

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 046**

51 Int. Cl.:

C07F 9/6512 (2006.01)

C07F 9/6561 (2006.01)

C07H 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2000 E 08001408 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 1914237**

54 Título: **Compuestos antivirales de éster de fosfonato**

30 Prioridad:

03.12.1999 US 168813 P

19.05.2000 US 205719 P

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

24.09.2014

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**HOSTETLER, KARL Y.;
KINI, GANESH D. y
BEADLE, JAMES R.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 498 046 T3

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

DESCRIPCIÓN

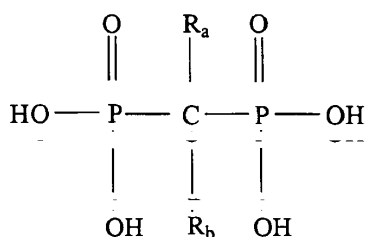
Compuestos antivirales de éster de fosfonato

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos compuestos fosfonato, a composiciones que los contienen, a procesos para producirlos y a su uso para tratar infecciones virales.

10 **Antecedentes de la invención**

Se sabe desde hace mucho que los compuestos fosfonato proporcionan diversos beneficios terapéuticos. Una clase particular de compuestos fosfonato terapéuticamente beneficiosos son los bisfosfonatos, es decir, análogos de pirofosfato en los que el átomo de oxígeno central del enlace pirofosfato es reemplazado por carbono. Diversos grupos sustituyentes se pueden unir a este átomo de carbono central para producir compuestos derivados de bisfosfonatos con diversos grados de potencia farmacológica. Estos derivados tienen la estructura general:



20 en la que R_a y R_b se pueden elegir independientemente entre hidroxilo, amino, sulfhidrilo, halógeno o diversos grupos alquilo o arilo, o una combinación de dichos grupos, que pueden estar además sustituidos. Los ejemplos incluyen *Etidronato*, en el que R_a es CH₃ y R_b es OH; *Clodronato*, ácido diclorometileno-bisfosfónico (Cl₂MDP), en el que R_a y R_b son Cl, *Pamidronato*, ácido 3-amino-1-hidroxi-propilideno-bisfosfónico, en el que R_a es etilamino y R_b es hidroxilo; *Alendronato*, ácido 4-amino-1-hidroxibutilideno-bisfosfónico, en el que R_a es propilamino y R_b es hidroxilo; *Olpadronato*, ácido 3-dimetilamino-1-hidroxi-propilideno-bisfosfónico, en el que R_a es dimetilaminoetil y R_b es hidroxilo; y amino-olpadronato (IG-9402), 3-(N,N-dimetilamino)-1-aminopropilideno-bisfosfonato, en el que R_a es N,N-dimetilaminoetil y R_b es NH₂.

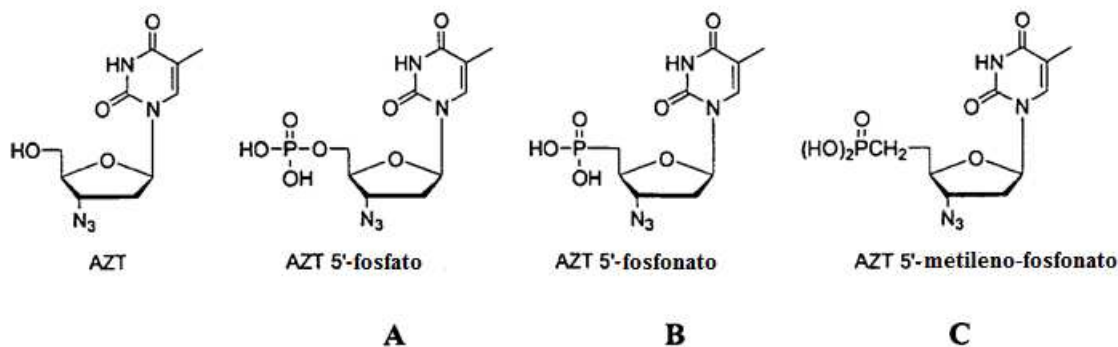
30 Los bisfosfonatos y sus derivados sustituidos tiene la propiedad intrínseca de inhibir la resorción ósea *in vivo*. Los bisfosfonatos también actúan inhibiendo la apoptosis (muerte celular programada) en los osteoblastos. Por lo tanto, las indicaciones para su uso incluyen el tratamiento y la prevención de la osteoporosis, el tratamiento de la enfermedad de Paget, los cánceres óseos metastásicos, el hiperparatiroidismo, la artritis reumatoide, la algodistrofia, la hiperostosis esternocostoclavicular, la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Engleman, y algunos trastornos no óseos. (Papapoulos, S. E., en Osteoporosis, R Marcus, D. Feldman y J. Kelsey, eds., Academic Press, San Diego, 1996. p. 1210, Tabla 1).

Aunque los bisfosfonatos tienen propiedades terapéuticamente beneficiosas, como medicamentos administrados por vía oral sufren de desventajas farmacológicas. Una desventaja es la baja disponibilidad oral: tan poco como 0.7% a 5% de una dosis administrada por vía oral es absorbida en el tracto gastrointestinal. La absorción oral se reduce aún más cuando se toman con alimentos. Además, se sabe que algunos bisfosfonatos actualmente disponibles, por ejemplo, FOSAMAX™ (Merck; alendronato de sodio), SKELID™ (Sanofi, tiludronato) y ACTONE™ (Procter and Gamble, risedronato) tienen toxicidad local, causando irritación y ulceración esofágicas. Otros bisfosfonatos, como amino-olpadronato, carecen de efectos antiresortivos (Van Beek, E. et al., J. Bone Miner Res 11(10):1492-1497 (1996) pero inhiben la apoptosis osteocítica y son capaces de estimular la formación ósea neta (Plotkin, L. et al., J Clin Invest 104(10):1363-1374 (1999) y patente de Estados Unidos N° 5,885,973). Por lo tanto, podría ser útil desarrollar derivados de bisfosfonatos químicamente modificados que mantengan o aumenten la actividad farmacológica de los compuestos de origen eliminando o reduciendo simultáneamente sus efectos secundarios indeseables.

50 Serafinowska et al., J. Med. Chem. 1995, 38, 1372-1379 describe la síntesis y la evaluación de profármacos de 9-[2-(fosfonometoxi)etoxi]adenina. EP 0632048 describe una clase de derivados éster de fosfonato de nucleótido para la administración oral como agentes antivirales. WO 98/38202 describe conjugados de fosfonoácido lipófilo y nucleósido y su uso para tratar infecciones virales. Yoshino et al, Chem. Pharm. Bull. 1990, 38(3), 676-680 describen la síntesis y la actividad vasodilatadora coronaria de una serie de derivados fosfonatos asimétricos y fosfonatos cíclicos de fostedilo (dietil 4-(benzotiazol-2-il)encilfosfonato).

Además de los bisfosfonatos, se sabe que los monofosfonatos también proporcionan beneficios terapéuticos. Una clase de monofosfonatos terapéuticamente beneficiosos son los fosfonatos de nucleótido antivirales, como por

ejemplo, cidofovir, cidofovir cíclico, adefovir, tenofovir y similares, así como los 5'-fosfonatos y metileno fosfonatos de azidotimidina, ganciclovir, aciclovir y similares. En los compuestos de este tipo, el 5'-hidroxilo de la porción azúcar, o su equivalente en nucleósidos acíclicos (ganciclovir, penciclovir, aciclovir) que no contienen una porción azúcar completa, es reemplazado por un enlace fósforo-carbono. En el caso de los metileno fosfonatos, un grupo metileno reemplaza el 5'-hidroxilo o su equivalente, y su átomo de carbono está, a su vez, unido covalentemente al fosfonato. Diversas estructuras de AZT se presentan más adelante, que incluyen compuestos contemplados para utilizar en la práctica de la presente invención. La AZT en sí misma se muestra a la izquierda. El compuesto A es AZT-monofosfato que tiene la unión fosfodiéster habitual entre el azúcar y el fosfato. En contraposición, en los compuestos B (AZT-5'-fosfonato) y C (AZT-5'-metileno fosfonato), el 5'-hidroxilo de 3'-azido, 2',3'-didesoxiribosa está ausente y ha sido reemplazado por un enlace fósforo-carbono (AZT-fosfonato) o por un metileno unido mediante un enlace fósforo-carbono (AZT-metileno fosfonato). Los compuestos B y C son ejemplos de compuestos útiles en la práctica de la presente invención.



Los compuestos de este tipo pueden ser nucleótidos activos como antiproliferativos o antivirales. Luego del metabolismo celular, se producen dos fosforilaciones adicionales para formar el difosfato fosfonato de nucleótido que representa el equivalente de trifosfato de nucleósido. Los difosfatos fosfonatos de nucleótido antivirales son inhibidores selectivos de las ARN o ADN polimerasas o las transcriptasas inversas virales. Es decir, su acción inhibitoria sobre las polimerasas virales es mucho mayor que su grado de inhibición de las ADN polimerasas α , β y γ de las células de mamífero o las ARN polimerasas de mamífero. Por el contrario, los difosfatos fosfonatos de nucleótido antiproliferativos inhiben las ADN y ARN polimerasas de las células neoplásicas y pueden mostrar mucho menor selectividad versus las ADN y ARN polimerasas de las células normales. Puesto que los fosfonatos de nucleótido son poco absorbidos desde el tracto gastrointestinal, con frecuencia requieren administración parenteral (por ej. el cidofovir). Además, la porción fosfonato cargada negativamente puede interferir con la penetración celular dando lugar a la reducción de la actividad como antivirales o antiproliferativos. Los compuestos de la invención pueden, sorprendentemente, superar las desventajas de esta clase de agentes.

Se conocen agentes farmacológicamente activos de fosfonatos antivirales; las patentes de Estados Unidos siguientes describen otros enfoques para análogos fosfonatos de nucleótido : 5,672,697 (Nucleósido-5'-metileno fosfonatos), 5,922,695 (Análogos fosfonometoxi-nucleótidos antivirales), 5,977,089 (Análogos fosfonometoxi-nucleótidos antivirales), 6,043,230 (Análogos fosfonometoxi-nucleótidos antivirales), 6,069,249. Se ha dado a conocer previamente la preparación y el uso de fosfatos de alquilglicerol unidos covalentemente a fármacos que no contienen fosfonato que tienen grupos funcionales amino, carboxilo, hidroxilo o sulfhidrilo. Estos profármacos comprenden opcionalmente un grupo conector o uno o dos ésteres fosfato adicionales entre el fármaco y el fosfato de alquilglicerol (patente de Estados Unidos N° 5,411,947 y solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 08/487,081). Se conocen ésteres parciales de ácido clorometanodifosfónico son conocidos (patente de Estados Unidos N° 5,376,649) y se ha informado de dianhidridos de clodronato (Ahlmarm, et al., J Med Chem 42: 1473-1476 (1999)). Sin embargo, se encontró que los ésteres parciales no liberaban el bisfosfonato activo por conversión química o bioquímica (Niemi, R. et al., J Chrom B 701:97-102 (1997)). También se describieron profármacos que contienen residuos de fosfato de alquilglicerol unidos a nucleósidos antivirales (patente de Estados Unidos N° 5,223,263) o fosfono-carboxilatos (patente de Estados Unidos N° 5,463,092).

Existe, por lo tanto, una necesidad continua de agentes farmacéuticos menos tóxicos y más eficaces para tratar una diversidad de trastornos causados por infección viral. Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención desarrollar derivados fosfonato químicamente modificados de los agentes antivirales y farmacéuticos. Estos derivados modificados aumentan la potencia del compuesto de origen, minimizando simultáneamente los efectos secundarios nocivos cuando se administran a un sujeto que los necesita.

