

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 527**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 31/4196** (2006.01)  
**A61K 31/135** (2006.01)  
**A61K 31/513** (2006.01)  
**A61K 31/5375** (2006.01)  
**A61K 31/661** (2006.01)  
**A61P 31/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2006 E 06741437 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 1877091**

54 Título: **Método para mejorar la farmacocinética de los inhibidores de las proteasas y de los precursores de los inhibidores de las proteasas**

30 Prioridad:

**27.04.2005 US 675082 P**

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

**01.07.2015**

73 Titular/es:

**TAIMED BIOLOGICS, INC. (100.0%)**  
**Rm. E 1803, 18F., No. 3, Yuan-Qu St, Nangang**  
**Dist**  
**Taipei City 115, TW**

72 Inventor/es:

**WU, JINZI J.;**  
**STRANIX, BRENT RICHARD;**  
**GE, MICHAEL;**  
**MILOT, GUY;**  
**PETRELLA, MARCO y**  
**PANCHAL, CHANDRA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 539 527 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

Método para mejorar la farmacocinética de los inhibidores de las proteasas y de los precursores de los inhibidores de las proteasas

Área técnica de la invención

5 Esta invención se refiere a compuestos y composiciones para utilizar en la mejora de la farmacocinética de los inhibidores de las proteasas y de los precursores de los inhibidores de las proteasas y a composiciones farmacéuticas relacionadas. Más particularmente, la presente invención se refiere a compuestos y composiciones para utilizar en la mejora de la farmacocinética de los inhibidores de las proteasas y de los precursores de los inhibidores de las proteasas mediante coadministración de ritonavir.

10 Antecedentes de la invención

Los inhibidores de la proteasa viral del VIH se desarrollaron recientemente y su uso comenzó recién en 1996. En la actualidad, se consideran los fármacos más eficaces contra la infección por el VIH. Desafortunadamente, los inhibidores de las proteasas más comunes, son moléculas hidrófobas relativamente grandes que poseen una biodisponibilidad bastante baja. Por consiguiente, se requiere una carga de pastillas muy alta para alcanzar la dosis terapéutica en un paciente. Esto es un elemento desestimulante, que muy a menudo causa la falta de adhesión del paciente y resultados de tratamiento inadecuados. Esta situación lleva a una concentración terapéutica del fármaco inferior a la óptima que a su vez lleva al desarrollo de cepas de VIH resistentes. En consecuencia, existe una necesidad urgente de mejorar la solubilidad y la biodisponibilidad de los inhibidores de las proteasas.

Se han desarrollado ejemplos de compuestos mejorados en forma de profármacos inhibidores de la aspartil proteasa como los descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 6,436,989 para Hale et al. Esta patente muestra una nueva clase de moléculas caracterizada por una solubilidad acuosa favorable, una elevada biodisponibilidad oral y una generación fácil del principio activo *in vivo*. No obstante, es bien sabido que el VIH tiene la capacidad de desarrollar resistencia a los fármacos disponibles en la actualidad. Por lo tanto, existe la necesidad de inhibidores de la proteasa del VIH alternativos que sean activos frente a cepas virales silvestres y resistentes. Por consiguiente, es deseable que las moléculas derivadas de los inhibidores actuales de la proteasa del VIH que muestran una mayor solubilidad y biodisponibilidad, luchen contra cepas virales resistentes.

En la patente de Estados Unidos N° 6,632,816 para Stranix et al. se describe una única clase de derivados aromáticos que son inhibidores de las aspartil proteasas.

Esta patente incluye, más particularmente, derivados de L-lisina sustituidos con *N*-aminoácidos sintéticos que poseen potentes propiedades inhibitorias de la aspartil proteasa. Sin embargo, sería ventajoso mejorar estos derivados aumentando la solubilidad acuosa y la biodisponibilidad para reducir la carga de pastillas y favorecer la adhesión del paciente al tratamiento. Puesto que es desafiante generar inhibidores de las proteasas que sean activos específicamente contra cepas silvestres y resistentes, la formación de derivados de los inhibidores originales de la proteasa del VIH como los inhibidores descritos en la patente de Estados Unidos N° 6,632,816 para Stranix et al, que se sabe que son activos contra cepas resistentes, representa una ruta viable con considerables ventajas. Más particularmente, es deseable la generación de compuestos y formulaciones que tengan mayor solubilidad acuosa, biodisponibilidad oral, tiempo de duración y propiedades de formulación, junto con otras ventajas, en el desarrollo de un fármaco eficaz. Por lo tanto, son deseables inhibidores de las proteasas con una mejor farmacocinética.

40 Resumen de la invención

En este documento se describen compuestos a base de lisina con mayor solubilidad y mejor biodisponibilidad oral y fueron descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 10/902,935 presentada el 2 de agosto de 2004 y publicada el 2 de febrero de 2006 con el N° 2006/0025592A1. Estos compuestos se escinden fácilmente *in vivo* para liberar un principio activo que tiene afinidad por las aspartil proteasas y que puede actuar como un inhibidor de las proteasas. Más particularmente, el principio activo puede unirse, por ejemplo, a una aspartil proteasa del VIH (patente de Estados Unidos N° 6,632,816) y puede inhibir a esta enzima. Los compuestos a base de lisina también se denominan en este documento precursores de los inhibidores de las proteasas.

En condiciones fisiológicas *in vivo* (por ej., condiciones metabólicas, entéricas y/o gastrointestinales, etc.) los compuestos a base de lisina, permiten la liberación de un inhibidor de las proteasas (por ej., un inhibidor de la aspartil proteasa). Los compuestos a base de lisina pueden servir por lo tanto como medios para mejorar la solubilidad y/o la biodisponibilidad de los inhibidores de las proteasas y por consiguiente pueden reducir la carga de pastillas y/o reducir la dosificación necesaria para la inhibición. En consecuencia, puede tener lugar un mejor tratamiento de los pacientes infectados por el VIH y una adhesión favorable de los mismos.

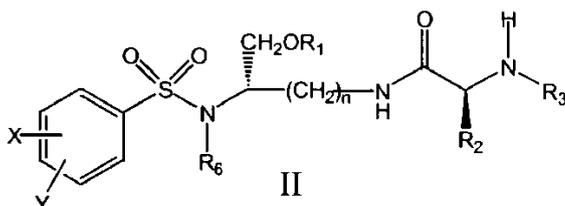
Los compuestos a base de lisina descritos en este documento se pueden usar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos o profilácticos para el tratamiento o la profilaxis de la infección por VIH.

El principio activo cuando se libera del compuesto a base de lisina puede actuar, por ejemplo, sobre la aspartil proteasa del VIH-1 incluidas las cepas virales de VIH-1 mutadas y no mutadas (por ej., NL4.3) así como sobre la proteasa del VIH-2 (mutado o no mutado) o incluso sobre las proteasas de virus relacionados (por ej. retrovirus (por ej. VIS, etc.) etc.).

- 5 En este documento se investiga otra manera de mejorar la farmacocinética de los compuestos a base de lisina descritos aquí o de los principios activos dados a conocer en la patente de Estados Unidos N° 6,632,816 para Stranix et al.

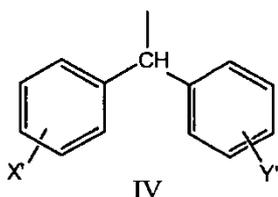
De conformidad con la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que contiene:

un compuesto a base de lisina de fórmula II



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde:

15 n es 4,  
X es 4-NH<sub>2</sub>,  
Y es H  
R<sub>6</sub> es *iso*-butilo,  
R<sub>3</sub> es CH<sub>3</sub>O-CO-  
X' e Y' son H,  
R<sub>2</sub> es un grupo difenilmetilo de fórmula IV



R<sub>1</sub> es (HO)<sub>2</sub>P(O);

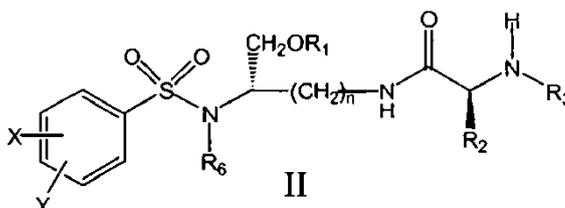
ritonavir; y

un portador farmacéuticamente aceptable;

25 donde la relación (p/p) entre dicho compuesto a base de lisina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y ritonavir, es de 6:1 a 3:1. La composición farmacéutica es capaz de mejorar la farmacocinética de un compuesto a base de lisina.

La presente invención también proporciona una combinación farmacéutica que contiene:

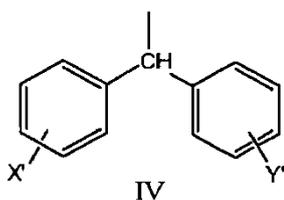
un compuesto a base de lisina de fórmula II



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde:

n es 4,  
X es 4-NH<sub>2</sub>,  
Y es H  
R<sub>6</sub> es *iso*-butilo,  
R<sub>3</sub> es CH<sub>3</sub>O-CO-

X' e Y' son H,  
R<sub>2</sub> es un grupo difenilmetilo de fórmula IV



R, es (HO)<sub>2</sub>P(O); y

5 ritonavir;

donde la relación (p/p) entre dicho compuesto a base de lisina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y ritonavir, es de 6:1 a 3:1.

10 El ritonavir y el compuesto de fórmula III o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden administrar por separado, simultáneamente o secuencialmente. El ritonavir y el compuesto de fórmula II o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden administrar a diferentes intervalos de tiempo.

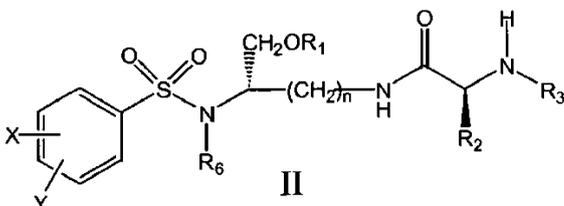
15 Por ejemplo, cuando se administra una combinación de un compuesto de fórmula III (o una de sus sales farmacéuticamente aceptables) y ritonavir, los dos agentes terapéuticos se pueden formular como composiciones separadas que se pueden administrar por separado al mismo tiempo o en diferentes momentos, usando la misma vía de administración o vías diferentes, en el mismo lugar de administración o en lugares de administración diferentes, etc. Alternativamente, los agentes terapéuticos se pueden administrar como una única composición ya sea por vía oral, por inyección, etc.

La composición farmacéutica de la invención o la combinación farmacéutica de la invención según se describen en este documento se pueden usar para el tratamiento o la prevención de una infección retroviral (por ej., VLTH, VIH, es decir, VIH-1, VIH-2) o para el tratamiento o la prevención del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

20 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un compuesto a base de lisina de fórmula II, en el que n, X, Y, X', Y', R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>6</sub> son los definidos en este documento, o a una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y ritonavir, en la fabricación de un fármaco (o una composición farmacéutica) para el tratamiento o la prevención de una infección por VIH (para reducir el riesgo o la probabilidad de infección por VIH), o nuevamente para reducir la carga del VIH en un mamífero que lo necesita o para el tratamiento o la prevención del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (para reducir el riesgo o la probabilidad de sufrir SIDA) para retrasar la aparición del SIDA (síntomas) o para disminuir los síntomas del SIDA en un mamífero que lo necesita, donde la relación (p/p) entre el compuesto a base de lisina y ritonavir es de 6:1 a 3:1.

30 Un "mamífero que lo necesita" se debe entender aquí, sin limitación, como un individuo infectado con VIH (es decir en cualquier etapa de la infección por VIH, por ej., infección primaria, sintomática, asintomática, SIDA) o que corre riesgo de sufrir una infección por VIH. Un "mamífero que lo necesita" por consiguiente, puede comprender, además de los individuos que tienen una infección por VIH aguda, una infección por VIH crónica o SIDA, individuos (por ej., trabajadores de la salud, un individuo que tiene relaciones sexuales sin protección, policías, etc.) que pueden, por ejemplo, haber tenido contacto con una posible fuente de contaminación con VIH.

La presente invención, proporciona además el compuesto a base de lisina de fórmula II



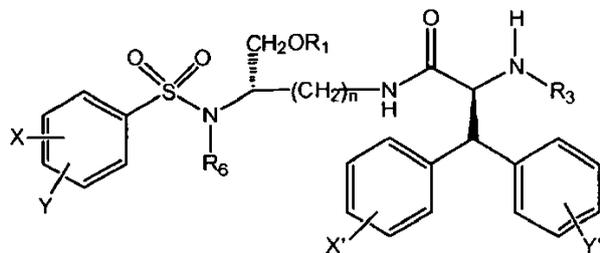
35 en el que n, X, Y, X', Y', R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>6</sub> son los definidos en la reivindicación 1, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y

40 ritonavir para usar en el tratamiento o la prevención de una infección por VIH o tratar o prevenir el SIDA, donde el ritonavir está en una cantidad que es suficiente para reducir el metabolismo del compuesto a base de lisina de fórmula II y donde la relación (p/p) entre dicho compuesto a base de lisina y ritonavir es de 6:1 a 3:1.

Asimismo, de conformidad con la presente invención, la composición farmacéutica se puede administrar, por ejemplo, por vía oral.

Además, de conformidad con la presente invención, la composición farmacéutica se puede administrar, por ejemplo, dos veces al día.

El compuesto a base de lisina de fórmula II que se puede usar para llevar a cabo la presente invención también puede ser representado por un compuesto de fórmula IIa;



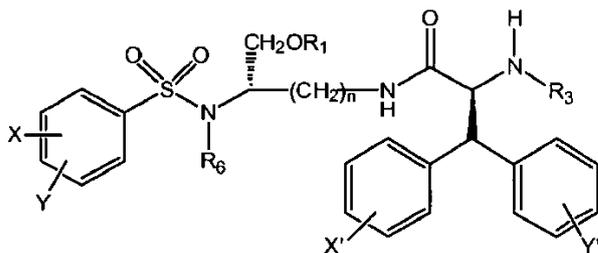
5 **IIa**

y sus sales farmacéuticamente aceptables (por ej., cuando el compuesto de la presente invención contiene un grupo amino, la sal farmacéuticamente aceptable puede ser una sal de amonio),

donde R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub>, n, X, Y, X', Y' son los definidos en este documento.

Más particularmente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que puede contener;

10 a) un compuesto de fórmula IIa



**IIa**

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde X, Y, X', Y', n, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>6</sub> son los definidos en este documento;

b) ritonavir, y;

15 c) un portador farmacéuticamente aceptable, donde la relación (p/p) entre dicho compuesto a base de lisina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y ritonavir, es de 6:1 a 3:1.

Cualquier compuesto que sea un precursor de un principio activo descrito en este documento se puede usar para llevar a cabo la presente invención y también está comprendido por la misma.

20 Además, de conformidad con la presente invención, la administración del compuesto de fórmula II y ritonavir se puede realizar por ejemplo por separado, simultáneamente o secuencialmente.

De conformidad con una realización particular de la presente invención, la administración del compuesto de fórmula II y ritonavir se puede realizar, por ejemplo, administrando a) una primera composición farmacéutica que puede contener un compuesto de fórmula II y un portador farmacéuticamente aceptable y b) una segunda composición farmacéutica que puede contener ritonavir y un portador farmacéuticamente aceptable.

25 Además, de conformidad con la presente invención, la administración del compuesto de fórmula II y ritonavir se puede realizar, por ejemplo, administrando una única composición farmacéutica que puede contener un compuesto de fórmula II, ritonavir y un portador farmacéuticamente aceptable.

De conformidad con una realización de la presente invención, el VIH puede ser VIH-1.

30 Asimismo, de conformidad con una realización de la presente invención, el VIH puede ser uno que tenga menor sensibilidad al ritonavir.

Adicionalmente, de conformidad con una realización de la presente invención, el VIH-1 puede ser uno que posea una aspartil proteasa que tenga una o más mutaciones (una mutación que le confiera resistencia a uno o más de los inhibidores de las proteasas mencionados en este documento).

5 Los compuestos indicados en este documento son realizaciones ejemplares de los compuestos que se pueden utilizar para llevar a cabo la presente invención y se debe entender que la presente invención no está restringida únicamente a estos compuestos.

10 La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para tratar, prevenir o reducir el riesgo o la probabilidad de infección por VIH o reducir la carga del VIH. La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" también se refiere a una cantidad eficaz para tratar, prevenir o reducir el riesgo o la probabilidad de sufrir el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), para retrasar la aparición de SIDA, o para reducir los síntomas de SIDA. También se debe entender que en este documento una "cantidad farmacéuticamente eficaz" puede ser interpretada como una cantidad que produce el efecto terapéutico deseado, administrada en una única dosis o en múltiples dosis, o en cualquier dosificación o vía de administración, o administrada sola o en combinación con otros agentes terapéuticos. En el caso de la presente invención, una "cantidad farmacéuticamente eficaz" se debe entender como una cantidad que tiene un efecto inhibitorio (parcial o total) sobre el ciclo de infección (por ej., inhibición de la replicación, reinfección, maduración, gemación, etc.) del VIH (VIH-1 y VIH-2 así como virus relacionados (por ej., VLTH-I y VLTH-II, y virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS))) y sobre cualquier organismo que dependa de las aspartil proteasas para su ciclo de vida. Un efecto inhibitorio se debe entender en este documento como un efecto como la reducción en la capacidad de un organismo (por ej. el VIH) para reproducirse (replicarse), para reinfectar las células circundantes, etc., o incluso como una inhibición completa (o eliminación) de un organismo.

Las expresiones "proteasa del VIH" y "aspartil proteasa del VIH" se usan indistintamente e incluyen, por ejemplo, la aspartil proteasa codificada por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 o 2.

25 La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para prevenir o reducir el riesgo o la probabilidad de infección por VIH en un paciente. Según se usa en este documento, el término "paciente" o "individuo" se refiere a un mamífero, incluido por ejemplo, un ser humano.

Las expresiones "portador farmacéuticamente aceptable", "adyuvante farmacéuticamente aceptable" y "vehículo fisiológicamente aceptable" se refieren a un portador o adyuvante atóxico que puede ser administrado a un paciente, junto con uno o más compuestos de la presente invención, y que no destruye la actividad farmacológica de éstos.

30 El término "precursor" se refiere a un compuesto, como un compuesto a base de lisina que es capaz de convertirse en un principio activo *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, el compuesto PL-461 es un precursor del compuesto PL-100, cuando se administra a un individuo, PL-461 se convierte en PL-100 *in vivo* (por ej., en condiciones fisiológicas).

El término "derivado" se refiere a un compuesto que ha sido sintetizado químicamente a partir de un compuesto original. Por ejemplo, cuando se considera la síntesis química de PL-461, PL-461 es un derivado de PL-100.

35 La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición farmacéutica incluye los materiales especificados y puede incluir otro material que no afecte materialmente las características básicas de la composición farmacéutica.

40 En este documento se describen los derivados farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula II y cuando corresponda sus sales farmacéuticamente aceptables como, por ejemplo, las sales de amonio. Un "derivado farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal, éster o sal de dicho éster, farmacéuticamente aceptable, de un compuesto de esta invención o de cualquier otro compuesto que, luego de la administración a un receptor (un mamífero), sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un principio activo o un metabolito o residuo de éste activo como antiviral.

45 Se debe entender que en este documento "un grupo alquilo lineal de 1 a 6 átomos de carbono" incluye por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo.

Se debe entender que en este documento "un grupo alquilo ramificado de 3 a 6 átomos de carbono" incluye por ejemplo, pero no exclusivamente, *iso*-butilo, *tert*-butilo, 2-pentilo, 3-pentilo, etc.

Se debe entender que en este documento, un "grupo cicloalquilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono" incluye por ejemplo, pero no exclusivamente, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo (es decir, C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>).

50 Las sales derivadas de bases adecuadas incluyen sales de metales alcalinos (por ej. sodio), metales alcalinotérreos, (por ej. magnesio), amonio y N-(C<sub>1-4</sub>alquil)<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Los compuestos descritos en este documento contienen uno o más átomos de carbono asimétricos y por lo tanto pueden estar como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, mezclas de diastereoisómeros y

diastereoisómeros individuales. Todos esos isómeros de esos compuestos están expresamente incluidos en la presente invención. Cada carbono estereogénico puede tener la configuración R o S.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en este documento incluyen las derivadas de bases y ácidos inorgánicos y orgánicos adecuados. Los ejemplos de dichas sales de ácido incluyen: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilhidrógenosulfato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftilsulfonato, nicotinato, nitrato, oxalato, pamoato, pectinato, perclorato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato.

Los compuestos que están comprendidos por la presente invención también contemplan la cuaternización de todos los grupos que contengan nitrógeno básico de los compuestos dados a conocer en este documento. El nitrógeno básico puede ser cuaternizado con cualquier agente conocido por los expertos en el área incluidos, por ejemplo, haluros de alquilo inferiores, como cloruros, bromuro y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo incluidos sulfatos de dimetilo, dibutilo y diamilo; haluros de cadena larga como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, y haluros de aralquilo incluidos bromuro de bencilo y fenetilo. Se pueden obtener productos solubles o dispersables en agua o aceite mediante dicha cuaternización.

