de L-alanina (3,06 g, 18,30 mmol) y trietilamina (5,10 ml, 36,50 mmol) en piridina (5,0 ml) se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (4,70 g, 21,32 mmol) y trifenilfosfina (5,59 g, 21,32 mmol) en piridina (5,0 ml) a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (10 % para dar el bisfosfonamidato (1,13 g, 71 %, Compuesto F) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,65 (s, 1H), 5,92 (s ancho, 1H), 5,03 (s ancho, 4,24 (m, 2H), 4,10-4,02 (m, 6H), 3,87 (m, 2H), 3,73 (m, 2H), 3,03 (s ancho, 1H), 1,65 (m, 4H), 1,37 (m, 6H), 0,93 (m, 6H), 0,88 (m, 2H), 0,63 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 20,61.

Ejemplo 25

Bisfosfonamidato: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,60 g, 1,83 mmol), clorhidrato del éster isopropílico de L-alanina (1,84 g, 10,98 mmol), y trietilamina (3,06 ml, 21,96 mmol) en 3,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (2,82 g, 12,80 mmol) y trifenilfosfina (3,36 g, 12,80 mmol) en piridina (3,0 ml) a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (10 % para dar el bisfosfonamidato (0,53 g, 52 %, Compuesto B) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,65 (s, 1H), 5,00 (m, 2H), 4,24 (m, 3,97 (m, 2H), 3,87 (m, 2H), 3,71 (m, 2H), 3,01 (s ancho, 1H), 1,34 (m, 6H), 1,23 (m, 12H), 0,86 (m, 2H), 0,62 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 20,59.

Ejemplo 26

Bisfosfonamidato 26: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), clorhidrato del éster n-butílico de L-alanina (0,33 g, 1,82 mmol) y trietilamina (0,51 ml, 3,60 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,47 g, 2,10 mmol) y trifenilfosfina (0,56 g, 2,10 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (10 % metanol/CH₂Cl₂) para dar el bisfosfonamidato (97 mg, 55 %) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,63 (s, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,09 (m, 4H), 4,01 (m, 2H), 3,86 (m, 2H), 3,72 (m, 2H), 3,01 (s ancho, 1H), 1,61 (m, 4H), 1,37 (m, 10H), 0,93 (m, 6H), 0,88 (m, 2H), 0,61 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 20,59.

Ejemplo 27

Bisfosfonamidato 27: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), clorhidrato del éster n-hexílico de L-alanina (0,38 g, 1,80 mmol) y trietilamina (0,51 ml, 3,60 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,47 g, 2,10 mmol) y trifetilfosfina (0,56 g, 2,10 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente, y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía sobre ISCO (2-propanol/CH₂Cl₂) para dar el bisfosfonamidato (0,13 g, 65 %) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,62 (s, 1H), 4,23 (m, 2H), 4,09 (m, 4H), 4,01 (m, 2H), 3,86 (m, 2H), 3,72 (m, 2H), 2,99 (s ancho, 1H), 1,61 (m, 4H), 1,36-1,29 (m, 18H), 0,88 (m, 6H), 0,84 (m, 2H), 0,60 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 20,61.

Ejemplo 28

Bisfosfonamidato 28: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), clorhidrato del éster n-octanílico de L-alanina (0,43 g, 1,80 mmol), y trietilamina (0,51 ml, 3,60 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,47 g, 2,10 mmol) y trifetilfosfina (0,56 g, 2,10 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía sobre ISCO (2-propanol/CH₂Cl₂) para dar el bisfosfonamidato (0,13 g, 61 %) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,61 (s, 1H), 4,21 (m, 2H), 4,07-4,00 (m, 6H), 3,84-3,70 (m, 4H), 2,98 (s ancho, 1H), 1,60 (m, 4H), 1,34 (m, 1,27 (m, 20H), 0,87 (m, 6H), 0,83 (m, 2H), 0,58 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 20,63.

Ejemplo 29

Bisfosfonamidato 29: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,70 g, 2,13 mmol), clorhidrato del éster etílico del ácido L-2-aminobutírico (2,15 g, 12,80 mmol) y trietilamina (3,57 ml, 25,56 mmol) en 3,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (3,29 g, 14,91 mmol) y trifetilfosfina (3,92 g, 91 mmol) en piridina (3,0 ml) a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (10 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el bisfosfonamidato (0,71 g, 60 %, Compuesto D) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,64 (s, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,16 (m, 4H), 3,89-3,87 (m, 4H), 3,72 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 3,01 (s ancho, 1H), 1,78-1,64 (m, 4H), 1,26 (m, 6H), 0,91 (m, 6H), 0,87 (m, 2H), 0,61 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 21,23.

Ejemplo 30

Bisfosfonamidato 30: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,70 g, 2,13 mmol) clorhidrato del éster n-butílico del ácido L-2-aminobutírico (2,50 g, 12,80 mmol), y trietilamina (3,57 ml, 25,56 mmol) en 3,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (3,29 g, 14,91 mmol) y trifetilfosfina (3,92 g, 14,91 mmol) en 3,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (10 % de metanol/CH₂Cl₂) para dar el bisfosfonamidato (0,40 g, 31 %, Compuesto C) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,64 (s, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,11 (m, 4H), 3,91 (m, 2H), 3,87 (m, 2H), 3,71 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 3,03 (s ancho, 1H), 1,79-1,64 (m, 4H), 1,60 (m, 4H), 1,37 (m, 4H), 0,94 (m, 6H), 0,90 (m, 6H), 0,86 (m, 2H), 0,62 (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 21,25.

Ejemplo 31

Bisfosfonamidato 32: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), clorhidrato del éster n-octanílico del ácido L-2-aminobutírico (0,33 g, 1,82 mmol), y trietilamina (0,51 ml, 3,60 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,47 g, 2,10 mmol) y trifetilfosfina (0,56 g, 2,10 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía sobre ISCO (2-propanol/CH₂Cl₂) para dar el bisfosfonamidato (0,12 g, 55 %) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,64 (s, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,13-4,05 (m, 4H), 3,91 (m, 2H), 3,87-3,72 (m, 4H), 3,01 (s ancho, 1H), 78-1,65 (m, 4H), 61-1,29 (m, 24H), 0,91 (m, 6H), 0,89 (m, 6H), 0,86 (m, 2H), (m, 2H); RMN ¹³P (CDCl₃) δ 21,20.

Ejemplo 32

Bisfosfonamidato 32: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,60 g, 1,82 mmol), clorhidrato del éster etílico de L-fenilalanina (2,51 g, 10,96 mmol), y trietilamina (3,06 ml, 21,84 mmol) en 3,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (2,82 g, 12,74 mmol) y trifetilfosfina (3,36 g, 12,74 mmol) en 3,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía sobre ISCO (2-propanol/CH₂Cl₂) para dar el bisfosfonamidato (0,53 g, 43 %) como una espuma amarilla pálida: RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,48 (s, 7,22-7,06 (m, 10H), 4,20 (m, 1H), 4,12 (m, 4H), 4,09 (m, 2H), 4,04 (m, 3,63 (m, 2H), 3,33-3,21 (m, 2H), 3,04-2,78 (m, 5H), 1,20 (m, 6H), 0,83 (m, 2H), 0,58

(m, 2H); RMN ^{13}P (CDCl_3) δ 20,38.

Ejemplo 33

Bisfosfonamidato 33: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (70 mg, 0,21 mmol), clorhidrato del éster n-butilico de L-fenilalanina (0,33 g, 1,26 mmol) y trietilamina (0,36 ml, 2,52 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,33 g, 1,47 mmol) y trifenilfosfina (0,39 g, 1,47 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente, y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO_3 saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na_2SO_4 , se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (10 % de metanol/ CH_2Cl_2) para dar el bisfosfonamidato (0,11 g, 70 %) como una espuma amarilla pálida: RMN ^1H (CDCl_3) δ 7,51 (s, 1H), 7,23-7,06 (m, 10H), 4,23 (m, 1H), 4,11-4,05 (m, 7H), 3,65 (m, 2H), 3,35-3,23 (m, 2H), 3,01 (m, 1H), 3,04-2,78 (m, 4H), 1,57 (m, 4H), 1,33 (m, 4H), 0,92 (m, 6H), 0,86 (m, 2H), 0,61 (m, 2H); RMN ^{13}P (CDCl_3) δ 20,35.