Breve descripción de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención proporciona análogos de compuestos fosfonato. Los compuestos fosfonato contemplados para utilizar de conformidad con la invención incluyen los que disminuyen la resorción ósea o inhiben la apoptosis de

osteoblastos u osteocitos, así como los que mejoran la bioactividad, la selectividad o la biodisponibilidad de los análogos fosfonatos de nucleótido que son útiles para el tratamiento del cáncer, diversas infecciones virales y similares. Los compuestos de la invención comprenden fosfonatos unidos covalentemente (directamente o indirectamente a través de una molécula conectora) a una porción alquilpropanodiol. En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan formulaciones farmacéuticas que contienen los análogos de los compuestos fosfonato descritos en este documento.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporcionan compuestos de la invención para utilizar en el tratamiento de infecciones virales.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 resume el efecto de un compuesto de referencia, 1-O-hexadeciloxipropano-alendronato, sobre la apoptosis de células osteocíticas MLO-Y4 inducida por dexametasona. Las barras representan la media \pm DE de 3 mediciones independientes. Las barras abiertas representan la ausencia de dexametasona y las barras oscurcidas representan la presencia de dexametasona 10^{-4} M.

La figura 2 resume el efecto de 1-O-hexadeciloxipropano-alendronato sobre la apoptosis de células calváticas inducida por dexametasona. Las barras representan la media \pm DE de 3 mediciones independientes. Las barras grises representan la ausencia de dexametasona y las barras negras representan la presencia de dexametasona 10^{-4} M.

Descripción detallada de la invención

Los compuestos fosfonato de la invención consiste en monoéster fosfonato formado mediante una unión covalente de un monofosfonato elegido entre:

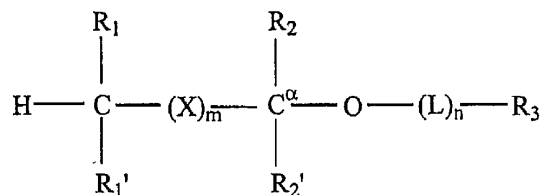
a) cidofovir o tenofovir;

b) un fosfonato de nucleósido antiviral o antiproliferativo derivado de un nucleósido que tiene un grupo 5'-hidroxilo, donde el fosfonato de nucleósido antiviral o antiproliferativo es un producto de la sustitución del grupo 5'-hidroxilo con una porción fosfonato ($-\text{PO}_3\text{H}_2$) o metileno fosfonato ($-\text{CH}_2-\text{PO}_3\text{H}_2$); y

c) un derivado de citosina arabinósido, gemcitabina, 5-fluorodesoxiuridina ribósido, 2-clorodesoxiadenosina, fludarabina o 1- β -D-arabinofuranosil-guanina;

a un compuesto que comprende la porción $-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{C}_1-\text{C}_{24}$ alquilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos fosfonato de la invención pertenecen a una clase más amplia de compuestos representados por la estructura:



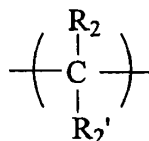
donde:

R_1 y R_1' son independientemente -H, $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ alquilo opcionalmente sustituido, $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ alqueno, $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ acilo, $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ alquilo, $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ alqueno o $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_{24})$ acilo, donde al menos uno de R_1 y R_1' no es -H, y donde dichas porciones alqueno o acilo tienen opcionalmente 1 a 6 dobles enlaces,

R_2 y R_2' son independientemente -H, $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ alquilo opcionalmente sustituido, $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ alqueno, $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ alquilo, $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ alqueno, $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ acilo, $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ acilo, $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ alquilo, $-\text{NH}(\text{C}_1-\text{C}_7)$ alquilo, $-\text{N}((\text{C}_1-\text{C}_7)\text{alquilo})_2$, oxo, halógeno, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ o $-\text{SH}$;

R_3 es un fosfonato farmacéuticamente activo, un bisfosfonato o un derivado fosfonato de un compuesto farmacológicamente activo, unido a un grupo funcional en un conector L opcional o a un átomo de oxígeno disponible en el C^α ;

X, cuando está presente, es:

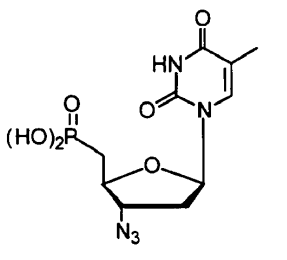
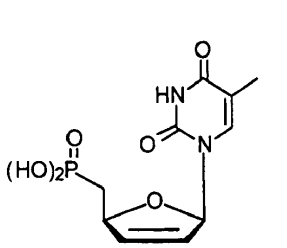
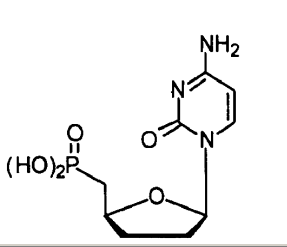
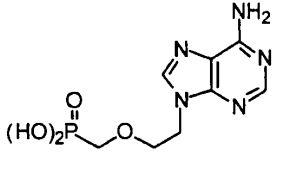


5 L es un enlace de valencia o una molécula de unión bifuncional de fórmula $-J-(CR_2)_t-G$, donde t es un número entero entre 1 y 24, J y G son independientemente $-O-$, $-S-$, $-C(O)O-$ o $-NH-$, y R es $-H$, alquilo sustituido o sin sustituir, o alquenoilo;
m es un número entero entre 0 y 6; y
n es 0 o 1.

10 En los compuesto de la invención, $m = 1$, R_2 y R_2' son H, y los compuestos son por tanto derivados propanodiol de un fosfonato terapéutico.

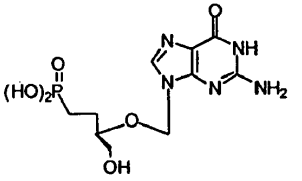
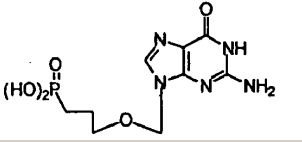
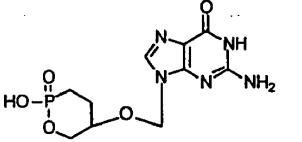
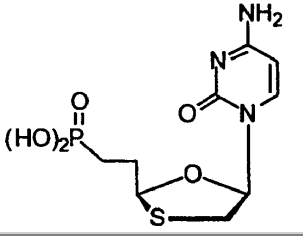
En los compuestos de la invención, R_1 es preferentemente un grupo alcoxi que tiene la fórmula $-O-(CH_2)_t-CH_3$, donde t es 11 a 19. Más preferentemente, t es 15 o 17.

15 Los nucleósidos útiles para tratar infecciones virales también se pueden convertir en sus correspondientes 5'-fosfonatos para usar como un grupo R_3 . Dichos análogos fosfonato contienen habitualmente un grupo fosfonato ($-PO_3H_2$) o metileno fosfonato ($-CH_2-PO_3H_2$) sustituyendo al grupo 5'-hidroxilo de un nucleósido antiviral. Algunos ejemplos de fosfonatos antivirales derivados por sustitución con $-PO_3H_2$ del 5'-hidroxilo son:

<p>ácido 3'-azido-3',5'-didesoxitimidina-5'-fosfónico (AZT-fosfonato)</p>		<p>Hakimelahi, G. H.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Sadeghi, M. M.; Tsay, S-C.; Hwu, J. R. J. Med. Chem. 1995, 38:4648-4659.</p>
<p>ácido 3',5'-didesoxitimidina-2'-eno-5'-fosfónico (d4T-fosfonato)</p>		<p>ídem</p>
<p>ácido 2',3',5'-tridesoxicitidina-5'-fosfónico (ddC-fosfonato)</p>		<p>Kofoed, T., Ismail, A. E. A. A.; Pedersen, E. B.; Nielsen, C. Bull. Soc. Chim. Fr. 1997, 134: 59-65.</p>
<p>9-[3-(fosfono-metoxi)propil]adenina (Adefovir)</p>		<p>Kim, C. U.; Luh, B. Y.; Misco, P. F.; Bronson, J. J.; Hitchcock, M. J. M.; Ghazzouli, I.; Martin, J. C. J. Med. Chem. 1990,33: 1207-1213.</p>

20

Algunos ejemplos de fosfonatos antivirales derivados por sustitución con $-CH_2-PO_3H_2$ del 5'-hidroxilo son:

Fosfonato de ganciclovir		Huffman, J.H.; Sidwell, R.W.; Morrison, A.G.; Coombs, J.; Reist, E.J., <i>Nucleoside Nucleotides</i> , 1994, 13:607-613.
Fosfonato de aciclovir		ídem
Fosfonato cíclico de ganciclovir		Smee, D.F.; Reist, E.J., <i>Antimicrob. Agents Chemother.</i> 1996, 40:1964-1966.
ácido 3'-tia-2',3'-didesoxicitidina-5'-fosfónico		Kraus, J.L.; <i>Nucleosides Nucleotides</i> , 1993, 12:157-162.

Otros fosfonatos de nucleótido antivirales preferidos contemplados para utilizar en la práctica de la invención se derivan de manera similar de nucleósidos antivirales que incluyen ddA, ddl, ddG, L-FMAU, DXG, DAPD, L-dA, L-dl, L-(d)T, L-dC, L-dG, FTC, penciclovir y similares.

5 Además, los fosfonatos antivirales como cidofovir y tenofovir se pueden usar como un grupo R₃ de conformidad con la presente invención.

10 Ciertos compuestos de la invención poseen uno o más centros quirales, p. ej. en las porciones azúcar, y por lo tanto pueden existir en formas ópticamente activas. Del mismo modo, cuando los compuestos contienen un grupo alqueno o una porción alquilo o acilo insaturado existe la posibilidad de isómeros *cis*- y *trans*- de los compuestos. Además puede haber presentes átomos de carbono asimétricos en un grupo sustituyente como un grupo alquilo. Los isómeros R- y S- y sus mezclas, incluidas las mezclas racémicas así como las mezclas de isómeros *cis*- y *trans*- están contemplados por esta invención. Todos dichos isómeros así como sus mezclas pretenden estar incluidos en la invención. Si se desea un estereoisómero particular, éste se puede preparar por métodos bien conocidos en el área mediante reacciones estereoespecíficas con materiales de partida que contienen los centros asimétricos y ya fueron resueltos o, alternativamente, por métodos que conducen a mezclas de los estereoisómeros y resolución por métodos conocidos.

20 Existen muchos compuestos fosfonato que se pueden derivatizar para mejorar su actividad farmacológica, o para aumentar su absorción oral, como por ejemplo, los compuestos dados a conocer en las patentes siguientes: Las patentes de los EE.UU. N° 3,468,935 (Etidronato), 4,327,039 (Pamidronato), 4,705,651 (Alendronato), 4,870,063 (Derivados de ácido bisfosfónico), 4,927,814 (Difosfonatos), 5,043,437 (Fosfonatos de azidodidesoxinucleósidos), 5,047,533 (Análogos fosfonato de nucleótido acíclicos de purina), 5,142,051 (Derivados N-fosfonilmetoxialquilo de bases pirimidina y purina), 5,183,815 (Agentes que actúan sobre los huesos), 5,196,409 (Bisfosfonatos), 5,247,085 (Compuestos de purina antivirales), 5,300,671 (Ácidos gem-difosfónicos), 5,300,687 (Trifluorometilbencilfosfonatos), 5,312,954 (Bis- y tetrakis-fosfonatos), 5,395,826 (Derivados de ácido guanidinaalquil-1,1-bisfosfónico), 5,428,181 (Derivados bisfosfonato), 5,442,101 (Derivados de ácido metilenobisfosfónico), 5,532,226 (Trifluorometilbencilfosfonatos), 5,656,745 (Análogos de nucleótidos), 5,672,697 (Nucleósido-5'-metileno fosfonatos), 5,717,095 (Análogos de nucleótidos), 5,760,013 (Análogos de timidilato), 5,798,340 (Análogos de nucleótidos), 5,840,716 (Compuestos fosfonato de nucleótido), 5,856,314 (Compuestos fosfonato heterocíclicos tio-sustituidos, que contienen nitrógeno), 5,885,973 (Olpadronato), 5,886,179 (Análogos de nucleótidos), 5,877,166 (Análogos fosfonato de nucleótido de 2-aminopurina enantioméricamente pura), 5,922,695 (Análogos fosfometoxi nucleótido antivirales), 5,922,696 (Derivados fosfonatos etilénico y alénico de purinas), 5,977,089 (Análogos fosfometoxi-nucleótidos antivirales), 6,043,230 (Análogos fosfometoxi-nucleótidos antivirales), 6,069,249 (Análogos

fosfonometoxi-nucleótidos antivirales); Patente belga N° 672205 (Clodronato); Patente europea N° 753523 (Ácidos bisfosfónicos amino-sustituídos); Solicitud de patente europea 186405 (difosfonatos de geminal); y similares.

