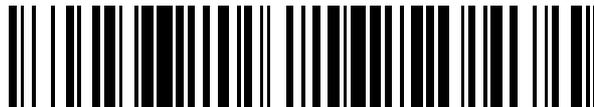


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 144**

51 Int. Cl.:

C07F 9/6512 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2002** **E 02740215 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016** **EP 1406911**

54 Título: **Derivados de 6-[2-(fosfonometoxi)alcoxi] pirimidina que tienen actividad antivírica**

30 Prioridad:

29.06.2001 US 302212 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2016

73 Titular/es:

**INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY AND
BIOCHEMISTRY OF THE ACADEMY OF
SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC (50.0%)
Flemingovo namesti 2
166 10 Praha 6, CZ y
REGA STICHTING VZW. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HOLY, ANTONIN;
BALZARINI, JAN M.R. y
DE CLERCQ, ERIK DESIRE ALICE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 564 144 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

Derivados de 6-[2-(fosfonometoxi)alcoxi] pirimidina que tienen actividad antivírica

5 **Antecedentes de la Invención****Campo de la Invención**

10 Se desvelan análogos nucleotídicos acíclicos que contienen grupos fosfonato, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 4.659.825, 4.808.716, 4.724.233, 5.142.051, 5.302.585, 5.208.221, 5.352.786, 5.356.886, en los documentos de publicación EP números 269.947, 481.214, 630.381, 369.409, 454.427, 468.119, 434.450, 618.214 y 398.231 y en los documentos WO 95/07920, WO 94/03467 y WO 96/33200. Las enseñanzas de estas patentes incluyen compuestos en los que un grupo fosfonato se une a una base de purina o pirimidina definida, generalmente en la posición 1 o 9 de las bases de pirimidina o purina, respectivamente, por medio de un grupo 2-(metoxi)propilo, un grupo 2-(metoxi)etilo, un grupo 2-metoxi-3-hidroxi-propilo, o un grupo 2-metoxi-3-fluoropropilo, conocidos respectivamente como compuestos de purina o pirimidina PMP, PME, HPMP y FPMP. Estos compuestos muestran actividad antivírica y citostática.

20 Daluge y col. (34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Oct. 4-7, 1994) desvela derivados de carbovir en los que la posición 6 de la purina está sustituida con ciclopropilamino, N-ciclopropil-N-metilamino o N-aziridinilo.

Cihlar y col., "Antimicrobial Agents and Chemotherapy" 39(1): 117-124 (1995) desvelan N⁶-aminohexil-PMEDAP.

25 Holy y col., "ACS Symp. Ser." 401: 57-71 (1989) y Holy, "Kem. Ind." 38(10): 457-462 (1989) describen la actividad antivírica de ciertos análogos nucleotídicos N⁶-sustituidos.

30 Se desvelan análogos de pirimidina fosfonato-sustituidos adicionales por Holy y col., "Collect. Czech. Chem. Commun." 64: 242-256 (1999) y J. Med. Chem. (1999), 42(12), 2064-2086, Eger y col., "J. Med. Chem." 37: 3057-3061 (1994), Wormstadt y col., "J. Heterocyclic Chem." 37: 1187-1191 (2000), y Franchetti y col., "Nucleosides & Nucleotides" 14(3-5): 607-610 (1995). Las últimas tres publicaciones tienen una cadena lateral que contiene fosfonato unida a través de un sustituyente 6-N de pirimidina 2,4-disustituida.

Objetivos de la invención

35 Un objetivo de esta invención es proporcionar compuestos que tienen actividad antiviral, en particular contra virus ARN o ADN tales como VIH, VHB o VHS.

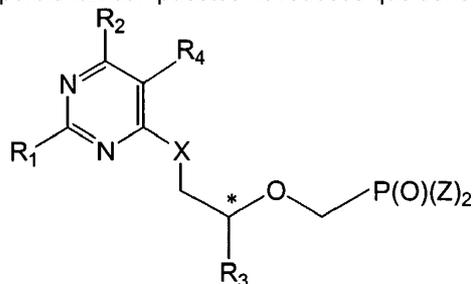
40 Es un objetivo adicional proporcionar compuestos útiles en la preparación de resinas de intercambio iónico o medios quirales.

Es un objetivo adicional proporcionar intermedios y métodos para preparar dichos compuestos.

45 Estos y otros objetivos se entenderán más completamente por referencia adicional a las divulgaciones en el presente documento.

Resumen de la Invención

De acuerdo con la invención, se proporcionan compuestos novedosos que tienen la fórmula (I)

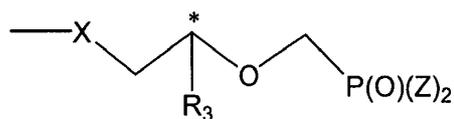


(I)

50 en la que

R₁ es H, amino o metilsulfanilo;

R₂ es H, metilo, halo, -N(R₅)₂, hidroxilo, hidroxilo protegido o un grupo de la fórmula (Ia)



(Ia)

R₃ es independientemente H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;

R₄ es H o halo;

X independientemente es oxígeno, azufre o un enlace;

5 Z es independientemente hidroxilo, un éster o una amida;

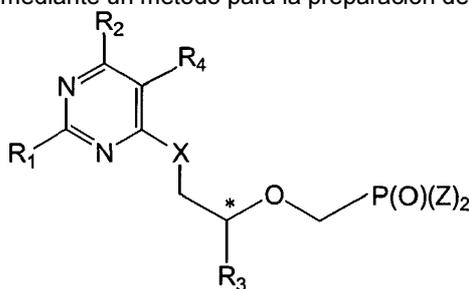
R₅ es independientemente H, alquilo C₁-C₈ o un grupo protector; y

* designa un átomo de carbono quiral; y

sales y solvatos de los mismos.

10

Los objetivos también se consiguen mediante un método para la preparación de compuestos de la fórmula (I)

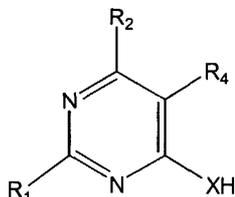


(I)

en la que

R₁, R₂, R₃, R₄, X, Z, R₅ y * se han definido anteriormente; que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula

15 (II)



(II)

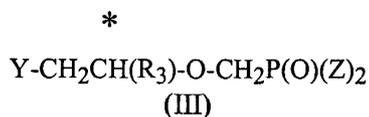
en la que

R₁ y R₅ se han definido anteriormente;

20 R₂ es H, metilo, halo, -N(R₅)₂, hidroxilo o hidroxilo protegido; y

X es O o S;

con un compuesto de la fórmula (III)



25

en la que

Z es un éster o una amida;

* designa un átomo de carbono quiral;

30 R₃ es H, metilo, halometilo o hidroximetilo protegido; y

Y es un grupo saliente

en disolvente aprótico dipolar en presencia de una base para obtener un compuesto de fórmula (I) en la que Z es éster o amida; (b) uno o ambos grupos Z opcionalmente se convierten para producir el compuesto de fórmula (I) en la que al menos un Z es hidroxilo.