Ejemplo 34

Bisfosfonamidato 34: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (70 mg, 0,21 mmol), clorhidrato del éster isobutílico de L-fenilalanina (0,33 g, 1,26 mmol) y trietilamina (0,36 ml, 2,52 mmol) en 1,0 ml de piridina se calentó a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió una solución amarilla brillante recién preparada de aldritol (0,33 g, 1,47 mmol) y trifenilfosfina (0,39 g, 1,47 mmol) en 1,0 ml de piridina a la mezcla de reacción anterior. La reacción se agitó a 60 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO_3 saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (10 % $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) para dar el bisfosfonamidato (78 mg, 50 %) como una espuma amarilla pálida: RMN ^1H (CDCl_3) δ 7,52 (s, 1H), 7,24-7,07 (m, 10H), 4,26 (m, 1H), 4,11 (m, 2H), 4,01 (m, 1H), 3,85 (m, 4H), 3,66 (m, 2H), 3,35-3,25 (m, 2H), 3,07-2,85 (m, 3H), 2,97-2,79 (m, 2H), 1,89 (m, 2H), 0,90 (m, 12H), 0,89 (m, 2H), 0,62 (m, 2H); RMN ^{13}P (CDCl_3) δ 20,31.

Ejemplo 35

BisPOC de cPrPMEDAP 35: Una mezcla del ácido fosfónico 6 (0,20 g, 0,61 mmol) y trietilamina (0,42 ml, 3,01 mmol) en 2,0 ml de 1-metil-2-pirrolidinona se calentó a 60 °C durante 30 minutos. Se añadió POCCl (0,45 g, 2,92 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto se dividió entre EtOAc y NaHCO_3 saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na_2SO_4 , se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía sobre ISCO (2-propanol/ CH_2Cl_2) para dar el bisPOC de cPrPMEDAP (0,13 g, 39 %) como un sólido: RMN ^1H (CDCl_3) δ 7,58 (s, 1H), 5,66 (m, 4H), 4,92 (m, 2H), 4,22 (m, 2H), 3,90-3,88 (m, 4H), 3,01 (s ancho, 1H), 1,81 (m, 12H), 0,86 (m, 2H), 0,62 (m, 2H); RMN ^{13}P (CDCl_3) δ 20,93.

Ejemplo 36

Este ejemplo muestra ensayos usados para demostrar la actividad de antiproliferación

Tipos celulares usados para los ensayos anti-proliferación

Las líneas celulares de cáncer humano usadas en los ensayos antiproliferación incluyeron seis líneas celulares de carcinoma cervical con tres tipos de VPH (VPH-16, VPH-18, VPH-39), una línea celular de carcinoma cervical negativo al VPH y dos carcinomas similares a queratinocitos provenientes de lengua. Las células humanas normales probadas incluyeron queratinocitos de piel, queratinocitos cervicales y fibroblastos pulmonares. Los queratinocitos de piel y los queratinocitos cervicales fueron obtenidos de Cambrex (East Rutherford, NJ) y todas las otras células fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). La Tabla 36-1 resume las características de cada tipo celular y las condiciones de cultivo. Procedimiento de ensayo anti-proliferación

1. Cultivo celular

Las células se desprendieron de los matraces de cultivo usando tripsina, se contaron y se plaquearon en placas de cultivo de 96 pocillos (250-1000 células por pocillo, dependiendo del tipo celular). Al día siguiente (definido como el día 0), después de que las células se acoplaron al fondo de las placas, se agregaron por duplicado diluciones seriadas cinco veces de los compuestos. Se agregaron cero compuestos y colchicina 10 μM (inhibidor de la división celular) a los pocillos control, los cuales podrían representar el 100 % de la proliferación y el 0 % de la proliferación, respectivamente.

2. Tinción de las células con sulforodamina B

Siete días después de la adición de los compuestos, las placas de cultivo se trataron con ácido tricloroacético al 10 % a 4 °C durante 1 hora, después se lavaron con agua. Este procedimiento permite que las proteínas derivadas de la célula se enlacen a la superficie del fondo de las placas. Las proteínas se tiñieron con 0,4 % de sulforodamina B en 1 % de ácido acético durante 10 minutos, seguido por lavado intenso con ácido acético al 1 %. El colorante remanente enlazado al fondo de las placas se disolvió en base Trizma 10 mM. Esto generó un color púrpura que se cuantificó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm, usando el espectrofotómetro.

3. Análisis de datos

A partir de los datos experimentales, se generó la curva sigmoideal de respuesta a la dosis y se calculó la concentración eficaz al 50 % (CE_{50}) usando GraphPad Prism versión 4.01 para Windows (Software GraphPad, San Diego, California, EEUU).

Tabla 36-1. Tipos celulares usados en los ensayos anti-proliferación

Nombre	Estado del VPH	Origen	Medio de cultivo*
Líneas celulares de carcinoma positivas al VPH			
SiHa	VPH-16 (1-2 copias por célula)	Carcinoma de células escamosas en cuello uterino	A1, A2
Ca Ski	VPH-16 (600 copias por célula)	Carcinoma epidermoide, metastatizado al intestino delgado desde la cuello uterino	A1, A2
MS751	VPH-18 (también contiene un genoma de VPH-45 parcial)	Carcinoma epidermoide, metastatizado a nódulos linfáticos desde el cuello uterino	A1, A2
HeLa	VPH-18	Adenocarcinoma epitelial en cuello uterino	A1, A2
C-4 I	VPH-18	Carcinoma en cuello uterino	A1, A2
ME-180	VPH-39	Carcinoma epidermoide, metastatizado al omentum de cuello uterino	A1, A2
Líneas celulares de carcinoma negativas al VPH			
HT-3	Ninguno	Carcinoma, metastatizado a nódulos linfáticos desde el cuello uterino	A1, A2
SCC-4	Ninguno	Carcinoma de células escamosas en lengua	A1, A2
SCC-9	Ninguno	Carcinoma de células escamosas en lengua	A1, A2
Células provenientes de tejidos humanos normales			
HEL299	Ninguno	Fibroblastos en pulmón embrionario	A1, A2
PHK (queratinocitos de piel)	Ninguno	Queratinocitos en prepucio de adulto	B1, B2
CK (queratinocitos cervicales)	Ninguno	Queratinocitos en cuello uterino de adulto	B1, B2
* Medio de cultivo			

Las células se mantuvieron en incubadoras humidificadas a 37 °C con 5 % de CO₂, en los siguientes medios de cultivo.

5 A1: Medio para mantenimiento de cultivo: Eagle MEM con BSS de Earle (Cambrex, East Rutherford, NJ), suplementado con 10 % de suero fetal bovino, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina.

A2: Medio para los ensayos antiproliferación: MEM de Eagle con BSS de Earle, suplementado con 5 % de suero fetal bovino, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

10 B1: Medio para mantenimiento de cultivo: queratinocito-SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado con 0,01 mg/ml de extracto de pituitaria bovina, 0,001 µg/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

B2: Medio para los ensayos de antiproliferación: mezcla 4:1 de B1 y A2.

Resultados

1. Actividad de antiproliferación selectiva de los profármacos de amidato en células SiHa positivas al VPH en comparación con fibroblastos normales.