5 Según se usa en este documento, el término "alquilo" se refiere a una cadena monovalente lineal o ramificada o a un radical cíclico de uno a veinticuatro átomos de carbono, que incluye metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, tert-butilo, n-hexilo, y similares.

10 Según se usa en este documento, "alquilo sustituido" comprende grupos alquilo que tienen además uno o más sustituyentes elegidos entre hidroxilo, alcoxi (de un grupo alquilo inferior), mercapto (de un grupo alquilo inferior), cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, halógeno, trifluorometilo, ciano, nitro, nitrona, amino, amido, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carboxilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, sulfurilo, y similares.

15 Según se usa en este documento, "alqueno" se refiere a grupos hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono, y que tienen un rango de átomos de carbono desde aproximadamente 2 hasta 24, y "alqueno sustituido" se refiere a grupos alqueno que tienen además uno o más sustituyentes como los indicados antes.

20 Según se usa en este documento, "arilo" se refiere a grupos aromáticos que tienen un rango de átomos de carbono desde 6 hasta 14 y "arilo sustituido" se refiere a grupos arilo que tienen además uno o más sustituyentes como los indicados antes.

25 Según se usa en este documento, "heteroarilo" se refiere a grupos aromáticos que contienen uno o más heteroátomos (p. ej., N, O, S o similares) como parte de la estructura del anillo y tienen un rango de átomos de carbono desde 3 hasta 14, y "heteroarilo sustituido" se refiere a grupos heteroarilo que tienen además uno o más sustituyentes como los indicados antes. Según se usa en este documento el término "enlace" o la expresión "enlace de valencia" se refieren a la unión entre átomos que consta de un par de electrones.

30 Según se usa en este documento, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales tanto de adición de ácido como de base.

35 Según se usa en este documento, el término "profármaco" se refiere a derivados de compuestos farmacéuticamente activos que tienen grupos química o metabólicamente escindibles y se convierten en el compuesto farmacéuticamente activo por solvolisis o en condiciones fisiológicas *in vivo*.

40 Los análogos fosfonato, que comprenden fosfonatos terapéuticamente eficaces (o derivados fosfonato de compuestos terapéuticamente eficaces) unidos covalentemente por un grupo hidroxilo a un 1-O-alquilglicerol, 3-O-alquilglicerol, 1-S-alquiltioglicerol o alcoxi-alcanol, se pueden absorber más eficazmente en el tracto gastrointestinal que los compuestos que los originan. Una dosis administrada por vía oral del análogo es tomada intacta del tracto gastrointestinal de un mamífero y el principio activo es liberado *in vivo* por la acción de enzimas endógenas. Los análogos fosfonato de la invención también pueden tener un grado mayor de bioactividad que los correspondientes compuestos sin derivatizar.

45 Los compuestos de la presente invención son una mejora respecto a los profármacos fosfato de alquilglicerol descritos en el estado anterior de la técnica porque la porción que contiene fosfonato se une directamente a la porción alcoxi-alcanol y porque la presencia del enlace fosfonato evita la conversión enzimática en el fármaco libre. Pueden estar presentes otros conectores entre estos grupos en los análogos mejorados. Por ejemplo, los conectores bifuncionales que tienen la fórmula $-O-(CH_2)_n-C(O)O-$, en los que n es 1 a 24, pueden conectar el fosfonato al grupo hidroxilo de la porción alcoxi-alcanol.

50 Lo anterior permite que el fosfonato de la invención logre un mayor grado de absorción oral. Además, enzimas celulares, pero no enzimas plasmáticas ni del tracto gastrointestinal, convertirán el conjugado en un fosfonato libre. Otra ventaja de los alcoxi-alcanol fosfonatos es que la tendencia de la administración simultánea de alimentos a reducir o abolir la absorción del fosfonato se reduce en gran medida o se elimina, lo que resulta en mayores niveles plasmáticos y mejor cumplimiento por parte del paciente.

55 Los compuestos de la invención se pueden administrar por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, soluciones, emulsiones o suspensiones, líquidos o partículas sólidas inhalados, partículas microencapsuladas, como un aerosol, a través de la piel mediante un dispositivo como un parche transdérmico, o por vía rectal, por ejemplo, en forma de supositorios. Los derivados lipófilos del profármaco de la invención son particularmente adecuados para la administración y los sistemas de liberación por absorción transdérmica, y se pueden usar también en dentífricos. La administración también puede tener lugar por vía parenteral en forma de soluciones inyectables.

65 Las composiciones se pueden preparar en formas convencionales, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, aerosoles, soluciones, suspensiones, o junto con portadores para aplicaciones tópicas. Las formulaciones farmacéuticas que

contienen los compuestos de esta invención se pueden preparar por técnicas convencionales, por ej., como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985.

5 El portador o diluyente farmacéutico empleado puede ser un portador sólido o líquido convencional. Los ejemplos de portadores sólidos son lactosa, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico, o éteres de alquilo inferior de celulosa. Los ejemplos de portadores líquidos son jarabes, aceite de cacahuete, aceite de oliva, fosfolípidos, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, polioxietileno o agua. El portador o diluyente puede incluir cualquier material para liberación sostenida conocido en el área como monoestearato o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera.

10 Si se usa un portador sólido para la administración oral, la preparación se puede comprimir o colocar en cápsulas de gelatina dura en forma de polvo o gránulos. La cantidad de portador sólido variará ampliamente, pero generalmente será entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 1 g. Si se utiliza un portador líquido, la preparación puede estar en forma de un jarabe, una emulsión, una cápsula de gelatina blanda, o un líquido inyectable estéril como una suspensión o solución en un líquido acuoso o no acuoso.

15 Los comprimidos se preparan mezclando el principio activo (es decir uno o más compuestos de la invención), con portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente inertes, inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de los excipientes que se pueden usar para los comprimidos son lactosa, almidón de maíz o sus derivados, talco, ácido esteárico o sus sales. Los ejemplos de excipientes adecuados para cápsulas de gelatina son aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos y líquidos. Los profármacos bisfosfonato también se pueden preparar en forma microencapsulada.

20 Para la administración nasal, la preparación puede contener un compuesto de la invención disuelto o suspendido en un portador líquido, en particular, un portador acuoso para la aplicación en aerosol. El portador puede contener solubilizantes como propilenglicol, tensioactivos, potenciadores de la absorción como lecitina o ciclodextrina, o conservantes.

25 Las composiciones farmacéuticas de esta invención para inyección parenteral comprenden líquidos, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosos o no acuosos estériles, farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para la reconstitución en soluciones o dispersiones estériles inyectables justo antes de usar.

30 Los excipientes adecuados para la preparación de soluciones y jarabes son agua, polioles, sacarosa, azúcar invertido, glucosa y similares. Los excipientes adecuados para la preparación de soluciones inyectables son agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales y similares.

35 Los productos farmacéuticos pueden contener además cualquiera de una serie de componentes agregados, como por ejemplo, conservantes, solubilizantes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, tampones, recubrimientos, antioxidantes, diluyentes y similares.

40 Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener un compuesto de acuerdo con la invención combinado con uno o más compuestos que tengan una actividad diferente, por ejemplo un antibiótico u otro material farmacológicamente activo. Dichas combinaciones están comprendidas por el alcance de la invención.

45 Los compuestos de la invención pueden ser útiles para tratar trastornos en mamíferos relacionados con el metabolismo óseo, las infecciones virales, la proliferación celular inapropiada y similares. Los métodos comprenden particularmente, administrar a un humano u otro mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de los profármacos de esta invención. Las indicaciones apropiadas para dicho tratamiento incluyen osteoporosis senil, posmenopáusica o inducida por esteroides, enfermedad de Paget, cánceres óseos metastásicos, hiperparatiroidismo, artritis reumatoide, algodistrofia, hiperostosis esternocostoclavicular, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Engleman, ciertos trastornos no óseos y enfermedad periodontal, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), gripe, virus del herpes simple (HSV), virus del herpes humano 6, citomegalovirus (CMV), virus de la hepatitis B, virus de Epstein-Barr (EBV), virus varicela-zóster, linfomas, trastornos hematológicos como leucemia, y similares.

50 De conformidad con un aspecto de la invención, se proporcionan compuestos para usar en el tratamiento de trastornos causados por infecciones virales. Las indicaciones adecuadas para dicho tratamiento incluyen virus sensibles como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), de la gripe, el virus del herpes simple (HSV), el virus del herpes humano 6, el citomegalovirus (CMV), los virus de la hepatitis B y C, el virus de Epstein-Barr (EBV), el virus varicela-zóster, y enfermedades causadas por los orthopoxvirus (p. ej., variola mayor y menor, vaccinia, viruela, viruela vacuna, viruela del camello, viruela del mono y similares), virus del Ébola, virus de los papilomas y similares.

55 Los profármacos de la invención se pueden administrar por vía oral, parenteral, tópica, rectal y a través de otras vías, con formas farmacéuticas apropiadas, según se desee.

Según se usa en este documento, el término "parenteral" se refiere a la inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular o intravítrea, o a técnicas de infusión.

5 La expresión "vía tópica" abarca la administración rectal y por inhalación de aerosoles, así como las rutas más comunes de la piel y las membranas mucosas de la boca y la nariz, y en dentífrico.

10 La expresión "cantidad eficaz" aplicada a los profármacos fosfonato de la invención es una cantidad que prevendrá o revertirá los trastornos indicados antes. Particularmente con respecto a los trastornos asociados al metabolismo óseo, una cantidad eficaz es una cantidad que prevendrá, atenuará o revertirá la resorción ósea anómala o excesiva, o la resorción ósea que se produce en las mujeres ancianas, particularmente posmenopáusicas o prevendrá o contrarrestará la metástasis ósea y la metástasis visceral en el cáncer de mama.

15 Con respecto a trastornos asociados a infecciones virales o proliferación celular inapropiada, p. ej., cáncer, la "cantidad eficaz" se determina por referencia a las dosis recomendadas del compuesto antiviral o antineoplásico de origen. La dosis elegida variará dependiendo de la actividad del compuesto elegido, la vía de administración, la gravedad de la afección en tratamiento, y el estado y los antecedentes médicos del paciente en tratamiento. Sin embargo, la experiencia en el área es comenzar con dosis del compuesto o de los compuestos a concentraciones menores que las requeridas para alcanzar el efecto terapéutico deseado y aumentar la dosis gradualmente hasta que se logra el efecto deseado. Si se desea, la dosis diaria eficaz se puede dividir en múltiples dosis a efectos de la administración, por ejemplo, dos a cuatro dosis por día. Sin embargo, se comprenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente en particular, dependerá de diversos factores que incluyen el peso corporal, el estado general de salud, la dieta, el tiempo, la vía de administración, la combinación con otros fármacos y la gravedad de la enfermedad en tratamiento.

25 Generalmente, los compuestos de la presente invención se dispensan en formas farmacéuticas unitarias que contienen de 1% a 100% de principio activo. El rango de dosis terapéutica es entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 1000 mg/kg/día, prefiriéndose de 0.10 mg/kg/día a 100 mg/kg/día, cuando se administra a pacientes, por ej., humanos, como un fármaco. Los niveles de dosis reales de principios activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden variar de modo de administrar una cantidad del compuesto o de los compuestos activos que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular.