En este documento se debe entender que si se menciona un "rango" o "grupo de sustancias" con respecto a una característica particular (por ej., temperatura, concentración, tiempo) de la presente invención, la presente invención se refiere a, e incorpora explícitamente, todos y cada uno de los miembros específicos y la combinación de los subrangos o los subgrupos no importa cuales. Por lo tanto, cualquier rango o grupo especificado se debe entender como una forma taquigráfica de referirse a cada uno y a todos los miembros de un rango o grupo individualmente, así como a cada uno y a todos los posibles subrangos o subgrupos comprendidos en ellos; y análogamente con respecto a todos los subrangos o subgrupos comprendidos dentro de ellos. Así, por ejemplo,

- con respecto al número de átomos de carbono, la mención del rango de 1 a 6 átomos de carbono se debe entender que incorpora cada uno y todos los números individuales de átomos de carbono así como los subrangos como, por ejemplo, 1 átomo de carbono, 3 átomos de carbono, 4 a 6 átomos de carbono, etc.
- con respecto al tiempo de reacción, un tiempo de 1 minuto o más se debe entender que incorpora específicamente cada uno y todos los tiempos individuales, así como los subrangos, por encima de 1 minuto, como por ejemplo, 1 minuto, 3 a 15 minutos, 1 minuto a 20 horas, 1 a 3 horas, 16 horas, 3 horas a 20 horas, etc.;
- y análogamente con respecto a otros parámetros como concentraciones, elementos, etc.

En particular se debe entender que cada una de las fórmulas de los compuestos incluye cada uno y todos los compuestos individuales descritos por ellas así como cada una y todas las posibles clases o subgrupos o subclases de los compuestos ya sea que dichas clases o subclases estén definidas como incluyendo positivamente compuestos particulares, como excluyendo compuestos particulares o una combinación de ambas; por ejemplo una definición excluyente para la fórmula (por ej. I) puede decir lo siguiente: "siempre que cuando uno de A y B es -COOH y el otro es H, -COOH no puede ocupar la posición 4".

Se debe entender que "g" o "gm" es una referencia a la unidad de peso gramo y "C", o "°C" es una referencia la unidad de temperatura Celsius.

Los compuestos descritos en este documento se pueden preparar fácilmente utilizando técnicas convencionales a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Las descripciones detalladas de estos métodos se presentan, por ejemplo, en los esquemas 1 a 5 que se tratan más adelante.

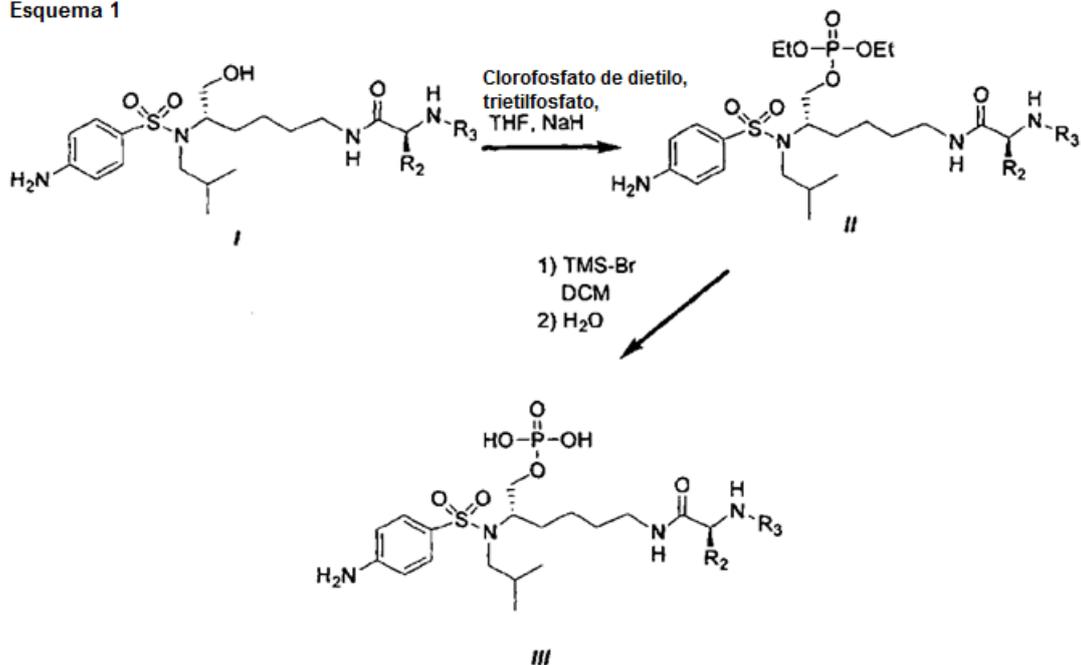
El esquema 1 ilustra un ejemplo genérico para la preparación del monoéster de fosfato III derivado de un alcohol primario (véase I), un compuesto de los inhibidores de la proteasa del VIH (véase el ejemplo 1 (pasos G y H) en la porción experimental de este documento para un ejemplo específico de esta síntesis).

Nota:

- a) R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son los definidos en este documento.

La síntesis del monoéster de fosfato III puede usar un inhibidor de la aspartil proteasa del VIH (I, véase patente de Estados Unidos Nº 6,632,816) como material de partida. El fosfotriéster de dietilo II se obtuvo con buen rendimiento luego del tratamiento con clorofosfato de dietilo e hidruro de sodio en una mezcla de tetrahidrofurano y trietilfosfato. Después, la adición de bromuro de trimetilsililo en diclorometano (DCM) dio el compuesto III con rendimientos de buenos a excelentes.

Esquema 1

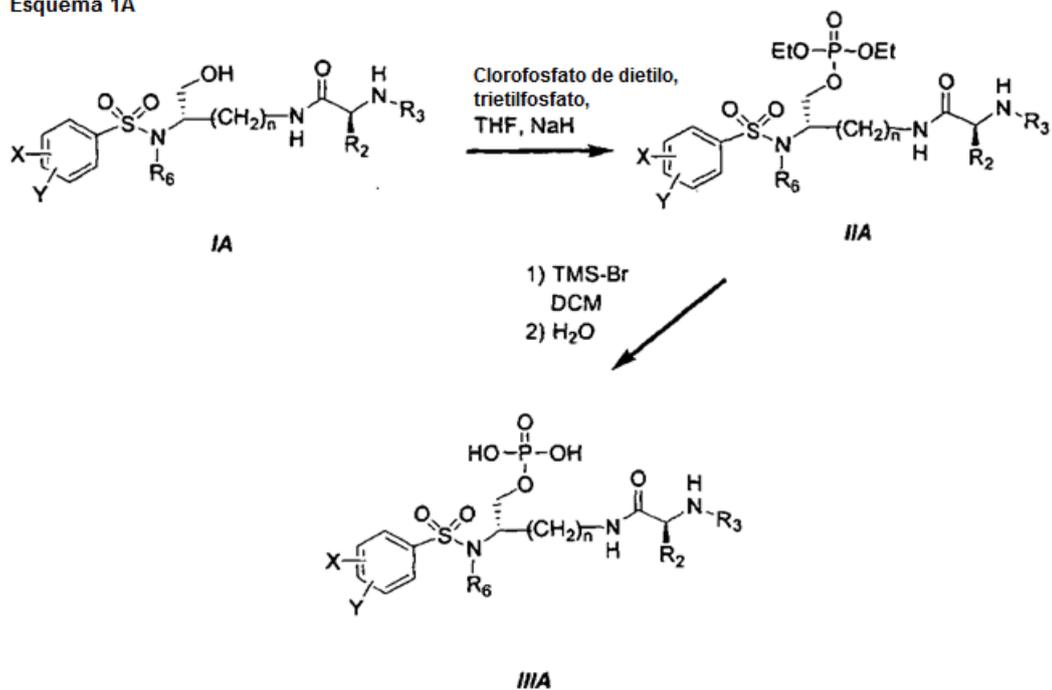


El esquema 1A representa otro ejemplo genérico para la preparación del monoéster de fosfato *III*A derivado de un alcohol primario (véase *IA*), un compuesto de los inhibidores de la proteasa del VIH.

Nota:

- 5 a) n, X, Y, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>6</sub> son los definidos en este documento.

Esquema 1A



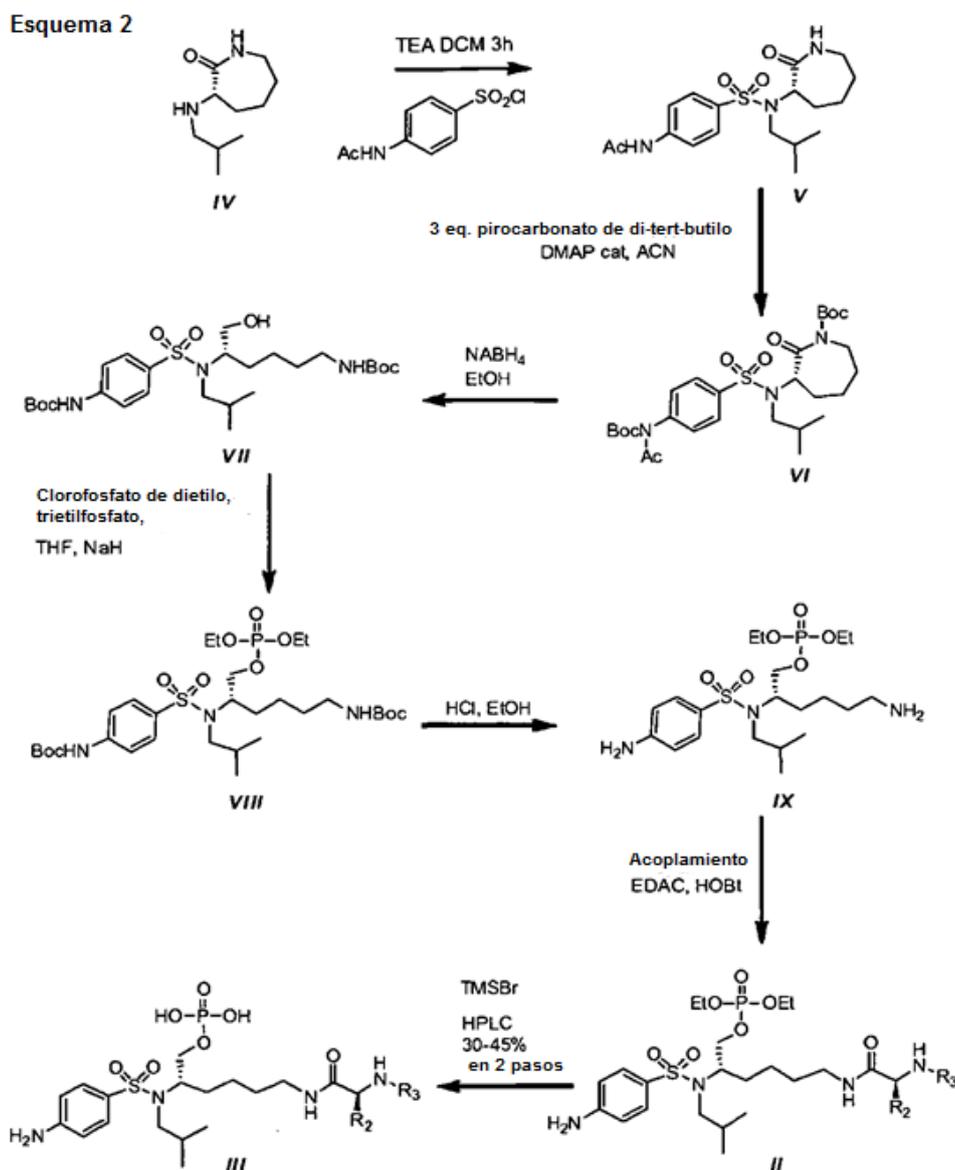
La síntesis del monoéster de fosfato *III*A se realiza como se describe para la preparación de *III* (esquema 1).

El esquema 2 ilustra un ejemplo genérico para la preparación del monoéster de fosfato *III*, un compuesto de los inhibidores de la proteasa del VIH, con un método diferente partiendo de (3S)-3-isobutilamino-azepan-2-ona (*IV*).

Nota:

a) R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son los definidos en este documento.

Como se muestra en el esquema 2, el derivado del monoéster de fosfato III se obtuvo a partir de (3S)-3-isobutilamino-azepan-2-ona (IV) en una secuencia de reacción de siete pasos. Inicialmente, se sulfonó (2S)-3-isobutilamino-azepan-2-ona (IV) con cloruro de 4-acetamidobencenosulfonilo en presencia de trietilamina en diclorometano para dar el compuesto V en excelentes rendimientos. El derivado VI se obtuvo cuantitativamente luego del tratamiento de V con pirocarbonato de di-*tert*-butilo y DMAP en acetonitrilo. La apertura reductora del anillo con borohidruro de sodio en etanol condujo a los productos intermedios clave VII con un buen rendimiento. El fosfotriéster de dietilo VIII se obtuvo con buen rendimiento luego del tratamiento con clorofosfato de dietilo e hidruro de sodio en una mezcla de tetrahidrofurano y trietilfosfato. Se eliminaron los grupos protectores Boc luego del tratamiento con HCl en etanol para dar el compuesto IX cuantitativamente (T.W. Greene y P. G. M. Wuts, Protective groups in Organic Synthesis, 3ª edición, John Wiley & Sons, Inc. 1999). Después, el acoplamiento del grupo amino libre presente en el producto intermedio IX con diversos aminoácidos sintéticos en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDAC) condujo el derivado II con rendimientos de buenos a excelentes. Finalmente, la adición de bromuro de trimetilsililo en diclorometano (DCM) dio el compuesto III con excelente rendimiento.

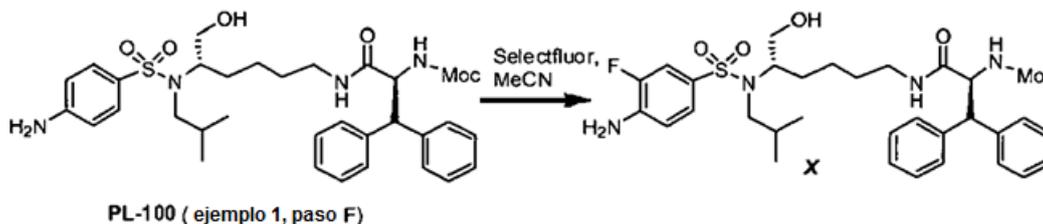


El esquema de referencia 3 presenta la transformación de un derivado difenilmetilo; éster metílico del ácido (1S,5S)-(1-{5-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-hidroxi-hexilcarbamoil}-2,2-difenil-etil)-carbámico (PL-100) en el análogo fluorado de su sal de sodio del monoéster de fosfato XI. Esta secuencia de reacción se puede usar para

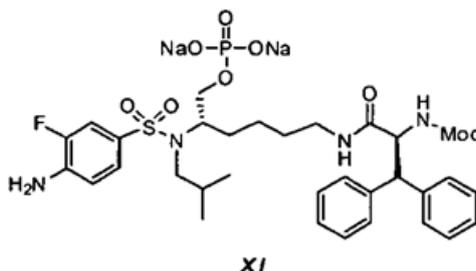
producir cualquier otro compuesto similar (compuestos) hecho de grupos difenilmetilo, 1-naftilo, 2-naftilo, bifenilo y 9-antrilo no sustituidos (o sustituidos), descritos en este documento.

- 5 Por lo tanto, el tratamiento de PL-100 con Selectfluor™ en acetonitrilo dio el derivado X con un rendimiento de 38%. La introducción del grupo monoéster de fosfato se realizó como se describió previamente en los esquemas 1 y 2. En primer lugar, el producto intermedio fosforiérster de dietilo se obtuvo con buen rendimiento luego del tratamiento con clorofosfato de dietilo e hidruro de sodio en una mezcla de tetrahidrofurano y trietilfosfato. En segundo lugar, la adición de bromuro de trimetilsililo en diclorometano (DCM) dio el compuesto monoéster de fosfato con rendimientos de buenos a excelentes. El producto final XI se obtuvo fácilmente luego del tratamiento del monoéster de fosfato con una solución de hidróxido de sodio con buenos rendimientos.

Esquema de referencia 3



1) Clorofosfato de dietilo,  
 trietilfosfato  
 THF, NaH,  
 2) TMS-Br, DCM  
 3) NaOH



- 10 Como apreciará un experto en el área, los esquemas de síntesis anteriores no pretenden ser una lista exhaustiva de todos los medios por los cuales los compuestos descritos en esta solicitud se pueden sintetizar sino que representan únicamente una ejemplificación de métodos de síntesis entre otros. Otros métodos serán evidentes para los expertos.
- 15 Los compuestos descritos en este documento se pueden modificar agregándoles funcionalidades adecuadas para aumentar las propiedades biológicas selectivas. Dichas modificaciones pueden incluir las que aumentan la penetración biológica en un sistema biológico dado (por ej. sangre, sistema linfático, sistema nervioso central), que aumentan la biodisponibilidad oral, que aumentan la solubilidad para permitir la administración por inyección, que alteran el metabolismo y alteran la velocidad de excreción.
- 20 Según se trató antes, los compuestos a base de lisina pueden liberar principios activos que son excelentes ligandos de las aspartil proteasas, por ejemplo de la proteasa del VIH-1. Concordantemente, estos compuestos, al liberar el principio activo, también son capaces de dirigirse a, e inhibir, eventos de etapas posteriores de la replicación, es decir, el procesamiento de las poliproteínas virales por la proteasa codificada por el VIH. Los compuestos descritos en este documento inhiben de manera ventajosa la capacidad del virus VIH-1 para infectar los linfocitos T humanos
- 25 inmortalizados durante un periodo de días, según se determinó por un ensayo que mide la cantidad de antígeno p24 extracelular; un marcador específico de la replicación viral (véase, Meek et al., Nature, 343, pp. 90-92 (1990)).
- Además de su uso en la profilaxis o el tratamiento de la infección por VIH o VLTH, la combinación descrita aquí también se puede usar como agente inhibidor o interruptor para otros virus que emplean aspartil proteasas, semejantes a las aspartil proteasas del VIH o el VLTH, en su ciclo de vida. Dichos compuestos inhiben el procesamiento proteolítico de los precursores de las poliproteínas virales al inhibir la aspartil proteasa. Debido a que
- 30 la aspartil proteasa es esencial para la producción de viriones maduros, la inhibición de ese procesamiento bloquea eficazmente la diseminación del virus al inhibir la producción y la reproducción de los viriones infecciosos, particularmente de las células infectadas aguda y crónicamente. Los compuestos descritos aquí inhiben ventajosamente las aspartil proteasas, bloqueando de esa manera la capacidad de las aspartil proteasas para catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos.
- 35

La combinación descrita en este documento se puede emplear de manera convencional para el tratamiento o la prevención del VIH o el VLTH, y otras infecciones virales que involucran aspartil proteasas en su ciclo de vida (replicación). Dichos métodos de tratamiento, sus niveles de dosificación y requerimientos, pueden ser elegidos por los expertos en el área entre métodos y técnicas disponibles. Por ejemplo, la combinación de un compuesto como el descrito en este documento y un inhibidor de CYP450, se puede asociar con un adyuvante farmacéuticamente aceptable para la administración de manera farmacéuticamente aceptable a un paciente infectado por un virus y en una cantidad eficaz para disminuir la gravedad de la infección viral.

Alternativamente, la combinación descrita antes se puede usar en vacunas y métodos para proteger a los individuos contra las infecciones virales durante un período prolongado. La combinación se puede emplear en dichas vacunas ya sea sola o con otros compuestos de esta invención de manera compatible con el uso convencional de los inhibidores de las proteasas o los derivados de los inhibidores de las proteasas en vacunas. Por ejemplo, la combinación de un compuesto como los descritos antes con ritonavir se puede combinar con adyuvantes farmacéuticamente aceptables, o sistemas de administración empleados convencionalmente en vacunas y administrar en cantidades profilácticamente eficaces para proteger individuos durante un período prolongado contra las infecciones virales, como la infección por el VIH. Como tales, los nuevos compuestos de la presente invención (luego de la escisión de una unidad fisiológicamente escindible) se pueden administrar en combinación con ritonavir como agentes terapéuticos para tratar o prevenir infecciones virales incluida la infección por el VIH, en un mamífero, e incluidos el tratamiento o la prevención del SIDA.