El objetivo fue descubrir un compuesto que inhiba el desarrollo de la lesión transformada por VPH sin afectar las células normales en la epidermis y la dermis (tales como los queratinocitos y los fibroblastos). Se establecieron ensayos antiproliferación *in vitro* usando células SiHa y células HEL, las cuales modelan la lesión transformada por VPH y los fibroblastos normales, respectivamente. Las células SiHa están derivadas de carcinoma de células escamosas en el cuello uterino, provocado por la infección por el VPH-16 y los fibroblastos HEL están derivados de pulmón embrionario humano normal (Tabla 36-1). Como se muestra en la Tabla 36-2, la concentración eficaz al 50 % (CE₅₀) de los siete profármacos de amidato en las células SiHa estuvieron en el intervalo de 0,13-3,2 nM, mientras que la CE₅₀ en células HEL estuvo en el intervalo de 12-727 nM, indicando que estos compuestos inhibieron la proliferación de células SiHa más eficientemente que las células HEL. El índice de selectividad de HEL/SiHa (CE₅₀ de HEL dividido entre CE₅₀ de SiHa) estuvo en el intervalo de 72-559 (Tabla 36-2).

Los siete profármacos de amidato producen el mismo metabolito, cprPMEDAP. cprPMEDAP es además metabolizado a PMEG [Compton y col., 1999; Haste y col., 1999]. La CE₅₀ antiproliferación de estos compuestos en células SiHa fue mucho más alta que las de los profármacos (Tabla 36-2), indicando que el acoplamiento de las porciones de amidato mejoró la potencia. Además, los índices de selectividad HEL/SiHa de cprPMEDAP y PMEG fueron 17 y 4,1, respectivamente (Tabla 36-2), indicando que los profármacos tienen mejor selectividad que cprPMEDAP, y cprPMEDAP tiene mejor selectividad que PMEG.

Se sabe que PMEG es fosforilado a PMEGpp que actúa como un inhibidor de la terminación de cadena de la ADN-polimerasa celular [Compton y col., 1999; Haste y col., 1999]. Cuatro inhibidores de ADN-polimerasa conocidos (Cidofovir, Ara C, doxifluridina y afidicolin) y otros fármacos anticancerosos con diferentes mecanismos de acción, incluyendo, los inhibidores de la ADN-topoisomerasa (dacarbazina, elipticina), alquilantes de ADN (doxorubicina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina), e inhibidores de tubulina (vincristina, vinblastina, etopósido e indanocina) se analizaron en células SiHa y HEL (Tabla 36-2). La CE₅₀ de antiproliferación de estos compuestos en células SiHa varió, y algunas fueron igualmente potentes o más potentes que los siete profármacos de amidato. No obstante, todos ellos mostraron bajos índices de selectividad HEL/SiHa (0,01-3,98), en comparación con los siete profármacos de amidato.

Tomado conjuntamente, se mostró un grupo único de compuestos que muestran la CE₅₀ antiproliferación de sub-bajo nM en células de carcinoma SiHa positivas al VPH-16, y una selectividad mayor de 50 veces en comparación con fibroblastos HEL.

2. Actividad de proliferación selectiva de los profármacos de amidato en células SiHa positivas al VPH en comparación con los queratinocitos normales

Con el fin de evaluar el efecto de los compuestos en células normales provenientes de la epidermis, se realizaron ensayos anti-proliferación usando queratinocitos humanos primarios, aislados de piel (PHK) y cuello uterino (CK). Los valores de CE₅₀ antiproliferación obtenidos con siete profármacos en PHK y CK fueron menores que aquellos en HEL, indicando que los queratinocitos son más susceptibles que los fibroblastos (Tabla 36-2 y 36-3). No obstante, los índices de selectividad de PHK/SiHa y CK/SiHa de estos profármacos y cprPMEDAP fueron todavía mejores que los compuestos control PMEG y un inhibidor de la ADN-polimerasa, AraC (Tabla 36-3). De este modo, los profármacos inhibieron preferentemente la proliferación de las células SiHa positivas a VPH-16, en comparación con los queratinocitos normales de piel y cuello uterino.

3. Actividades antiproliferación en otras células positivas a VPH

Los siete profármacos se analizaron después en cinco líneas celulares adicionales derivadas del carcinoma cervical inducido por VPH (listadas en la Tabla 36-1) en ensayos de antiproliferación, y los datos se muestran en la Tabla 4 junto con los datos de SiHa. En las células SiHa, C-4I y MS751, todos los compuestos, excepto el Compuesto C mostraron CE₅₀ antiproliferación de sub-bajo nM. En células CaSki, HeLa y ME-180, no obstante, todos los compuestos fueron significativamente menos potentes, con CE₅₀ en el intervalo de 7,8-410 nM. No parece existir correlación entre la resistencia y el tipo de VPH (16, 18 ó 39), o resistencia y metástasis (CaSki, MS751, y ME180 son derivadas del sitio con metástasis). El compuesto control AraC (inhibidor de la ADN-polimerasa) inhibió uniformemente todas las líneas celulares con valores de CE₅₀ en el intervalo de 94-257 nM.

4. Actividades antiproliferación en células de carcinoma negativas al VPH

Para investigar el efecto de los compuestos sobre las líneas celulares de carcinoma negativas al VPH, se probaron tres líneas celulares (HT-3, SCC4, SCC9, Tabla 36-1) en ensayos antiproliferación. Como se muestra en la Tabla 36-4, los siete profármacos fueron igualmente o más potentes que el compuesto AraC control.

Tabla 36-2. Inhibición selectiva de las células SiHa VPH16+ comparadas con los fibroblastos HEL

ID del compuesto	Nota	Selectividad (HEL/SiHa)	Antiproliferación CE50 (nM)	
			Carcinoma cervical SiHa (VPH-16)	Fibroblasto de pulmón HEL
A		72	0,8	43
B		559	1,3	727
C		115	0,20	23
D		135	3,2	431
E		164	0,50	82
F		210	2,5	526
G		92	0,13	12
Controles				
cprPMEDAP	Metabolito	17	284	4821
PMEG	Metabolito	4,1	207	861
AraC	Inh de pol-ADN	0,113	257	29
Cidofovir	Inh de pol-ADN	0,3	84013	27952
Doxifluridina	Inh de pol-ADN856	0,449	8755	3927
Afidicolina (+)	Inh de pol-ADN	0,40	856	324
Dacarbazina	Inh de ADN-topo	3,98	7402	29841
Elipticina	Inh de ADN-topo	1,02	478	486
Doxorrubicina	Alquilador de ADN	0,43	9,76	4,20
Mitoxantrona	Alquilador de ADN	<0,37	8,67	<3,2
Clorhidrato de mecloretamina	Alquilador de ADN	1,02	21863	22203
Bleomicina	Alquilador de ADN	0,01	3138	20,28
Vincristina	Inh de tubulina	1,55	1,24	1,92
Vinblastina	Inh de tubulina	0,39	0,68	0,27
Etopósido	Inh de tubulina	0,31	469	144
Indanosina	Inh de tubulina	0,27	588	159

Tabla 36-3. Inhibición selectiva de células SiHa VPH16+ en comparación con los queratinocitos primarios

ID del compuesto	Nota	Selectividad (PHK/SiHa)	Selectividad (CK/SiHa)	Antiproliferación EC50 (nM)		
				Carcinoma cervical SiHa (VPH16)	Queratinocitos de piel PHK	Queratinocitos cervicales CK
A		58	11	0,6	35	7
B		75	42	1,3	98	54
C		4	7	0,20	0,8	1,4
D		12	7	3,2	39	22
E		10	11	0,50	5,2	5,4
F		31	3	2,5	78	7,1
G		22	15	0,13	2,9	1,9
Controles						
cprPMEDAP	Metabolito	13	2,4	284	3698	694
MPEG	Metabolito	0,48	2,4	207	101	501
AraC	Inh de pol-ADN	0,57	0,4	257	147	107

Tabla 36-4. Actividades de antiproliferación en otras células de carcinoma positivas y negativas al VPH