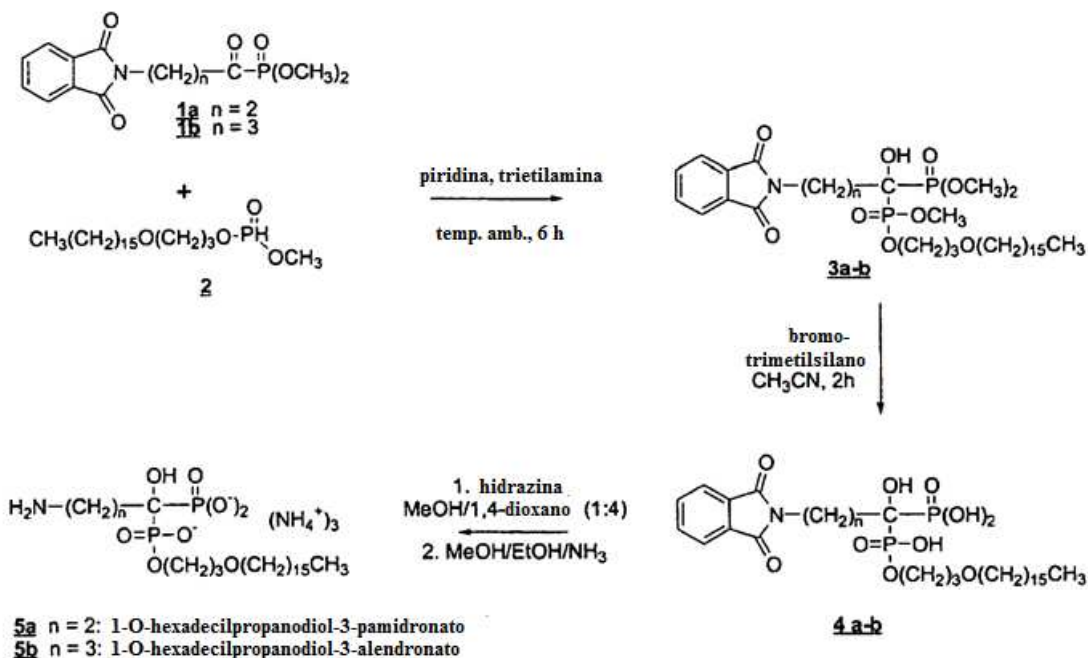
35 Una serie de experimentos en animales han demostrado la eficacia de los bisfosfonatos para prevenir la pérdida ósea en condiciones experimentales diseñadas para imitar trastornos clínicos relacionados. Basándose en estos estudios, se dispone de varios sistemas de modelos de animales pequeños para evaluar los efectos de los bisfosfonatos. Estas pruebas también son útiles para medir la eficacia comparativa de los profármacos bisfosfonato. La evaluación del tratamiento con bisfosfonatos requiere habitualmente la determinación del peso de las cenizas femorales y la masa ósea, medidas, por ejemplo como volumen óseo trabecular, entre grupos de animales tratados y sin tratar. Thompson, D. et al. (1990) J. Bone and Mineral Res. 5(3):279-286, dan a conocer el uso de dichos métodos para evaluar la inhibición de la pérdida ósea en ratas inmovilizadas que fueron tratadas con bisfosfonato de aminohidroxibutano. Yamamoto, M. et al. (1993) Calcif Tissue Int 53:278-282 indujeron hipertiroidismo en ratas para producir cambios óseos semejantes a los del hipertiroidismo en humanos, y compararon bioquímicamente grupos sin tratar y tratados con bisfosfonato, basándose en la medición de osteocalcina, y por análisis histomorfométrico, que incluye diferencias en el volumen de huesos esponjosos, y comparación histológica de superficies de osteoides, osteoclastos y osteoblastos en cortes de hueso. Seedor, J.G. et al. (1991) J. Bone and Mineral Res. 6(4):339-346 describen estudios del efecto del alendronato en antagonizar la pérdida ósea en ratas ovariectomizadas mediante el peso de las cenizas femorales y el análisis histomorfométrico del volumen trabecular tibial. El ensayo de Schenk, que comprende el examen histológico de las epífisis de ratas en crecimiento, también se puede usar como un ensayo de cribado. Un ejemplo de prueba de cribado para evaluar los efectos de antagonismo de la resorción ósea de los compuestos en ratas de laboratorio transformadas en osteopénicas mediante diversas estrategias, se proporciona en el ejemplo 14

50 Los compuestos de la invención se pueden preparar de diversas maneras, como se describe en general en los esquemas I a VI. Los esquemas I a IV se proporcionan como referencia. Los métodos generales de esterificación de fosfonato descritos más adelante se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no deben ser interpretados como limitantes de esta invención en modo alguno. En efecto, se han desarrollado varios métodos para la condensación directa de ácidos fosfónicos con alcoholes (véase, por ejemplo, R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH, Nueva York, 1989, p. 966 y las referencias citadas en este documento). El aislamiento y la purificación de los compuestos y productos intermedios descritos en los ejemplos se puede efectuar, si se desea, por cualquier procedimiento de separación o purificación adecuado como, por ejemplo, filtración, extracción, cristalización, cromatografía en columna por desorción súbita, cromatografía en capa delgada, destilación o una combinación de estos procedimientos. Hay ilustraciones específicas de procedimientos de separación y aislamiento en los ejemplos siguientes. También se pueden usar, por supuesto, otros procedimientos equivalentes de separación y aislamiento.

65

El esquema I describe una síntesis de profármacos bisfosfonato que contienen un grupo amino primario, como pamidronato o alendronato. El ejemplo 1 proporciona condiciones para la síntesis de 1-O-hexadeciloxipropil-alendronato (HDP-alendronato) o 1-O-hexadeciloxipropil-pamidronato (HDP-pamidronato). En este proceso, una mezcla de 4-ftalimidobutanoil fosfonato de dimetilo (1b, preparada como se describe en la patente de Estados Unidos 5,039,819)) y metil fosfito de hexadeciloxipropilo (2) en solución de piridina se trata con trietilamina para obtener el tetraéster bisfosfonato 3b que se purifica mediante cromatografía en gel de sílice. El producto intermedio 2 se obtiene mediante transesterificación de fosfito de difenilo como se describe en Kers, A., Kers, I., Stawinski, J., Sobkowski, M., Kraszewski, A. Synthesis, Abril de 1995, 427-430. Por lo tanto, se trata primero difenil fosfito en solución de piridina con hexadeciloxipropan-1-ol y después con metanol para proporcionar el compuesto 2.

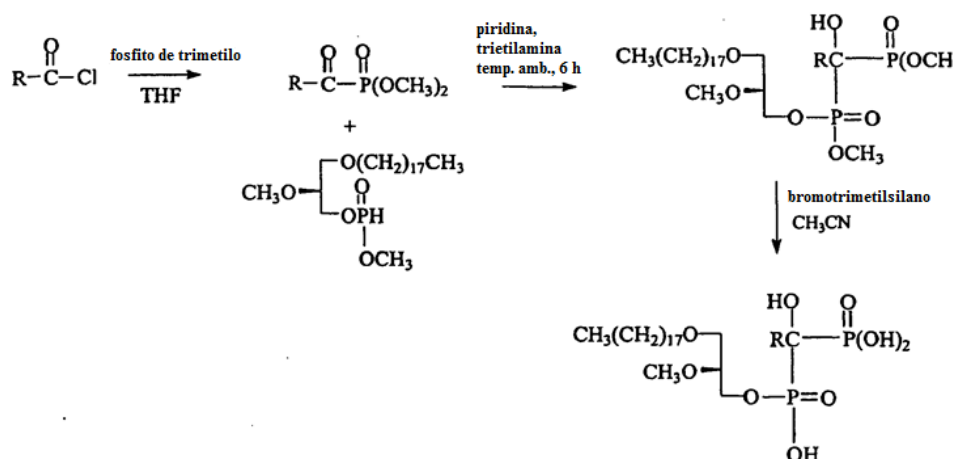
Esquema I



Un aspecto importante del proceso es que se pueden usar otros alcoholes de cadena larga en lugar de hexadeciloxipropan-1-ol para generar los diversos compuestos de esta invención. El tratamiento del producto intermedio 3b con bromotrimetilsilano en acetonitrilo escinde los ésteres metílicos selectivamente para producir el monoéster 4b. El tratamiento de 4b con hidrazina en un sistema solvente mezclado (20% de metanol/80% de 1,4-dioxano) resulta en la eliminación del grupo protector ftalimido como se muestra. El profármaco alendronato deseado se recoge por filtración y se convierte en la sal de triamonio mediante tratamiento con amoníaco metanólico.

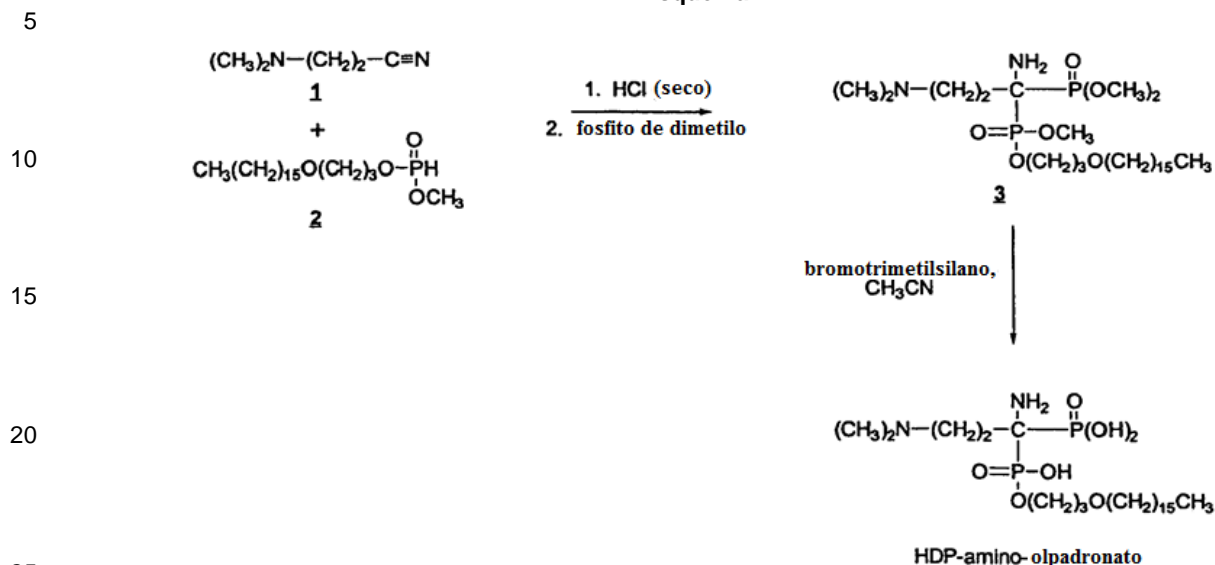
El esquema II ilustra una síntesis de análogos bisfosfonatos que carecen de un grupo amino primario. En este caso los pasos del proceso son similares a los del Esquema 1 excepto porque la protección con un grupo ftalimido y la subsiguiente desprotección por hidrazinólisis son innecesarias.

Esquema II



Los bisfosfonatos que tienen grupos 1-amino, como amino-olpadronato, se pueden convertir en análogos usando un proceso ligeramente modificado que se muestra en el esquema III.

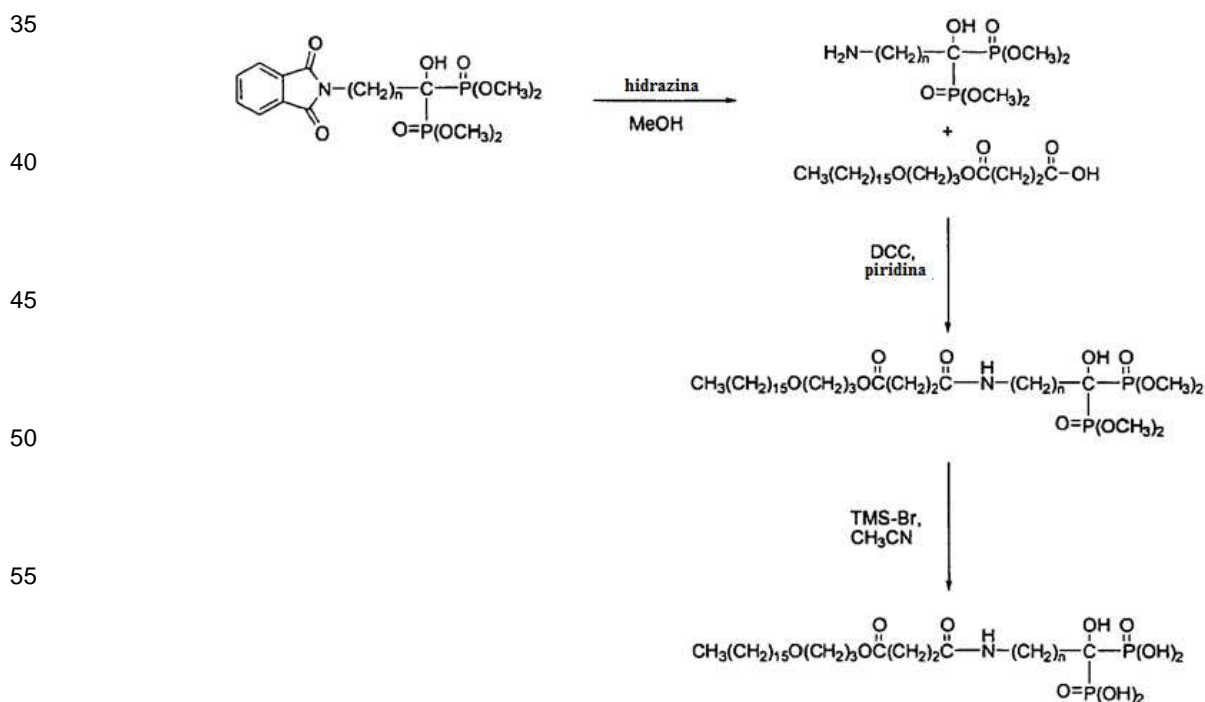
Esquema III



El tratamiento de una mezcla de compuesto 2 y 3-(dimetilamino)propionitrilo con HCl seco seguido de la adición de fosfito de dimetilo produce el tetraéster 3 el cual, luego de la desmetilación con bromotrimetilsilano, produce el hexadeciloxipropil-amino-olpadronato.