La combinación de los compuestos descritos en este documento con ritonavir se puede administrar a un paciente sano o infectado por el VIH (antes o después del inicio de los síntomas del SIDA) como un único agente o en combinación con otros antivirales que interfieran con el ciclo de replicación del VIH. Al administrar los compuestos de la presente invención con otros antivirales que se dirigen a diferentes eventos en el ciclo de vida viral, el efecto terapéutico de esos compuestos se potencia. Por ejemplo, el antiviral coadministrado puede ser uno que se dirija a eventos tempranos en el ciclo de vida viral, como la unión a las células del receptor y la entrada en la célula, la transcripción inversa y la integración del ADN viral en el ADN celular. Los antivirales que se dirigen a dichos eventos tempranos del ciclo de vida incluyen, entre otros, polisacáridos polisulfatados, sT4 (CD4 soluble) y otros compuestos que bloquean la unión del virus a los receptores CD4 en los linfocitos T que acarrean CD4 y otras células CD4(+), o inhiben la fusión de la envoltura viral con la membrana citoplasmática, y didanosina (ddl), zalcitabina (ddC), estavudina (d4T), zidovudina (AZT) y lamivudina (3TC) que inhiben la transcripción inversa. Por ejemplo se puede utilizar otro inhibidor de la proteasa con compuestos de la presente invención. También se pueden coadministrar otros fármacos antirretrovirales y antivirales con los compuestos de esta invención para proporcionar un tratamiento terapéutico destinado a reducir sustancialmente o eliminar la infectividad viral y los síntomas asociados a ella. Los ejemplos de otros antivirales incluyen ganciclovir, didesoxicitidina, fosfonoformiato trisódico, eflomitina, ribavirina, aciclovir, alfa-interferón y trimenotrexato. Además, se pueden utilizar otros tipos de fármacos para potenciar el efecto de los compuestos de esta invención, como inhibidores de la desensvoladura del virus, inhibidores de proteínas transactivantes Tat o Rev, moléculas antisentido o inhibidores de la integrasa viral. Estos compuestos también se pueden coadministrar con otros inhibidores de la aspartil proteasa del VIH. Además, se puede encontrar útil administrar compuestos de la presente invención con cualquier otro fármaco (otros compuestos antivirales, antibióticos, analgésicos, etc.).

Las terapias de combinación según esta invención ejercen un efecto sinérgico en la inhibición de la replicación del VIH porque cada componente de la combinación actúa en un sitio diferente de la replicación del VIH. El uso de dichas combinaciones también reduce ventajosamente la dosis de un determinado antirretroviral convencional que sería necesaria para un efecto terapéutico o profiláctico deseado en comparación con ese agente cuando se administra como monoterapia. Estas combinaciones pueden reducir o eliminar los efectos colaterales de las terapias convencionales con un solo antirretroviral sin interferir con la actividad antirretroviral de esos agentes. Estas combinaciones reducen el potencial de resistencia a las terapias con un solo agente minimizando simultáneamente cualquier toxicidad asociada. Estas combinaciones también pueden aumentar la eficacia del agente convencional sin aumentar la toxicidad asociada. Las terapias de combinación comprendidas por la presente invención incluyen, por ejemplo, la administración de un compuesto de esta invención con AZT, 3TC, ddl, ddC, d4T u otros inhibidores de la transcriptasa inversa.

Alternativamente, una combinación de los compuestos descritos aquí con ritonavir también se puede coadministrar con otros inhibidores de la proteasa del VIH como Ro 31-8959 (Saquinavir; Roche), L-735,524 (Indinavir; Merck), AG-1343 (Nelfinavir; Agouron), ABT-378/r (Lopinavir; Abbott), y VX-478 (Amprenavir; Glaxo) para aumentar el efecto de la terapia o la profilaxis contra diversos mutantes virales o miembros de otras especies cuasi VIH.

La administración de compuestos de la presente invención se puede realizar, por ejemplo, como agentes únicos o en combinación con inhibidores de la transcriptasa inversa retroviral u otros inhibidores de la aspartil proteasa del VIH. La coadministración de los compuestos de esta invención con inhibidores de la transcriptasa inversa retroviral o inhibidores de la aspartil proteasa del VIH puede ejercer un efecto sinérgico sustancial, por lo tanto prevenir, disminuir sustancialmente o eliminar completamente la infectividad viral y sus síntomas asociados.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar de manera o forma tal que permitan la escisión de la unidad R1 para liberar un inhibidor de la proteasa. Los compuestos de esta invención también se pueden

administrar, por ejemplo, en combinación con inmunomoduladores (por ej., bropirimina, anticuerpo anti alfa-interferón, IL-2, GM-CSF, metionina encefalina, alfa-interferón, dietilditiocarbamato de sodio, factor de necrosis tumoral, naltrexona y rEPO) antibióticos (por ej., isetionato de pentamidina) o vacunas para prevenir o combatir la infección y la enfermedad asociadas a la infección por el VIH, como SIDA y ARC.

- 5 Cuando la combinación de los compuestos descritos en este documento con ritonavir se administra en terapias de combinación con otros agentes, se pueden administrar al paciente secuencialmente o al mismo tiempo. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas o profilácticas según esta invención pueden estar compuestas por una combinación de uno o más compuestos de esta invención y otro agente terapéutico o profiláctico.

- 10 Aunque esta invención se enfoca en el uso de la combinación dada a conocer para prevenir o tratar infecciones por el VIH, la combinación de esta invención también se puede usar como inhibidora de otros virus que dependen de aspartil proteasas similares para eventos obligatorios en sus ciclos de vida. Estos virus incluyen, pero no exclusivamente, retrovirus que causan enfermedades tipo SIDA como los virus de la inmunodeficiencia de los simios, VIH-2, VLTH-I y VLTH-II. Además, la combinación de esta invención también se puede usar para inhibir otras aspartil proteasas y, en particular, otras aspartil proteasas humanas incluidas la renina y las aspartil proteasas que procesan los precursores de la endotelina.

- 15 Las composiciones farmacéuticas de esta invención contienen cualquiera de los compuestos de la presente invención y sus sales farmacéuticamente aceptables, con cualquier portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, pero no exclusivamente, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, como seroalbúmina humana, sustancias tampón como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, como sulfato de protamina, fosfato ácido disódico, fosfato ácido de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y lanolina.

- 20 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por vía oral, parenteral, mediante inhalación de aerosol, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o a través de un depósito implantado. Por consiguiente se entiende en este documento que la administración oral o la administración por inyección están comprendidas por la presente invención. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden, por ejemplo, ser administrado por vía oral en una solución acuosa. Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener cualquier portador, adyuvante o vehículo convencional atóxico y farmacéuticamente aceptable. El término "parenteral" según se usa en este documento incluye la inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

- 25 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con técnicas conocidas utilizando dispersantes o humectantes (como, por ejemplo, Tween 80) y suspensivos adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión estéril en un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran aminoácidos, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como solvente o suspensivos. Con este fin, se puede utilizar cualquier aceite fijo blando, incluidos los mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados glicérido son útiles en la preparación de inyectables porque son aceites naturales farmacéuticamente aceptables como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante alcohol de cadena larga, como Ph. Helv. o un alcohol similar.

- 30 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar oralmente en cualquier forma farmacéutica aceptable por vía oral que incluye, pero no exclusivamente, cápsulas, comprimidos y suspensiones y soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los portadores que se utilizan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se agregan habitualmente lubricantes como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsulas, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran oralmente suspensiones acuosas, el principio activo se combina con emulsionantes y suspensivos. Si se desea, también se pueden agregar ciertos edulcorantes y/o saborizantes y/o colorantes.

- 35 Las composiciones farmacéuticas de esta invención también se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal. Estas composiciones se pueden preparar mezclando un compuesto de esta invención con un excipiente no irritante adecuado, que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por consiguiente que se funda en el recto para liberar los principios activos. Dichos materiales incluyen, pero no exclusivamente, manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

- 40 La administración tópica de las composiciones farmacéuticas de esta invención es especialmente útil cuando el tratamiento deseado involucra áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica. Para aplicación tópica a

la piel, la composición farmacéutica se debe formular con una pomada adecuada que contenga los principios activos suspendidos o disueltos en un portador. Los portadores para administración tópica de los compuestos de esta invención incluyen, pero no exclusivamente, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno o polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas se pueden formular con una loción o crema adecuada que contenga el principio activo suspendido o disuelto en un portador. Entre los portadores adecuados se encuentran, pero no exclusivamente, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. Las composiciones farmacéuticas de esta invención también se pueden aplicar tópicamente a la parte inferior del tracto intestinal mediante una formulación en supositorio rectal o en una formulación pura adecuada. También están incluidos en esta invención los parches transdérmicos tópicos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar mediante un aerosol o inhalación nasal. Dichas composiciones se preparan según técnicas bien conocidas en el área de la formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes, promotores de la absorción para aumentar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros solubilizantes o dispersantes adecuados, conocidos en el área.

Niveles de dosis entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal por día, o por ejemplo entre 0.01 y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por día, o por ejemplo entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal por día del principio activo, son útiles en la prevención y el tratamiento de una infección viral, incluida la infección por el VIH. Generalmente, las composiciones farmacéuticas de esta invención se administrarán entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 veces por día o alternativamente, como una infusión continua. Dicha administración se puede usar como una terapia crónica o aguda. La cantidad de principio activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma farmacéutica individual variará dependiendo del paciente tratado y del modo particular de administración. Una preparación típica contendrá entre aproximadamente 5% y aproximadamente 95% de un compuesto deseado (p/p) es decir, un principio activo o un precursor. Por ejemplo, dichas preparaciones pueden contener entre aproximadamente 20% y aproximadamente 80% de un compuesto deseado.

Luego de la mejoría de la afección del paciente, se puede administrar, si fuera necesario, una dosis de mantenimiento de un compuesto, una composición o una combinación de esta invención. Posteriormente, la dosis o frecuencia de administración, o ambas, se pueden reducir en función de los síntomas hasta un nivel en que se mantenga la mejoría de la afección. Cuando los síntomas se hayan aliviado hasta un nivel deseado, el tratamiento debe cesar. Sin embargo, los pacientes pueden necesitar un tratamiento intermitente a largo plazo, luego de cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

Como apreciará un experto en el área, pueden ser deseables dosis mayores o menores de las indicadas antes. La dosificación específica y el régimen de tratamiento para cualquier paciente particular dependerán de diversos factores, como la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el género, la dieta, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y el curso de la infección, la disposición del paciente a la infección y la evaluación del médico tratante.

En la descripción de este documento, se usan las siguientes abreviaturas:

Abreviatura	Significado
Ac	Acetilo
AcOH	Ácido acético
APCI	Ionización química a presión atmosférica
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
APV	Amprenavir
ATV	Atazanavir
AZT	3-Azido-3-desoxitimina (Zidovudina)
Boc	Benciloxicarbonilo
t-Butyl	<i>tert</i> -butilo
CAM	Molibdato cérico amónico
DCM	Diclorometano
DMAP	<i>N,N</i> -dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido

Abreviatura	Significado
DMF	Dimetilformamida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDAC	Clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Alcohol etílico
g	Gramo
h	Hora
VIH-1, -2	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, tipo 2
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
VLTH-I, II	Virus linfotrópico T humano tipo I, tipo II
IL-2	Interleucina-2
IDV	Indinavir
kg	Kilogramo
L	Litro
LC-MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
LPV	Lopinavir
M	Molar
MeOH	Alcohol metílico
mg	Miligramo
p.f.	Punto de fusión
min	Minuto
Moc	Metoxicarbonilo
mol	Mol
mL	Mililitro
mmol	Milimol
NFV	Nelfinavir
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
po	Por vía oral
rEPO	Eritropoyetina recombinante
RTV	Ritonavir
SQV	Saquinavir
TLC	Cromatografía en capa delgada
3TC	2',3'-Didesoxi-3-tiacitidina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano

Breve descripción de las figuras

En las figuras que ilustran las realizaciones ejemplares de la presente invención;

Fig. 1 es una gráfica que ilustra el cambio en veces (FC) y la mediana del cambio en veces en  $CI_{50}$  vs la cepa de referencia (NL-4.3) observado para diversos inhibidores de la proteasa;

Fig. 2 es un esquema que ilustra las ventajas de los compuestos a base de lisina dados a conocer en este documento;

5 Fig. 3 es un esquema que ilustra la escisión de una unidad fisiológicamente escindible de un compuesto a base de lisina (por ej., PL-461) que genera el principio activo (por ej., PL-100);

Fig. 4 es una gráfica que ilustra la solubilidad en agua de PL-461 a diversos pH;

Fig. 5 es una gráfica que ilustra la concentración plasmática del fármaco después de la administración de un compuesto a base de lisina (por ej., PL-461) o de un principio activo (por ej., PL-100) en ratas;

10 Fig. 6 es un histograma que ilustra el efecto de los inhibidores de CYP450 sobre el metabolismo de diversos inhibidores de la proteasa del VIH-1 en microsomas hepáticos humanos;

Fig. 7 es un histograma que ilustra la biodisponibilidad de un compuesto a base de lisina (por ej., PL-461) o de un principio activo (por ej., PL-100) en combinación con diversas concentraciones de un inhibidor de CYP450 (por ej., ritonavir) en ratas;

15 Fig. 8 es una gráfica que ilustra la concentración plasmática del fármaco después de la administración de un compuesto a base de lisina (por ej., PL-461) en combinación con un inhibidor de CYP450 (por ej., ritonavir) en ratas;

Fig. 9 es un histograma que ilustra la biodisponibilidad del fármaco luego de la administración de diferentes relaciones entre el compuesto a base de lisina (por ej., PL-461)/inhibidor de CYP450 (CYP450) en ratas y;

20 Fig. 10 es una tabla que ilustra la inhibición de subfamilias de CYP450 por el principio activo PL-100.

#### Ejemplos

Esta sección describe la síntesis de compuestos a base de lisina capaces de liberar inhibidores de la aspartil proteasa del VIH según se describió en este documento. Estos ejemplos tienen únicamente el propósito de ilustrar y no deben ser considerados como limitantes del alcance de la invención en modo alguno. Esta sección presenta la síntesis detallada de compuestos N° 1 a 10 de esta invención.

25

Los esquemas de síntesis ejemplares de los principios activos se dieron a conocer en la patente de Estados Unidos N° 6,632,816 para Stranix et al.,

#### Materiales y métodos - preparación de los compuestos

30 Se llevó a cabo una cromatografía en capa delgada (TLC) analítica con placas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> E. Merck de 0.25 mm y se eluyó con los sistemas solventes indicados. Se realizó cromatografía preparativa mediante cromatografía por desorción súbita, empleando gel de sílice 60 (EM Science) con los sistemas solventes indicados y presión de aire positiva para permitir la velocidad de elución apropiada. La detección de los compuestos se llevó a cabo exponiendo las placas eluidas (analíticas o preparativas) a yodo, luz UV y/o tratando las placas analíticas con una solución al 2% de *p*-anisaldehído en etanol que contenía 3% de ácido sulfúrico y 1% de ácido acético, seguido de calentamiento. Alternativamente, las placas analíticas se pueden tratar con una solución al 0.3% de ninhidrina en etanol que contenga 3% de ácido acético y/o una solución de CAM preparada con 20 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> y 8.3 g Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> polihidrato en agua (750 mL) que contenga ácido sulfúrico concentrado (90 mL).

35

La HPLC preparativa se llevó a cabo en un aparato Gilson equipado con una columna C18, un módulo manipulador de líquido 215 y bombas con capacidad cabeza de 25 mL/min. La HPLC se operó con un sistema informático Gilson UniPoint.

40

#### Condiciones de la HPLC semipreparativa para la purificación de los compuestos de prueba

Sistema de HPLC: 2 bombas Gilson N° 305-25 mL, manipulador de líquidos para inyección y recolección Gilson N° 215 y un detector de absorbancia Gilson N° 155 UV-Vis, todo controlado desde un software Gilson Unipoint V1.91

Columna: Alltech (N° 96053) Hyperprep PEP, C-18, 100 Å, 8 µm, 22 x 250 mm

45 Flujo: 15 mL/min

Solventes: A: H<sub>2</sub>O; B: CH<sub>3</sub>CN

Gradiente: 25% a 80% de B en 40 min

Detector: absorbancia; λ: 210 y 265 nm

50 En cada corrida se inyectó el material crudo disuelto en acetonitrilo hasta una concentración de alrededor de 50 a 80 mg/2 mL. Las fracciones se recogieron en cantidades de 9 mL, la correspondiente absorbancia se detectó en el detector UV.

A menos que se indique lo contrario, todos los materiales de partida se obtuvieron de fuentes comerciales como Aldrich Co. o Sigma Co.

Los puntos de fusión (p.f.) se determinaron en un aparato de punto de fusión Büchi 530 en tubos capilares y no se corrigieron.

- 5 Los espectros de masas se registraron en un sistema Hewlett Packard LC/MSD 1100 usando fuentes de APCI o electronebulización en modo negativo o modo positivo.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (NMR) se registraron en un Bruker AMX-II-500 equipado con una sonda inversa o QNP. Para la adquisición de datos las muestras se disolvieron en deuterocloroformo (CDCl<sub>3</sub>), deuterioacetona (acetona-d<sub>6</sub>), deuterometanol (CD<sub>3</sub>OD) o deuterodimetilsulfóxido (DMSO-d<sub>6</sub>) usando tetrametilsilano como estándar interno. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm), las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz) en tanto las multiplicidades se indican como s para singlete, d para doblete, 2d para dos dobletes, dd para doblete de dobletes, t para triplete, q para cuadruplete, quint. para quintuplete, m para multiplete, y br s para singlete ancho.

Descripción detallada de la invención

## 15 Ejemplos:

*Ejemplos específicos para la preparación de derivados de fórmula general I*

La preparación de PL-100, PL-337 y otros compuestos de esta clase se presenta en la patente de Estados Unidos N° 6,632,816 para Stranix et al.

Los compuestos siguientes se prepararon como derivados de L-lisina empleando los procedimientos resumidos en los esquemas 1, 1A, 2, 3, 4 y 5 de esta invención.

Ejemplo 1. Preparación del éster metílico del ácido (1S,5S)-(1-{5-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-fosfonooxi-hexilcarbamoil}-2,2-difenil-etil)-carbámico (PL-461)

La preparación del compuesto del título se basa en los esquemas 1 y 2 de esta invención.

Paso A. Preparación de (3S)-3-isobutilamino-azepan-2-ona (IV)

25 Se disolvió L- $\alpha$ -amino-caprolactama (22.0 g) en diclorometano frío (DCM, 200 mL). Se agregó lentamente isobutiraldehído (12.6 g) y se calentó hasta que se disipó el calor desprendido (se forma agua sobre la superficie). La solución fría se agregó a 46.5 g de NaBH(OAc)<sub>3</sub> en polvo en DCM (0.5 L). Se agregó AcOH (70 mL) a la solución. La mezcla ligeramente turbia se agitó a 20 °C durante 4 h. Se agregaron lentamente 500 mL de solución de NaOH 2 M a la mezcla turbia y se ajustó el pH a 11 usando una solución de NaOH concentrada, y después la mezcla se agitó durante otros 20 min. Después de la extracción, la capa de DCM se secó con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El aceite así obtenido cristalizó lentamente en reposo (27.8 g, 85%) y se usó sin purificación adicional en el paso siguiente.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.93 (d, J = 6.5, 3H), 0.97 (d, J = 6.5, 3H), 1.39 (t, J = 9.8, 1 H), 1.47 (m, 1 H), 1.78-1.65 (m, 2H), 2.00-1.93 (m, 2H), 2.32-2.2 (m, 2H), 2.38 (t, J = 9.7, 1 H), 3.16 (m, 3H), 6.62 (s, 1 H (NH)). pf 52-54 °C (hexanos).

Una pequeña muestra se convirtió en S-metil bencil urea agregando el sólido a una solución de S-metil bencil isocianato en MeCN. La NMR da 98% ee

Paso B. Preparación de N $\alpha$ -isobutil-N $\alpha$ -(4-acetamidobencenosulfonil)-L- $\alpha$ -amino-caprolactama (V)

40 Se disolvió N $\alpha$ -isobutil-L- $\alpha$ -amino-caprolactama (IV) (4.1 g de base libre) en DCM (200 mL) y se trató con 4.0 g de trietilamina, seguida de cloruro de 4-acetamidobencenosulfonilo (5.2 g). Se agregó una porción de 0.1 g de dimetilaminopiridina y la mezcla se agitó durante 5 h. La suspensión espesa resultante se vertió en 500 mL de HCl 0.5 M y se agitó vigorosamente. El sólido de la solución bifásica se separó por filtración y se lavó con acetona fría para dar 7.3 g (87%) del producto limpio.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 0.93 (d, J = 6.0, 3H), 0.96 (d, J = 6.0, 3H), 1.39 (t, J = 12.0, 1 H), 1.85-1.65 (m, 3H), 2.08-2.18 (m y s, 6H), 2.90-2.97 (m, 1H), 3.00-3.06 (m, 2H), 3.35 (dd, J = 14.2, 8.5, 1 H), 4.65 (d, J = 8.7, 1H), 6.3 (s, 1 H), 7.42 (d, J = 8.8, 2H), 7.6 (d, J = 8.8, 2H). pf 230-233 °C (EtOH).