35

En otra realización de esta invención, se proporciona un método para la preparación de compuestos de fórmula (I) en la que

R₁ es H, amino o metilsulfanilo;

R₂ es -N(R₅)₂

R₃ es independientemente H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;

R₄ es H o halo

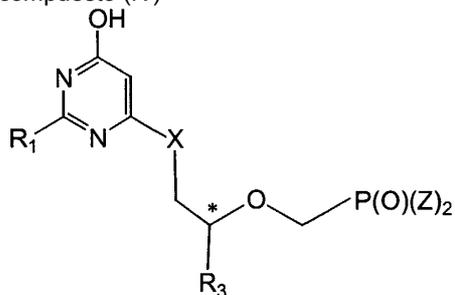
5 X es oxígeno o azufre;

Z es independientemente hidroxilo, un éster o una amida;

R₅ es independientemente H, alquilo C₁-C₈ o un grupo protector; y

* designa un átomo de carbono quiral

que comprende hacer reaccionar un compuesto (IV)



(IV)

10 en la que

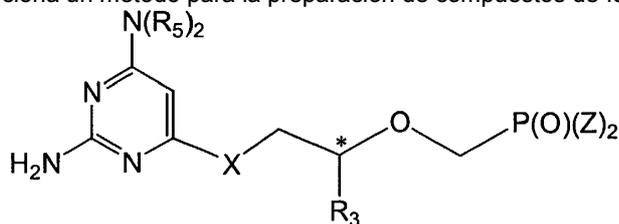
R₃ es H, metilo, halometilo o hidroximetilo protegido;

X es O o S; y

15 Z es amida o éster;

con N(R₅)₂. Uno o ambos grupos Z se convierten opcionalmente en el compuesto de fórmula (I), en la que al menos un Z es hidroxilo.

20 En otra realización, se proporciona un método para la preparación de compuestos de fórmula (V)



(V)

en la que

R₃ es H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;

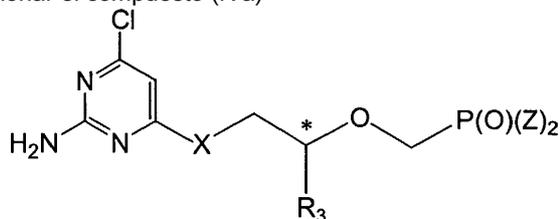
25 R₅ independientemente es H, alquilo C₁-C₈ o un grupo protector;

X es oxígeno o azufre;

Z es independientemente hidroxilo, un éster o una amida; y

* designa un átomo de carbono quiral;

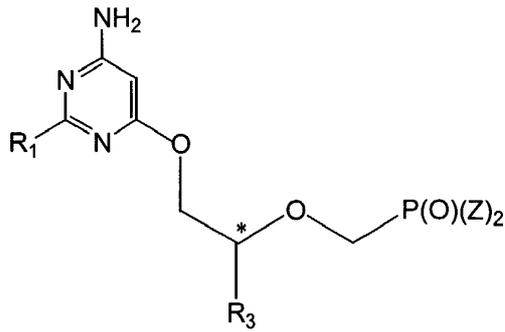
30 que comprende hacer reaccionar el compuesto (IVa)



(IVa)

con N(R₅)₂ en disolvente anhidro, hidróxido alcalino o carbonato alcalino en una solución acuosa y Z se convierte opcionalmente en el compuesto de fórmula (V), en la que 1 o 2 grupos Z son hidroxilo.

35 En otra realización, se proporciona un método para la preparación de compuestos de fórmula (VI)

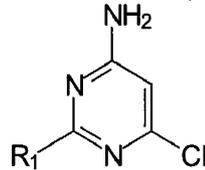


(VI)

en la que

- 5 R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
 R₃ es H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;
 Z es independientemente hidroxilo, un éster o una amida; y
 * designa un átomo de carbono quiral;

que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (VII)



(VII)

10

en la que

R₁ es H, amino o metilsulfanilo
 con un compuesto de la fórmula (VIII)

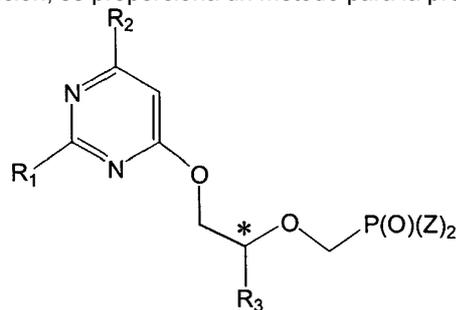


(VIII)

15

en la que Z es amida o éster
 en presencia de una base. Opcionalmente uno o ambos grupos Z se convierten para producir un hidroxilo.

En otra realización de esta invención, se proporciona un método para la preparación de compuestos de fórmula (XIII)



(XIII)

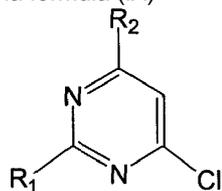
20

en la que

- R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
 * es un átomo de carbono quiral;
 R₂ es H, cloro, hidroxilo o amino;
 25 R₃ es H, metilo, halometilo o hidroximetilo; y
 Z es amida o éster;

que comprende

(a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (IX)

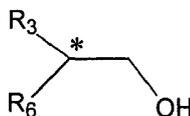


(IX)

en la que

- 5 R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
R₂ es H, cloro o amino;

con un compuesto de la fórmula (X)

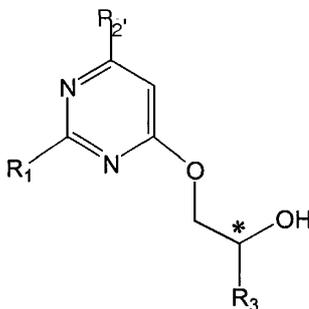


(X)

10 en la que

- R₃ es H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;
* es un átomo de carbono quiral;
R₆ es hidroxilo o hidroxilo protegido;
15 o R₃ y R₆ se unen por un grupo protector acetal o cetal cíclico;

en presencia de una base sin disolvente o en presencia de un disolvente aprótico para producir un compuesto de fórmula (XI)

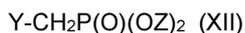


(XI)

20 en la que

- R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
* es un átomo de carbono quiral;
25 R₂ es H, cloro o amino; y
R₃ es H, metilo, halometilo o hidroximetilo protegido; y

(b) hacer reaccionar el compuesto (XI) con un compuesto de la fórmula (XII)



30

en la que

- Y es un grupo saliente;
35 Z es amida o éster

en presencia de una base en dimetilformamida o tetrahydrofurano para producir un compuesto de fórmula (XIII);
y

(c) hidrolizar opcionalmente el grupo Z en el compuesto (XIII)
para producir un compuesto de fórmula (VI) donde 1 o 2 grupos Z son hidroxilo y X es un átomo de oxígeno.

40

En otra realización de esta invención, se proporciona un método para la preparación de compuestos de fórmula (I) en la que

R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
 R₃ es H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;
 R₄ es halo;
 X es oxígeno;

5 Z es independientemente hidroxilo, un éster o una amida; y
 * designa un átomo de carbono quiral;
 que comprende (a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VI)
 en la que

10 R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
 R₃ es H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;
 Z es independientemente un éster; y
 * designa un átomo de carbono quiral;

15 con un halógeno elemental en un disolvente inerte para producir un compuesto de fórmula (I).

Opcionalmente uno o ambos grupos Z se convierten en hidroxilo.

20 Los objetivos adicionales de esta invención se consiguen por un método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) a un paciente que necesita tal tratamiento.