ID del compuesto	Antiproliferación EC50 (nM) en células de carcinoma positivas al VPH						Antiproliferación EC50 (nM) en células de carcinoma negativas al VPH		
	SiHa VPH16	CaSki VPH16	HeLa VPH18	MS-751 VPH18	C-41 VPH18	ME-180 VPH39	HT-3 cuello uterino	SCC-4 lengua	SCC-9 lengua
A	0,6	29	16	1,7	6,5	27	14	17	40
B	1,3	246	410	18	27	254	104	53	150
C	0,20	3,87	6,6	0,54	1,0	7,8	9,5	2,1	2,5
D	3,2	301	398	16	24	288	127	44	147
E	0,50	38	19	2,40	3,1	27	17	8	13
F	2,5	124	127	4,2	6,0	41	24	10	28
G	0,13	28	12	0,9	3,1	8,2	6,0	2,1	7,9
Controles									
AraC	257	94	174	144	123	101	214	74	68

5 Ejemplo 37

Ensayo de antiproliferación

Los ensayos de antiproliferación miden el efecto de los compuestos sobre la proliferación de las células cultivadas. Los compuestos activos en los ensayos de antiproliferación pueden ser citostáticos (inhiben la división celular) y/o citocidas (matan las células). Mediante la realización de los ensayos de antiproliferación usando células de

carcinoma positivas al VPH y células normales, se identificaron los compuestos que inhiben selectivamente la proliferación de las células de carcinoma positivas al VPH en comparación con las células de tejidos humanos normales. La Tabla 37-1 resume las características de cada tipo celular, incluyendo seis líneas celulares de carcinoma cervical transformadas por el VPH, queratinocitos de piel humana normales (PHK), y fibroblastos de pulmón normal (HEL). Los queratinocitos de piel se obtuvieron de Cambrex (East Rutherford, NJ). Todas las otras células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA).

Las células se desprendieron de los matraces de cultivo usando tripsina, se contaron y se plaquero en placas de cultivo de 96 pocillos (250-100 células por pocillo, dependiendo del tipo celular). Al siguiente día (definido como día 0), se agregaron diluciones en serie a un quinto, de los compuestos, por duplicado. Siete días después de la adición de los compuestos, las placas de cultivo se trataron con ácido tricloroacético al 10 % a 4 °C durante 1 hora y se lavaron con agua. Este procedimiento permite que las proteínas celulares se enlacen a la superficie inferior de las placas. Las proteínas se tiñieron con 0,4 % de sulforrodamina B en 1 % de ácido acético por 10 minutos, seguido por lavado intensivo con ácido acético al 1 %. El colorante remanente enlazado al fondo de las placas fue solubilizado en base Trizma 10 mM, generando un color púrpura. La intensidad del color (proporcional al número de células) se cuantificó mediante la medición de la absorbancia a 510 nm de longitud de onda, usando un espectrofotómetro. Las células sin el tratamiento con el fármaco (=100 % de proliferación) y las células tratadas con colchicina 10 µM (inhibidor de la división celular) (=0 % de proliferación) se usaron como controles para determinar el porcentaje de inhibición. Los valores del porcentaje de inhibición se trazaron gráficamente frente a las concentraciones del compuesto, ajustados a una curva de respuesta a la dosis sigmoidal, a partir de la cual se determinó la concentración del compuesto que redujo la proporción o velocidad de proliferación celular en un 50 % (=CE₅₀). Se usó GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, EEUU) para el ajuste de la curva y el cálculo de la CE₅₀.

Ensayo de apoptosis (procedimiento de inducción de caspasa 3)

La inducción de las caspasas es uno de los eventos tempranos asociados con la apoptosis o la muerte celular programada. La actividad de las caspasas se puede detectar cuantitativamente usando el sustrato fluorescente. Los compuestos que actúan directamente de la vía apoptótica pueden inducir la caspasa en un periodo de incubación relativamente corto (< 24 horas). Los compuestos que perturban otra fisiología celular, que eventualmente provoca apoptosis, pueden requerir un periodo de incubación más prolongado (> 48 horas) para la inducción de la caspasa.

Se plaquero 10.000 células en placas de cultivo de 96 pocillos y se incubaron con diluciones seriadas cinco veces de los compuestos por 24, 48 y 72 horas. Las células se lisaron y se midió la actividad de las caspasas en los lisados celulares usando el sustrato fluorescente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (equipo de ensayo de caspasa, Roche, Indianápolis, IN).

Ensayo de apoptosis (procedimiento de tinción con anexina V)

La translocación de la fosfatidilserina a partir de la parte interna de la membrana celular hacia la parte externa es uno de los eventos tempranos/intermedios asociados con la apoptosis con la muerte celular programada. La fosfatidilserina translocada puede detectarse mediante la incubación de las células con anexina V marcada con FITC, que es una proteína de unión al fosfolípido dependiente de Ca⁺⁺. Cuando las células están teñidas con anexina-FITC y yoduro de propidio (que tiñe las células muertas), las células vivas son negativas para ambos colorantes, las células muertas son positivas para ambos, mientras que las células apoptóticas son sensibles únicamente a la anexina FITC.

Las células SiHa VPH-16 se cultivaron con tres diferentes concentraciones de los compuestos durante 3 ó 7 días y simultáneamente se tiñeron con anexina FITC y yoduro de propidio. La tinción de cada célula individual fue examinada mediante citometría de flujo.

Resultados

Actividad de antiproliferación selectiva

El propósito de este procedimiento fue identificar los compuestos que inhiben el desarrollo de la lesión transformada por el VPH sin afectar las células normales en la epidermis y la dermis (tales como los queratinocitos y los fibroblastos). Por lo tanto, los compuestos fueron analizados en células SiHa, PHK y HEL, que son modelos de las células transformadas con VPH, queratinocitos normales y fibroblastos normales, respectivamente.

Los compuestos representativos de la presente invención mostraron niveles detectables de actividad de antiproliferación en células SiHa, con una concentración eficaz del 50 % (CE₅₀) menor de 25.000 nM. Los compuestos activos fueron también analizados en células HEL. En todos los casos, las CE₅₀ en las células HEL fueron mayores que las CE₅₀ en las células SiHa, indicando que los compuestos activos inhibieron la proliferación de las células SiHa más eficientemente que las células HEL. Otros análogos de nucleótidos/nucleósido, tales como PMEG (2-fosfonometoxietilguanina), Ara-C (citarabina, N° CAS 147-94-3) y gencitabina (N° CAS 95058-81-4) no mostraron tal selectividad. El podofilox (N° CAS 518-28-5), el ingrediente activo del fármaco antiarrugas Condilox, tampoco mostró selectividad.

Los compuestos profármacos representativos de la presente invención, tales como aquellos enumerados en la tabla 37-2 muestran actividades. En la mayoría de los casos, los profármacos fueron más potentes y en algunos casos, más selectivos que sus respectivos compuestos progenitores. La mayoría de los profármacos fosfoamidato fueron más activos y selectivos que el podofilox.

Tomados conjuntamente, se identificó que los compuestos poseían una CE₅₀ antiproliferación sub nM en células SiHa positivas al VPH-16 y una selectividad mayor a 50 veces en comparación con los queratinocitos PHK o los fibroblastos HEL.

Actividad antiproliferación en otras líneas celulares de VPH+

Los compuestos seleccionados se analizaron también en cinco líneas celulares adicionales derivadas del carcinoma cervical inducido por VPH (ver ejemplo 36 y tabla 37-3). Cada compuesto mostró niveles diferentes de actividades en las líneas celulares VPH+, independientemente del tipo de VPH presente. En general, los compuestos fueron más potentes en las células SiHa (VPH-16), C-4I (VPH-18), y MS751 (VPH-18) que en células CaSki (VPH-16), HeLa (HpV-18) y ME-180 (VPH-39).