45 Paso C. Preparación del éster tert-butílico del ácido (3S)-3-[[4-(acetil-tert-butoxicarbonil-amino)-bencenosulfonil]-isobutil-amino]-2-oxo-azepan-1-carboxílico (activación de Boc) (VI)

50 Se suspendieron 4.2 g de N $\alpha$ -isobutil-N $\alpha$ -(4-acetamidobencenosulfonil)-L- $\alpha$ -amino-caprolactama (V) en 30 mL de MeCN y se sometió ultrasonido brevemente para romper cualquier trozo grande. A esta suspensión blanca se le agregaron 6.7 g (3 eq.) de pirocarbonato de di-*tert*-butilo en 10 mL de MeCN. La suspensión se agitó con una barra magnética y se le agregó una porción de 120 mg de DMAP. La solución se tornó de color amarillo claro transparente

luego de algunos minutos. La TLC (EtOAc) reveló 1 producto de Rf 0.9 (Rf del material de partida a 0.4). La solución se vertió en agua destilada 20 mL y se extrajo con éter, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó produciendo 6.90 g. Se recristalizó una muestra de hexanos.

5 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 0.68 (d, *J* = 6.0, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.0, 3H), 1.39 (s, 10H), 1.47 (s, 9H), 1.85-1.65 (m, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.80 (q, *J* = 4, 1 H), 3.10-3.36 (m, 2H), 4.01 (d, *J* = 8.0, 1 H), 4.85 (d, *J* = 8.7, 1 H), 7.32 (d, *J* = 8.8, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.8, 2H). pf 123-124 °C

Paso D. Preparación de (1*S*)-4-amino-*N*-(5-amino-1-hidroximetil-pentil)-*N*-isobutil-bencenosulfonamida (*VII*-desprotegido) (apertura reductora del anillo y desprotección)

10 Una porción de 3.0 g de éster tert-butílico del ácido (3*S*)-3-[[4-(acetil-tert-butoxicarbonil-amino)-bencenosulfonil]-isobutil-amino]-2-oxo-azepan-1-carboxílico (*VI*, paso C) se disolvió en 40 mL de EtOH seguido de 750 mg de NaBH<sub>4</sub>. El calentamiento breve con una pistola de calor produjo una solución transparente. La TLC reveló una mancha veteadada después de 20 min (EtOAc). La solución se concentró hasta formar una pasta, se vertió en 40 mL de NaOH 1 N y se extrajo con acetato de etilo, la fase orgánica se secó con NaSO<sub>4</sub> y se evaporó para dar 2.8 g del producto intermedio (*VI*); éster tert-butílico del ácido (1*S*)-{4-[(5-tert-butoxicarbonilamino-1-hidroximetil-pentil)-isobutil-sulfamoil]-fenil}-carbámico (*VII*).

15 El producto intermedio anterior se disolvió en 5 mL de EtOH y se agregaron 5 mL de HCl 12 N. Se observó un vigoroso desprendimiento de gas durante algunos minutos. Después de 2 h la solución se evaporó y se volvió básica con KOH concentrada y se extrajo con EtOAc produciendo 1.75 g de un polvo blanco.

20 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 0.82 (m, 6H), 0.97-1.12 (m, 2H), 1.15-1.30 (m, 3H), 1.57 (m, 1H), 1.84 (m, 1 H), 2.40 (t, *J* = 7.8, 2H), 2.75 (m, 1 H), 2.85 (m, 1 H), 3.21 (m, 1 H), 3.44 (d, *J* = 6.4, 2H), 5.92 (s, 2H), 6.59 (d, *J* = 8.0, 2H), 7.39 (d, *J* = 8.0, 2H).

Paso E. preparación del ácido (2*S*)-2-metoxicarbonilamino-3,3-difenil-propiónico

25 A una solución de L-difenilalanina (241 mg, 1.0 mmol) (Peptech Corp.) en 5 mL de NaOH 1 N y 0.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado (solución resultante a pH 10) se le agregó metoxicarbonilsuccinimida ( metil éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster del ácido carbónico) (180 mg, 1.1 mmol) disuelto en 5 mL. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución alcalina se extrajo una vez con éter (10 mL) y la fase acuosa se acidificó con HCl 1 N. Esto se extrajo 2 veces con 20 mL de EtOAc, y las fases orgánicas combinadas se lavaron con 50 mL de HCl 1 N. La fase orgánica se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó hasta obtener un aceite, que solidificó para producir 250 mg (83%) del material deseado. Este derivado se usó como tal en el paso siguiente.

30 Paso F. Preparación del éster metílico del ácido (1*S*,5*S*)-(1-{5-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-hidroxi-hexilcarbamoil}-2,2-difenil-etil)-carbámico (PL-100)

35 El compuesto del título se preparó a partir de (1*S*)-4-amino-*N*-(5-amino-1-hidroximetil-pentil)-*N*-isobutil-bencenosulfonamida (*VII*-desprotegido) (paso D) y ácido (2*S*)-2-metoxicarbonilamino-3,3-difenil-propiónico (paso E) empleando el procedimiento de acoplamiento con HOBT y EDAC que se describe en el ejemplo 3 (paso D). El producto final se obtuvo con un rendimiento de 67% (121 mg).

LC-MS: 625.3 (M+H)<sup>+</sup>, 95% puro

40 <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 0.71-0.85 (m, 2H), 0.88 (d, *J* = 6.3, 5H), 0.91-0.96 (m, 2H), 1.29-1.34 (m, 1H), 1.41-1.52 (m, 1H), 1.82-1.92 (m, 1H), 2.61-2.68 (m, 1H), 2.81-2.85 (m, 2H), 2.94-3.05 (m, 2H), 3.38-3.40 (t, *J* = 5.0, 1 H), 3.50-3.51 (m, 1H), 3.52 (s, 3H), 4.28 (d, *J* = 11.0, 1 H), 4.87 (d, *J* = 11.0, 1 H), 6.69 (d, *J* = 8.0, 2H), 7.15-7.18 (m, 2H), 7.20-7.31 (m, 6H), 7.33 (d, *J* = 7.9, 2H), 7.47 (d, *J* = 7.5, 1 H).

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 20.0, 20.1, 23.3, 25.4, 28.1, 28.5, 28.9, 38.1, 40.0, 51.2, 51.6, 53.1, 57.2, 57.4, 59.5, 61.9, 62.4, 112.6, 125.7, 126.2, 126.3, 127.9, 128.1, 128.15, 128.2, 128.4, 128.7, 141.3, 141.9, 152.4, 155.9, 169.9, 172.5.

Paso G. Preparación del éster metílico del ácido (1*S*,5*S*)-(1-{5-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-(dietoxifosforiloxi)-hexilcarbamoil}-2,2-difenil-etil)-carbámico

45 El compuesto PL-100 (producto del paso F, 203 mg, 0.325 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano seco (3 mL) y 0.2 mL de trietilfosfato en atmósfera de N<sub>2</sub>. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 15 min, seguido de la adición de clorofosfato de dietilo (0.061 mL, 0.423 mmol). Se agregó hidruro de sodio (60% en aceite mineral) (17 mg, 0.423 mmol) a 0 °C. La solución se agitó durante 1 h a 0 °C y 12 h a temperatura ambiente. Se agregaron 20 mL de Amberlite XAD-2 a la solución y las perlas se mezclaron bien con el solvente. A la mezcla se le agregó agua helada 50 2 mL, y el THF se eliminó por evaporación. Después las perlas se lavaron con agua destilada 6 veces 100 mL y luego se extrajeron tres veces con acetato de etilo (30 mL). La fase combinada se evaporó y el residuo se secó en alto vacío. El producto crudo se purificó por cromatografía por desorción súbita empleando acetato de etilo/hexano (8/2), y después EtOAc 100% como eluyente. El rendimiento de esta reacción fue de 152 mg 61%.

LC-MS: 761.2 (M+H)<sup>+</sup>, 90% puro

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0.68-0.75 (m, 1H), 0.75-0.84 (m, 1H), 0.84-1.10 (m, 9H), 1.21-1.50 (m, 8H), 1.88 (m, 1 H), 2.58-2.71 (m, 1H), 2.80-2.89 (m, 1 H), 2.89-3.08 (m, 2H), 3.49-3.60 (s, 3H), 3.65-3.74 (m, 1H), 3.85-3.95 (m, 1H), 3.97-4.02 (m, 1H), 4.07-4.21 (m, 4H), 4.29 (d, J = 10.8, 1H), 6.71 (d, J = 8.0, 2H), 7.10-7.20 (m, 2H), 7.20-7.32 (m, 5H), 7.32-7.45 (m, 3H), 7.50 (d, J = 7.5, 2H), 7.86 (s a, 1H).

5  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.62

Paso H. Preparación del éster metílico del ácido (1S,5S)-(1-{5-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-fosfonooxi-hexilcarbamoil}-2,2-difenil-etil)-carbámico (PL-461)

10 El producto del paso G preparado antes (152 mg) se disolvió en diclorometano anhidro (3.0 mL). Se agregó bromuro de trimetilsililo (0.5 mL) a 0 °C. La mezcla se agitó durante 1 h a esta temperatura y durante toda la noche a temperatura ambiente. El solvente se evaporó y se agregó 0.2 mL de agua al residuo. Se agregaron 3 mL de EtOH se mezcló y se evaporó. Este paso se repitió tres veces y el residuo se secó al vacío. Rendimiento 98 mg (70%) de los derivados del título de este primer ejemplo.

LC-MS: 705.2 (M+H)<sup>+</sup>, 95% puro

15  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0.65-0.73 (m, 1H), 0.75-0.83 (m, 1H), 0.89 (d, J = 5.6, 8H), 1.27-1.38, (m, 1H), 1.42-4.55 (m, 1H), 1.82-1.94 (m, 1H), 2.57-2.68 (m, 1H), 2.78-2.90 (m, 1H), 2.91-3.09 (m, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.60-3.72 (m, 1H), 3.87-4.05 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 4.29 (d, J = 11.3, 1H), 4.90 (d, J = 11.4, 1 H), 6.73 (d, J = 8.0, 2H), 7.13-7.22 (m, 2H), 7.22-7.33 (m, 6H), 7.33-7.45 (m, 2H), 7.51 (d, J = 7.5, 2H).

$^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  2.80

20 Ejemplo 2. Preparación de la sal de sodio del éster metílico del ácido (1S,5S)-(1-{5-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-fosfonooxi-hexilcarbamoil}-2,2-difenil-etil)-carbámico (PL-462)

Se agregaron 70.7 mg del producto final del ejemplo 1 a 1 mL de NaOH 0.1 N y se diluyó con 1 mL de agua destilada. Después la solución se congeló y liofilizó. Rendimiento 67.2 mg (92%) del material deseado con 95% de pureza.

25  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0.72-0.83 (m, 1H), 0.90 (d, J = 5.8, 9H), 1.26-1.38 (m, 1H), 1.53-1.65 (m, 1H), 1.88-2.00 (m, 1H), 2.60-2.70 (m, 1H), 2.79-2.89 (m, 1H), 2.98-3.00 (m, 1H), 3.00-3.08 (m, 1 H), 3.54 (s, 3H), 3.58-3.71 (m, 1 H), 3.72-3.83 (m, 1 H), 3.84-3.95 (m, 1 H), 4.28 (d, J = 11.1, 1H), 4.91 (d, J = 11.0, 1H), 6.70 (d, J = 7.6, 2H), 7.12-7.22 (m, 2H), 7.22-7.32 (m, 6H), 7.33-7.40 (m, 2H), 7.50 (d, J = 7.7, 2H).

$^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  3.13

30 Ejemplo de referencia 3. Preparación del éster metílico del ácido (1S,5S)-(1-{5-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-fosfonooxi-hexilcarbamoil}-2-naftalen-2-il-etil)-carbámico (PL-507)

La preparación del compuesto del título se basa en el esquema 2 de esta invención.

Paso A. Preparación del éster tert-butílico del ácido (1S)-(4-{[5-tert-butoxicarbonilamino-1-(dietoxifosforiloximetil)-pentil]-isobutil-sulfamoil}-fenil)-carbámico (VIII)

35 Se disolvieron 2.00 g (3.7 mmol) de éster tert-butílico del ácido (1S)-{4-{[5-tert-butoxicarbonilamino-1-hidroximetil-pentil]-isobutil-sulfamoil}-fenil}-carbámico (VII) (ejemplo 1, paso D) en 0.63 mL de trietilfosfato y 10 mL de THF a 0 °C en atmósfera inerte de argón. Se agregó 0.63 mL (4.44 mmol) de dietilclorofosfato y después se agregó en porciones 0.25 g (6.2 mmol) de NaH al 60% en aceite. Se permitió que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se dejó en agitación durante 2 h (la LC-MS mostró que se había completado luego de 1 h). Se agregaron a la solución 20 mL de resina Amberlite XAD-2 y la suspensión se mezcló bien y se agregó a 200 mL de agua helada.

40 Después de agitar durante 15 min la suspensión de resina se filtró y la resina se lavó varias veces con agua destilada (500 mL). El producto deseado se desorbió de la resina con acetona (5 X 50 mL) y EtOAc (5 X 50 mL), y después la fase orgánica se secó en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Después de la evaporación del solvente se obtuvieron 2.66 g (89%) de un aceite transparente. El producto crudo contenía una fracción de dos fosfatos de dietilo y se usó tal cual en el paso siguiente.

45  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0.91 (d, J = 6.3, 6H), 1.11-1.21 (m, 2H), 1.33 (t, J = 6.9, 10H), 1.43 (s, 9H), 1.53 (s, 10H), 1.90-1.97 (m, 1H), 2.88-2.96 (m, 3H), 2.96-3.04 (m, 1H), 3.81-3.90 (m, 1 H), 3.91-3.99 (m, 1 H), 4.01-4.14 (m, 4H), 7.61 (d, J = 8.3, 2H), 7.72 (d, J = 8.4, 2H).

$^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.59

50 Paso B. Preparación de dietil éster (2S)-6-amino-2-[(4-amino-bencenosulfonilo)-isobutil-amino]-hexil éster del ácido fosfórico (IX)

El producto crudo obtenido en el paso anterior (*VIII*, 2.66 g) se disolvió en 12 mL de EtOH. Se agregaron 4 mL de HCl<sub>conc</sub>, se calentó brevemente a 70 °C y después se dejó a temperatura ambiente durante 3 h. El solvente se evacuó y el residuo se trituró con 50 mL de éter. El residuo espeso se disolvió después en 3 mL de agua helada y se ajustó el pH a 12 con NaOH al 50%. La suspensión espesa obtenida se extrajo con EtOAc (3 X 50 mL) y la fase orgánica se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de la filtración del agente de secado la fase orgánica se evacuó para producir 1.84 g (98%) del producto deseado (*IX*).

LC-MS: 480.2 (M+H)<sup>+</sup>, 95% puro.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 0.91 (s, 6H), 1.11-1.26 (m, 3H), 1.28-1.43 (m, 8H), 1.45-1.51 (m, 1H), 1.52-1.61 (m, 1H), 1.89-1.96 (m, 1H), 2.56 (t, J = 6.7, 2H), 2.85-2.91 (m, 1H), 2.98-3.11 (m, 1H), 3.79-3.99 (m, 1 H), 3.94 (d, J = 5.3, 1 H), 4.09-4.11 (m, 4H), 6.69 (d, J = 7.9, 2H), 7.50 (d, J = 7.9, 2H).

<sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 1.61

Paso C. Preparación del ácido (2*S*)-2-metoxicarbonilamino-3-naftalen-2-il-propiónico (o L-Moc-2-naftilalanina)

A una solución de L-2-naftilalanina (215 mg, 1 mmol) (Peptech Corp.) en 5 mL de NaOH 1 N y 0.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado (solución resultante a pH 10) se le agregó metoxicarbonilsuccinimida (187 mg, 1.1 mmol) disuelto en 5 mL. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución alcalina se extrajo una vez con éter (10 mL) y la fase acuosa se acidificó con HCl 1N. Esto se extrajo 2 veces con 20 mL de EtOAc, y las fases orgánicas combinadas se lavaron con 50 mL de HCl 1 N. La fase orgánica se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó hasta obtener un aceite, que solidificó para producir 200 mg (73%) del material deseado. Este producto intermedio (al que se hace referencia como aminoácido *N*-sustituido) se usó sin purificación adicional en el paso siguiente.

Paso D. Preparación del éster metílico del ácido (1*S*,5*S*)-(1-{5-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-fosfonooxi-hexilcarbamoil}-2-naftalen-2-il-etil)-carbámico (PL-507)

Se activaron 100 mg de L-Moc-2-naftilalanina (paso C) con 100 mg de EDAC y 57 mg de HOBt en 1.5 mL de DMF durante 30 minutos. Después, se agregaron 100 mg de dietil éster 6-amino-2-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-hexil éster del ácido fosfórico (paso B) y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregaron 40 mL de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M a la solución de DMF y se dejó durante 10 min. Después se agregaron 50 mL de EtOAc y la mezcla se agitó vigorosamente. Se efectuó la separación de la fase de EtOAc, seguido de extracción con ácido cítrico al 5% (50 mL) una vez, después agua (50 mL) 3 veces y finalmente solución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se separó y se evaporó. El residuo se tomó en 50 mL de DCM y se volvió a evaporar. El residuo se tomó nuevamente en 50 mL de DCM y se le agregó 0.5 mL de TMSBr. La solución se dejó toda la noche (16 h). Se evacuó el DCM y se agregó una solución helada de MeOH:agua 1:1, se agitó brevemente y se evacuó. El residuo se trituró con éter y después se disolvió en NaOH 1 N. La solución transparente se extrajo con éter y la fase acuosa se acidificó con HCl 6 N. Después se recogió un precipitado blanco por filtración que se secó al vacío durante toda la noche. Rendimiento 88 mg del compuesto del título.

LC-MS: 679.8 (M+H)<sup>+</sup>, 95% puro.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 0.89-0.98 (m, 8H), 1.15 (m, 2H), 1.35 (m, 1H), 1.45 (m, 1H), 1.88 (m, 1H), 2.84 (m, 2H), 2.98 (m, 1H), 3.01 (m, 2H), 3.24 (m, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.60 (m, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.99 (m, 1 H), 4.39 (t, J = 6.8, 1 H), 6.91 (d, J = 8.0, 2H), 7.34 (d, J = 8.0, 1 H), 7.45 (m, 2H), 7.58 (d, J = 8.0, 2H), 7.66 (s, 1 H), 7.70-7.82 (m, 3H).

<sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 2.56

Ejemplo de referencia 4. Preparación de (2*S*,2*S*)-mono-(2-[(4-aminobencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-{2-[(morfolina-4-carbonilo)-amino]-3-naftalen-1-il-propionilamino}-hexil) éster del ácido fosfórico (PL-498)

Paso A. Preparación del ácido (2*S*)-2-[(morfolina-4-carbonil)-amino]-3-naftalen-1-il-propiónico

A una solución de L-1-naftilalanina (215 mg, 1 mmol) (Peptech Corp.) en 5 mL de NaOH 1 N y 0.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado (solución resultante a pH 10) se le agregó cloruro de morfolina-4-carbonilo (150 mg, 1.0 mmol) disuelto en 5 mL. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución alcalina se extrajo una vez con éter (10 mL) y la fase acuosa se acidificó con HCl 1N. Esto se extrajo 2 veces con 20 mL de EtOAc, y las fases orgánicas combinadas se lavaron con 50 mL de HCl 1 N. La fase orgánica se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó hasta obtener un aceite, que solidificó para producir 125 mg (38%) del material deseado. Este compuesto se usó como tal en el paso siguiente.

Paso B. Preparación de (2*S*,2*S*)-mono-(2-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-{2-[(morfolina-4-carbonil)-amino]-3-naftalen-1-il-propionilamino}-hexil) éster del ácido fosfórico (PL-498)

Este compuesto se preparó de la misma manera que el producto del ejemplo 3 (paso D) con 100 mg de ácido (2*S*)-2-[(morfolina-4-carbonil)-amino]-3-naftalen-1-il-propiónico (paso A de este ejemplo). El residuo precipitado resultante se purificó posteriormente por HPLC preparativa en fase reversa. Rendimiento 41 mg del compuesto final.

LC-MS: 734.8 (M+H)<sup>+</sup>, 95% puro.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 0.83-0.98 (m, 8H), 1.00-1.25 (m, 4H), 1.45-1.52 (m, 1H), 1.52-1.66 (m, 1H), 1.88-1.99 (m, 1H), 2.77-2.92 (m, 2H), 2.98-3.16 (m, 3H), 3.40-3.49 (m, 1H), 3.50-3.56 (m, 6H), 3.67-3.69 (m, 1H), 3.81-3.89 (m, 1H), 3.99-4.05 (m, 1H), 4.59 (t, J = 6.0, 1H), 6.75 (d, J = 8.0, 2H), 7.30-7.60 (m, 7H), 7.75 (d, J = 8.0, 1H), 7.90 (d, J = 7.8, 1H), 8.23 (d, J = 7.8, 2H).

<sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 2.71

Ejemplo 5. Preparación de (2S,2S)-mono-{6-(2-acetilamino-3,3-difenil-propionilamino)-2-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-hexil} éster del ácido fosfórico (PL-504)

Paso A. Preparación del ácido (2S)-2- acetilamino-3,3-difenil-propiónico

10 A una solución de L-difenilalanina (100 mg, 0,4 mmol) (Peptech Corp.) en 5 mL de NaOH 1 N y 0.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado (solución resultante a pH 10) se le agregó cloruro de acetilo (0.5 mmol l) disuelto en 5 mL. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución alcalina se extrajo una vez con éter (10 mL) y la fase acuosa se acidificó con HCl 1N. Esto se extrajo 2 veces con 20 mL de EtOAc, y las fases orgánicas combinadas se lavaron con 50 mL de HCl 1N. La fase orgánica se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó hasta  
15 obtener un aceite, que solidificó para producir 70 mg (60%) del material deseado. Este producto intermedio crudo se usó como tal en el paso siguiente.

Paso B. Preparación de (2S,2S)-mono-{6-(2-acetilamino-3,3-difenil-propionilamino)-2-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-hexil} éster del ácido fosfórico (PL-504)

20 Este compuesto se preparó de la misma manera que el producto del ejemplo 3 (paso D) con 100 mg de ácido (2S)-2-acetilamino-3,3-difenil-propiónico (paso A de este ejemplo). El producto final se obtuvo con un rendimiento de 30% (30 mg).

LC-MS: 689.3 (M+H)<sup>+</sup>, 95% puro.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 0.77-1.04 (m, 9H), 1.10-1.17 (m, 1H), 1.23-1.49 (m, 1H), 1.46-1.57 (m, 1H), 1.78 (s, 3H), 1.88-1.99 (m, 1H), 2.80-2.92 (m, 2H), 2.92-3.08 (m, 2H), 3.63-3.75 (m, 1H), 3.79-3.95 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 4.34 (d, J = 11.3, 1H), 5.19-5.28 (m, 1H), 6.77-6.85 (m, 2H), 7.10-7.20 (m, 2H), 7.27-7.33 (m, 6H), 7.32-7.41 (m, 2H), 7.49-7.62 (m, 2H).

<sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 2.70

Ejemplo de referencia 6. Preparación del éster metílico del ácido (1S,5S)-(1-[5-[(4-amino-3-fluoro-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-fosfonooxi-hexilcarbamoil]-2,2-difenil-etil)-carbámico (PL-515)

30 Primera metodología: La preparación del compuesto del título se basa en el esquema 3 de esta invención.

Paso A. Preparación del éster metílico del ácido (1-[5-[(4-amino-3-fluoro-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-hidroxihexilcarbamoil]-2,2-difenil-etil)-carbámico (X) (PL-337)

35 El producto del ejemplo 1, paso F (0.624 g, 1 mmol) se disolvió en 5 mL de MeCN a 24 °C. Se le agregó SelectFluor 0.35 g (1 mmol) en una porción y se agitó durante 1 h. Se agregó 1 mL de agua y la solución se inyectó directamente en una HPLC preparativa en fase reversa. El producto se recogió y se liofilizó para dar 250 mg (38%) de rendimiento de un sólido blanco.

LC-MS: 643.3 (M+H)<sup>+</sup>, 99% puro.

<sup>1</sup>H NMR (MeOD): δ 0.71-0.85 (m, 2H), 0.88 (d, J = 6.3, 6H), 0.91-0.96 (m, 2H), 1.21-1.29 (m, 1H), 1.41-1.52 (m, 1H), 1.82-1.92 (m, 1H), 2.61-2.68 (m, 1H), 2.81-2.85 (m, 2H), 2.94-3.05 (m, 2H), 3.38-3.40 (t, J = 5, 1H), 3.49-3.52 (m, 5H), 4.28 (d, J = 10, 1H), 4.87 (d, J = 10, 1H), 6.90 (t, J = 8.3, 1H), 7.20 (m, 2H), 7.28 (m, 3H), 7.33 (m, 3H), 7.39 (m, 4H).

Paso B. Preparación del éster metílico del ácido (1S,5S)-(1-[5-[(4-amino-3-fluoro-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-(dietoxi-fosforiloxi)-hexilcarbamoil]-2,2-difenil-etil)-carbámico

45 El producto del paso A se fosforiló con clordietilfosfato siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 1, paso G. Rendimiento 157 mg, 68%.

LC-MS: 779.3 (M+H)<sup>+</sup>, 95% puro.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 0.82 (m, 1H), 0.92 (d, J = 6.2, 8H), 0.96 (m, 3H), 1.36 (d, J = 3.7, 6H), 1.90 (m, 1H), 2.69 (m, 1H), 2.89 (m, 1H), 2.98 (m, 2H), 3.56 (s, 3H), 3.74 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 4.03 (m, 1H), 4.12 (q, J = 7.5 y 14.8, 4H), 4.32 (d, J = 11.4, 1H), 4.92 (d, J = 11.4, 1H), 6.90 (t, J = 8.3, 1H), 7.20 (m, 2H), 7.28 (m, 3H), 7.33 (m, 3H), 7.39 (m, 4H).

<sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 1.65

Paso C. Preparación del éster metílico del ácido (1S,5S)-(1-{5-[(4-amino-3-fluoro-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-fosfonooxi-hexilcarbamoil}-2,2-difenil-etil)-carbámico (XI) (PL-515)

Se llevó a cabo la desprotección usando el procedimiento descrito en el ejemplo 1, paso G. Rendimiento 101 mg.

5 LC-MS: 723.2 (M+H)<sup>+</sup>, 95% puro.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 0.65-0.77 (m, 1 H), 0.77-0.85 (m, 1H), 0.85-1.05 (m, 9H), 1.25-1.39 (m, 1 H), 1.40-1.52 (m, 1H), 1.82-1.98 (m, 1 H), 2.58-2.72 (m, 1H), 2.82-2.92 (m, 1H), 2.92-3.05 (m, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.64-3.75 (m, 1 H), 3.80-3.92 (m, 1H), 3.91-4.04 (m, 1 H), 4.29 (d, J = 11.4, 1H), 7.19 (t, J = 6.6, 1H), 7.13-7.21 (m, 2H), 7.22-7.33 (m, 6H), 7.34-7.38 (m, 2H), 7.39-7.48 (m, 2H).

10 <sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 2.74

Segunda metodología: La preparación del compuesto del título se basa en el esquema 4 de esta invención.

Paso A. Preparación del éster metílico del ácido (1S,5S)-(1-{5-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-fosfonooxi-hexilcarbamoil}-2,2-difenil-etil)-carbámico (PL-461)

15 Se activó ácido (2S)-2-metoxicarbonilamino-3,3-difenil-propiónico ((ejemplo 1, paso E) 0.9 g, 3 mmol) en DMF (5 mL) con EDAC (1.7 g, 9 mmol) y HOBT (1.2 g, 9 mmol). Se agregaron a la solución 1.17 g de (2S)-ácido fosfórico 6-amino-2-[(4-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-hexil éster dietil éster (IX) (ejemplo 3, paso B) y la mezcla se agitó durante 3 h. Después se agregaron 20 g de resina Amberlite XAD-2 y las perlas se dejaron embeber durante 10 min. La resina se transfirió a un filtro de vidrio y se lavó bien con agua destilada (400 mL) y 200 mL de NaHCO<sub>3</sub> 1 M. Después las perlas se lavaron con 4 porciones X 50 ml de MeOH y después con EtOAc 200 mL. La fase orgánica se evaporó. El residuo se adsorbió en gel de sílice y se pasó través de una columna de gel de sílice corta (EtOAc) para producir 2.4 g (83%) de un sólido blanco luego de la evaporación.

NMR idéntica a la del ejemplo 1, paso H.

Paso B. Preparación del éster metílico del ácido (1S,5S)-{1-[5-[(4-amino-3-fluoro-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-(dietoxi-fosforiloxi)-hexilcarbamoil]-2,2-difenil-etil}-carbámico (XII)

25 El producto del paso A anterior, éster metílico del ácido (1S,5S)-(1-{5-[(4-amino-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-fosfonooxi-hexilcarbamoil}-2,2-difenil-etil)-carbámico (0.555 g, 0.73 mmol) se disolvió en 5 mL de MeCN. Se le agregó Selectfluor (0.26 g, 0.7 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 min. La mezcla se purificó por HPLC preparativa en fase reversa y se liofilizó para producir 278 mg (48% de rendimiento) de un sólido blanco.

<sup>1</sup>H NMR idéntica a la entrada previa, véase primera metodología más arriba.

30 Paso C. Preparación del éster metílico del ácido (1S,5S)-(1-{5-[(4-amino-3-fluoro-bencenosulfonil)-isobutil-amino]-6-fosfonooxi-hexilcarbamoil}-2,2-difenil-etil)-carbámico (XIII, en este caso específico es compuesto XI) (PL-515)

El procedimiento para preparar esta derivado fue como se describió en el paso de desprotección para la metodología anterior. Rendimiento 139 mg (70%) después de la HPLC en fase reversa.

<sup>1</sup>H NMR idéntica a la entrada previa, véase primera metodología más arriba.

35 Ejemplo 11. Actividad inhibitoria y citotoxicidad

Se demostró que los principios activos que son liberados de los compuestos a base de lisina descritos en este documento inhiben la aspartil proteasa del VIH (patente de Estados Unidos N° 6,632,816). Después de la administración oral, los niveles plasmáticos del compuesto a base de lisina; PL-461 en ratas, son insignificantes o inferiores a los límites de detección, en comparación con los niveles plasmáticos del principio activo; PL-100, lo que indica que la porción fosfato del compuesto a base de lisina (por ej., PL-461) se escinde metabólicamente y la mayor parte de este compuesto se convierte en el principio activo correspondiente (por ej., PL-100) *in vivo*.

Se evaluó el perfil de resistencia cruzada de un principio activo representativo; PL-100 frente a 63 cepas de VIH con sensibilidad reducida a todos los inhibidores de las proteasas (IP) aprobados, incluido el atazanavir.

45 En resumen, la actividad antiviral de PL-100 se determinó usando células MT4 infectadas con una cepa de VIH adaptada en el laboratorio (NL4-3). A efectos de comparar, se evaluaron en paralelo siete inhibidores de proteasa (IP) aprobados. El resultado de este experimento se presenta en la tabla 3.

Estos datos sugieren que la actividad antiviral de PL-100 es semejante a la de otros IP.

## ES 2 539 527 T3

Se evaluó la citotoxicidad de PL-100 y otros IP en el mismo sistema de cultivo celular. El índice de selectividad (IS) es la relación entre la citotoxicidad (CC<sub>50</sub>) y la actividad antiviral (CE<sub>50</sub>). El índice de selectividad es similar al índice terapéutico pero se refiere a estudios *in vitro*.

Este resultado indica que PL-100 es un IP potente, selectivo y no citotóxico.

5

Tabla 3

Inhibidor de la proteasa	CE <sub>50</sub> (nM)	CC <sub>50</sub> (nM)	IS (CC <sub>50</sub> /CE <sub>50</sub> )
Atazanavir	4	55 000	13 750
Amprenavir	47	> 100 000	> 2128
Indinavir	67	> 100 000	> 1493
Lopinavir	19	28 000	1474
Nelfinavir	29	8000	276
Ritonavir	61	25 000	410
Saquinavir	12	19 000	1583
PL-100	16	33 000	2063

Atazanavir (ATV) es fabricado por BMS (Bristol Myers Squibb), Amprenavir (APV) es fabricado por GSK (Glaxo SmithKline), Indinavir (IDV) es fabricado por Merck, Lopinavir (LPV) es fabricado por Abbott, Nelfinavir (NFV) es fabricado por Pfizer, Ritonavir (RTV) es fabricado por Abbott, Saquinavir (SQV) es fabricado por Roche.

- 10 Los inhibidores de la clase IP de VIH han demostrado que a veces se unen a las proteínas plasmáticas lo que puede afectar su potencia *in vivo*. Por consiguiente se evaluó el efecto de 40% de suero humano sobre la actividad antiviral de PL-100 en células MT4 infectadas con NL4-3. Como se muestra en la tabla 4, la adición de suero humano redujo la actividad antiviral de PL-100 en 6 veces, lo que resultó en un aumento de su CE<sub>50</sub> a 100 nM. Esto es similar a lo que se informó para los fármacos aprobados nelfinavir (NFV) e indinavir (IDV). Por lo tanto no se espera que la unión a proteínas de PL-100 sea un problema importante en la clínica.
- 15

Tabla 4

Condiciones de cultivo	CE <sub>50</sub> nM (cambio en veces)
10% de PBS*	18 (1.0)
10% de FBS* + 40% de suero humano	106 (5.9)
*Suero fetal bovino	

Ejemplo 12. Perfil de resistencia cruzada

- 20 Por lo tanto se evaluó el perfil de resistencia cruzada de PL-100 frente a 63 cepas de VIH con sensibilidad reducida a todos los inhibidores de las proteasas (PI) aprobados, incluido el atazanavir.

El grupo de 63 cepas virales se eligió basándose en las razones siguientes: 1) Alto nivel de pérdida de sensibilidad a IP específicos; 2) Alto nivel de pérdida de sensibilidad a múltiples IP; 3) Buena representación de las mutaciones primarias. Este grupo consiste en virus resistentes de pacientes con gran experiencia con IP y alto nivel de resistencia a los IP.

- 25 El genotipo de estos virus abarca una amplia gama de patrones de mutación. Nosotros buscamos particularmente las mutaciones primarias de IP siguientes: D30N, L33F/I, M46I/L, G48V, I50L/V, V82A/F/S/T, I84V y L90M según definió la sociedad internacional de SIDA (IAS)-USA. La tabla 5 ilustra la repartición y la potencia del grupo elegido.

Tabla 5

Nº de mutaciones primarias de IP	Nº de cepas virales
0	3
1	6
2	11

## ES 2 539 527 T3

Nº de mutaciones primarias de IP	Nº de cepas virales
3	22
4	17
5	3
6	1

La mutación mencionada antes se refiere al aminoácido original (natural) (código de una letra)/posición en la proteasa del VIH-1/aminoácido resultante del o los cambios (código de una letra). El código de una letra de los aminoácidos es conocido en el área.

- 5 Por ejemplo: D30N se refiere al: ácido aspártico (D) encontrado en la posición 30 de la proteasa del VIH-1 que fue cambiado (mutado) por una asparragina (N): L33F/I se refiere a la: leucina (L) encontrada en la posición 33 de la proteasa del VIH-1 que fue cambiada (mutada) por fenilalanina (F) o isoleucina (I); etc.

La tabla 6 ilustra el resultado del perfil de resistencia cruzada de 63 cepas resistentes diferentes

Tabla 6

ID MUESTRA	Mutaciones clave <sup>1</sup>	ID Grupo	CAMBIO EN VECES EN CISO V.S. REFERENCIA						
			ATV	AMP	IDV	LPV	NPV	SQV	PL-100
03-129572	24I/33F/54V/82A/84V	1		13.2	10.4	43.4	31.4	85.4	4.2
03-129573	24I/33F/46L/54L/82A	3		7.7	13.3	16.9		1.5	8.4
03-129574	54V/82A/84V/90M	5		6.7	29.3	46.5	33.1	125.3	
03-129575	33F/54V/73S/82A/84V/90M	6		68.8	32.8	130.1	172.1	400*	37.2
03-129576	33F/46L/54V/82A/84V/90M	7		20.9	11.4	59.7	31.4	61.4	18.4
03-129578	46I/82T/84V	11		2.8			1.6	1	1.2
03-129579	46I/82T/84V	13		5.9	12.9	20.1	16.2	32	2.6
03-129580	46I/82T/84V/90M	15		4.5	31.4	17.2	39.9	105.7	4.8
03-129581	33I/46I/84V/88D/90M	16		6.2	38.5	28.3	71.7	192.8	16.3
03-129583	84V/90M	21		9.3			12.1	27	2.3
03-129584	33F/50V	24		36.8	1.3	12.8	3.6	1.7	2.7
03-129585	48V/54V/82A/90M	26		3.9	53.4	70.4	68.2	400*	1.9
03-129586	30N/88D/90M	28		1.8	2.3	1.2	42.1		1.4
04-148709	32I/47A	1	1	19.7	18.8	65.1		0.2	1.4
04-148710	46I/47V/84V	118		7.1	20.1	19.5		11	1.3
04-148711	46I/47A/84V	119		2.6	47.2	151.8	10.4	1.1	14.8
04-148712	46I/88S	122		13.5	0.3	10.3	1.7	28.9	1.9
04-148713	46I/88S	123		3.1	0.2	2	0.7	4.8	0.4
04-148714	46I/88S	124		9.9	0.9	11.3		25.2	2
04-148715	33F/54L/88S/90M	9	65	6.9			41.4	31.7	3.3
04-148716	33F/54L/88S/90M	10	18.9	13.3	14.3		14.5	18.5	1.7
04-148718	33I/46I/84V/88D/90M	19	16.4	27.7	26.2		39.6	133.9	15.6
04-148719	33F/46I/84V/88D/90M	20	38	21		47.5	27.9	400*	18.8
04-148720	30N/33F/46L/54L/84V/88D	125	66.1	106.3		37.9	400*	237.3	23.2
04-148721	32I/46I/47V/50L	127	81.2		2.1			0.6	1.3
04-148722	33F/54L/82A/90M	40	10.7	20.9	16.4		13.6	24	51.5
04-148723	33F/54L/82A/90M	42	72.9	13.6	10.5	13.1	10.4		30.3
04-148724	33F/54V/73S/82A/90M	44	11.9	16.4	18.5	52.9	20	16.7	16.9
04-148725	32I/46L/47V/84V	53	25	89.4	21.7	133.9		0.8	0.6
04-148726	33F/54L/82A/84V	132	44.5	54.5	120.2	44.5	17.2	37.6	31.2
04-148727	33F/54V/82A/84V	133	100.9	37.9	18.7	119.6			18.4
04-148728	33F/46I/53L/82A/84V	134	18.3	20.8		21.1	11.1	23.2	17.8
04-148729	33F/54V/82T/84V/90M	61	14.1	26.6	26.8	19.2	14.9	51	14.4
04-148730	33F/46L/53L/54V/82A	67	22.7	15.3	16.8	65.9	28.3	14	15.6
04-148731	46L/54M/82L/84V/90M	69	52.3	116.8	42.5	47.7	43.8	50.3	84
04-148732	46L/54V/82A/90M	74	11.8	92.4	15.8	17.2	14.1	41.5	32.3
04-148733	46I/54V/82A/84V	76	26.5	18.9	16.2	45.1			15.2
04-148734	46L/54V/73C/84V/90M	78	55.2	26.6	93.2	36.9	82.6	400*	10.8
04-148735	46I/82T/84V/90M	81	32	76.9	30.2	15.2	27.1	79.3	10.3
04-148736	46I/82A/84V/90M	82					11.2		10.1
04-148737	54V/82A/84V/90M	84	50.5	38.5	37.4	103.3	36.1	133.9	20.3
04-148738	33F/54V/82A/84V/90M	86	24.7	18.6		33.6	21.1	85.5	10.8
04-148739	48V/54V/82A/90M	138	28	1.1	23.1	24.4	25.4	400*	1.1
04-148740	46L/48V/82A/84V/90M	141	91.6	35.6	36.5	44.7	43.6	400*	13.4
04-148741	48V/82A/84V/90M	142	57.7	24	34	18.7	27.3	400*	13.5
04-148742	46L/48V/82A/84V	94	21.5					36	1.2
04-148743	46L/48V/82A/90M	95	35.4		36.1		30.8	320.7	7.6
04-148744	46L/50L/54V/82A	98	68.9			10.6	11.8		10.2
04-148745	46I/50L/54V/82A	99	67.5				14	2.2	
04-148746	33I/46I/84V/90M	105	78.2	10.8	73.7	18.1	165.1	270.8	14.7
04-148747	33I/46I/84V/90M	107	47.5	10.6	30.3	17.1	28.5	44.4	33.6
04-148748	37S/41K/70E	115	1.4	0.7	1.2	1	1.6	1.2	0.9
04-148749	37T/41K/70E	151	1.5	1.9	1.4	1.3	1.9	1.2	1.9
04-148750	46I/53L/82T/90M	172	33.7		33.5	17.9	32.9	64.1	8.3
04-148751	54V/84V	171	78.2				15	12.2	0.8
04-148752	54V/84V	152	33.2	14.9	19.5	28.5	32.9	102.1	1.2

En la tabla 6 anterior, (1) indica las mutaciones utilizadas para seleccionar los virus en al menos un grupo; las mezclas fueron ignoradas para este propósito, (2) indica subtipo no B y (\*) indica que no se alcanzó el 50% de inhibición con la concentración de fármaco más alta probada y que por lo tanto se le asignó un valor de FC (400) arbitrario.