Descripción Detallada de la Invención

25 Como se usa en el presente documento, y a menos que se modifique por el contexto inmediato, alquilo se refiere a hidrocarburos saturados ramificados, normales o cíclicos e incluye metilo, etilo, propilo, ciclopropilo, ciclobutilo, isopropilo, n-, sec-, iso- y terc-butilo, pentilo, isopentilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, neopentilo y t-pentilo.

Halo normalmente significa cloro, pero incluye bromo, flúor o yodo.

30 R₁ normalmente es H o amino, pero también puede ser metilsulfanilo (es decir metiltio).

R₂ es generalmente hidroxilo o -N(R₅)₂, en la que R₅ independientemente es H o alquilo C₁-C₈.

35 R₃ normalmente es H o metilo, pero puede ser hidroximetilo (normalmente configuración (S) sustancialmente libre del enantiómero (R)) o halometilo, y, si metilo o halometilo, preferiblemente está en la configuración (2R) sustancialmente libre de la configuración (2S). Generalmente halometilo es fluorometilo.

R₅ es generalmente H, pero también puede ser alquilo (C₁-C₃) inferior (uno o ambos casos).

40 Como se describe adicionalmente a continuación, Z es adecuadamente cualquier éster o amida conocido hasta ahora para su uso con fosfonatos nucleotídicos. Cuando Z es un éster, tiene la estructura OR₇. R₇ es normalmente H (es decir, Z es hidroxilo) en compuestos que tienen actividad antivírica *per se*, aunque otros grupos éster R₇ descritos a continuación son adecuados para su uso como grupos protectores o como profuncionalidad para realizaciones de profármacos.

45 X es preferiblemente O.

Z es un éster o una amida cuando se desea proteger los compuestos de esta invención contra reacciones no deseadas o cuando el objeto es proporcionar un profármaco *in vivo* del compuesto. De otro modo, Z es OH.

50 Los ésteres o amidas son útiles como intermedios protegidos en la síntesis de compuestos de esta invención, en la que Z = OH. En esta realización, la selección de éster o amida puede no ser importante, dependiendo de la naturaleza de la reacción implicada. Todo lo que se necesita es que el sustituyente Z no se elimine hasta la etapa en la síntesis en la que se desea, y si esto no es evidente en los argumentos teóricos puede determinarse fácilmente por experimentos rudimentarios. Por ejemplo, se usan en particular ésteres para proteger los grupos fosfonato hidroxilo contra alquilación.

60 Cuando Z sirve como una funcionalidad profármaco, el éster o la amida se retira *in vivo* del fosfonato. Los ésteres o los amidatos de profármaco adecuados se seleccionan opcionalmente basándose en la especificidad del sustrato de esterazas y/o carboxipeptidasas que se espera encontrar en las células en las que se desea la hidrólisis del precursor. En la medida en que la especificidad de estas enzimas se desconoce, se puede explorar una pluralidad de análogos nucleotídicos de esta invención hasta que se encuentra la especificidad del sustrato deseada. Esto será evidente a partir de la aparición del fosfonato libre o la actividad antivírica. Se seleccionan generalmente compuestos que (i) no se hidrolizan o se hidrolizan de forma comparativamente lenta en el tracto gastrointestinal superior, (ii) son permeables en el intestino y células y (iii) se hidrolizan en el citoplasma celular y/o la circulación sistémica. Se usan cribas con células de tejidos particulares para identificar precursores que se liberan en órganos susceptibles a una

infección vírica o microbiana diana, por ejemplo en el caso del hígado, fármacos precursores con capacidad de hidrólisis en el hígado. Otras infecciones, por ejemplo CMV o VIH, se tratan opcionalmente con un precursor que se hidroliza en

5 sustancialmente la misma tasa y a sustancialmente el mismo grado en todos los tejidos. Los ensayos conocidos en la técnica son adecuados para estos propósitos, incluyendo ensayos de estabilidad del lumen intestinal, permeabilidad celular, estabilidad de homogeneizado hepático y estabilidad en plasma. Estos ensayos se usan para determinar las características de biodisponibilidad de los precursores.

10 Se encuentran ejemplos típicos de sustituyentes éster y amida del grupo Z en los documentos WO95/07920, WO98/04569 y EP 481214 A1. Cualquier género o especie éster o amida descrito en estas publicaciones (y en el orden de preferencia expuesto en dichas publicaciones) puede usarse como grupo Z en el presente documento.

15 Normalmente, ambos Z son hidroxilo o ambos son éster y/o amida, es decir, normalmente 2 o ningún grupo Z es hidroxilo. En general, cuando ningún Z es OH, entonces un Z es amida y uno es éster. Se prefieren amidas con aminoácidos de origen natural y ésteres con fenilo. El carboxilo o carboxilos libres de grupos Z aminoácidos se esterifican generalmente con alquilo C₁-C₈.

20 En general, Z es hidroxilo en compuestos que se van a usar directamente con fines antiviricos, es decir, dichos compuestos se emplean sin ningún requisito para la hidrólisis *in vivo* del éster o de la amida.

Los grupos protectores para hidroxilo incluyen acetales, cetales o alquilo C₁-C₈. Un grupo protector típico para amino es tritilo. Se conocen otros grupos protectores convencionales (Greene y col., "Protecting Groups in Organic Synthesis, 2ª Ed. 1991, págs. 10-142 y 309-405).

25 Utilidades

Los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de virus, o como compuestos intermedios en la preparación de dichos compuestos. Infecciones víricas ejemplares a tratarse p a ensayarse para su susceptibilidad a compuestos de esta invención incluyen infecciones causadas por virus ADN o ARN tales como herpesvirus (CMV, VHS 1, VHS 2, VEB, virus varicela zóster [VVZ], herpesvirus tipo 1 de bóvidos, herpesvirus tipo 1 de équidos, HVH-6, papilomavirus (VPH tipos 1-55 incluyendo VPH carcinogénico), flavivirus (incluyendo virus de la fiebre amarilla, virus de la fiebre porcina africana y virus de la encefalitis japonesa), togavirus (incluyendo virus de la encefalomiélitis equina venezolana), virus de influenza (tipos A-C), retrovirus (VIH-1, VIH-2, VLTH-1, VLTH-II, VIS, VLF_e, VIF, VSMMo), adenovirus (tipos 1-8), poxvirus (virus vaccinia), enterovirus (poliovirus tipo 1-3, Coxsackie, virus de la hepatitis A, y virus ECHO), virus de gastroenteritis (virus Norwalk, rotavirus), hantavirus (virus Hantaan), polioma virus, papovavirus, rinovirus, virus de parainfluenza tipos 1-4, virus de la rabia, virus sincitial respiratorio (VSR), virus de hepatitis A, B, C y E, y similares.

40 Compuestos preferidos de esta invención para el tratamiento de herpesvirus, hepadnavirus y VIH son aquellos en que R₁ = NH₂, R₂ = NH₂ u OH, X = O y R₃ = H o metilo. Otras actividades antivirales de los compuestos de esta invención se determinan por ensayo rutinario de la actividad antiviral usando ensayos de inhibición enzimática, ensayos de cultivo tisular, ensayos en modelos animales y similares que serán comprendidos por los expertos en la materia.

45 Los compuestos novedosos esta invención son también útiles *per se* o como intermedios en la preparación de polímeros que tienen una gran diversidad de utilidades diagnósticas, terapéuticas e industriales.