El esquema IV ilustra la síntesis de un análogo bisfosfonato en el que el grupo lipídico está unido a un grupo amino primario del compuesto de origen en vez de como un éster fosfonato.

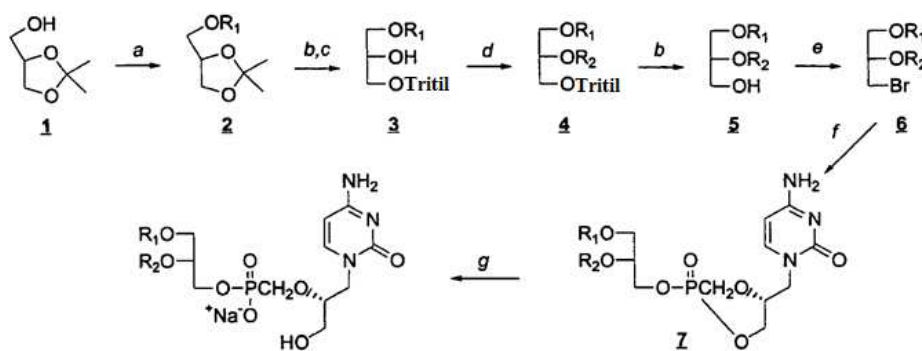
Esquema 4



El esquema V ilustra una síntesis general de análogos alquilglicerol o alquilpropanodiol de cidofovir, cidofovir cíclico y otros fosfonatos. El tratamiento de 2,3-isopropiliden glicerol, 1, con NaH en dimetilformamida seguido de reacción con un metanosulfonato de alquilo produce el alquil éter, 2. La eliminación del grupo isopropilideno por tratamiento con ácido acético seguido de reacción con cloruro de tritilo en piridina produce el producto intermedio 3. La alquilación del producto intermedio 3 con un haluro de alquilo resulta en el compuesto 4. La eliminación del grupo

trilito con ácido acético al 80% acuoso produce el O,O-dialquil glicerol, 5. La bromación del compuesto 5 seguida de reacción con la sal sódica de cidofovir cíclico u otro nucleótido que contenga fosfonato produce el aducto fosfonato deseado, 7. La apertura del anillo del aducto cíclico se lleva a cabo mediante reacción con hidróxido de sodio acuoso. La especie propanodiol preferida se puede sintetizar sustituyendo 1-O-alkilpropano-3-ol por el compuesto 5 en el esquema V. Los análogos de tenofovir y adefovir se pueden sintetizar sustituyendo estos fosfonatos de nucleótido por CDVc en la reacción (f) del Esquema V. De manera similar, se pueden formar de este modo otros fosfonatos de nucleótido de la invención.

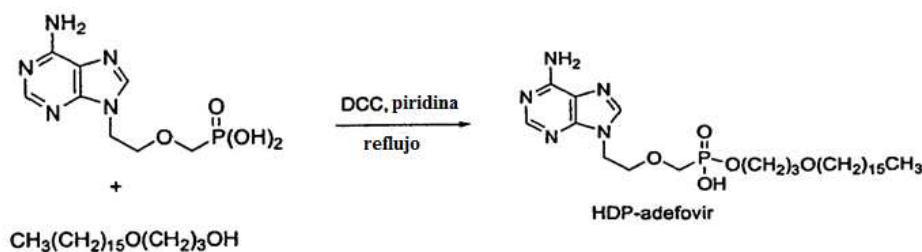
Esquema V



Reactivos: a) NaH, R₁OSO₂Me, DMF; b) ácido acético ac. al 80%; c) cloruro de trilito, piridina; d) NaH, R₂-Br, DMF; e) CBr₄, trifenilfosfina, THF; f) cidofovir cíclico (sal DCMC), DMF; g) NaOH 0.5 N

El esquema VI ilustra un método general para la síntesis de fosfonatos de nucleótido de la invención utilizando 1-O-hexadeciloxipropil-adefovir como ejemplo. El fosfonato de nucleótido (5 mmol) se suspende en piridina seca y se le agregan un derivado alcoxialcohol o alquiglicerol (6 mmol) y 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 10 mmol). La mezcla se calienta a reflujo y se agita vigorosamente hasta que se completa la reacción de condensación seguida de cromatografía en capa delgada. Después la mezcla se enfría y se filtra. El filtrado se concentra a presión reducida y el residuo se adsorbe en gel de sílice y se purifica mediante cromatografía en columna por desorción súbita (elución con aproximadamente diclorometano/metanol 9:1) para producir el monoéster fosfonato correspondiente.

Esquema VI



La invención se describirá ahora más detalladamente por referencia a los ejemplos no limitantes siguientes.

Ejemplo de referencia 1

Síntesis de 1-O-hexadecilpropanodiol-3-alendronato

A. Metil fosfito de hexadeciloxipropilo (b)

Se preparó metil fosfito de hexadeciloxipropilo utilizando el método descrito en: Kers, A., Kers, I., Stawinski, J., Sobkowski, M., Kraszewski, A. Synthesis abril de 1995, 427-430. Una solución de fosfito de difenilo (14 g, 60 mmol) en piridina (50 mL) mantenida a 0 °C se agregó lentamente a una solución de hexadeciloxipropan-1-ol (6.0 g, 20 mmol) en piridina (25 mL). La mezcla se agitó una hora antes de agregar metanol anhidro (10 mL). Después de agitar una hora más, el solvente se evaporó y el residuo se adsorbió en gel de sílice y se le realizó una cromatografía, utilizando elución por gradiente (hexanos a 20% de acetato de etilo/80% de hexanos), para dar el compuesto 2 puro como un sólido ceroso, de bajo punto de fusión (4.5 g, 60% de rendimiento), ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.79 (d, 1H, J = 696 Hz), 4.19 (q, 2H), 3.78 (d, 3H), 3.51 (t, 3H), 3.40 (t, 2H), 1.95 (pent, 2H), 1.25 (s ancho, 28H), 0.88 (t, 3H).

B. Trimetil 4-ftalimidobutanoil fosfonato de hexadeciloxipropilo (3b)

A una mezcla de 4-ftalimidobutanoil fosfonato de dimetilo (1b, 3.0 g, 7.9 mmol, preparado como se describe en la patente de Estados Unidos 5,039,819) y metil fosfito de hexadeciloxipropilo (2, 2.9 g, 9 mmol) en piridina (50 mL) se le agregó trietilamina (0.2 g, 2 mmol). La mezcla se agitó 5 horas a temperatura ambiente y después el solvente se eliminó al vacío. El residuo se adsorbió en gel de sílice y se le realizó cromatografía (acetato de etilo) para dar el compuesto 3b (3.5 g, 63%) como un aceite viscoso. ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.84 (d, 2H), 7.72 (d, 2H), 4.45 (m, 1H), 4.27 (m, 4H), 4.15 (q, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.71 (t, 2H), 3.51 (m, 2H), 3.38 (t, 2H), 2.04 (m, 2H), 1.94 (pent., 2H), 1.54 (m, 2H), 1.25 (s ancho, 28H), 0.88 (t, 3H). ³¹P NMR (22.54 (doblete), 21.22 (cuartete)).

10 C. 4-Ftalimidobutanoil fosfonato de hexadeciloxipropilo (4b)

El compuesto 3b anterior (3.0 g, 4.3 mmol) se disolvió en acetonitrilo seco (50 mL) y se enfrió hasta 0 °C. Se le agregó lentamente una solución de bromotrimetilsilano (3.9 g, 25.5 mmol) en acetonitrilo (25 mL) y después la solución se agitó otras 2 horas. Después la mezcla se vertió lentamente sobre hielo picado. El precipitado que se formó se recogió por filtración al vacío y se secó al vacío para dar 1.2 g de 4b (42% de rendimiento). ¹H NMR (DMSO-d₆) 7.86 (m, 4H), 3.99 (q, 2H), 3.66 - 3.55 (m, 1H), 3.54 (m, 2H), 3.35 (t, 2H), 3.27 (t, 2H), 1.89 - 1.80 (m, 1.72 (pent., 2H), 1.53-1.40 (m, 2H), 1.22 (s ancho, 28H), 0.85 (t, 3H). ³¹P NMR (21.51 (doblete), 19.50 (doblete)).

20 D. 1-O-hexadecilpropanodiol-3-alendronato (5b)

El compuesto 4b (300 mg, 0.45 mmol) se disolvió en una mezcla de 1,4-dioxano (20 mL) y metanol (5 mL). Luego se le agregó hidrazina anhidra y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El precipitado que se separó se recogió por filtración al vacío y se enjuagó con 1,4-dioxano. Después el sólido se suspendió en etanol y se le agregó amoníaco metanólico (3 mL). Después de agitar durante 10 minutos, el sólido resultante se recogió por filtración, se enjuagó con etanol y se secó al vacío para producir 220 mg de HDP-alendronato (5b) como la sal de triamonio. El análisis por FT-IR indicó eliminación del grupo protector ftalimido. Electronebulización MS m/e 532 (MH⁺), 530 (MH).

30 Ejemplo de referencia 2

Síntesis de 1-O-hexadecilpropanodiol-3-pamidronato (5a)

Se prepara 1-O-hexadecilpropanodiol-3-pamidronato de manera análoga (según el esquema 1) excepto que se usa ácido 3-ftalimidopropanoico para preparar 3-ftalimidopropanoil fosfonato de dimetilo (1a). El compuesto 1a se condensa con 2 para producir el trimetil bisfosfonato 3a. La desprotección como en los pasos C y D anteriores produce HDP-pamidronato como se muestra.

Ejemplo de referencia 3

40 Síntesis de 1-O-octadecil-2-O-metil sn-glicero-3-alendronato

Los profármacos con grupos lipófilos diferentes de hexadeciloxipropilo se preparan sustituyendo diversos alcoholes de cadena larga con el hexadeciloxipropan-1-ol en el paso A del ejemplo 1. Por ejemplo, la reacción de 1-O-octadecil-2-O-metil-sn-glicerol con difenil fosfito en piridina seguida de tratamiento con metanol da metil fosfito de 1-O-octadecil-2-O-metil-sn-glicerilo. La condensación de este dialquilfosfito con el fosfonato 1b, seguida de los pasos de desprotección C y D da 1-O-octadecil-2-O-metil-sn-glicero-3-alendronato. El esquema 2 ilustra una síntesis de otros conjugados bisfosfonato que no tienen un grupo amino primario en la cadena lateral. En este caso la protección con un grupo ftalimido y la desprotección por hidrazinólisis son innecesarias.