Las mutaciones clave indicadas en la tabla 6, se refieren únicamente a la posición en la proteasa del VIH-1 que ha sido mutada y al aminoácido resultante (código de una letra) encontrado en la proteasa mutada de la cepa resistente. El aminoácido original no se indica.

Por ejemplo, 33F/46L/54V/82A/84V/90M (grupo ID 7 de la tabla 6) indica que el aminoácido en la posición 33 fue mutado a fenilalanina (F), el aminoácido en la posición 46 fue mutado a leucina (L), el aminoácido en la posición 54 fue mutado a valina (V), el aminoácido en la posición 82 fue mutado a alanina (A), el aminoácido la posición 84 fue

mutado a valina (V) y el aminoácido en la posición 90 fue mutado a metionina (M). Análogamente con las otras cepas virales resistentes indicadas en la tabla 6.

5 Los resultados presentados en la tabla 6 anterior indican el cambio en veces (FC, en inglés) en  $CI_{50}$  respecto a la cepa de referencia (NL-4.3). Las celdas negras indican un  $FC \leq 10$ , las celdas grises indican valores de  $FC 2.5 \leq FC < 10$  y las celdas blancas indican un valor de  $FC$ ;  $0 \leq FC < 2.5$ . Los resultados del perfil de resistencia cruzada se ilustran aún más en el gráfico de la figura 1.

La tabla 7 resume los resultados de sensibilidad fenotípica obtenidos frente a las 63 cepas diferentes resistentes a múltiples IP mencionadas antes.

Tabla 7

	ATV	APV	IDV	LPV	NFV	SQV	PL-100
Mediana de FC	15.6	9.7	8.1	17.9	15	23.2	3.6
Media de FC	25.7	18.5	16.5	31.3	31.7	85	8.7
% de FC < 2.5	16	14	13	10	10	27	37
% de FC < 10	38	52	54	37	27	40	76
% de FC > 50	22	8	5	19	10	37	3

10

En los estudios de perfil de resistencia cruzada frente a las 63 cepas resistentes mencionadas en este documento, se determinó la  $CE_{95}$  de PL-100 frente a cada cepa. La mediana de  $CE_{95}$  representa la concentración necesaria para inhibir 95% de la replicación viral del 50% de las variantes diferentes de VIH-1 resistentes a los fármacos. La tabla 8 ilustra el porcentaje de cepas resistentes analizadas con la unión a proteínas ajustada  $CE_{95} \leq 200$  ng/ml. Las cepas resistentes se agrupan por el número de mutaciones primarias que tienen.

15

Tabla 8

Nº de mutaciones primarias de IP	% de cepas virales con $CE_{95} \leq 200$ ng/ml
0	100
1	100
2	36
3	23
4	0
5-6	0

La  $CE_{95}$  de PL-100 se determinó frente a cada una de las 63 cepas resistentes indicadas en este documento. La tabla 9 ilustra el porcentaje de cepas resistentes analizadas con la unión a proteínas ajustada  $CE_{95} \leq 630$  ng/ml. Las cepas resistentes se agrupan por el número de mutaciones primarias que tienen.

20

Tabla 9

Nº de mutaciones primarias de IP	% de cepas virales con $CE_{95} \leq 630$ ng/ml
0	100
1	100
2	82
3	55
4	29
5-6	0

Los resultados presentados en este documento indican que PL-100 tiene un perfil de resistencia cruzada favorable frente a varias cepas de VIH.

Ejemplo 13. Biodisponibilidad de los compuestos

Para mejorar la estabilidad química, la solubilidad acuosa de los principios activos, se designaron, sintetizaron y purificaron diversos compuestos a base de lisina, como derivados de PL-100 (PL-461, PL-462, etc.) (Fig. 2, Tabla 10). Se demostró que el principio activo es eficaz contra una aspartil proteasa del VIH-1 (patente de Estados Unidos N° 6,632,816). Como se mencionó precedentemente, los principios activos presentan una potente actividad antiviral cuando se los prueba en cepas virales del VIH-1 no mutadas (NL4.3 como el virus de tipo silvestre) así como en varias cepas mutadas.

Por consiguiente se desarrollaron y probaron diversos precursores de PL-100. Los ejemplos de precursores representativos de PL-100 se ilustran en la tabla 10. PL-100 y PL-337 se eligieron como principios activos representativos entre los dados a conocer en la patente de Estados Unidos N° 6,632,816 para Stranix et al, para mejorar la farmacocinética de estos potentes inhibidores.

Los compuestos indicados en la tabla 10 se prepararon siguiendo el esquema 1, 1A, 2, 3, 4 o 5; y más particularmente como se describió en cada ejemplo indicado antes. Los números de los compuestos indicados en la tabla 10 (N° de Ej.) corresponden a los números de ejemplo presentados precedentemente.

Tabla 10: Estructuras de los ejemplos de compuestos a base de lisina y principios activos

I

Ej. N°	X	Y	n	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>6</sub>	X'/Y'	D, L, DL R, S, RS
1 (PL-461)	4-NH <sub>2</sub>	H	4	(HO) <sub>2</sub> P(O)	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> CH	CH <sub>3</sub> O-CO	<i>iso</i> -butilo	H/H	S,S
2 (PL-462)	4-NH <sub>2</sub>	H	4	(NaO) <sub>2</sub> P(O)	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> CH	CH <sub>3</sub> O-CO	<i>iso</i> -butilo	H/H	S,S
3 (PL-507)	4-NH <sub>2</sub>	H	4	(HO) <sub>2</sub> P(O)	Naftil-2-CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> O-CO	<i>iso</i> -butilo	H/H	
4 (PL-498)	4-NH <sub>2</sub>	H	4	(HO) <sub>2</sub> P(O)	Naftil-1-CH <sub>2</sub>	4-morfolina-CO	<i>iso</i> -butilo	H/H	S,S
5 (PL-504)	4-NH <sub>2</sub>	H	4	(HO) <sub>2</sub> P(O)	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> CH	CH <sub>3</sub> CO	<i>iso</i> -butilo	H/H	S,S
6 (PL-515)	4-NH <sub>2</sub>	3-F	4	(HO) <sub>2</sub> P(O)	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> CH	CH <sub>3</sub> O-CO	<i>iso</i> -butilo	H/H	S,S
11 (PL-100)	4-NH <sub>2</sub>	H	4	H	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> CH	CH <sub>3</sub> O-CO	<i>iso</i> -butilo	H/H	
12 (PL-337)	4-NH <sub>2</sub>	3-F	4	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> CH	CH <sub>3</sub> O-CO	<i>iso</i> -butilo	H/H	

Para evaluar la magnitud de la escisión *in vivo* del grupo fosfato de los compuestos putativos, PL-100, PL-462 (basado en PL-100), se administraron los compuestos PL-337 y PL-515 (basados en PL-337) *po* (*per os*, (es decir, por boca)) (50 mg/kg) a ratas Sprague-Dawley machos y se midió su concentración plasmática a diferentes intervalos de tiempo post administración.

Todos los artículos de prueba (PL-100, PL-462, PL-337 y PL-515) se prepararon en vehículos diferentes a una concentración final de 25 mg/mL. La composición del vehículo es la siguiente: (1) 20% de etanol; 50% de propilenglicol; 0.05% p/v de Tween 20 y agua (Mezcla); (2) tampón PBS (PBS).

Los artículos de prueba se administraron a las ratas Sprague-Dawley machos en una única dosis oral de 50 mg/kg. Cada artículo se probó en tres ratas. Se extrajeron muestras de sangre (0.2-0.3 mL) a los tiempos post administración de 10, 20, 40, 60, 120, 180 y 360 minutos. La sangre extraída se centrifugó para aislar el plasma. El plasma resultante se separó y se almacenó a -70 °C.

Como se indicó antes, cuando los compuestos a base de lisina descritos en este documento se administran *in vivo*, el principio activo se libera y por lo tanto puede inhibir la proteasa de los retrovirus. Por ejemplo como se ilustra en la Fig.3 cuando PL-461 (o PL-462) se administra *in vivo*, la porción fosfato (en el caso de PL-461) es escindida

metabólicamente para generar el principio activo; PL-100. Análogamente cuando se administra PL-515 *in vivo*, la porción fosfato es escindida para generar PL-337.

Se trataron muestras de plasma junto con muestras estándar y para control de calidad para precipitar proteínas, y después se analizaron por HPLC-MS para determinar la presencia de PL-462, PL-100, PL-515 y PL-337.

5

Tabla 11

Compuesto	PL-462 (Nº de Ej. 2)	PL-100 (Nº de Ej. 1-F)	PL-515 (Nº de Ej. 13)	PL-337 (Nº de Ej. 13-A)
Vehículo	PBS	Mezcla	PBS	Mezcla
Número de ratas	3	3	3	3
Dosis (mg/kg)	50 po	50 po	50 po	50 po
AUC (µg/h*ml)	0.816 ± 0.295 (PL-100, detectado)	0.675 ± 0.171	1.075 ± 0.625 (PL-337, detectado)	1.180 ± 0.196
C <sub>máx</sub> (nM)	330 ± 109	498 ± 203	545 ± 215	681 ± 131
T <sub>máx</sub> (min)	93 ± 60	40 ± 16	87 ± 60	60 ± 15

En la tabla 11 anterior: 50 mg/kg de PL-462 = 43 mg/kg de PL-100  
50 mg/kg de PL-515 = 43 mg/kg de PL-337

Los resultados demuestran que los compuestos PL-462 y PL-515 pueden ser administrados por vía oral en soluciones acuosas. Ninguno de los compuestos, ni PL-462 ni PL-515, administrados en soluciones acuosas, es detectado en las muestras sanguíneas, lo que sugiere el rápido metabolismo a PL-100 y PL-337 los fármacos precursores.

10

La administración de soluciones acuosas de PL-462 y PL-515 mostró una administración entre equivalente y ligeramente superior de PL-100 y PL-337 en comparación con las formulaciones no acuosas de PL-100 y PL-337.

Basándose en estos resultados, todos los compuestos fosforilados descritos en la presente invención mostrarán propiedades farmacocinéticas similares.

El coeficiente de partición (LogP) de los compuestos elegidos y de los inhibidores de la proteasa del VIH (fármacos) correspondientes, son los siguientes:

15

Tabla 12.

Compuestos	LogP	Fármacos correspondientes	LogP
PL-461 (o PL-462)	-1.2	PL-100	3.6
PL-515	-0.75	PL-337	3.8

Los LogP se midieron de la manera estándar disolviendo 1 mg del compuesto en 0.8 mL de octanol y en el mismo volumen de tampón de fosfato de pH 7.4 (KHPO<sub>4</sub> 0.04 M). La concentración de los compuestos en las fases se detectó por LC-MS. esta prueba demostró la solubilidad de los compuestos al pH fisiológico. Los LogP obtenidos muestran que los compuestos son muy solubles en comparación con los fármacos correspondientes.

20

Los resultados de los experimentos de solubilidad ilustrados en la Fig. 4 indican que PL-461 también posee una solubilidad en agua moderada en condiciones ácidas y que la solubilidad aumenta drásticamente cuando el pH >4.5. La solubilidad en agua de PL-100 y PL-461 a pH 7.5 es 0.079 y 145 mg/ml para PL-100 y PL-461, respectivamente.

25

La versión fosforilada de PL-100; es decir PL-461, se eligió para una evaluación posterior debido a su estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad oral.

Materiales y métodos - estudios farmacocinéticos

Se llevaron a cabo varios estudios para determinar el perfil farmacocinético de los compuestos a base de lisina descritos en este documento solos o en combinación con inhibidores de CYP450.

30

Se llevó a cabo un primer estudio (estudio 1 N° 141690) para evaluar el perfil farmacocinético de PL-100 y PL-461 después de la administración de una única dosis oral en combinación con ritonavir y se llevaron a cabo otros dos

estudios (estudio 2 N° 143656 y estudio 3 N° 144536) para evaluar el perfil farmacocinético de PL-461 después de la administración de una única dosis oral en combinación con ritonavir.

5 Los animales de prueba fueron ratas Sprague Dawley (especie *Rattus norvegicus*) de 6-7 semanas de vida antes del comienzo de la dosificación y se obtuvieron de Charles River (Montreal, Canadá). El estudio comprende habitualmente 6 animales por grupo.

Veinticuatro horas antes de la iniciación del estudio, las ratas se distribuyeron al azar en 6 grupos, y cada grupo tuvo 6 ratas (3 ratas por cada jaula). Las ratas ayunaron durante 3 h antes de la dosificación y 3 h después de la misma.

10 Las formulaciones se prepararon como se indica a continuación. Las soluciones son estables a temperatura ambiente durante una semana y se cubren con papel de aluminio para evitar la luz. La mezcla contiene etanol, propilenglicol, Tween 20 y agua para inyección (20%, 50%, 0.1% y 30%, v/v/v/v). El pH de todas las soluciones se ajustó a 7.5. El volumen de dosificación para todas las formulaciones fue de 2 mL por kg de peso corporal.

15 La muestra de sangre se extrajo 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 h después de la dosificación. Las muestras de sangre se centrifugaron para separar el plasma y las muestras de plasma separadas se colocaron en crioviales y se congelaron a -80 °C para el análisis posterior. Las muestras de plasma junto con los estándares y las muestras para control de calidad se trataron mediante precipitación de proteínas y después se analizaron por HPLC-MS.

#### Precipitación de proteínas

20 En resumen, la precipitación de proteínas se realizó en alícuotas de 50.0 mL de blanco de plasma (para los estándares y las muestras para control de calidad (CC)) o de plasma para farmacocinética (PK, en inglés). Se agregaron 5.00 µL de solución de concentración conocida para los estándares y las muestras para CC o de acetonitrilo/DMSO = 1/1 para las muestras PK.

25 Las muestras se mezclaron en un equipo tipo Vórtex durante 10 segundos. Se agregaron 150 µL de solución de trabajo del estándar interno (1.00 µg/mL PL-459-01 en acetonitrilo). Las muestras se volvieron a mezclar en Vórtex durante 10 segundos y se sometieron a ultrasonido durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 10 000 rpm y se transfirieron 100 µL de sobrenadante a un inserto. Se agregaron 100 µL de agua desionizada (0.2% de FA) y las muestras se mezclaron en Vórtex. Finalmente, se inyectaron 20 µL en el HPLC.

#### Condiciones del instrumento para HPLC

##### HPLC:

30 Columna: Zorbax SB-C18, 2.1 x 50 mm, 5 µm  
 Fase móvil: Acuosa (Ac) = 0.1 % de ácido fórmico en agua desionizada  
 Orgánica (Org) = 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo  
 Gradiente: De 30% a 90% de Org en 5 min, después se retornó a 30% de Org en 1 min y se equilibró 4 min  
 35 Velocidad de flujo: 0.30 mL/min  
 Tiempo de la corrida: 10 min  
 Tiempo de retención: 5.9 min para PL-100 y PL-459 (IS), 4.6 min para PL-461, 6.3 min para ritonavir

##### MSD:

40 Fuente: ESI  
 Ancho del pico: 0.07 min  
 Polaridad: Positiva  
 Tiempo de adquisición: 2.0 - 7.0 min  
 Modo de adquisición: SIM, MH+, 625.3 para PL-100; 630.3 para PL-459 (IS), 705.3 para PL-461, 721.3 para ritonavir  
 45 Fragmentador: 100  
 Ganancia: 1.5  
 Resolución: Alta  
 Cámara de pulverización  
 Temperatura del gas: 325 °C Gas de secado: 12.0 L/min  
 Presión del nebulizador: 55 psig Vcap: 4.000 V

50

Cálculos de biodisponibilidad

$$\text{Biodisponibilidad de PL461} = \frac{(AUC_{0-24h} - p.o.)}{(AUC_{0-24h} - iv.)} \cdot \frac{\text{Dosis} - iv}{\text{Dosis} - po} \cdot \frac{PM - PL461}{PM - PL100} \cdot 100\%$$

$$\text{Biodisponibilidad de PL100} = \frac{(AUC_{0-24h} - p.o.)}{(AUC_{0-24h} - iv.)} \cdot \frac{\text{Dosis} - iv}{\text{Dosis} - po} \cdot 100\%$$

Nota:

- 5                    Peso molecular de PL461 = 705  
                       Peso molecular de PL100 = 624

Artículos de prueba para los estudios 1, 2 y 3

A menos que mencione específicamente, se usaron ratas hembras.

Artículos de prueba del estudio 1

Nombre:	PL-100-06
Lote/Nº de lote:	06
Condiciones de almacenamiento:	Temperatura ambiente (15 - 30 °C)
Nombre:	PL-461-05
Lote/Nº de lote:	05 (ZL-177-091404)
Condiciones de almacenamiento:	Temperatura ambiente (15 - 30 °C)
Nombre:	Ritonavir
Lote/Nº de lote:	749592E22
Condiciones de almacenamiento:	Temperatura ambiente (15 - 30 °C)

10

Formulación utilizada en el estudio 1

Formulación 1:

PL-100-06 (30 mg/kg) la concentración es 15 mg/mL

PL-100-06; 90.0 mg disueltos en 6.00 mL de Mezcla

15    Formulación 2:

PL-100-06 (30 mg/kg) la concentración es 15 mg/mL y Ritonavir (10 mg/kg) la concentración es 5 mg/mL

PL-100-06; 90.0 mg + 30 mg de RTV disueltos en 6.00 mL de Mezcla

Formulación 3:

PL-100-06 (30 mg/kg) la concentración es 15 mg/mL y Ritonavir (30 mg/kg) la concentración es 15 mg/mL

20

PL-100-06; 90.0 mg + 90 mg de RTV disueltos en 6.00 mL de Mezcla

Formulación 4:

PL-461-05 (30 mg/kg) la concentración es 15 mg/mL

PL-461-05; 90.0 mg disueltos en 6.00 mL de Mezcla, pH 7.0

Formulación 5:

## ES 2 539 527 T3

PL-461-05 (30 mg/kg) la concentración es 15 mg/mL y Ritonavir (10 mg/kg) la concentración es 5 mg/mL

PL-461-05; 90.0 mg + 30 mg de RTV disueltos en 6.00 mL de Mezcla, pH 7.0

Formulación 6:

PL-461-05 (30 mg/kg) la concentración es 15 mg/mL y Ritonavir (30 mg/kg) la concentración es 15 mg/mL

5 PL-461-05; 90.0 mg + 90 mg de RTV disueltos en 6.00 mL de Mezcla, pH 7.0

Artículos de prueba del estudio 2

Nombre:	PL-461-05
Lote/Nº de lote:	05 (ZL-7-177-091404)
Condiciones de almacenamiento:	Temperatura ambiente (15 - 30 °C)
Nombre:	Ritonavir
Lote/Nº de lote:	749592E22
Condiciones de almacenamiento:	Temperatura ambiente (15 - 30 °C)

Formulación utilizada en el estudio 2

Formulación 1:

10 PL-461-05 (29.93 mg/kg) la concentración es 14.97 mg/mL

PL-461-05; 89.8 mg disueltos en 6.00 mL de Mezcla

Formulación 2:

PL-461-05 (30.2 mg/kg) la concentración es 15.10 mg/mL y Ritonavir (10 mg/kg) la concentración es 5 mg/mL

15 PL-461-05; 90.6 mg + 30 mg RTV disueltos en 6.00 mL de Mezcla

Formulación 3:

PL-461-05 (29.43 mg/kg) la concentración es 14.72 mg/mL y Ritonavir (5,10 mg/kg) la concentración es 2.55 mg/mL

PL-461-05; 88.3 mg + 15.3 mg RTV disueltos en 6.00 mL de Mezcla

20 Formulación 4:

PL-461-05 (51.27 mg/kg) la concentración es 25.63 mg/mL

PL-461-05; 153.8 mg disueltos en 6.00 mL de Mezcla, pH 7.0

Formulación 5:

25 PL-461-05 (50,03 mg/kg) la concentración es 25.02 mg/mL y Ritonavir (17.03 mg/kg) la concentración es 8.52 mg/mL

PL-461-05; 150.1 mg + 51.1 mg de RTV disueltos en 6.00 mL de Mezcla, pH 7.0

Formulación 6:

PL-461-05 (49.33 mg/kg) la concentración es 24.67 mg/mL y Ritonavir (8.03 mg/kg) la concentración es 4.02 mg/mL

30 PL-461-05; 148.0 mg + 24.1 mg de RTV disueltos en 6.00 mL de Mezcla, pH 7.0

## ES 2 539 527 T3

### Artículos de prueba del estudio 3

Nombre:	PL-461-06
Lote/Nº de lote:	06 (SAP-8-57-102604)
Condiciones de almacenamiento:	Temperatura ambiente (15 - 30 °C)
Nombre:	Ritonavir (RTV)
Lote/Nº de lote:	749592E22
Condiciones de almacenamiento:	Temperatura ambiente (15 - 30 °C)

### Formulación utilizada en el estudio 3

#### Formulación 1:

- 5 PL-461-06 (30 mg/mL) la dosis es 60 mg/kg  
PL-461-06; 180.0 mg disueltos en 6.00 mL de Mezcla

#### Formulación 2:

- PL-461-06 (15 mg/mL) la dosis es 30 mg/kg y Ritonavir (5 mg/mL) la dosis es 10 mg/kg  
PL-461-06; 90.0 mg + 30 mg de RTV disueltos en 6.00 mL de Mezcla

#### 10 Formulación 3:

- PL-461-06 (50 mg/mL) la dosis es 100 mg/kg y Ritonavir (5 mg/mL) la dosis es 10 mg/kg  
PL-461-06; 300.0 mg + 30 mg de RTV disueltos en 6.00 mL de Mezcla

#### Formulación 4:

- 15 PL-461-06 (50 mg/mL) la dosis es 100 mg/kg  
PL-461-06; 300.0 mg disueltos en 6.00 mL de Mezcla

#### Formulación 5:

- PL-461-06 (30 mg/mL) la dosis es 60 mg/kg y Ritonavir (5 mg/mL) la dosis es 10 mg/kg  
PL-461-06; 180.0 mg + 30 mg de RTV disueltos en 6.00 mL de Mezcla

#### Formulación 6:

- 20 PL-461-06 (50 mg/mL) la dosis es 100 mg/kg y Ritonavir (8.33 mg/mL) la dosis es 16.67 mg/kg  
PL-461-06; 300 mg + 50 mg de RTV disueltos en 6.00 mL de Mezcla

### Artículos de prueba del estudio 4

PL-461-06

Lote/Nº de lote: 06 (SAP-8-57-102604)

- 25 Condiciones de almacenamiento: Temperatura ambiente (15 - 30 °C)

Ritonavir (RTV)

Lote/Nº de lote: 21-802AW21

Condiciones de almacenamiento: Temperatura ambiente (15 - 30 °C)

Fabricante: Abbott Laboratories, Limited

30

Preparación utilizada en el estudio 4

PL-461-06 Preparación 1	
Artículos de prueba:	PL-461 (20 mg/mL)
Vehículo:	Agua para inyección
pH:	6.0
Aspecto:	Solución amarilla pálida
Condiciones de almacenamiento:	Temperatura ambiente (15 -30 °C)
PL-461-06 Preparación 2	
Artículos de prueba:	PL-461 (60 mg/mL)
Vehículo:	Agua para inyección
pH:	6.0
Aspecto:	Solución amarilla pálida
Condiciones de almacenamiento:	Temperatura ambiente (15 -30 °C)
PL-461-06 Preparación 3	
Artículos de prueba:	PL-461 (200 mg/mL)
Vehículo:	Agua para inyección
pH:	6.0
Aspecto:	Solución amarilla
Condiciones de almacenamiento:	Temperatura ambiente (15 -30 °C)

Solución de Ritonavir (16 mg/mL)

- 5                    2 mL de la solución de Ritonavir, Norvir, (80 mg/mL) se diluyen con 8 mL de mezcla que contiene 60% de propilenglicol y 40% de agua. La concentración final de Ritonavir es 16.0 mg/mL.