Los compuestos de esta invención son adecuados como intermedios para preparar medios de absorción por afinidad que llevan grupos de sustituyentes que tienen propiedades útiles para absorber compuestos de mezclas impuras. Estos se preparan y se usan de la misma manera que otros medios de intercambio iónico que contienen los mismos sustituyentes, por ejemplo fosfonato o amino. Por ejemplo, el grupo fosfonato de los compuestos en el presente documento se une covalentemente a una matriz insoluble y sustituyentes amino libres R₁ en la base heterocíclica y sirven como sitios de intercambio iónico. Como alternativa, el grupo amino de la base heterocíclica se une a la matriz y el grupo fosfonato libre es útil entonces en la absorción cromatográfica de moléculas cargadas positivamente. Otras realizaciones inmovilizadas de los compuestos en el presente documento son útiles en la purificación de proteínas, por ejemplo, enzimas a las que pueden unirse los compuestos de esta invención, por ejemplo, proteínas de transporte (véase Cihlar, anteriormente).

60 Serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica métodos adecuados de incorporación de los compuestos de esta invención en matrices insolubles, tales como resinas poliméricas. Los compuestos en el presente documento pueden inmovilizarse reticulando covalentemente los grupos pirimidina amino o hidroxilo en una matriz insoluble. De forma análoga, los compuestos de esta invención se incorporan en resinas insolubles uniendo el hidroxilo del grupo fosfonato o un grupo hidroximetilo R₃ a la matriz o resina usando agentes de unión covalente conocidos hasta ahora. Se describen métodos de unión adecuados en Cihlar (anteriormente).

Los compuestos de esta invención también son útiles como reticuladores o separadores en la preparación de matrices de absorción de afinidad (en lugar de funcionar como restos de afinidad *per se* como se aprecia en los párrafos anteriores). Los compuestos en el presente documento contienen múltiples grupos funcionales que son adecuados como sitios para reticular sustancias deseadas. Es convencional unir reactivos de afinidad, tales como

5 hormonas, péptidos, anticuerpos, encimas, fármacos, y similares, a sustratos insolubles. Estos reactivos insolubilizados se emplean de forma conocida para absorber sustancias de preparaciones fabricadas, muestras de diagnósticos y otras mezclas impuras. De forma análoga, se usan enzimas inmovilizadas para realizar conversiones catalíticas con una fácil separación de la enzima del producto.

10 En algunas realizaciones, no es necesario que los compuestos de esta invención se reticulen en materiales insolubles. Por ejemplo, pueden usarse para unir analitos a grupos detectables en la preparación de reactivos de diagnóstico solubles.

Se conocen bien en la técnica métodos para la reticulación usando los grupos de sustituyentes que se encuentran en los compuestos de esta invención. Por ejemplo, el ácido fosfónico se usa para formar ésteres con alcoholes o amidas con aminas. De forma análoga, son adecuados el sitio amino, halo, hidroxilo u otros sitios reactivos que se encuentran en la pirimidina. Por supuesto, la protección de grupos reactivos se usará cuando sea necesario al ensamblar el reactivo reticulado. En general, los compuestos de la invención se usan uniéndolos a través de ácido fosfónico a los grupos hidroxilo o amino del compañero de unión, y se unen covalentemente a otro compañero de

20 unión a través de otro sustituyente del compuesto de esta invención. Por ejemplo, un primer compañero de unión, tal como una hormona esteroide, se esterifica en el ácido fosfónico de esta invención y después este conjugado se reticula a través de R_3 hidroximetilo en Sepharose activada por bromuro de cianogeno, obteniendo así el esteroide inmovilizado. Se conocen bien otras reacciones químicas para la conjugación. Véase, por ejemplo Maggio, "Enzyme-Immunoassay" (CRC, 1988, págs. 71-135) y las referencias citadas en ese documento.

25 Formulaciones farmacéuticas

Los compuestos de esta invención y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables (a partir de ahora en este documento mencionados colectivamente como los ingredientes activos) se formulan para administración por

30 cualquier vía apropiada para la afección a tratarse. Los compuestos y formulaciones preferiblemente serán estériles.

Los ingredientes activos se colocan en formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones, para uso tanto veterinario como humano, comprenden al menos un ingrediente activo, como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables para el mismo y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El vehículo o vehículos deben ser "aceptable" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el destinatario.

Las formulaciones se presentan convenientemente en forma monodosis y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. En general, las formulaciones se preparan poniendo en

40 asociación de forma uniforme e íntima el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si fuera necesario, dando forma al producto.

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

Para infecciones externas del ojo u otros tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las formulaciones se aplican preferiblemente en forma de una pomada o crema tópica que contiene el ingrediente o ingredientes activos en una cantidad de, por ejemplo, el 0,075 al 20 % p/p (incluyendo el ingrediente o ingredientes activos en un intervalo entre el 0,1 % y el 20 % en incrementos del 0,1 % p/p tales como del 0,6 % p/p, 0,7 % p/p, etc.), normalmente del 0,2 al 15 % p/p y más normalmente del 0,5 al 10 % p/p. Cuando se formulan en una pomada, los ingredientes activos pueden emplearse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, los ingredientes activos

60 pueden formularse en una crema con una base de crema de aceite-en-agua.

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

La fase oleosa de las emulsiones de esta invención puede constituirse a partir de ingredientes conocidos de un modo conocido. Esta fase puede comprender un emulsionante en solitario, o una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o tanto con una grasa como con un aceite. Preferiblemente, se incluye un

emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. Los estabilizantes de emulsión adecuados para su uso en la formulación de la presente invención incluyen Tween® 60, Span® 80, alcohol cetosteárico, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y lauril sulfato sódico. Aceite o grasas adecuadas incluyen ésteres de alquilo mono o dibásicos de cadena lineal o ramificada tales como di-isoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo o palmitato de 2-etilhexilo. Éstos pueden usarse en solitario o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Como alternativa, pueden usarse lípidos de alto punto de fusión tales como vaselina blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica al ojo también incluyen colirios donde el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el ingrediente activo. El ingrediente activo está normalmente presente en dichas formulaciones en una concentración del 0,01 al 20 % en peso.

Las formulaciones adecuadas para administración nasal donde el vehículo es un sólido incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros (incluyendo tamaños de partícula en un intervalo entre 20 y 500 micrómetros en incrementos de 5 micrómetros tales como 30 micrómetros, 35 micrómetros, etc.), que se administra por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo. Las formulaciones adecuadas donde el vehículo es un líquido, para administración en forma de, por ejemplo, un pulverizador nasal o en forma de gotas nasal, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para administración en aerosol pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales y pueden suministrarse con otros agentes terapéuticos tales como pentamidina para el tratamiento de neumonía por *Pneumocystis*.

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

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener anti-oxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven a la formulación isotónica con la sangre del destinatario pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones improvisadas de inyección a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente. Las formulaciones monodosis preferidas son aquellas que contienen una dosis diaria o sub-dosis diaria unitaria, como se ha indicado anteriormente en este documento, o una fracción apropiada de la misma, de un ingrediente activo.

La presente invención proporciona adicionalmente composiciones veterinarias que comprenden al menos un ingrediente activo como se ha definido anteriormente junto con un vehículo veterinario para el mismo. Los vehículos veterinarios son materiales para administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que son por lo demás inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el ingrediente activo.