50 Ejemplo de referencia 4

Síntesis de HDP-amino-olpadronato

El esquema 3 ilustra la síntesis de conjugados de 1-amino bisfosfonato Utilizando el compuesto 2 del ejemplo 1, 3-(dimetilamino)propionitrilo y los procedimientos descritos en: Orlovskii, V. V.; Vovsi, B.A. J. Gen Chem. USSR (Engl. Transl.) 1976, 46: 294-296, se prepara el éster de trimetilbisfosfonato 3. La desmetilación con bromotrimetilsilano como se describe en el paso C del ejemplo 1 proporciona HDP-amino-olpadronato.

Ejemplo de referencia 5

60 Síntesis de 1-O-hexadecilpropanodiol-3-succinil-alendronato

El esquema 4 ilustra la síntesis de un conjugado de bisfosfonato en el que el grupo lipídico está unido a un grupo amino primario del compuesto de origen. Se disolvió tetrametil-(4-ftalimido-1-hidrobutilideno)bisfosfonato (2.0 g, 4.4 mmol) en hidrazina metanólica 0.2 M (100 mL), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La

mezcla se concentró hasta la mitad de su volumen cuando un sólido comenzó a separarse. El sólido se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad.

La NMR de protón mostró que este compuesto era tetrametil-(4-amino-1-hidroxiutilideno)bisfosfonato. Éste se secó en pentóxido de fósforo a 50 °C durante toda la noche. A una suspensión de 1.2 g del compuesto en una mezcla de piridina (25 mL) y N,N-dimetilformamida (25 mL) se le agregó 3-succinil-1-hexadeciloxipropano (1.76 g, 4.4 mmol). Se agregó dicitohexilcarbodiimida (2.52 g, 12.21 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos días. La mezcla se filtró; el filtrado se absorbió en gel de sílice y se le realizó cromatografía por desorción súbita con un gradiente creciente de metanol en diclorometano (0%-20%) para producir el compuesto succinilado. Éste se desbloqueó con bromuro de trimetilsililo en acetonitrilo para producir el compuesto del título que se purificó por cristalización de metanol.

Ejemplo 6

Síntesis de ésteres hexadeciloxipropílico y 1-O-octadecil-sn- glicerílico de adefovir

A una mezcla de adefovir (1.36 g, 5 mmol) y 3-hexadeciloxi-1-propanol (1.8 g, 6 mmol) en piridina seca se le agregó DCC (2.06 g, 10 mmol). La mezcla se calentó a reflujo y se agitó 18 h, después se enfrió y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se aplicó a una columna corta de gel de sílice. La elución de la columna con diclorometano/metanol 9:1 produjo hexadeciloxipropil-adefovir (HDP-ADV) como un polvo blanco.

A una mezcla de adefovir (1.36 g, 5 mmol) y 1-O-octadecil-sn-glicerol (2.08 g, 6 mmol) en piridina seca (30 mL) se le agregó DCC (2.06 g, 10 mmol). La mezcla se calentó a reflujo y se agitó durante toda la noche, después se enfrió y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se aplicó a una columna corta de gel de sílice. La elución de la columna con diclorometano/metanol 9:1 produjo 1-O-octadecil-sn-gliceril-3-adefovir.

Ejemplo 7

Síntesis de éster hexadeciloxipropílico de AZT-fosfonato

El análogo fosfonato de AZT (ácido 3'-azido-3'-5'-didesoxitimidina-5'-fosfónico) se sintetizó usando el procedimiento publicado: Hakimelahi, G. H.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Sadeghi, M. M.; Tsay, S-C.; Hwu, J. R. Journal of Medicinal Chemistry, 1995 38,4648-4659.

El AZT-fosfonato (1.65 g, 5 mmol) se suspendió en piridina seca (30 mL), después se le agregaron 3-hexadeciloxi-1-propanol (1.8 g, 6 mmol) y DCC (2.06 g, 10 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo y se agitó durante 6 h, después se enfrió y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se aplicó a una columna de gel de sílice. La elución de la columna con diclorometano/metanol 9:1 produjo éster hexadeciloxipropílico del ácido 3'-azido-3'-5'-didesoxitimidina-5'-fosfónico.

Ejemplo 8

Síntesis de los ésteres hexadeciloxipropílico, octadeciloxipropílico, octadeciloxietílico y hexadecílico de cidofovir cíclico

A una suspensión en agitación de cidofovir (1.0 g, 3.17 mmol) en N,N-DMF (25 mL) se le agregó N,N-dicitohexil-4-morfolina carboxamida (DCMC, 1.0 g, 3.5 mmol). La mezcla se agitó durante toda la noche para disolver el cidofovir. Esta solución transparente se cargó después en un embudo de adición y se agregó lentamente (30 min) a una solución en agitación en piridina caliente (25 mL, 60 °C) de 1,3-dicitohexilcarbodiimida (1.64 g, 7.9 mmol). Esta mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 16 h, después se enfrió hasta temperatura ambiente, y el solvente se eliminó a presión reducida. El residuo se adsorbió en gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna por desorción súbita utilizando elución por gradiente (CH₂Cl₂ + MeOH). El producto UV activo se eluyó finalmente con CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 5:5:1. La evaporación del solvente dio 860 mg de un sólido blanco. El espectro ¹H y ³¹P NMR mostró que este era la sal DCMC de cidofovir cíclico (rendimiento = 44%).

A una solución de cidofovir cíclico (sal DCMC) (0.5 g, 0.8 mmol) en DMF seca (35 mL) se le agregó 1-bromo-3-hexadeciloxipropano (1.45 g, 4 mmol) y la mezcla se agitó y se calentó a 80 °C durante 6 h. Después la solución se concentró al vacío y el residuo se adsorbió en gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna por desorción súbita utilizando elución por gradiente (CH₂Cl₂ + EtOH). El producto alquilado se eluyó con CH₂Cl₂/EtOH 90:10. Las fracciones que contenían el producto puro se evaporaron para producir 260 mg de HDP-cidofovir cíclico (55% de rendimiento).

A una solución de cidofovir cíclico (sal DCMC) (1.0 g, 3.7 mmol) en DMF seca (35 mL) se le agregó 1-bromo-3-octadeciloxipropano (2.82 g, 7.2 mmol) y la mezcla se agitó y se calentó a 85 °C durante 5 h. Después la solución se concentró al vacío y el residuo se adsorbió en gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna por desorción súbita utilizando elución por gradiente (CH₂Cl₂ + MeOH). El producto alquilado se eluyó con CH₂Cl₂/MeOH 9:1. Las fracciones que contenían el producto puro se evaporaron para producir 450 mg de ODP-cidofovir cíclico.

A una solución de CDVc (sal DCMC) (1.0 g, 3.7 mmol) en DMF seca (35 mL) se le agregó 1-bromo-3-octadeciloxietano (3.0 g, 7.9 mmol) y la mezcla se agitó y se calentó a 80 °C durante 4 h. Después la solución se concentró al vacío y el residuo se adsorbió en gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna por desorción súbita utilizando elución por gradiente (CH₂Cl₂ + MeOH). El producto alquilado se eluyó con CH₂Cl₂/MeOH 9:1. Las fracciones que contenían el producto puro se evaporaron para producir 320 mg de octadeciloxietil-CDVc.

A una solución de cidofovir cíclico (sal DCMC) (0.5 g, 0.8 mmol) en DMF seca (35 mL) se le agregó 1-bromo-3-hexadecano (1.2 g, 4 mmol) y la mezcla se agitó y se calentó a 80 °C durante 6 h. Después la solución se concentró al vacío y el residuo se adsorbió en gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna por desorción súbita utilizando elución por gradiente (CH₂Cl₂ + MeOH). El producto alquilado se eluyó con CH₂Cl₂/MeOH 9:1. Las fracciones que contenían el producto puro se evaporaron para producir 160 mg de hexadecil-CDVc.

Ejemplo 9

Síntesis de los ésteres hexadeciloxipropílico, octadeciloxipropílico, octadeciloxietílico y hexadecílico de cidofovir

Se disolvió hexadeciloxipropil-CDV cíclico anterior en NaOH 0.5 M y se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. Después se agregó gota a gota ácido acético acuoso al 50% para ajustar el pH a aproximadamente 9. El HDP-CDV precipitado se aisló por filtración, se enjuagó con agua y se secó, y después se recrystalizó (p-dioxano/agua 3:1) para dar HDP-CDV.

De manera similar, se hidrolizaron los ésteres octadeciloxipropílico, octadeciloxietílico y hexadecílico de CDVc usando NaOH 0.5 M y se purificaron para dar los diésteres de cidofovir correspondientes.

Ejemplo 10

Síntesis de éster hexadeciloxipropílico de fosfonato cíclico de ganciclovir

El análogo fosfonato cíclico de ganciclovir se preparó usando el procedimiento publicado: (Reist, E. J.; Sturm, P. A.; Pong, R. Y.; Tanga, M. J. y Sidwell, R. W. Synthesis of acyclonucleoside phosphonates for evaluation as antiviral agents, p. 17-34. En J. C. Martin (ed.), Nucleotide Analogues as Antiviral Agents, American Chemical Society, Washington, D. C.). Luego de la conversión en la sal DCMC en DMF el fosfonato de GCVc se trató con 1-bromo-3-hexadeciloxipropano y la mezcla se calentó a 80 °C durante 6 horas. El aislamiento del producto alquilado mediante cromatografía de desorción súbita produjo HDP-fosfonato de GCV cíclico

Ejemplo 11

Síntesis de éster hexadeciloxipropílico de fosfonato de ganciclovir

El HDP-fosfonato de GCV cíclico anterior se disolvió en NaOH 0.5 M y se agitó a temperatura ambiente para convertirlo en diéster acídico. La solución se neutralizó con ácido acético ac. al 50% para precipitar el producto que se recrystalizó en p-dioxano/agua 3:1.

Ejemplo de referencia 12

El 1-O-hexadeciloxipropano alendronato inhibe la apoptosis de células osteocíticas MLO-Y4 inducida por dexametasona

Se pretrataron células osteocíticas MLO-Y4 con la concentración indicada de 1-O-hexadeciloxipropano-alendronato (HDP-alendronato) durante 1 hora y después las células se incubaron durante 6 horas con y sin dexametasona (concentración final 10⁻⁴ M). El porcentaje de células muertas se determinó por absorción de azul de tripano (Plotkin et al., J Clin Invest 104:1363-1374, 1999). Los resultados se presentan en la figura 1. Las barras representan la media ± DE de 3 mediciones independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA de 1 vía (prueba de Student-Keuls-Newman). *p<0.05. HDP-alendronato a una concentración entre 10⁸ y 10⁻⁵ M inhibe la apoptosis inducida por dexametasona.

Ejemplo de referencia 13

El 1-O-hexadeciloxipropano alendronato inhibe la apoptosis inducida por dexametasona en células calváticas

Se obtuvieron células calváticas de ratones C57BL/6J neonatos y se realizaron varios pasajes en cultivo tisular. Las células se pretrataron con la concentración indicada de HDP-alendronato durante 1 hora y a continuación se incubaron durante 6 horas con y sin dexametasona 10⁻⁴ M. El porcentaje de células muertas se determinó por

absorción de azul de tripano (Plotkin, L. et al., J Clin Invest 104:1363-1374, 1999). Los resultados se presentan en la figura 2. Las barras representan la media \pm DE de 3 mediciones independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA de 1 vía (prueba de Student-Keuls-Newman). * $p < 0.05$. El pretratamiento de las células con HDP-alendronato a una concentración de 10^{-8} o mayor abolió el aumento en el % de células muertas inducido por dexametasona ($p < 0.05$). Las células expuestas a DEVD $0.05 \mu\text{M}$ (un péptido inhibidor de la apoptosis) seguido de dexametasona no presentaron un aumento en el % de células muertas lo que demuestra que DEVD bloquea la apoptosis inducida por dexametasona.

Ejemplo de referencia 14

Inhibición de la resorción ósea en ratas ovariectomizadas por el 1-O-hexadecilpropano-alendronato

Miembros de los grupos de ratas Sprague-Dawley hembras (250 gm-280 gm) que habían sido sometidas a ovariectomía bilateral se trataron con sal disódica del ácido 4-amino-1-hidroxibutilideno-1,1-bisfósónico o 1-O-hexadecilpropanodiol-3-alendronato inyectados por vía subcutánea en dosis graduadas de 0 mg /kg/día a 8 mg /kg/día, por un período de cuatro a doce semanas. A las doce semanas las ratas, incluidos los miembros de un grupo de control, se sacrificaron y se incineraron los fémures de cada animal. Alternativamente, el método de administración puede ser oral. Se determinó el peso de las cenizas de los fémures de cada individuo, se compararon los valores para cada grupo como un indicador de la masa ósea para determinar la inhibición relativa de la pérdida ósea entre los protocolos de tratamiento. Los animales tratados con 1-O-hexadecilpropano alendronato presentaron menor pérdida de masa ósea que los controles ovariectomizadas.