Inducción de la apoptosis (procedimiento de inducción de caspasa 3)

Un compuesto representativo de la presente invención se analizó para determinar la inducción de la apoptosis en células SiHa. Cuando las células se incubaron durante 72 horas (barras sólidas) se observó una inducción significativa que responde a la dosis de la caspasa, indicando que el compuesto induce la apoptosis (figura 37-1). La inducción de la caspasa fue menos obvia con incubación de 48 horas (barras sombreadas) y no se observó con la incubación de 24 horas (datos no mostrados).

Inducción de la apoptosis (procedimiento de tinción con anexina V)

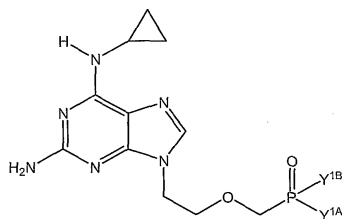
Se analizaron PMEG, N6-ciclopropilPMEDAP y un compuesto representativo de la presente invención a tres diferentes concentraciones para determinar la inducción de la apoptosis en células SiHa, usando el procedimiento de tinción doble con anexina V-propidio. Con los tres compuestos se observó un porcentaje mayor de células apoptóticas en el día 7 que en el día 3. El compuesto representativo de la presente invención anteriormente mencionado fue el más activo en la inducción de la apoptosis; el día 7, el 63,8 % de las células de los cultivos tratados con 0,2 µg/m de este compuesto fueron apoptóticas. En contraste, los cultivos tratados con 0,2 µg/ml de PMEG y 0,5 µg/ml de N6-ciclopropilPMEDAP únicamente tuvieron el 1,2 % y el 15,9 % de células apoptóticas, respectivamente.

Tabla 37-1. Tipos celulares usados en los ensayos antiproliferación

Nombre	Estado del VPH*	Origen	Medio de cultivo**
Líneas celulares de carcinoma positivos al VPH			
SiHa	VPH-16	Carcinoma de células escamosas en cuello uterino	A1, A2
Ca Ski	VPH-16	Carcinoma epidermoide, metastatizado al intestino delgado desde el cuello uterino	A1, A2
MS751	VPH-18 (también contiene un genoma parcial del VPH-45)	Carcinoma epidermoide, metastatizado al nodo linfático desde el cuello uterino	A1, A2
HeLa	VPH-18	Adenocarcinoma epitelial en cuello uterino	A1, A2
C-4 I	VPH-18	Carcinoma en cuello uterino	A1, A2
Me-180	VPH-39	Carcinoma epidermoide, metastatizado al omentum desde el cuello uterino	A1, A2
Células provenientes de tejidos humanos normales			
HEL299	Ninguno	Fibroblastos en pulmón embrionario	A1, A2
PHK (queratinocitos de piel)	Ninguno	Queratinocitos en prepucio de adulto	B1, B2
* El subtipo del ADN del VPH integrado en el ADN celular			
** Medios de cultivo			

Las células se mantuvieron en incubadoras humidificadas a 37°C con 5 % de CO₂, en los siguientes medios de cultivo:

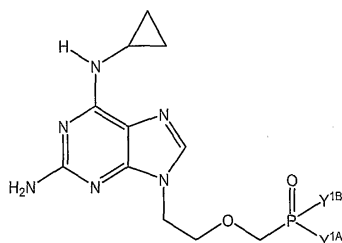
- A1: Medio para mantenimiento de cultivo: MEM de Eagle con BSS de Earle (Cambrex, East Rutherford, NJ), suplementado con 10 % de suero fetal bovino, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.
- 5 A2: Medio para ensayos de antiproliferación: MEM de Eagle con BSS de Earle, suplementado con 5 % de suero fetal bovino, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.
- B1: Medio para mantenimiento de cultivo: queratinocito-SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado con 0,01 mg/ml de extracto de pituitaria bovina, 0,001 µg/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.
- B2: Medios para ensayo antiproliferación: mezcla 4:1 de B1 y A2.
- 10 Tabla 37-2. Actividad de antiproliferación del profármacos de fosfoamidato de PMEDAP sustituido con N6 en células SiHa, VPH16+, queratinocitos PHK y en fibroblastos HEL



en la que R^{x1} y R^{x2} están sustituidos como se representa en la fórmula, e Y^{1A} e Y^{1B} están sustituidos como se indica

Y ^{1A}	Y ^{1B}
OH	OH
POC	POC
O-iPr	O-iPr
Ala-Et	Ala-Et
Ala-Pr	Ala-Pr
Ala-iPr	Ala-iPr
Ala-Bu	Ala-Bu
Ala-cBu	Ala-cBu
Ala-cPen	Ala-cpentilo
Ala-hexilo	Ala-hexilo
Ala-octilo	Ala-octilo
Ala-Et	Aba-Et
Ala-Bu	Aba-Bu
Aba-octilo	Aba-octilo
Phe-Et	Phe-Et
Phe-Bu	Phe-Bu
Phe-iBu	Phe-iBu
Phe-cBu	Phe-cBu
OPh	Ala-Me
OPh	Ala-Et
OPh	Ala-Pr

(continuación)



en la que R^{X1} y R^{X2} están sustituidos como se representa en la fórmula, e Y^{1A} e Y^{1B} están sustituidos como se indica

OPh	Ala-iPr
OPh	Ala-Bu
OPh	Ala-tBu
OPh	Ala-hexilo
OPh	Ala-octilo
OPh	Aba-Et
OPh	Aba-Bu
OPh	Aba-cBu
OPh	Aba-octilo
OPh	Phe-Et
OPh	Phe-Bu
OPh	Phe-iBu
OPh	D-Ala-Me

Tabla 37-3. Actividades antiproliferación de N6-ciclopropil-PMEDAP y sus profármacos de fosfoamidato en seis diferentes células positivas al VPH

ID del Compuesto	CE50 antiproliferación (nM) en célula de carcinoma positivas al VPH					
	SiHa VPH16	CaSki VPH16	HeLa VPH18	MS-751 VPH18	C-4I VPH18	ME-180 VPH39
A	0,6	29	16	1,7	6,5	27
B	1,3	246	410	18	27	254
C	0,2	3,9	6,6	0,5	1,0	7,8
D	3,2	301	398	16	24	288
E	0,5	38	19	2,4	3,1	27
F	2,5	124	127	4,2	6,0	41
G	0,13	28	12	0,9	3,1	8,2
H	0,03	2,0	0,7	0,04	0,44	1,8
(cprPMEDAP)	284	14149	6926	3313	1332	8315

Ejemplo 38

Estudio de irritación de piel de conejo de los compuestos A y B

Se realizó un estudio para evaluar el potencial de dos compuestos de la presente invención para producir irritación, cuando se administran mediante aplicación dérmica a conejos macho durante siete días consecutivos. Se asignaron al estudio un total de seis machos, tal como se presenta en la tabla siguiente.

Asignaciones de Grupo		
Número de Grupo	Artículo de Ensayo ^a	Número de Animales (machos)
1	Compuesto B ^b	3
2	Compuesto A ^c	3

^aCada animal recibió tratamientos dérmicos del vehículo (gel de placebo), un artículo control positivo y tres concentraciones del artículo de ensayo apropiado. Cada animal recibió un artículo de ensayo con las concentraciones del 0,01, 0,03 y 0,1 %.

^bEl artículo de control positivo usado fue 9-(2-fosfonilmetoxietil)guanina al 0,1 % (PMEG).

^cEl artículo de control positivo usado fue Cidofovir® al 1 %.

El vehículo, los artículos de control positivos y los artículos de ensayo se aplicaron dérmicamente una vez al día durante siete días durante el estudio. Los artículos de ensayo se administraron a concentraciones del 0,01, 0,03 y 0,1 %. Los artículos de control positivos fueron administrados a concentraciones del 0,1 % (PMEG) o el 1 % (Cidofovir®). El volumen de dosis para todas las formulaciones fue un volumen fijo de 100 µl.