Ejemplo 14. Farmacocinética de PL-461

La farmacocinética (PK) de PL-461 se evaluó y comparó con la del principio activo original

- 10                   El perfil farmacocinético se obtuvo por administración de los fármacos de prueba; PL-100 y PL-461 en ratas. Se administró PL-100 o PL-461 por vía oral en las dosis indicadas en la Fig. 5. Cada punto correspondiente al tiempo en la figura representa la [PL-100] plasmática promedio (ng/ml) de 6 ratas hembras a una dosis determinada.

Los resultados indican que la biodisponibilidad oral absoluta para PL-100 y PL-461 a 30 mg/kg es 8.7 y 23%, respectivamente. La biodisponibilidad de PL-461 a 100 mg/kg es de 23%.

- 15                   La línea horizontal en la Fig. 5 representa la [PL-100] plasmática de 200 ng/ml. El perfil farmacocinético de PL-461 muestra que el tiempo (t) > 200 ng/ml es de aproximadamente 6 horas en ratas a una dosis de 100 mg/kg, lo que sugiere que PL-461 tiene potencial como un fármaco de dos veces al día para mantener dicha [PL-100] plasmática en un hombre a una dosis equivalente.

Se compararon los parámetros farmacocinéticos de PL-100 y PL-461 en ratas\*\*. Estos resultados se resumen en la tabla 13, a continuación.

20

Tabla 13

	Dosis (mg/kg)	Vía	$\lambda z$ (1/h)	T1/2 (h)	Tmáx (h)	Cmáx (ng/ml)	Túlt (h)	Cúlt (ng/ml)	AUCúlt (h/ng/ml)	AUCinf (h ng/ml)	Vz_F (L/kg)	Cl_F (L/h/kg)
PL-100*	5	i.v.	0.52	1.2	0.1	1804	6	44	1369	1434	6.1	3.5
PL-100*	50	p.o.	0.09	8.4	0.4	457	24	15	1101	1284	549	44
PL-461*	50	p.o.	0.10	9.4	0.5	1216	24	13	2226	2416	282	23

En la tabla 13 las abreviaturas son las siguientes:

*Az constante de velocidad de eliminación*

*t1/2 semivida de eliminación plasmática*

*Tmáx tiempo de concentración máxima*

*Cmáx concentración máxima*

*Túlt tiempo de la última concentración medible*

*Cúlt última concentración medible*

*AUCúlt área bajo la curva de conc. plasmática -tiempo desde cero hasta la última concentración medible*

*AUCinf área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde cero extrapolada al infinito*

*Vz\_F volumen aparente de distribución*

*Cl\_F depuración oral aparente*

\*Cada grupo de tratamiento tuvo al menos 6 ratas hembras.

\*\*El análisis farmacocinético se hizo usando el método no compartimental con WinNonLin Professional (versión 4.0).

AUC se calculó usando el método lineal hacia arriba/logarítmico hacia abajo.

Los resultados presentados en la Fig. 5 y en la tabla 13 indican que PL-461 tiene mejor farmacocinética que PL-100.

5 Ejemplo 15. Métodos y composiciones para mejorar la farmacocinética de principios activos y compuestos a base de lisina

Los resultados presentados en este documento indican que aunque los principios activos (por ej., PL-100, etc.) y los compuestos a base de lisina (por ej., PL-461, PL-462, etc.) son buenos compuestos antivirales, la farmacocinética todavía se puede mejorar.

10 Por consiguiente se llevaron a cabo otros experimentos a ese efecto administrando PL-100 o PL-461 con un fármaco capaz de inhibir la monooxigenasa del citocromo P450 (CYP450) (es decir un inhibidor de CYP450) para evaluar si este tipo de inhibidores podía aumentar la farmacocinética de los compuestos descritos en este documento.

15 Se eligieron ritonavir, quinidina, ketoconazol y sulfafenazol entre los inhibidores de CYP450 y se comparó la farmacocinética de combinaciones de PL-461 e inhibidores de CYP450 con la farmacocinética de otra combinación de IP e inhibidores de CYP450. El efecto de los inhibidores de CYP450 sobre el metabolismo de la anti-proteasa del VIH-1 se evaluó en microsomas hepáticos humanos.

Aunque, ketoconazol y sulfafenazol son capaces de aumentar la farmacocinética de PL-100, los resultados de la Fig. 6 indican que la combinación más eficaz es la de PL-100 y ritonavir.

Los resultados presentados en la Fig. 7 y en la tabla 14 ilustran la biodisponibilidad de PL-100 o PL-461 cuando se administra en combinación con un inhibidor de CYP450.

20 Tabla 14. Biodisponibilidad oral de PL-100 y PL-461 en ratas hembras (Nº 141690)

Nº de grupo	Artículo de prueba	Dosis* (mg/kg)	Dosis** (mg/kg)	Biodisponibilidad absoluta*** (%)							Prom.	DE	CV(%)	Máx	Mín	Mediana
1	PL100/RTV	30/0	30/0	8.5	8.4	8.5	9.0	7.2	10.7	<b>8.7</b>	1.1	12.8	10.7	7.2	<b>8.5</b>	
2		30/10	33/10	36.3	25.0	24.8	31.3	21.9	33.7	<b>28.8</b>	6.3	19.9	36.3	21.9	<b>28.1</b>	
3		30/30	32/30	70.0	54.6	75.3	54.8	70.2	41.2	<b>61.0</b>	13.0	21.3	75.3	41.2	<b>62.4</b>	
4	PL461/RTV	30/0	35/0	15.9	33.6	13.0	14.9	22.3	23.8	<b>20.6</b>	7.7	37.3	33.6	13.0	<b>19.1</b>	
5		30/10	34/11	80.7	45.1	105.1	94.3	47.7	36.5	<b>68.2</b>	28.8	42.3	105.1	36.5	<b>64.2</b>	
6		30/30	34/34	32.7	93.8	42.1	64.9	66.7	43.5	<b>57.3</b>	22.4	39.1	93.8	32.7	<b>54.2</b>	

\*: Dosis prevista por protocolo

Nº de grupo	Artículo de prueba	Dosis* (mg/kg)	Dosis** (mg/kg)	Biodisponibilidad absoluta*** (%)	Prom.	DE	CV(%)	Máx	Mín	Mediana
**: Dosis corregida por los resultados de CC. ***: La biodisponibilidad se calculó a partir de la dosis corregida.										

Estos resultados indican que el ritonavir (RTV: un inhibidor de CYP450) aumenta la biodisponibilidad de PL-100 y también la de PL-461.

5 Otro inhibidor de CYP450 eficaz para aumentar la farmacocinética de los principios activos o los compuestos a base de lisina (denominados aquí "compuestos") descritos en este documento, se puede identificar mediante la  
 10 coadministración de un inhibidor de CYP450 putativo y un compuesto deseado (uno o más compuestos) en un ensayo (por ejemplo un ensayo en microsomas o estudios *in vivo*) descrito aquí y la medición de la cantidad de compuesto residual (principio activo) que todavía permanece después de varios tiempos luego de la administración (incubación). Un inhibidor de CYP450 que aumenta la biodisponibilidad del compuesto (principio activo) en comparación con la biodisponibilidad medida sin el inhibidor de CYP450 putativo sería encontrado eficaz para el propósito de mejorar la farmacocinética del compuesto.

15 En el estudio 4, ritonavir se administró primero y PL-1461 se administró 15 o 30 minutos después. El resultado obtenido usando este esquema de administración (Tabla 15) indica que este método es tan eficaz para aumentar la farmacocinética del compuesto a base de lisina dado a conocer en este documento como el método de los estudios 1-3.

Tabla 15

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Conc. del artículo de prueba (mg/mL)	Vía de administración	Volumen de dosificación (mL/kg)	Número de animales por grupo
1	PL-461-06	100	20	Oral	5	3 machos/3 hembras
2	PL-461-06	300	60	Oral	5	3 machos/3 hembras
3	PL-461-06	1000	200	Oral	5	3 machos/3 hembras
4	RTV	16	16	Oral	1	3 machos/3 hembras
	PL-461-06	100	20	Oral	5	
5	RTV	16	16	Oral	1	3 machos/3 hembras
	PL-461-06	100	20	Oral	5	
6	RTV	16	16	Oral	1	3 machos/3 hembras
	PL-461-06	100	20	Oral	5	

Ejemplo 16. Farmacocinética de combinaciones de compuestos a base de lisina e inhibidores de CYP450

20 En los estudios 1, 2 y 3 mencionados antes, PL-461 y RTV fueron coadministrados por vía oral en las dosis indicadas en la Fig. 8.

25 Cada punto correspondiente al tiempo en la Fig. 8 representa la concentración plasmática promedio de PL-100 (ng/ml) de 6 ratas hembras a una dosis determinada. La línea horizontal en la Fig.8 representa la concentración plasmática de PL-100 de 630 ng/ml. El perfil farmacocinético muestra que el tiempo (t) > 630 ng/ml es de aproximadamente 6 horas en ratas a una dosis de 100 mg/kg para PL-461 y 16.7 mg/kg para RTV, lo que sugiere que PL-461 tiene potencial como un fármaco de dos veces al día para mantener dicha concentración plasmática de PL-100 en un hombre a una dosis equivalente.

Ejemplo 17. Optimización de la relación entre los compuestos a base de lisina versus el inhibidor de CYP450

30 Se determinó la biodisponibilidad oral absoluta de PL-461 en diversas condiciones como se indica en la Fig.9. Más particularmente, se varió la concentración de PL-461 y la proporción de PL-461 en comparación con CYP450. Los resultados presentados aquí indican que se puede alcanzar una suficiente biodisponibilidad oral, con respecto a CE<sub>95</sub> ajustada por unión a proteínas frente a cepas resistentes cuando se refuerzan a una relación de 6 (PL-461) a 1

(RTV), aunque otras relaciones también pueden ser utilizadas con éxito como se indica en la tabla 16 a continuación.

Tabla 16. Biodisponibilidad oral de PL-461 en ratas con y sin ritonavir (Nº 141690, Nº 143656, Nº 144536)

Nivel de dosis de PL461	Relación de dosis (PL461/RTV)	Dosis* (mg/kg)	Biodisponibilidad absoluta (%)**						Prom.	DE	CV(%)	Máx	Mín	Mediana
		(PL461/RTV)												
30 mg/kg	N/A***	35/0	15.9	33.6	13.0	14.9	22.3	23.8	<b>22.5</b>	6.9	30.7	33.6	13.0	<b>23.8</b>
		27/0	30.1	24.0		24.5								
	6/1	26/3.5	42.2	37.6		45.1	65.5		<b>47.4</b>	12.3	26.0	65.5	37.6	<b>43.7</b>
	3/1	34/11	80.7	45.1	105.1	94.3	47.7	36.5	<b>52.6</b>	24.5	46.6	105.1	26.5	<b>43.9</b>
		26/9.2	62.1	45.3	26.5	38.5	42.6	34.7						
		26/8.4	34.7	37.1	32.9	28.6	54.9	39.4						
1/1	34/34	32.7	93.8	42.1	64.9	66.7	43.5	<b>57.3</b>	22.4	39.1	93.8	32.7	<b>54.2</b>	
50 mg/kg	N/A***	48/0	11.1	20.3	3.2	23.3		31.3	<b>17.4</b>	7.7	44.6	31.3	7.1	<b>14.7</b>
		51/0	12.0	7.1	14.7	24.4	13.4	24.4						
	6/1	55/11	34.9	51.7	33.9	58.4	46.0	24.1	<b>41.5</b>	12.8	30.7	58.4	24.1	<b>40.5</b>
	3/1	45/15	49.0	64.5	41.9	42.3	13.8	85.2	<b>49.5</b>	24.0	48.6	85.2	13.8	<b>45.7</b>
100 mg/Kg	N/A***	84/0	13.6	37.1	25.3	25.6	15.2		<b>23.4</b>	9.5	40.6	37.1	13.6	<b>25.3</b>
	10/1	85/9.2	25.2	20.1	40.0	20.3	28.9	51.4	<b>31.0</b>	12.4	40.0	51.4	20.1	<b>27.1</b>
	6/1	89/17	91.2	47.0	39.1	56.7	35.6		<b>53.9</b>	22.4	41.5	91.2	35.6	<b>47.0</b>

\*: Dosis corregida por los resultados de CC.  
 \*Tabla 10: Estructuras de los ejemplos de compuestos a base de lisina y principios activos\*: La biodisponibilidad se calculó a partir de la dosis corregida.  
 \*\*\*: Sin ritonavir

5 Finalmente la Fig. 10 indica que PL-100 inhibe a CYP3A4/5 como lo hace el RTV. La mayor Ki de RTV (aproximadamente 10 veces mayor) confirma que es capaz de actuar como un agente de refuerzo para PL-100.

Se demostró aquí que PL-100 es un nuevo IP potente, específico y no tóxico, y que tiene patrón de resistencia cruzada favorable comparado con todos los IP aprobados.

10 PL-461, un precursor de PL-100, es >1800 veces más soluble que PL-100 y tiene 2 a 3 veces mayor biodisponibilidad oral que PL-100. PL-461 tiene potencial como nuevo IP para el tratamiento de pacientes infectados con cepas de VIH resistentes a los IP que tienen, por ejemplo dos o menos mutaciones primarias. PL-461, cuando se combina con un inhibidor de CYP450 como, por ejemplo, ritonavir, tiene un gran potencial como nuevo IP para el tratamiento de pacientes infectados con cepas de VIH resistentes a los IP que tienen mutaciones (por ejemplo, dos o más mutaciones primarias). En este documento se encontró que la relación entre PL-461 y ritonavir necesaria para el refuerzo es adecuada para la administración *in vivo*.

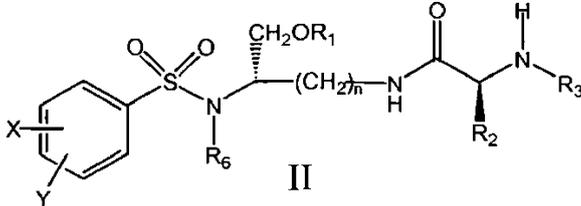
15 Basándose en los datos de resistencia cruzada de PL-100 y los resultados de la farmacocinética, se espera que dosis equivalentes de PL-461 en un hombre inhiban eficazmente la replicación de cepas de VIH proteasa-resistentes. Además, estos datos también sugieren que PL-461 también se puede administrar, por ejemplo, usando un régimen de dosificación conveniente de dos veces al día.

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que contiene:

a) un compuesto a base de lisina de fórmula II



5 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde:

n es 4,

X es 4-NH<sub>2</sub>,

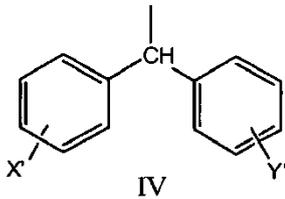
Y es H

R<sub>6</sub> es *iso*-butilo,

10 R<sub>3</sub> es CH<sub>3</sub>O-CO-,

X' e Y' son H,

R<sub>2</sub> es un grupo difenilmetilo de fórmula IV



R<sub>1</sub> es (HO)<sub>2</sub>P(O);

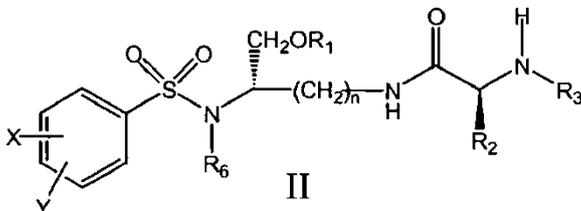
15 b) ritonavir; y

c) un portador farmacéuticamente aceptable;

donde la relación (p/p) entre dicho compuesto a base de lisina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y ritonavir, es de 6:1 a 3:1.

2. Una combinación farmacéutica que contiene:

20 a) un compuesto a base de lisina de fórmula II



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde:

n es 4,

X es 4-NH<sub>2</sub>,

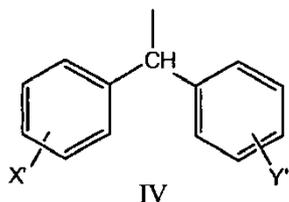
25 Y es H

R<sub>6</sub> es *iso*-butilo,

R<sub>3</sub> es CH<sub>3</sub>O-CO-,

X' e Y' son H,

R<sub>2</sub> es un grupo difenilmetilo de fórmula IV



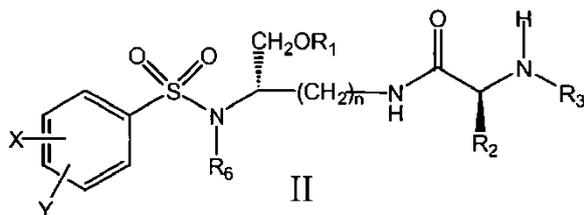
5 R<sub>1</sub> es (HO)<sub>2</sub>P(O); y

b) ritonavir;

donde la relación (p/p) entre dicho compuesto a base de lisina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y ritonavir, es de 6:1 a 3:1.

10 3. La combinación farmacéutica de la reivindicación 2, en la que el compuesto a base de lisina de fórmula II y ritonavir se formulan como composiciones separadas que se pueden administrar por separado, al mismo tiempo o en momentos diferentes.

4. El uso de un compuesto a base de lisina de fórmula II



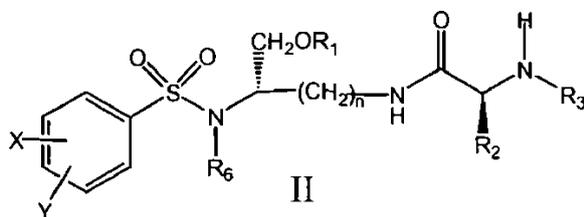
15 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y ritonavir en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una infección por el VIH o para el tratamiento o la prevención del SIDA,

donde n, X, Y, X', Y', R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>6</sub> son los definidos en la reivindicación 1;

y donde la relación (p/p) entre el compuesto a base de lisina y ritonavir es de 6:1 a 3:1.