Estas composiciones veterinarias pueden administrarse por vía oral, parenteral o por cualquier otra vía deseada.

Los compuestos de este documento opcionalmente se usan en formulaciones farmacéuticas de liberación controlada que contienen como ingrediente activo uno o más compuestos activos en que la liberación del ingrediente activo está controlada y regulada para permitir una dosificación menos frecuente o para mejorar la farmacocinética o el perfil de toxicidad de un compuesto dado. En general, los compuestos se administran desde sistemas de liberación controlada tales como el implante del documento WO 92/14450 o la patente de Estados Unidos 5.098.443, o las matrices de la patente de Estados Unidos 4.740.365 o la patente de Estados Unidos 5.141.752. Muchos otros son conocidos y son adecuados para su uso en este documento.

Administración terapéutica

Las vías adecuadas para administración incluyen oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo ocular, bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravítrea, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural). La vía preferida de administración dependerá de la afección del paciente, la toxicidad del compuesto y el sitio de infección, entre otras consideraciones conocidas para el médico.

Para cada una de las indicaciones terapéuticas indicadas anteriormente, la cantidad necesaria de un ingrediente activo (como se ha definido anteriormente) dependerá de varios factores incluyendo la gravedad de la afección a tratarse, el agente infeccioso, si el uso es profiláctico o para tratar una infección aguda, el sitio de infección o patología y otros factores en última instancia a juicio del médico o veterinario asistente. En general, sin embargo, una dosis adecuada para consideración del médico estará en el intervalo de metoxifosfonatos análogos (véase

supra), teniendo en cuenta diferencias en la potencia en ensayo *in vitro*, generalmente de 0,1 a 250 mg por kilogramo de peso corporal del destinatario por dosis (incluyendo uno o más ingredientes activos en un intervalo entre 0,1 mg y 400 mg/kg/dosis en incrementos de 0,5 mg/kg/dosis tales como 2,5 mg/kg/dosis, 3,0 mg/kg/dosis, 3,5 mg/kg/dosis, etc.), normalmente en el intervalo de 0,5 a 50 mg por kilogramo de peso corporal por dosis y más habitualmente en el intervalo de 1 a 300 mg por kilogramo de peso corporal por dosis.

La dosis deseada se administra a intervalos apropiados en formas monodosis, habitualmente con una dosis de inducción relativamente más alta y dosis inferiores de mantenimiento menos frecuentes. Los compuestos también se usan de forma profiláctica, por ejemplo, mediante la administración en aproximadamente de 1 a 7 días antes de la infección vírica. Los tumores o crecimientos por VPH y las lesiones por herpes a menudo se tratan de forma tópica, por inyección local o mediante geles tópicos, pomadas o similares.

Los compuestos de la invención opcionalmente se emplean en combinación con otros agentes terapéuticos para el tratamiento o profilaxis de las infecciones o afecciones indicadas anteriormente. Ejemplos de dichos agentes terapéuticos adicionales incluyen agentes que son eficaces para el tratamiento o profilaxis de infecciones víricas. Éstos incluyen, aunque sin limitación, los NRTI, 3'-azido-3'-desoxitimidina (zidovudina, AZT), 2'-desoxi-3'-tiacitidina (3TC), 2',3'-didesoxi-2',3'-dideshidrotimidina (D4T), carbovir (2',3'-didesoxi-2',3'-dideshidroguanosina carbocíclica), abacavir (ABC), 2',3'-didesoxiinosina (ddl), didanosina, 2',3'-didesoxicidina (ddc, zalcitabina), 3'-azido-2',3'-didesoxiuridina, (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina (BVDU), 2-cloro-2'-desoxiadenosina, 2-desoxicoformicina, 5-fluorouracilo, 5-fluorouridina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, 5-trifluorometil-2'-desoxiuridina, 6-azauridina, ácido 5-fluoroorótico, metotrexato, triacetiluridina, 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-1-β-D-arabinosil)-5-yodocitidina (FIAC), tetrahidroimidazo(4,5,1-jk)-(1,4)-benzodiazepin-2(1H)-tiona (TIBO) u otros inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (por ejemplo, nevirapina, delaviridina, efavirens, daparivina, etc.), inhibidores de proteasa (por ejemplo, saquinavir, indinavir, ritonavir, amprenavir, y similares), 2'-nor-GMPcíclico, arabinósido de 6-metoxipurina (ara-M), 2'-O-valerato de arabinósido de 6-metoxipurina, arabinósido de citosina (ara-C), nucleósidos acíclicos tales como aciclovir, valaciclovir, penciclovir, famciclovir, ganciclovir, análogos de nucleótidos acíclicos tales como HPMP, PMEA, PMEG, PMPA, PMPDAP, FPMPA, HPMPA y HPMPDAP, (2R, 5R)-9-[tetrahidro-5-(fosfonometoxi)-2-furanil]adenina, (2R, 5R)-1-[tetrahidro-5-(fosfonometoxi)-2-furanil]timina, otros antivirales incluyendo ribavirina (arabinósido de adenina), 2-tio-6-azauridina, tubercidina, ácido aurintricarboxílico, 3-desazaneoplanocina, neoplanocina, rimantidina, adamantina, y foscarnet (fosfonoformiato trisódico).

Métodos de síntesis

Los compuestos que están dentro de la fórmula (I) se sintetizan alquilando la base 6-hidropirimidina correspondiente con 2-cloroetoximetilfosfonato de dialquilo (o sus análogos que producen otros grupos R₃) en presencia de NaH, Cs₂CO₃ o DBU (1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno) en un disolvente aprótico dipolar, normalmente DMF, opcionalmente seguido de desprotección, por ejemplo con bromotrimetilsilano y la hidrólisis posterior. El producto de la fórmula (I) se acompaña por formación de cantidades variables del N1-isómero correspondiente, es decir 1-[2-(fosfonometoxi)etil]pirimidin-6-ona 2,4-disustituida. Puede eliminarse por cromatografía como el diéster neutro antes del tratamiento de bromotrimetilsilano.

Otro método de preparación de compuestos de la fórmula (I) comprende la transformación de derivados de 4-cloro-6-[2-(fosfonometoxi)etoxil]pirimidina 2-sustituida (y sus análogos R₃) por reacción con aminas primarias o secundarias en disolventes anhidros (por ejemplo, etanol), hidróxido alcalino o carbonato alcalino en agua. Esta reacción puede catalizarse, por ejemplo, por 1,3,5-triazol, imidazol o, ventajosamente, con DABCO (diazabicyclooctano). Después, los grupos protectores opcionalmente se eliminan, por ejemplo, por tratamiento con bromotrimetilsilano e hidrólisis.

Los compuestos de fórmula (I) también pueden obtenerse mediante la reacción de 6-halogenopirimidinas 2,4-disustituidas con alcóxido sódico de 2-hidroxi-etilfosfonato de dialquilo (o sus análogos que producen otros grupos R₃) seguido de desprotección opcional. La ventaja de este procedimiento consiste en la formación únicamente del isómero O6 requerido. La selección del procedimiento sintético adecuado depende de la disponibilidad del derivado de pirimidina heterocíclica usado como material de partida.

Los compuestos de fórmula (I) también pueden obtenerse por la reacción de 6-(2-hidroxi)alquil]pirimidinas 2,4-disustituidas con p-toluenosulfoniloximetilfosfonato de dialquilo en presencia de NaH. Los materiales de partida se preparan por tratamiento de la 6-cloropirimidina apropiada con un diol protegido o sin proteger en presencia de una base.