Los sitios de ensayo para cada animal se afeitaron antes de la administración inicial y si fue necesario durante el estudio. Los dos sitios fueron pinzados sobre el lado dorsal izquierdo y tres fueron pinzados sobre el lado dorsal derecho. El perfil de cada dosificación (aproximadamente 6,45 cm² (1 pulgada cuadrada) cada una) fue marcado con tinta indeleble. El área pinzada total comprendió menos del 10 % de la superficie corporal total de cada animal. El vehículo y el control positivo apropiado y el artículo de ensayo se administraron a cada animal dentro de un sitio de dosificación de aproximadamente 6,45 cm² (1 pulgada cuadrada). El vehículo se aplicó sobre el sitio rostral izquierdo (Sitio de Dosis 1), y el artículo de control positivo apropiado se aplicó al sitio caudal izquierdo (Sitio de Dosis 2). El artículo de ensayo apropiado se aplicó como sigue: el 0,01 % al sitio rostral derecho (Sitio de Dosis 3), el 0,03 % al sitio intermedio derecho (Sitio de Dosis 4) y el 0,1 % al sitio caudal derecho (Sitio de Dosis 5). Se colocaron collares sobre los animales inmediatamente después de la dosificación durante 1 a 2 horas.

Los sitios se evaluaron por eritema y edema antes de la dosificación el día 1 y diariamente después de ello, aproximadamente 24 horas después de cada dosis y antes de la siguiente dosis. A cada sitio se le asignó una calificación de irritación con base en la escala de Draize para la calificación de irritación de la piel (Draize JH, Woodard G, Calvery HO, *Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes*. J Pharmacol Exp Ther 1944; 82: 377-90).

Las observaciones para la mortalidad, morbilidad y la disponibilidad del alimento y el agua se realizaron dos veces al día para todos los animales. Los exámenes clínicos detallados se realizaron antes de la repartición aleatoria, antes de la dosificación en el día 1 y diariamente después de ello. Los pesos corporales se midieron y se registraron el día después de la llegada, antes de la repartición aleatoria y antes de la dosificación en los días 1, 3 y 7.

La eutanasia se realizó mediante sobredosis de anestesia intravenosa con solución de eutanasia basada en pentobarbital sódico y los sangrados cortando los vasos femorales. Los animales se examinaron cuidadosamente para determinar las anomalías externas incluyendo las masas. La piel se reflejó desde una incisión de línea intermedia ventral y cualesquiera anomalías se identificaron y correlacionaron con los hallazgos ante-mortem. Las cavidades abdominales, torácica y craneal se examinaron para determinar anomalías y los órganos se retiraron, examinaron, y, cuando se requirió, se colocaron en formalina amortiguada neutra. Los sitios de dosificación, los riñones y cualesquiera lesiones gruesas de cada animal se recogieron y conservaron. Los exámenes microscópicos de secciones con parafina teñida con hematoxilina y eosina fijadas, se realizaron para cada sitio de dosificación en todos los animales. Los portaobjetos se examinaron por parte de un patólogo veterinario. Se usó un sistema de graduación de cuatro pasos para definir las lesiones graduables para realizar la comparación entre los grupos de dosis.

Conclusiones

Los dos artículos de ensayo no produjeron hallazgos clínicos notables, irritación dérmica, cambios en el peso corporal u observaciones macroscópicas y microscópicas en ninguna de las concentraciones de dosificación. Uno de los controles positivos estuvo asociado con hallazgos clínicos y observaciones macroscópicas y microscópicas ligeras a moderadas.

Ejemplo 39

Estudio de irritación de la piel de conejo de los compuestos B y H

Se realizó un estudio para evaluar el potencial de dos compuestos de la presente invención para producir irritación cuando se administraron mediante aplicación dérmica a conejos macho durante siete días consecutivos. Se asignaron un total de 24 machos al estudio.

Diseño de Estudio para el Compuesto B						
	Grupo 1	Grupo 1 Concentración ^b		Grupo 2	Grupo 2 Concentración ^b	
Sitio de Dosis	(n=6) ^a	%	(mg/ml)	(n=6) ^a	%	(mg/ml)
1	Vehículo control	0,0	0,0	PMEG (control positivo)	1,0 %	1,0
2	Dosis baja	0,03	0,3	Dosis baja	0,03	0,3
3	Dosis media	0,1	1,0	Dosis media	0,1	1,0
4	Dosis alta	0,3	3,0	Dosis alta	0,3	3,0

^aCada grupo consistió en seis conejos intactos.

^bEl vehículo para el sitio de Dosis 1, Grupo 1, y Sitio de Dosis 1, Grupo 2 (PMEG) fue el gel vehículo. El vehículo para los sitios tratados del Grupo 1 fue el gel vehículo, y el vehículo para los sitios tratados del Grupo 2 fue el ungüento del vehículo.

Diseño de Estudio para el Compuesto H						
	Grupo 3	Grupo 3 Concentración ^b		Grupo 4	Grupo 4 Concentración ^b	
Sitio de Dosis	(n=6) ^a	%	(mg/ml)	(n=6) ^a	%	(mg/ml)
1	Vehículo control	0,0	0,0	PMEG (control positivo)	1,0 %	10,0
2	Dosis baja	0,03	0,3	Dosis baja	0,03	0,3
3	Dosis media	0,1	1,0	Dosis media	0,1	1,0
4	Dosis alta	0,3	3,0	Dosis alta	0,3	3,0

^aCada grupo consistió en seis conejos intactos.

^bEl vehículo para el sitio de Dosis 1, Grupo 3 fue el ungüento vehículo, y el vehículo para el Sitio de Dosis 1, Grupo 4 (cPrPMEDAP) fue el gel vehículo. El vehículo para los sitios tratados del Grupo 3 fue el gel vehículo, y el vehículo para los sitios tratados del Grupo 4 fue el ungüento vehículo.

Los artículos de ensayo y de control se administraron dérmicamente una vez al día durante 7 días consecutivos durante el estudio. Los niveles de dosis para el Compuesto B fueron el 0,03, 0,1 y 0,3 %. Los niveles de dosis para el Compuesto H fueron del 0,03, 0,1 y 0,3 %. El nivel de dosis para PMEG (control positivo) fue del 0,1 %. El nivel de dosis para cPrPMEDAP (control positivo) fue de 1,0 %. El nivel de dosis para el control del vehículo fue del 0,0 % (este fue dosificado como formulaciones de gel y de ungüento). El volumen de dosis para todos los sitios fue un volumen constante de 100 µl. Menos de 24 horas antes de la primera administración, se pinzó el pelo de la espalda del animal. Esta área pinzada comprendió no menos del 10 % del área superficial corporal total. Se tuvo cuidado de evitar someter a abrasión la piel.

Los artículos de ensayo, control positivo y control vehículo se administraron en un sitio de dosificación de aproximadamente 2,54 x 2,54 cm (1 x 1 pulgada). Dos sitios de dosificación se colocaron a lo largo de la superficie dorsal izquierda. El artículo o vehículo control positivo se administró al sitio rostral, y la dosis baja del artículo de ensayo se administró al sitio caudal. Los dos sitios de dosificación se colocaron a lo largo de la superficie dorsal derecha. La dosis media del artículo de ensayo se administró al sitio rostral, y la dosis alta del artículo de ensayo se administró al sitio caudal. Se colocaron collares a los animales durante aproximadamente dos horas inmediatamente después de la dosificación. La duración de la portación de los collares se documentó en los datos brutos.