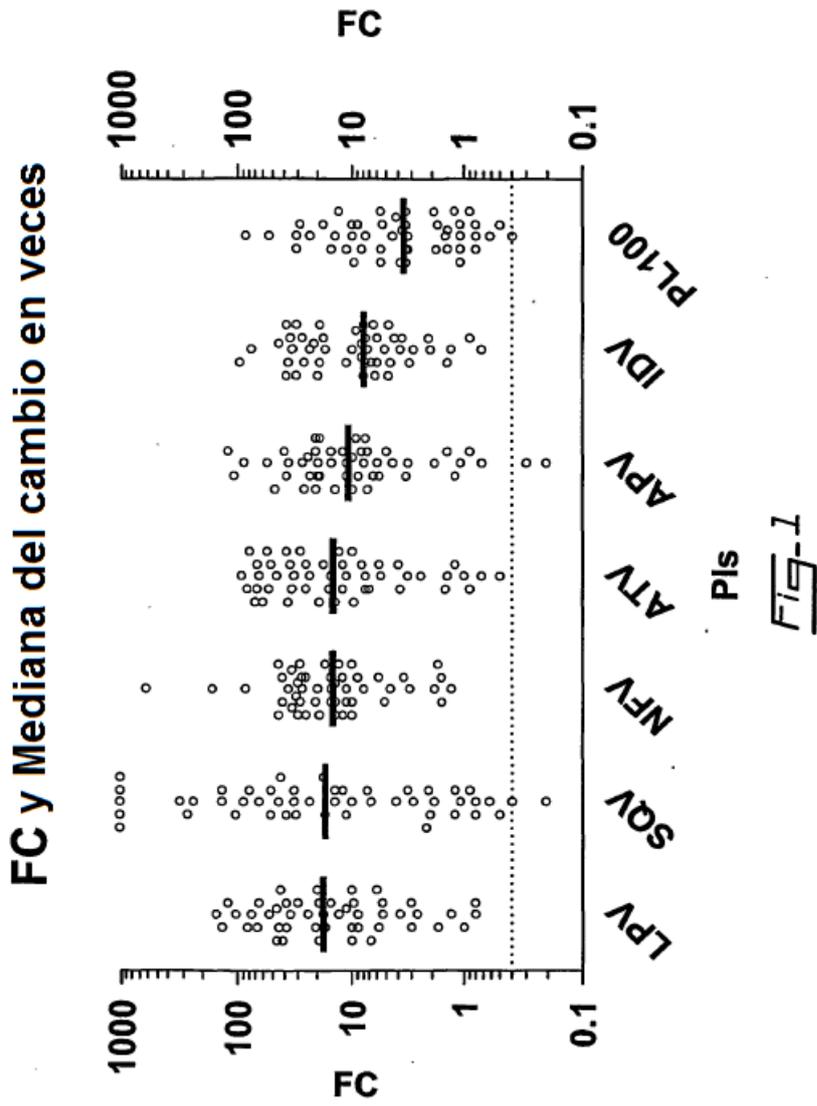
20 5. Una composición farmacéutica como la definida en la reivindicación 1, o una combinación farmacéutica como la definida en la reivindicación 2 o 3, destinada al tratamiento o la prevención de una infección por VIH o al tratamiento o la prevención del SIDA.

6. El compuesto a base de lisina de fórmula II



en el que n, X, Y, X', Y', R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>6</sub> son los definidos en la reivindicación 1 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y

25 ritonavir para usar en el tratamiento o la prevención de una infección por VIH o tratar o prevenir el SIDA, donde ritonavir está en una cantidad que es suficiente para reducir el metabolismo del compuesto a base de lisina de fórmula II y donde la relación (p/p) entre dicho compuesto a base de lisina y ritonavir es de 6:1 a 3:1.



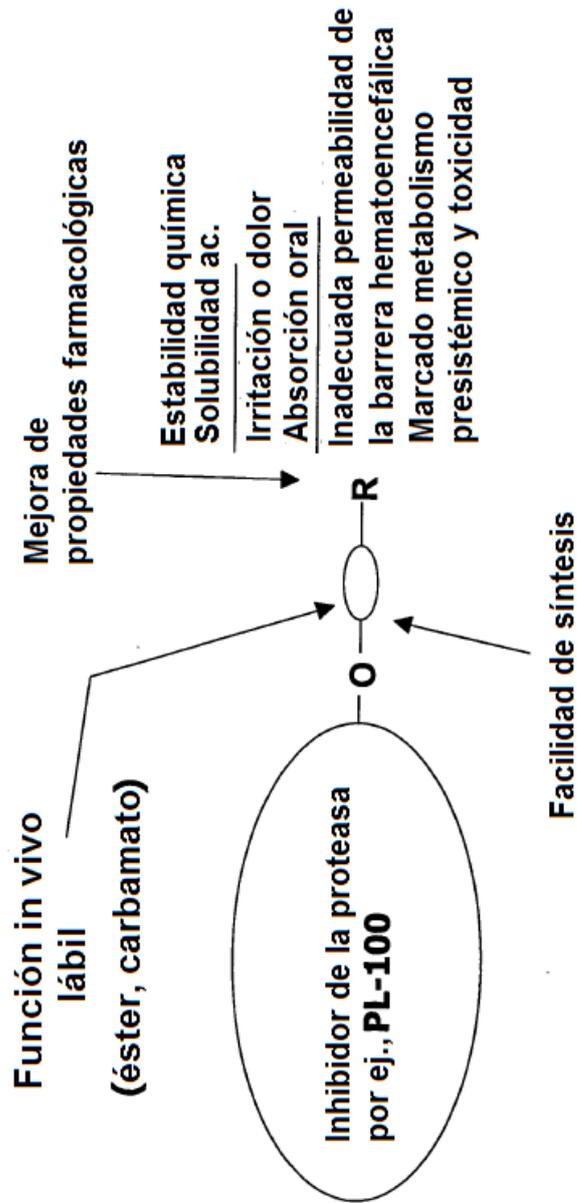


FIG-2

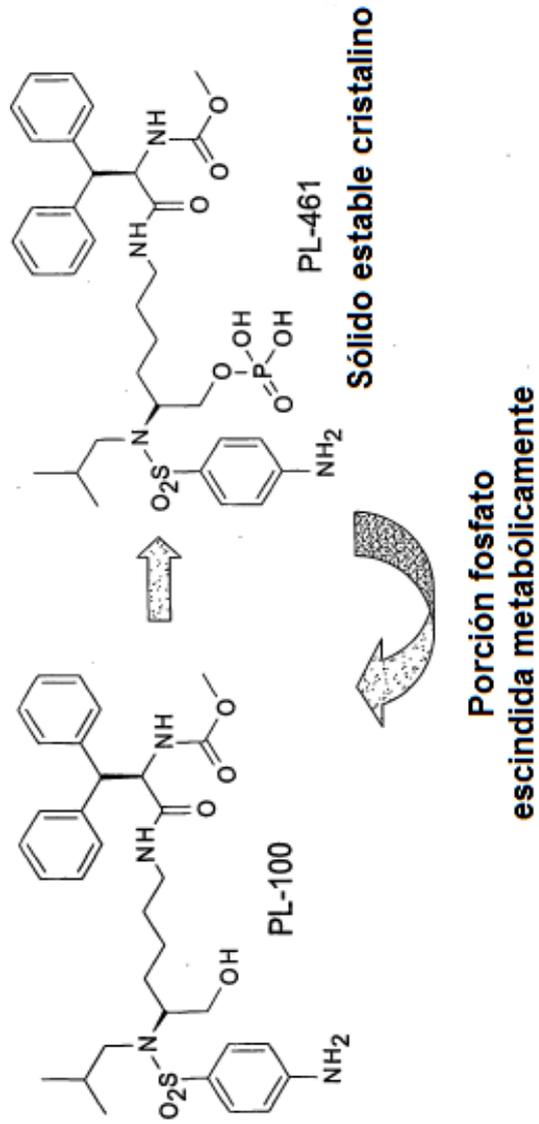


FIG-3

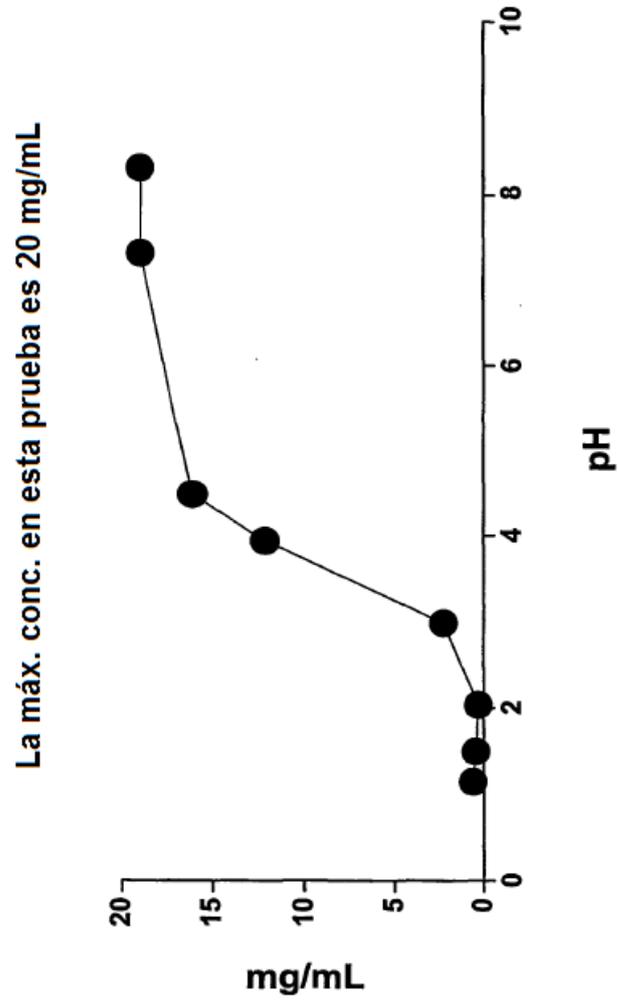


Fig-4

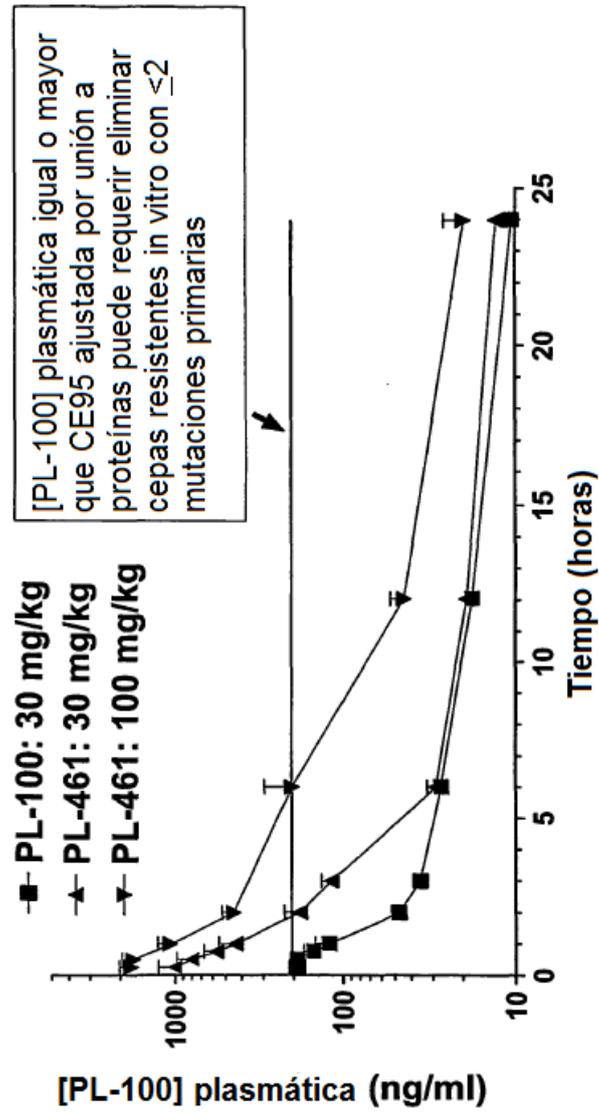


FIG-5

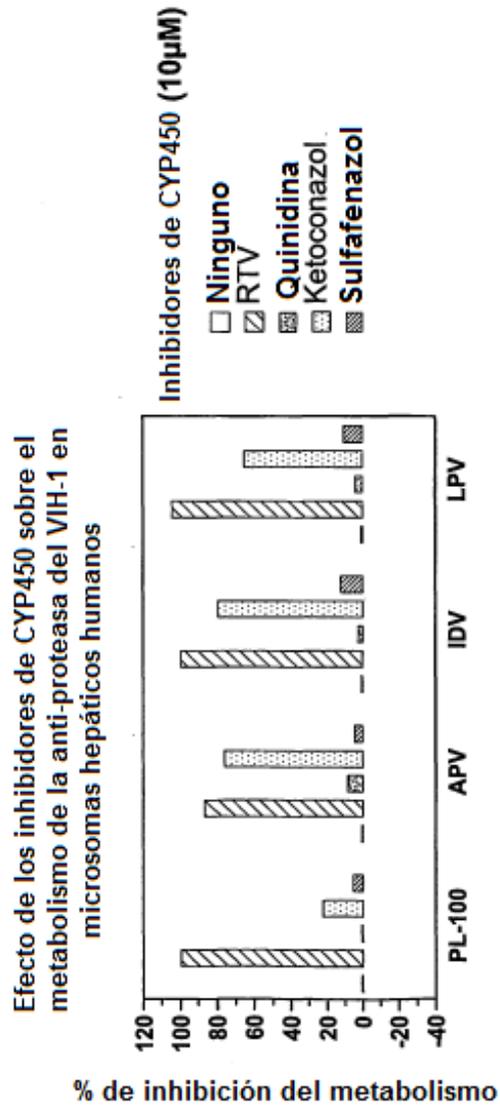


Fig. 6

Biodisponibilidad oral de PL100 y PL461 en ratas hembras (Nucro N° 141690)

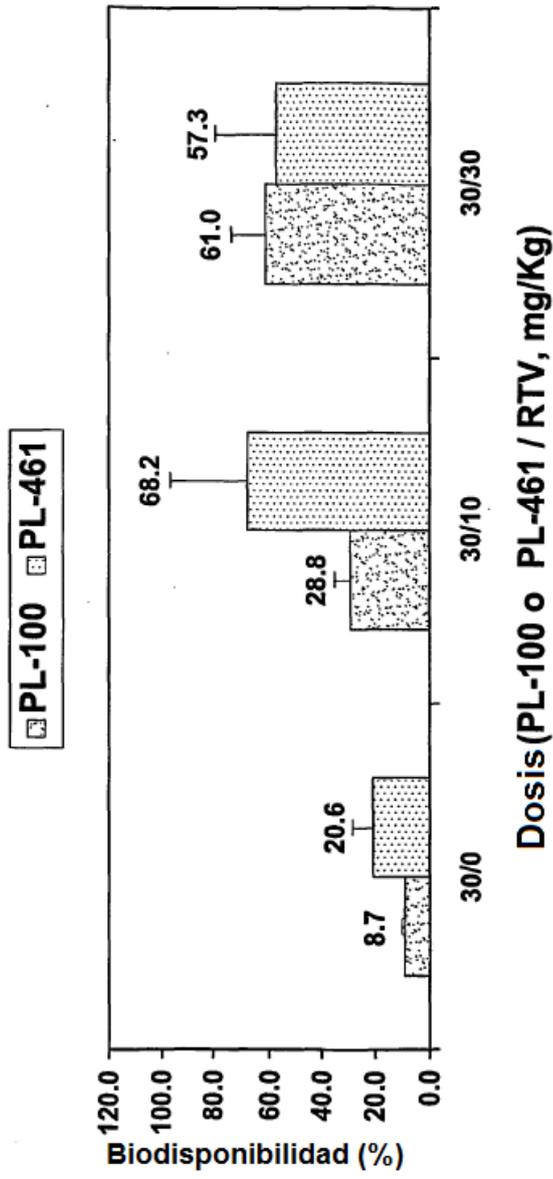


Fig-7

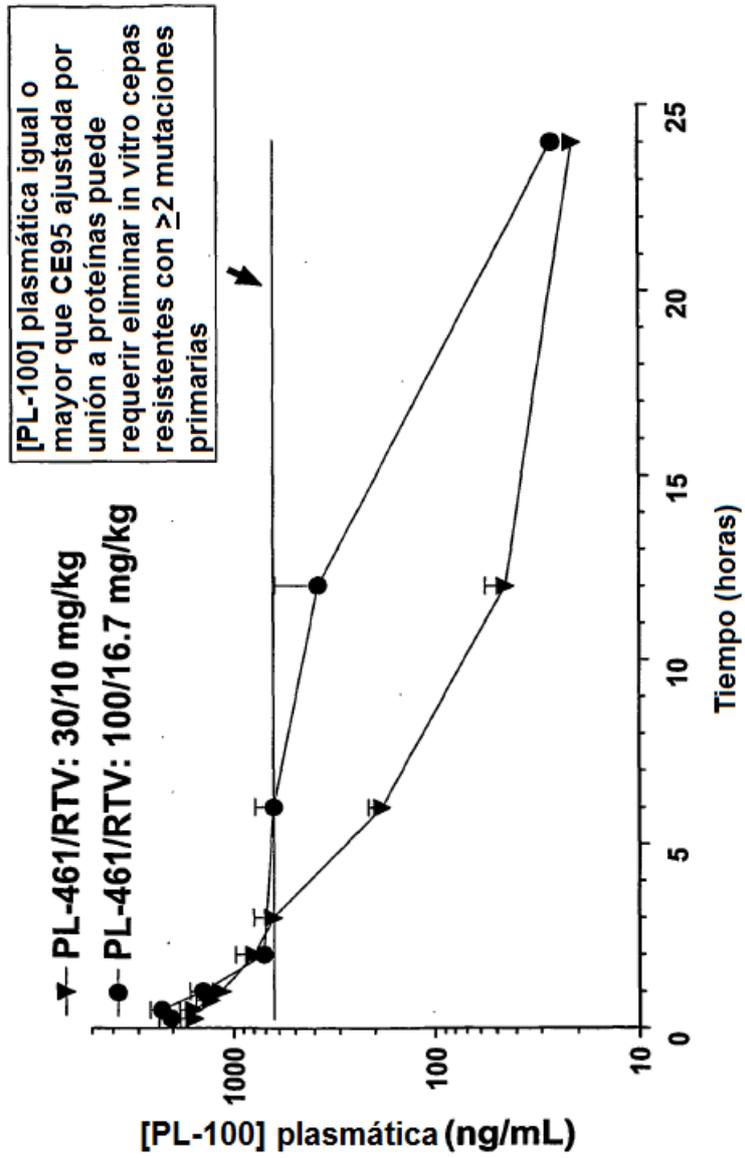
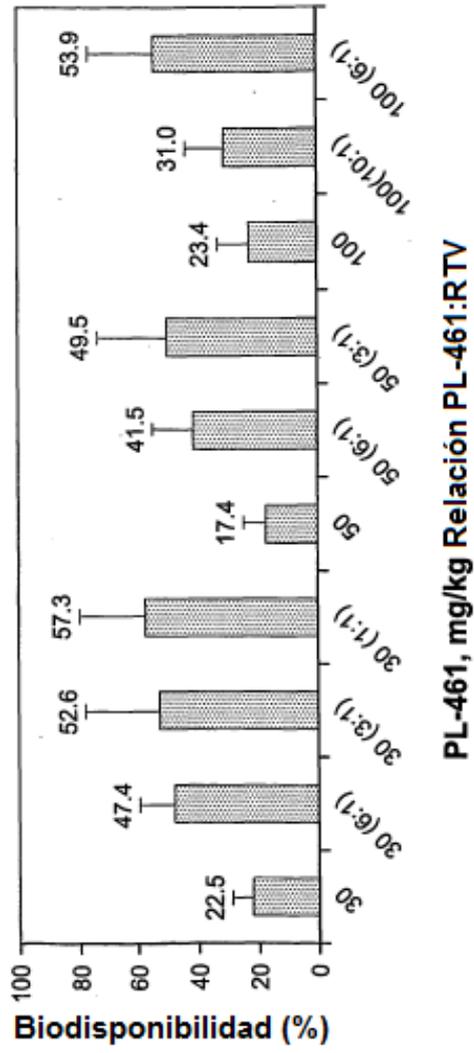


FIG-8



**FIG-9**

**Efecto de PL-100 y Ritonavir sobre CYP450 humanos seleccionados**

Enzima	Sustrato sonda	Reacción metabólica	K <sub>i</sub> (μM)	
			PL-100	Ritonavir
CYP2C9	Tolbutamida	Tolbutamida Metil-Hidroxilación	13.3 ± 1.7	13.9 ± 2.0
CYP2D6	Dextrometorfano	Dextrometorfano O-Desmetilación	27.8 ± 2.3	2.7 ± 0.3
CYP3A4/5	Testosterona	Testosterona 6β-Hidroxilación	0.445 ± 0.050	0.033 ± 0.005

**Fig-10**