Ejemplo de referencia 15

Inhibición de la resorción ósea en humanos con osteoporosis por el 1-O-octadeciloxipropil-alendronato

Dos grupos de mujeres posmenopáusicas se trataron con placebo o con 1-O-octadeciloxipropil-alendronato con una dosis oral de 0.1 mg/kg/día a 100 mg/kg/día durante un período de dos a tres años. Los miembros de los grupos de tratamiento fueron controlados continuamente durante el curso del tratamiento con relación a la densidad mineral ósea, la incidencia de fracturas vertebrales y el progreso de deformidades vertebrales mediante examen radiográfico y pérdida de altura. Las comparaciones de las mediciones se hicieron entre varios grupos de tratamiento para determinar la eficacia de las formas de terapia con alendronato entre el grupo de tratamiento. El grupo tratado con 1-O-octadeciloxipropil alendronato tuvo menos fracturas y menor tasa de reducción de la densidad ósea que el grupo del placebo.

Ejemplo de referencia 16

Estimulación de la formación de hueso en humanos con osteoporosis inducida por esteroides por el 1-O-octadeciloxipropil-amino-olpadronato

Grupos de pacientes con osteoporosis inducida por esteroides se trataron con 1-O-octadeciloxipropil-amino-olpadronato o con placebo con una dosis oral de 0.1 mg/kg/día a 100 mg/kg/día durante un período de un mes a un año. Los miembros de los grupos de tratamiento fueron controlados continuamente durante el curso del tratamiento con relación a la densidad mineral ósea, la incidencia de fracturas vertebrales y el progreso de deformidades vertebrales mediante examen radiográfico y pérdida de altura. Las comparaciones de las mediciones se hicieron entre varios grupos de tratamiento para determinar la eficacia de la terapia con 1-O-octadeciloxipropil-amino-olpadronato entre el grupo de tratamiento. Comparadas con el tratamiento con placebo, la densidad ósea aumenta y las fracturas disminuyen en los pacientes tratados con 1-O-octadeciloxipropil-amino-olpadronato.

Ejemplo de referencia 17

Actividad antiviral y selectividad de los análogos fosfonatos de nucleótido frente al citomegalovirus humano (HCMV)

Ensayo antiviral para HCMV: se llevaron a cabo ensayos antivirales para el ADN del HCMV por hibridación de ADN según comunicaron Dankner, W.M., Scholl, D., Stanat, S.C., Martin, M., Souke, R.L. y Spector, S.A., J. Virol. Methods 21:293-298, 1990. En resumen, se pretrataron células MRC-5 subconfluentes en placas de cultivo de 24 pocillos durante 24 h con diversas concentraciones de fármaco en medio esencial mínimo de Eagle (E-MEM) que contenía 2% de FBS y antibióticos. Se eliminó el medio y las cepas de HCMV se agregaron a una dilución que resultará en un efecto citopático (CPE) de 3-4 + en los pocillos que no tenían fármaco en 5 días. El virus se absorbió durante 1 h a 37 °C, se aspiró y se reemplazó con las diluciones del fármaco. Después de 5 días de incubación se cuantificó el ADN de HCMV por triplicado mediante hibridación de ácido nucleico usando un kit de prueba de sensibilidad antiviral para CMV de Diagnostic Hybrids, Inc. (Athens, OH). El medio se eliminó y las células se lisaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la absorción del lisado, se hibridaron filtros Hybriwix™ durante toda la noche 60 °C. Los filtros Hybriwix™ se lavaron durante 30 min a 73 °C y se contaron en un contador gamma. Los resultados se expresan como CE₅₀ (la concentración inhibitoria 50%).

Se realizaron experimentos preliminares en derivados 1-O-hexadecilpropanodiol (HDP) de cidofovir y adefovir, como se muestra en la tabla 1.

5

Tabla 1

Fármaco	CE ₅₀ de HCMV, μ M	CEM, CC ₅₀ , μ M	Índice de selectividad
CDV	0.45 \pm 0.09 (3)	857	1900
CDVc	0.47 \pm 0.13 (3)	>1000	>2100
HDP-CDVc	0.0005 (2)	30	59 600
Adefovir	55 (1)	-	-
HDP-Adefovir	0.01 (1)	-	-

10

Como indican los resultados de la tabla 1, 1-O-hexadecilpropanodiol-3-CDV cíclico (HDP-CDVc) fue > 900 veces más activo que CDV o CDV cíclico. Si bien es más citotóxico, el índice de selectividad frente al HCMV en células en división rápida fue > 59 000 vs. 1900 a >2100 para el CDV sin derivatizar. Basándose en estos resultados preliminares promisorios, se llevaron a cabo otros experimentos utilizando otros compuestos de la invención. Estos otros experimentos se describen como sigue.

15

Citotoxicidad de los compuestos de prueba in vitro: Se trataron fibroblastos de pulmón humano (MRC-5, American Type Culture Collection, Rockville, MD) subconfluentes en placas de 24 pocillos con fármacos diluidos en E-MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY) complementado con 2% de suero de feto bovino y antibióticos. Después de 5 días de incubación a 37 °C, se inspeccionó visualmente la monocapa de células bajo aumento y se calculó la concentración de fármaco que causó una reducción del 50% en la cantidad de células.

20

Los datos obtenidos de esos experimentos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Inhibición de la replicación de CMV humano en fibroblastos de pulmón humano MRC-5 analizada mediante reducción de ADN			
Compuesto	CE ₅₀ , μ M	CC ₅₀ , μ M	Índice de selectividad
Cidofovir (CDV)	0.46	>1000	>2174
Cidofovir cíclico (CDVc)	0.47	>1000	>2128
1-O-hexadecilpropanodiol-3-CDV	2 x 10 ⁻⁶	10	5 x 10 ⁶
1-O-hexadecilpropanodiol-3-CDVc	3 x 10 ⁻⁴	320	1 x 10 ⁶
1-O-octadecilpropanodiol-3-CDV	3 x 10 ⁻⁵	32	1 x 10 ⁶
1-O-octadecilpropanodiol-3-CDVc	3 x 10 ⁻⁴	320	1 x 10 ⁶
1-O-octadeciletanodiol-2-CDV	<1 x 10 ⁻⁹	210	2 x 10 ¹¹
1-O-octadeciletanodiol-2-CDVc	3 x 10 ⁻⁴	320	1 x 10 ⁶
Hexadecil-CDVc	0.04	6.5	163
Adefovir (ADV)	55	>1000	>18
1-O-hexadecilpropanodiol-3-ADV	0.10	6.5	65
1-O-octadecil-sn-glicero-3-ADV	0.21	-	-

CE₅₀ - concentración efectiva 50%; CC₅₀ - concentración citotóxica 50%; índice de selectividad - CC₅₀/CE₅₀. Los resultados de CE₅₀ son el promedio de 3 a 6 determinaciones, con la excepción de que ADV es una sola única determinación hecha por duplicado

25

Como indican los resultados mostrados en la tabla 2, los compuestos de la invención son uniformemente más activos y selectivos que cidofovir, cidofovir cíclico y adefovir sin derivatizar.

Ejemplo 18

Efecto de HDP-CDVc sobre la replicación del poxvirus, *in vitro*

Se ensayó la actividad de cidofovir (CDV), cidofovir cíclico (CDVc), y 1-O-hexadecilpropanodiol-3-CDVc (HDP-CDVc) como actividad antiviral en fibroblastos de prepucio humano infectados con virus vaccinia o el virus de la viruela vacuna midiendo la reducción dependiente de la dosis en el efecto citopático (CPE). Se determinaron los valores de CE_{50} para el virus vaccinia y el virus de la viruela vacuna en un ensayo de reducción de CPE en fibroblastos de prepucio humano (HFF). Los datos obtenidos de esta manera se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Fármaco	CE_{50} para vaccinia, μM	CE_{50} para viruela vacuna, μM	Fibroblastos de prepucio humano, CC_{50} , μM
CDV	1.80	2.10	89.8
CDV cíclico	0.97	0.72	>100
HDP-CDVc	0.11	<0.03	>100
Lípido de control	>100	>100	>100

Como se muestra en la tabla 3, HDP-CDVc fue muy activo contra el virus vaccinia con un valor de CI_{50} de 0.11 μM versus 0.97 y 1.8 μM para CDVc y CDV, respectivamente. En las células infectadas con viruela vacuna HDP-CDVc fue extremadamente eficaz con una CI_{50} < 0.03 μM versus 0.72 y 2.1 para CDVc y CDV, respectivamente. Basándose en estos datos preliminares promisorios, se investigaron los efectos de los análogos de cidofovir de la invención sobre la replicación de otros ortopoxvirus.

Ensayo del efecto citopático antiviral para poxvirus(CPE): a cada concentración del fármaco, se infectaron tres pocillos que contenían células Vero con 1000 ufp/pocillo de ortopoxvirus y tres se dejaron sin infectar para la determinación de la toxicidad. Se examinaron las placas y se tiñieron después de haber sido infectadas con el virus, las células sin tratar mostraron un CPE de 4+. Se agregó rojo neutro al medio y se evaluó el CPE mediante absorción de rojo neutro a 540 nm. Se determinaron las concentraciones inhibitoria (CE_{50}) y citotóxica (CC_{50}) 50% de curvas de dosis-respuesta. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

Compuesto	CE_{50} , μM					CC_{50} , μM
	Vaccinia	Viruela vacuna	Variola mayor, Bangladesh	Variola mayor, Yamada	Variola menor, Garcia	
CDV	2.2	3.8	100	-	-	>100
CDVc	-	-	100	-	-	>100
HDP-CDV	<0.03	<0.03	0.0015	0.0015	0.0006	>0.1
HDP-CDVc	0.11	<0.03	>0.01	-	-	>0.1

CE_{50} - concentración efectiva 50%; CC_{50} - concentración citotóxica 50% en células Vero; índice de selectividad - CC_{50}/CE_{50} ; abreviaturas como en la tabla 2. Los resultados son el promedio de 3 determinaciones.

Como se muestra en la tabla 4, los compuestos de la invención fueron sustancialmente más activos que CDV o CDVc sin derivatizar frente al virus vaccinia, de la viruela vacuna y varias cepas de la viruela.

Ejemplo 19

Efecto del 1-O-hexadecilpropanodiol-3-adefovir (HDP-ADV) sobre la replicación del VIH-1, *in vivo*

Los experimentos preliminares de inhibición de la replicación del VIH-1 por los compuestos de la invención se llevaron a cabo como sigue. Los ensayos de fármacos se llevaron a cabo como describieron previamente Larder et. al., Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 34:436-441, 1990. Células HT4-6C infectadas con VIH-1 se expusieron a fármacos como se indicó y se incubaron durante 3 días a 37 °C. Las células se fijaron con cristal violeta para visualizar las placas. Se evaluó la actividad antiviral como el porcentaje de placas de control (no fármaco) medido en muestras tratadas con fármaco. La CE_{50} es la concentración micromolar que reduce el número de placas en 50%. Se comparó la actividad de adefovir con AZT (zidovudina) y 1-O-hexadecilpropanodiol-3-adefovir (HDP-ADV) en células HT4-6C infectadas con VIH-1. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Fármaco	CE ₅₀ , µM, en ensayo de reducción de placas de VIH-1
AZT	0.007
Adefovir	16.0
HDP-ADV	0.0001

5 Adefovir fue moderadamente activo con una CE₅₀ de 16 µM. AZT fue muy activo como se preveía (CE₅₀ 0.007 µM) pero HDP-ADV fue el más activo de los tres compuestos con una CE₅₀ de 0.0001 µM, más de 5 logs más activo que el propio adefovir. Basándose en estos resultados preliminares promisorios, se llevaron a cabo otros experimentos como sigue.