Las observaciones para determinar la mortalidad, morbilidad y la disponibilidad de alimento y agua se realizaron dos veces al día para todos los animales. Los sitios de ensayo se evaluaron por eritema y edema antes de la primera administración, y aproximadamente a las 24 horas después de cada administración (antes de la siguiente dosificación programada) y diariamente durante el periodo de registro de 7 días. Las observaciones para determinar los signos clínicos se realizaron diariamente durante el estudio al mismo tiempo que las observaciones dérmicas. Los pesos corporales se midieron y registrados el día después de la recepción, antes de la repartición aleatoria, antes de la administración del artículo de ensayo en el día 1, y en los días 7 y 14, y en la necropsia (días 8 y 15). Los pesos corporales tomados a la recepción y antes de la repartición aleatoria no se comunican, pero se mantienen en el archivo del estudio. Se recogerán muestras de sangre de 4 a 6 ml de 6 animales/grupo a la terminación, y 3 animales/grupo a la recuperación de la vena yugular u otra vena adecuada para la evaluación de los parámetros de patología clínica.

Se tomaron muestras sanguíneas adicionales (aproximadamente 1 ml) de todos los animales de la vena yugular y otra vena adecuada para la determinación de las concentraciones en plasma del artículo de ensayo aproximadamente a las 2 horas después de la dosis en el día 7. Las muestras se dispusieron en tubos que contenían EDTA potásico y se almacenaron sobre un bloque de hielo hasta que se centrifugaron. Los animales no se sometieron a ayuno antes de la recolección de la sangre. Las muestras se almacenaron a -70 °C antes del examen.

Los exámenes de necropsia completos se realizaron siguiendo los procedimientos aprobados por un patólogo veterinario en todos los animales. La eutanasia se realizó mediante una sobredosis de anestesia con solución de eutanasia basada en pentobarbital sódico vía la vena/arteria de la oreja u otra vena adecuada y los sangrados se realizaron mediante corte de los vasos femorales. Los animales se examinaron cuidadosamente para evaluar las anomalías externas incluyendo las masas. La piel se reflejó a partir de la incisión de línea media ventral y cualesquiera anomalías se identificaron y correlacionaron con los hallazgos antemortem. Las cavidades abdominales, torácica y craneal se examinaron para evaluar las anomalías y los órganos se retiraron, se examinaron y, cuando se requirió, se dispusieron en formalina amortiguada neutra. El examen microscópico de las secciones de parafina teñidas con hematoxilina y eosina, fijadas se realizó sobre las secciones de tejidos provenientes de los sitios de dosificación (4 por animal), los riñones, y cualesquiera lesiones severas.

En el momento de la necropsia, el día 8 para los animales del estudio principal y el día 15 para los animales en recuperación, se identificaron cuatro sitios de dosificación por animal. Aproximadamente la mitad de cada sitio de dosificación fue extirpado y luego recogido y conservado tal como se mencionó anteriormente para el procesamiento histológico. Mientras que la otra mitad aproximada de cada sitio de dosificación estuvo todavía intacta sobre el animal, se realizaron los siguientes procedimientos. Los sitios de dosificación se frotaron con tres gasas de etanol (95 %) y se dejaron secar completamente. Se aplicó cinta (cinta de embalaje 3M® o equivalente) a cada sitio de dosificación diez veces. Se usó una pieza limpia de cinta para cada aplicación. Las porciones remanentes de los sitios de dosificación se extirparon después con tijeras. Las tijeras se lavaron entre cada sitio de dosis y cada animal con acetona y etanol. El orden de retirada de sitio de dosis fue el sitio vehículo o control positivo, sitio de baja dosis, sitio de dosis media y sitio de dosis alta. Se extirpó 1 cm² de tejido de cada sitio de dosis. La muestra de tejido se pesó y se registró. Los punzones de piel se desmenuzaron con tijeras limpias en frascos de escintilación individuales de tamaño apropiado. Se agregaron 5 ml de solución salina amortiguada con fosfato al frasco de escintilación. El tejido se homogeneizó después con pulsos de 20 segundos usando un homogeneizador mecánico. Los homogeneizados se congelaron rápidamente a aproximadamente -20 °C.

Conclusiones

Con base a las calificaciones de irritación dérmica y los hallazgos microscópicos, uno de los artículos de ensayo fue no irritante en el gel vehículo, pero fue un irritante leve a moderado en el ungüento vehículo. El segundo artículo de ensayo fue un irritante muy ligero en el gel vehículo y un irritante leve cuando fue formulado en el ungüento vehículo.

Ejemplo 40

Preparación de la composición farmacéutica de gel tópico

Este ejemplo ilustra la preparación de una composición de gel tópico representativo que contiene un compuesto activo de la Fórmula I.

Se prepara una composición tópica de gel que tiene la composición siguiente:

Componentes	% p/p
Compuesto activo	X*
Tampón de pH 4,5 ó 7	25
Propilenglicol, USP	25
Hidroxietilcelulosa, NF	1,25
Propilparabeno, NF	0,01
Metilparabeno, NF	0,09
Edetato disódico, USP	0,025
Glicerina, USP	10,00

(continuación)

Componentes	% p/p
Acido Cítrico, USP	0,50
Agua estéril para inyección, USP	38,125
*X=compuesto en el intervalo de 0,01 % a 1,0 %	

Pueden usarse otros compuestos de la Fórmula I, tales como los preparados de acuerdo con la presente memoria descriptiva como el compuesto activo en la preparación de las formulaciones de gel de este ejemplo.

5 Los siguientes ingredientes también han sido evaluados para determinar si son adecuados durante el desarrollo de esta formulación:

Miristato de isopropilo (disolvente/codisolvente/aumentador de la penetración),

Polietilenglicoles, triacetina (disolventes),

Alcohol cetílico y alcohol estearílico (agentes de rigidización),

Carbómero (aumentador de la viscosidad), y

10 Tweens, Spans (emulsionantes).

Ejemplo 41

Preparación de la composición farmacéutica de ungüento tópico

Este ejemplo ilustra la preparación de una composición de ungüento tópico representativa que contiene un compuesto activo de la Fórmula I.

15 Se prepara una composición de ungüento tópico que tiene la composición siguiente:

Componentes	% p/p
Compuesto activo	X*
Glicerina, USP	94,0
Sesquioleato de sorbitan, NF	0,5
Propilenglicol, USP	4,5
*X=Compuesto en el intervalo de 0,01 % a 1,0 %	

Pueden usarse otros compuestos de la Fórmula I, tales como los preparados de acuerdo con la presente memoria descriptiva como el compuesto activo en la preparación de las formulaciones de ungüento de este ejemplo.

20 Los siguientes ingredientes también han sido evaluados para determinar si son adecuados durante el desarrollo de esta formulación:

Miristato de isopropilo (disolvente/codisolvente/aumentador de la penetración),

Polietilenglicoles, triacetina (disolventes),

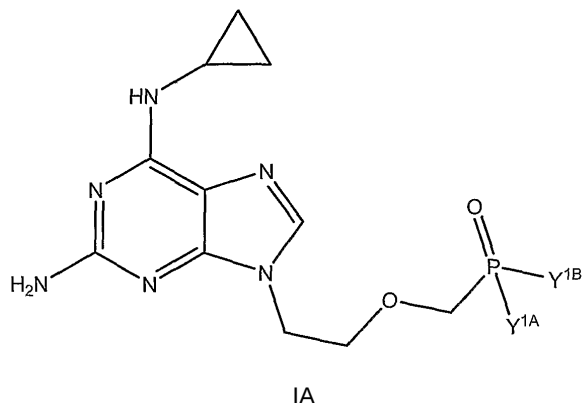
Alcohol cetílico y alcohol estearílico (agentes de rigidización),

Carbómero (potenciador de la viscosidad), y

25 Tweens, Spans (emulsionantes).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la Fórmula IA o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un procedimiento para el tratamiento de infecciones por el virus del papiloma (VPH)



5 en la que

Y^{1A} e Y^{1B} son $-NH(R^x)$;

R^x es independientemente R^2 ;