Los compuestos de fórmula (I) pueden obtenerse adicionalmente por sustitución en diversas posiciones del anillo pirimidina. Por lo tanto, los derivados 5-halo pueden obtenerse por reacciones con halógeno elemental o por reacciones de intercambio aniónico con halógeno.

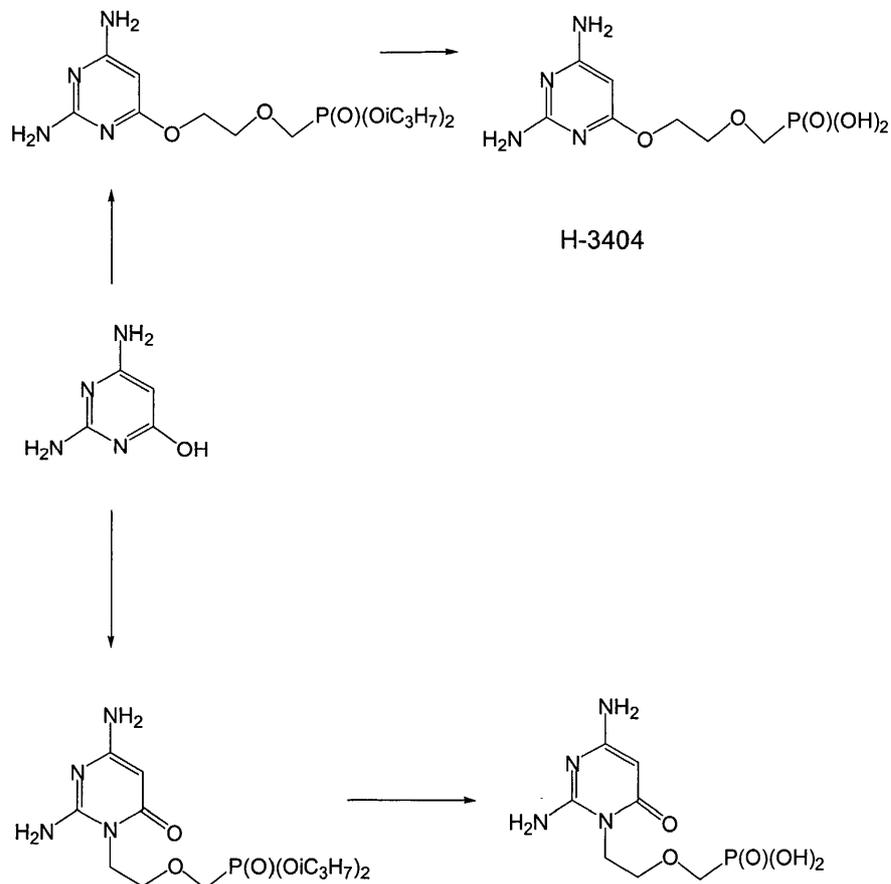
Las amidas o los ésteres del grupo Z se convierten en hidroxilo por hidrólisis.

Están fácilmente disponibles monoésteres a partir del diéster o una mezcla de di y monoésteres por tratamiento con

litio o azida sódica en DMF (A. Holy, "Synthesis 1998" 381-385 (1998)).

La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos.

5 Ejemplo 1



(a) 2,4-Diamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina y 2,4-Diamino-1-[2-(fosfonometoxi)etil]pirimidina-6(1H)-ona

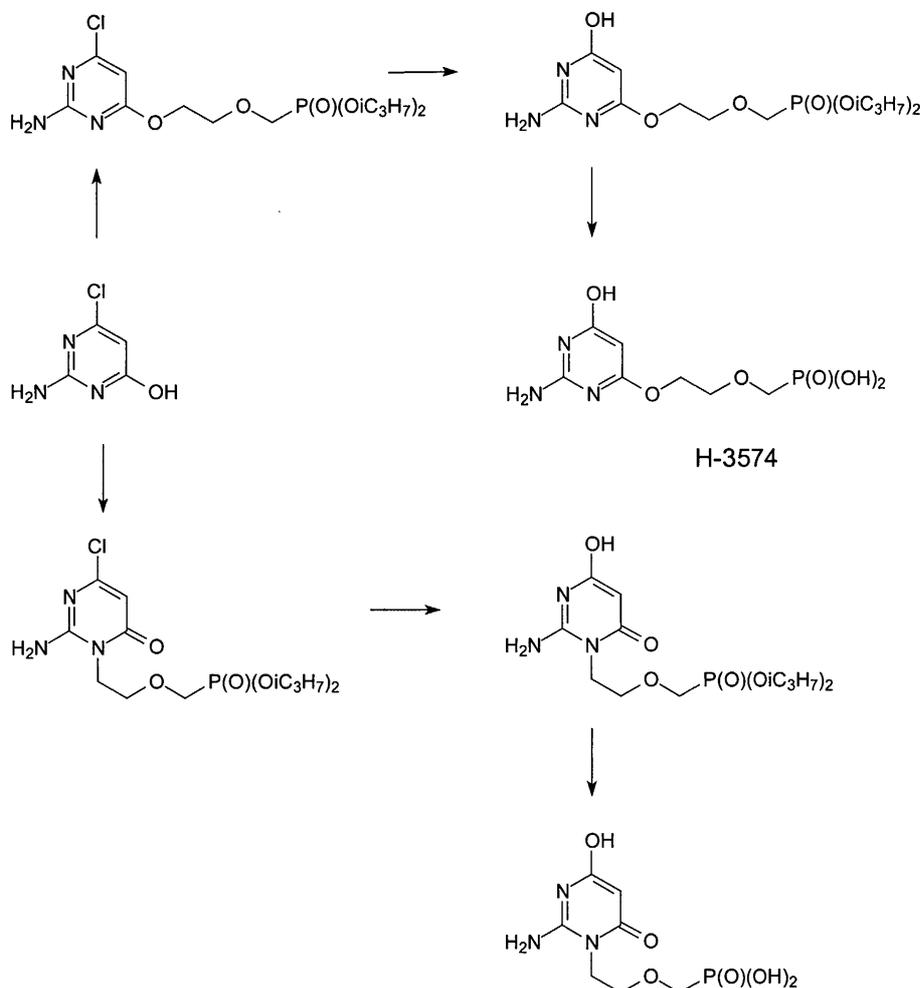
Una mezcla de 2,4-diamino-6-hidroxipirimidina (2,52 g, 20 mmol), carbonato de cesio (3,25 g, 10 mmol) en dimetilformamida (40 ml) se agitó durante 30 min a 80 °C y se añadió 2-cloroetoximetilfosfonato de diisopropilo (3,5 ml, 23,4 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h a 100 °C y se filtró de las sales. El filtrado se retiró al vacío y el residuo se sometió a cromatografía sobre columna de gel de sílice (300 ml) con cloroformo. La elución dio un producto que se cristalizó en acetato de etilo - éter de petróleo para proporcionar 1,2 g (17,2 %) de 2,4-diamino-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]pirimidina, p.f. 159 °C. Para $C_{13}H_{25}N_4O_5P$ (348,3) calculado 44,83 % de C, 7,23 % de H, 16,08 % de N, 8,89 % de P; observado 44,99 % de C, 7,28 % de H, 16,18 % de N, 9,03 % de P. Espectro de masas: 349,3 (MH^+)(100), 265,1 ($MH^+ - 2 \times iPr$)(6); 139 (26); 127,1 (Base H^+)(37). 1H RMN (CD_3SOCD_3): 1,24 d, 6 H y 1,24 d, 6 H, $J(CH_3,CH) = 6,2$ (4x CH_3); 3,74 m, 2 H (H-2'); 3,78 d, $J(CH_2-P) = 8,2$ (CH_2-P); 4,22 m, 2H (H-1'); 4,59 dh, 2 H, $J(CH,P) = 8,2$, $J(CH,CH_3) = 6,2$ (2x CH); 5,02 s, 1 H (H-6); 5,85 s a, 2 H y 6,00 s a, 2H (2x NH_2). ^{13}C RMN (CD_3SOCD_3): 23,85 d, $J(CH_3,P) = 4,6$ (2x CH_3); 23,99 d, $J(CH_3,P) = 4,1$ (2x CH_3); 63,65 (C-1'); 65,02 d, $J(CH_2-P) = 164,4$ (CH_2P); 70,32 d, $J(CH,P) = 6,0$ (2x $CH-O$); 71,05 d, $J(2',P) = 11,9$ (C-2'); 76,35 (C-5); 163,01, 166,15 y 169,92 (C-2, C-4 y C-6).