10 *Ensayo antiviral para VIH-1:* se midió el efecto de los compuestos antivirales sobre la replicación del VIH en células HeLa HT4-6C que expresan CD4 mediante un ensayo de reducción de placas (Larder, B.A., Chesebro, B. Y Richman, D.D. Antimicrob. Agents Chemother., 34:436-441, 1990). En resumen, se infectaron monocapas de células HT4-6C con 100-300 unidades formadoras de placa (UFP) del virus por pocillo, en placas de microdilución de 24 pocillos. Se agregaron diversas concentraciones de fármaco al medio de cultivo, medio de Eagle modificado de Dulbecco que contenía 5% de FBS y antibióticos, como se indicó antes. Después de 3 días a 37 °C, las monocapas se fijaron con solución de formaldehído al 10% en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se tiñeron con cristal violeta al 0.25% para visualizar las placas de virus. Se evaluó la actividad antiviral como el porcentaje de 15 placas de control medido en muestras tratadas con fármaco. Se evaluó la citotoxicidad por el método de Hostetler et al., Antiviral Research, 31:59-67, 1996. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6

Inhibición de la replicación del VIH en células HT4-6C por reducción de placas			
Compuesto	CE ₅₀ , µM	CC ₅₀ , µM	Índice de selectividad
Adefovir (ADV)	8.2	>1000	>122
1-O-hexadecilpropanodiol-3-ADV	0.008	6.5	813

CE₅₀ - concentración efectiva 50%; CC₅₀ - concentración citotóxica 50%; índice de selectividad - CC₅₀/CE₅₀. Los valores de CE₅₀ son el promedio de 4 experimentos.

20 Como indican fácilmente los resultados de la tabla 6, el compuesto de la invención 1-O-hexadecilpropanodiol-3-ADV es más activo y selectivo que el adefovir.

25 Ejemplo 21

Efecto de los análogos de cidofovir sobre la replicación del virus del herpes

30 *Ensayo antiviral para el HSV-1:* se inocularon células MRC-5 subconfluentes en placas de cultivo de 24 pocillos eliminando el medio y agregando virus HSV-1 a una dilución que resultará en un CPE de 3-4+ en los pocillos sin fármaco en 20-24 h. Esto se absorbió durante 1 h a 37 °C, se aspiró y se reemplazó con diversas concentraciones de fármacos en E-MEM que contenía 2% de FBS y antibióticos. Después de aproximadamente 24 h de incubación, se cuantificó el ADN de HSV por triplicado mediante hibridación de ácido nucleico usando un kit de prueba de sensibilidad antiviral para HSV de Diagnostic Hybrids, Inc. (Athens, OH). El medio se eliminó y las células se lisaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la absorción del lisado, se hibridaron filtros Hybriwix™ 35 durante toda la noche a 60 °C. Los filtros Hybriwix™ se lavaron durante 30 min a 73 °C y se contaron en un contador gamma. Se evaluó la citotoxicidad como se describe en el ejemplo 17. Los valores de CE₅₀ y CC₅₀ obtenidos de esta manera se muestran en la tabla 7.

Tabla 7

Inhibición de la replicación de HSV humano en fibroblastos de pulmón humano MRC-5 analizada mediante reducción de ADN			
Compuesto	CE ₅₀ , µM	CC ₅₀ , µM	Índice de selectividad
Cidofovir (CDV)	1.20	>1000	> 800
Cidofovir cíclico (CDVc)	2.10	>1000	>475
1-O-hexadecilpropanodiol-3-CDV	4 x 10 ⁻⁷	10	25 x 10 ⁶
1-O-hexadecilpropanodiol-3-CDVc	0.030	320	10,667

Inhibición de la replicación de HSV humano en fibroblastos de pulmón humano MRC-5 analizada mediante reducción de ADN			
Compuesto	CE ₅₀ , μM	CC ₅₀ , μM	Índice de selectividad
1-O-octadecilpropanodiol-3-CDV	0.003	32	10,667
1-O-octadecilpropanodiol-3-CDVc	0.330	320	970
1-O-octadeciletanodiol-2-CDV	0.002	210	105,000
1-O-octadeciletanodiol-2-CDVc	0.008	320	40,000

Las abreviaturas como en la tabla 2 CE₅₀ - concentración efectiva 50%; CC₅₀ - concentración citotóxica 50%; índice de selectividad - CC₅₀/CE₅₀. Los valores de CE₅₀ son el promedio de dos experimentos con la excepción de que HDP-CDV es una sola determinación por duplicado.

Como se muestra en la tabla 7, todos los compuestos de la invención son más activos contra HSV-1 que los fosfonatos de nucleótido sin derivatizar, cidofovir o cidofovir cíclico.

- 5 Aunque la invención precedente ha sido descrita con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad y comprensión, será evidente para los técnicos con experiencia en el área, a la luz de las enseñanzas de esta invención, que pueden efectuársele ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que contiene un monoéster fosfonato formado por una unión covalente de un monofosfonato elegido entre:

- 5 a) cidofovir o tenofovir;
 b) un fosfonato de nucleósido antiviral o antiproliferativo derivado de un nucleósido que tiene un grupo 5'-hidroxilo, donde el fosfonato de nucleósido antiviral o antiproliferativo es un producto de la sustitución del grupo 5'-hidroxilo con una porción fosfonato ($-\text{PO}_3\text{H}_2$) o metileno fosfonato ($-\text{CH}_2-\text{PO}_3\text{H}_2$); y
 10 c) un derivado de citosina arabinósido, gemcitabina, 5-fluorodesoxiuridina ribósido, 2-clorodesoxiadenosina, fludarabina o 1- β -D-arabinofuranosil-guanina;

a una porción $-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{C}_1-\text{C}_{24}$ alquilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la porción $-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{C}_1-\text{C}_{24}$ alquilo es $-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_t-\text{CH}_3$, donde t es 11 a 19.

3. El compuesto de la reivindicación 2, donde t es 15 o 17.

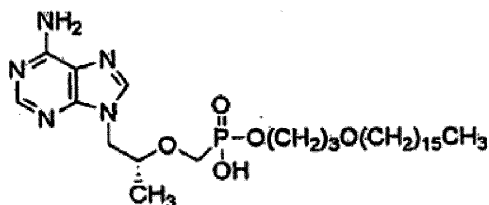
4. El compuesto de la reivindicación 1, donde el éster monofosfonato se forma mediante una unión covalente de cidofovir o tenofovir a la porción $-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{C}_1-\text{C}_{24}$ alquilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5. El compuesto de la reivindicación 4, donde la porción $-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{C}_1-\text{C}_{24}$ alquilo es octadecilpropanodiol o hexadecilpropanodiol.

6. El compuesto de la reivindicación 4 formado mediante la unión covalente de cidofovir a $-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

7. El compuesto de la reivindicación 4 formado mediante una unión covalente de tenofovir a la porción $-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{C}_1-\text{C}_{24}$ alquilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

8. El compuesto de la reivindicación 7, donde la porción $-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{C}_1-\text{C}_{24}$ alquilo es $-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$ y el compuesto formado mediante una unión covalente de tenofovir a $-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$ tiene la estructura:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

9. Una composición que contiene un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un portador farmacéuticamente aceptable.

10. El uso de un compuesto para la preparación de un medicamento destinado a tratar una enfermedad viral en un sujeto que lo necesita, donde dicho compuesto es un compuesto de la reivindicación 1 a 8 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

11. El uso de la reivindicación 10, donde dicha enfermedad viral se elige entre el virus de la inmunodeficiencia humana, la gripe, el virus del herpes simple, el virus del herpes humano, el citomegalovirus, los virus de la hepatitis B y C, el virus de Epstein-Barr, el virus varicela-zóster, el orthopoxvirus, el virus del Ébola y el virus de los papilomas.

12. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar en el tratamiento de una enfermedad viral.

13. El compuesto de la reivindicación 12, donde dicha enfermedad viral se elige entre el virus de la inmunodeficiencia humana, la gripe, el virus del herpes simple, el virus del herpes humano, el citomegalovirus, los virus de la hepatitis B y C, el virus de Epstein-Barr, el virus varicela-zóster, el orthopoxvirus, el virus del Ébola y el virus de los papilomas.

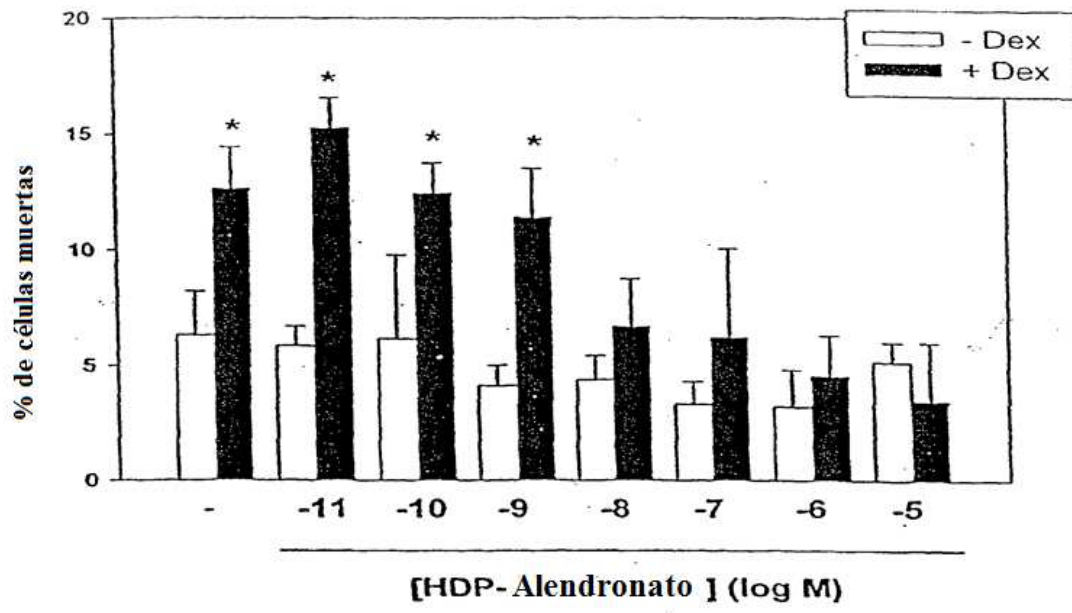


Figura 1

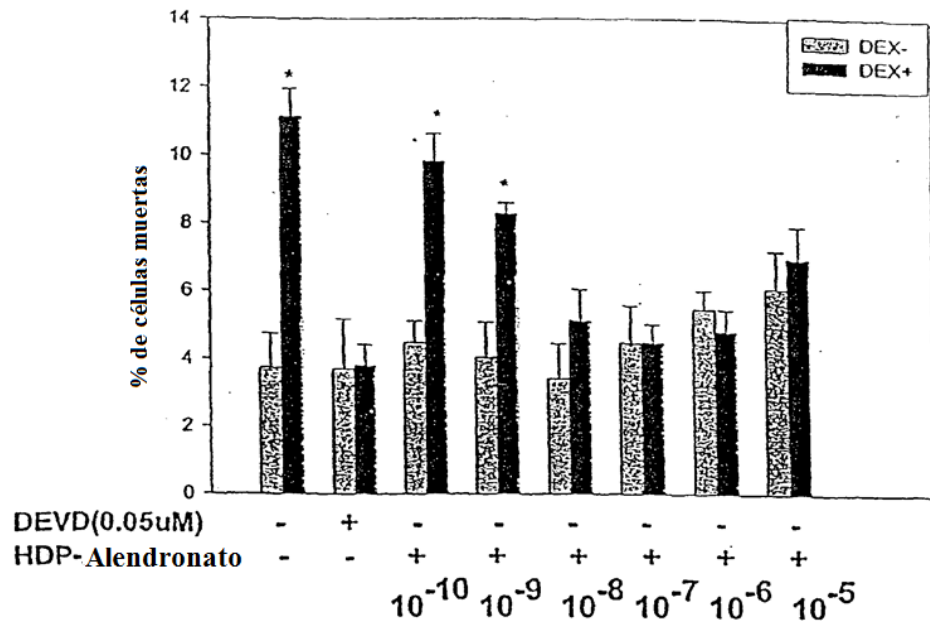


Figura 2