R^2 es

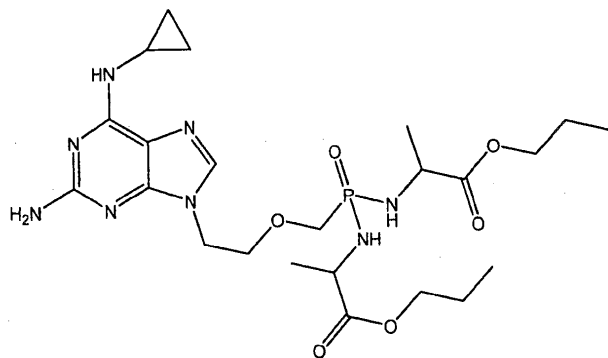
10 (a) etilo sustituido con $C(=O)OR^4$, en la que R^4 es metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, i-butilo, s-butilo, t-butilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, 3,3-dimetil-2-butilo, vinilo, alilo, ciclopentenilo, 5-hexenilo, etinilo o propargilo;

(b) propilo sustituido con $C(=O)OR^4$, en la que R^4 es un alquilo de 1 a 18 átomos de carbono, un alquenilo de 2 a 18 átomos de carbono o un alquinilo de 2 a 18 átomos de carbono; o

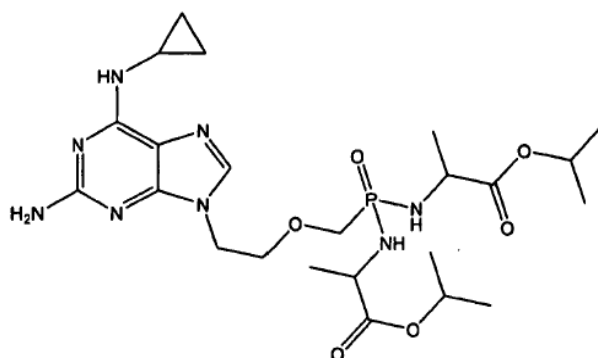
15 (c) metilo sustituido con 2 R^3 , en la que un R^3 es $-R^5W^3$ y el otro R^3 es $C(-O)OR^4$; R^4 es un alquilo de 1 a 18 átomos de carbono, un alquenilo de 2 a 18 átomos de carbono o un alquinilo de 2 a 18 átomos de carbono; en la que el "alquilo" contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios y cíclicos; el "alquenilo" contiene átomos normales, secundarios, terciarios y cíclicos con al menos un sitio de insaturación; el "alquinilo" contiene átomos normales, secundarios, terciarios y cíclicos con al menos un sitio de insaturación; R^5 es metileno; W^3 es fenilo.

20

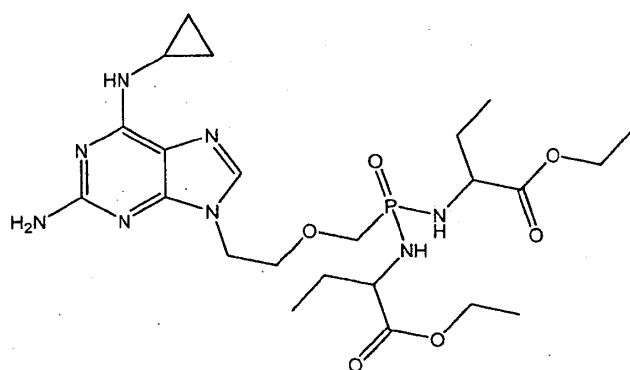
2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, que está seleccionado entre:



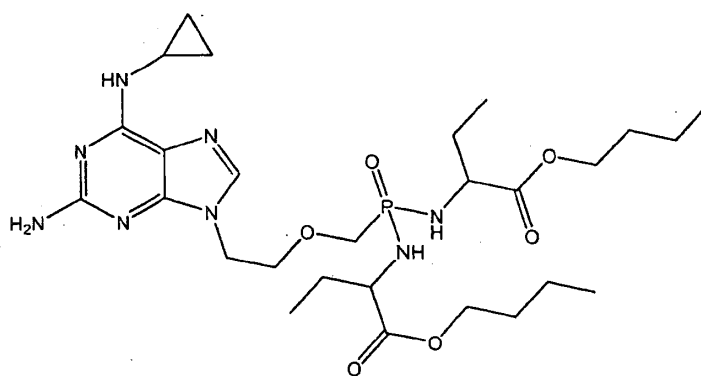
(a)



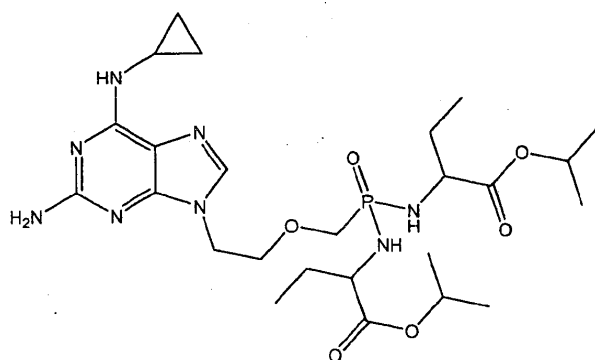
(b)



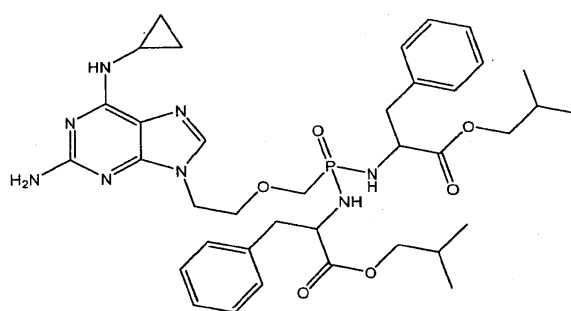
(c)



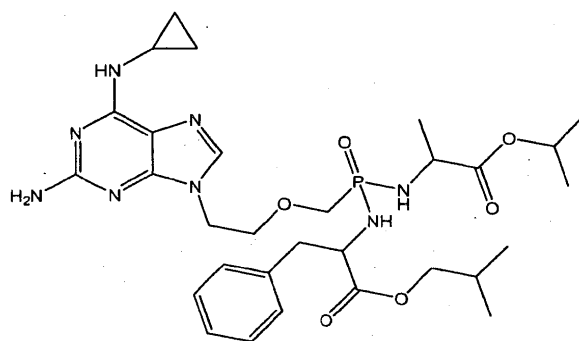
(d)



(e)

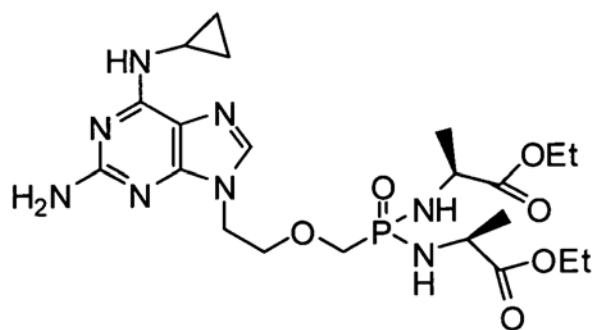


(f)

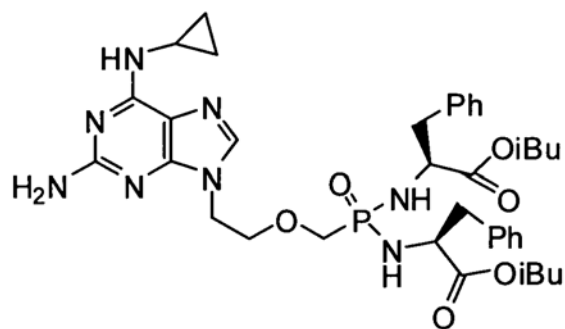


(g)

3. El compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula



- 5 4. El compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula



5. El compuesto para su uso de una cualquiera de las reivindicación 1 a 4 que además comprende el uso de al menos un agente antivírico.