Este compuesto (1,0 g, 2,9 mmol) se trató con $BrSiMe_3$ (4 ml) en acetonitrilo (40 ml) durante una noche. Los disolventes se retiraron al vacío, el residuo se codestiló con acetonitrilo (2 x 25 ml) y al residuo se le añadió agua (50 ml). La solución se volvió alcalina con amoníaco acuoso conc. y se evaporó al vacío. El residuo se aplicó en una solución acuosa sobre una columna (100 ml) Dowex 50 X 8 (forma H^+) y la columna se eluyó con agua (3 ml/min); la elución se siguió de la medición continua de la absorción UV del eluato a 254 nm. Después de la retirada de la fracción de absorción UV neutra, la columna se eluyó con amoníaco acuoso al 2,5 % y la fracción de absorción UV se recogió. Se retiró al vacío, se disolvió de nuevo en agua (20 ml), se llevó a pH 9-10 mediante amoníaco acuoso conc. y se aplicó sobre una columna (70 ml) Dowex 1 x 2 (forma acetato) lavada previamente vigorosamente con agua. La elución con agua dio (con retención) un producto que se cristalizó en agua para proporcionar 2,4-diamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina (0,60 g, 78,3 %), p.f. 279 °C (agua). E_{up} 0,80. Para $C_7H_{13}N_4O_5P$ (264,2)

calculado 31,83 % de C, 4,96 % de H, 21,21 % de N, 11,72 % de P; observado 31,52 % de C, 5,04 % de H, 20,96 % de N, 11,53 % de P. Espectro UV [$\lambda_{\text{máx}}$ ($\epsilon_{\text{máx}}$)] (pH 2): 276 (9100), (pH 7): 265 (7500). Estos datos confirman el espectro UV publicado para 2,4-diamino-6-metoxipirimidina ($\lambda_{\text{máx}}$ 263 y 275, resp.). ^1H RMN (CD_3SOCD_3 , 40 °C): 3,58 d, 2 H, $J(\text{CH}_2, \text{P}) = 8,7$ (CH₂P); 3,74 t, 2 H, $J(2', 1') = 4,9$ (H-2'); 4,23 t, 2 H, $J(1', 2') = 4,9$ (H-1'); 5,07 s, 1 H (H-5); 5,86 s a, 2 H y 6,01 s a, 2 H (2 x NH₂). ^1H RMN (D_2O): 3,69 d, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{P}) = 8,7$ (CH₂P); 3,91 m, 2H (H-2'); 4,30 m, 2 H (H-1'); 5,45 s, 1 H (H-5). ^{13}C RMN (D_2O): 69,30 (C-1'); 70,28 d, $J(\text{CH}_2, \text{P}) = 151,3$ (CH₂P); 73,35 d, $J(2', \text{P}) = 10,3$ (C-2'); 79,63 (C-5); 165,46, 169,35 y 171,08 (C-2, C-4 y C-6). La posición de campo bajo de señal de carbono C-1' en los isómeros O (diéster y fosfonato libre) (δ 63,65 y 69,30, respectivamente) indica que el grupo PME está unido al átomo de oxígeno en C-6.

La elución adicional de la columna sobre gel de sílice con cloroformo dio 1,8 g (26 %) de 2,4-diamino-1-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etil]pirimidina-6(1H)-ona amorfa (F_R 0,35, S1) que se secó al vacío sobre P_2O_5 . P.f. 196-197 °C. El residuo (5,17 mmol) se trató con bromotrimetilsilano (6 ml) en acetonitrilo (60 ml) durante una noche y se trató como se describe para el isómero O. La purificación de la mezcla desalada sobre columna Dowex 1 (elución con agua) dio un producto que se cristalizó en agua para proporcionar 0,95 g (65 %) de 2,4-diamino-1-[2-(fosfonometoxi)etil]pirimidina-(1H)-ona, p.f. 228 °C (agua). E_{Up} 0,90. Para $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (282,2) calculado 29,79 % de C, 5,36 % de H, 19,85 % de N, 10,98 % de P; observado 29,76 % de C, 5,22 % de H, 20,01 % de N, 10,92 % de P. Espectro de masas: 349,2 (MH^+)(100); 265,1($\text{MH}^+ - 2x \text{iPr}$)(35); 126 (BH^+) (26). Espectro UV [$\lambda_{\text{máx}}$ ($\epsilon_{\text{máx}}$)] (pH 2): 264 (18000), (pH 7): 267 (12200). El valor $\lambda_{\text{máx}}$ coincide con el valor publicado para 2,4-diamino-1-metilpirimidina-6(1H)-ona (268 nm). ^1H RMN (CD_3SOCD_3): 3,59 d, 2 H, $J(\text{CH}_2, \text{P}) = 8,4$ (CH₂P); 3,60 t, 2 H, $J(2', 1') = 6,1$ (H-2'); 3,96 t, 2 H, $J(1', 2') = 6,1$ (H-1'); 4,61 s, 1 H (H-5); 5,88 s a, 2 H y 6,61 s a, 2 H (2 x NH₂). ^1H RMN (D_2O): 3,48 d, 2 H, $J(\text{CH}_2, \text{P}) = 8,4$ (CH₂P); 3,76 t, 2 H, $J(1', 2') = 5,2$ (H-1'); 4,09 t, 2H, $J(2', 1') = 5,2$ (H-2'); 5,06 s, 1 H (H-5). ^{13}C RMN (D_2O): 45,15 (C-1'); 70,41 d, $J(\text{CH}_2, \text{P}) = 154,7$ (CH₂P); 74,09 d, $J(2', \text{P}) = 11,8$ (C-2'); 81,05 (C-5); 159,73, 166,79 y 168,04 (C-2, C-4 y C-6). La posición de campo alto de C-1' (δ 45,15) indica N-sustitución. Dos señales de grupos NH₂ (δ 6,61 y 5,88) que se observan en el espectro ^1H RMN en DMSO excluyen la sustitución en las posiciones exo 2-NH₂ y/o 4-NH₂ y concuerda con la sustitución esperada en N(1).

Ejemplo 2



(a) 2-Amino-4-cloro-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]pirimidina y 2-amino-4-cloro-1-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona.

Se codestiló 2-amino-4-cloro-6-hidroxipirimidina monohidrato (25 mmol) con tolueno (3 x 50 ml) al vacío, y el residuo se trató con DMF (50 ml), DBU (3,8 ml) y 2-cloroetoximetilfosfonato de diisopropilo (7 ml). La mezcla se agitó durante 16 h a 100 °C y los volátiles se eliminaron por evaporación a 50 °C/2 kPa. El residuo se recogió en cloroformo (200 ml), se filtró y se lavó con NaCl saturado (100 ml). El lavado acuoso se extrajo con cloroformo (5 x 50 ml), los extractos combinados se secaron con sulfato de magnesio y se evaporaron. La separación sobre columna de gel de sílice (150 ml) en cloroformo por gradiente de cloroformo-etanol dio 2-amino-4-cloro-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]pirimidina, rendimiento del 27,2 %, p.f. 89 °C. Para C₁₃H₂₃ClN₃O₅P (367,77) calculado 42,46 % de C, 6,30 % de H, 9,64 % de Cl, 11,43 % de N, 8,42 % de P; observado 42,34 % de C, 6,34 % de H, 9,79 % de Cl, 11,30 % de N, 8,23 % de P. Espectro de masas: 368,3 (MH⁺)(100). ¹H RMN (CD₃SOCD₃): 1,22 d, 6 H y 1,23 d, 6 H, J(CH₃,CH) = 6,1 (CH₃); 3,78 d, J(CH₂-P) = 8,3 (CH₂-P); 3,80 m, 2H (H-2'); 4,37 m, 2H (H-1'); 4,58 m, 2 H (P-OCH); 6,06 s, 1 H (H-5); 7,05 s a, 2 H (NH₂). ¹³C RMN (CD₃SOCD₃): 23,83 d, 2C, J(CH₃,P) = 4,9 y 23,97 d, 2C, J(P,C) = 3,9 (CH₃); 65,00 d, J(P,C) = 164,1 (P-C); 65,15 (C-1'); 70,35 d, 2C, J(P,C) = 6,7 (P-OC); 70,52 d, 2C, J(P,C) = 11,7 (C-2'); 94,46 (C-5); 160,12 (C-2); 162,97 (C-4); 170,56 (C-6).

La elución adicional y la cristalización en acetato de etilo-éter dio 2-amino-4-cloro-1-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona, rendimiento del 52,4 %, p.f. 95 °C. Para C₁₃H₂₃ClN₃O₅P (367,77) calculado 42,46 % de C, 6,30 % de H, 9,64 % de Cl, 11,43 % de N, 8,42 % de P; observado 42,28 % de C, 6,22 % de H, 9,65 % de Cl, 11,50 % de N, 8,27 % de P. Espectro de masas: 368,4 (MH⁺)(100). ¹H RMN (CD₃SOCD₃): 1,20 d, 6 H y 1,22 d, 6 H, J(CH₃,CH) = 6,1 (CH₃); 3,69 t, 2 H, J(2',1') = 5,5 (H-2'); 3,76 d, J(CH₂-P) = 8,1 (CH₂-P); 4,06 t, 2H, J(1',2') = 5,5 (H-1'); 4,55 m, 2 H (P-OCH); 5,67 s, 1 H (H-5); 7,60 s a, 2 H (NH₂). ¹³C RMN (CD₃SOCD₃): 23,84 d, 2C, J(CH₃,P) = 3,9 y 23,97 d, 2C, J(P,C) = 3,9 (CH₃); 40,29 (C-1'); 65,03 d, J(P,C) = 164,1 (P-C); 69,01 d, 2C, J(P,C) = 11,7 (C-2'); 70,41 d, 2C, J(P,C) = 5,9 (P-OC); 98,28 (C-5); 155,73 (C-2); 157,87 (C-4); 161,48 (C-6).

(b) 2-Amino-4-hidroxi-6-[2(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina

Una mezcla de 2-amino-4-cloro-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi) etoxi]pirimidina (5,7 g), DABCO (3,6 g) y K₂CO₃ (9,0 g) en agua (100 ml) se calentó a reflujo durante 150 min en agitación, se enfrió y se acidificó mediante la adición de Dowex 50 x 8 (forma H⁺). La suspensión se hizo alcalina con amoníaco acuoso conc. y después de 5 min en agitación, se filtró y la resina se lavó con metanol acuoso al 50 % (200 ml). El filtrado se evaporó a sequedad, se añadió etanol (50 ml) y la mezcla se evaporó a sequedad. El residuo dio en cromatografía sobre columna de gel de sílice (150 ml) con gradiente de cloroformo-etanol 2-amino-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]-4-hidroxipirimidina cristalina, p.f. 154 °C con un rendimiento del 78 %. Para C₁₃H₂₄N₃O₆P (349,3) calculado 44,70 % de C, 6,92 % de H, 12,03 % de N, 8,37 % de P; observado 44,58 % de C, 7,02 % de H, 11,95 % de N, 8,53 % de P. ¹H RMN (CD₃SOCD₃): 1,24 d, 6 H y 1,23 d, 6 H, J(CH₃,CH) = 6,2 (4xCH₃); 3,74 m, 2 H (H-2'); 3,76 d, J(CH₂-P) = 8,3 (CH₂-P); 4,19 m, 2H (H-1'); 4,59 m, 2 H (P-OCH); 4,75 s, 1 H (H-5); 6,65 s a, 2 H, 2H (NH₂); 10,45 s, 1H (OH). ¹³C RMN (CD₃SOCD₃): 23,87 d, 2C, J(CH₃,P) = 4,9 y 24,01 d, 2C, J(P,C) = 3,9 (CH₃); 65,03 d, J(P,C) = 164,6 (P-C); 65,04 (C-1'); 70,37 d, 2C, J(P,C) = 6,3 (P-OC); 70,87 d, J(P,C) = 11,7 (C-2'); 79,95 (C-5); 155,68 (C-4); 164,25 (C-2); 171,01 (C-6).

Este producto se trató con bromotrimetilsilano (10 ml) en acetonitrilo (80 ml) durante una noche, se evaporó al vacío y el residuo se trató con agua (50 ml). Después de 10 min, a la reacción alcalina se le añadió amoníaco acuoso conc. y la mezcla se evaporó. El residuo se desionizó en una columna (100 ml) de Dowex 50 x 8 y el eluato de amoníaco de absorción UV se evaporó a sequedad. Se disolvió en un mínimo de agua caliente mediante la adición de amoníaco acuoso conc. y se acidificó por HCl conc. a pH 3-3,5. El precipitado se recogió, se lavó con agua, etanol y se secó al vacío. Rendimiento, 0,7 g, p.f. 227 °C. Para C₇H₁₂N₃O₆P (265,16) calculado 31,71 % de C, 4,56 % de H, 15,85 % de N, 11,68 % de P; observado 31,55 % de C, 4,62 % de H, 16,15 % de N, 11,51 % de P.

Ejemplo 3**(a) 2,4-Diamino-6-(S)-[2-(fosfonometoxi)propoxi]pirimidina (H-3560) (S)-2-(4-Toluenosulfoniloxi)propiloximetilfosfonato de diisopropilo**

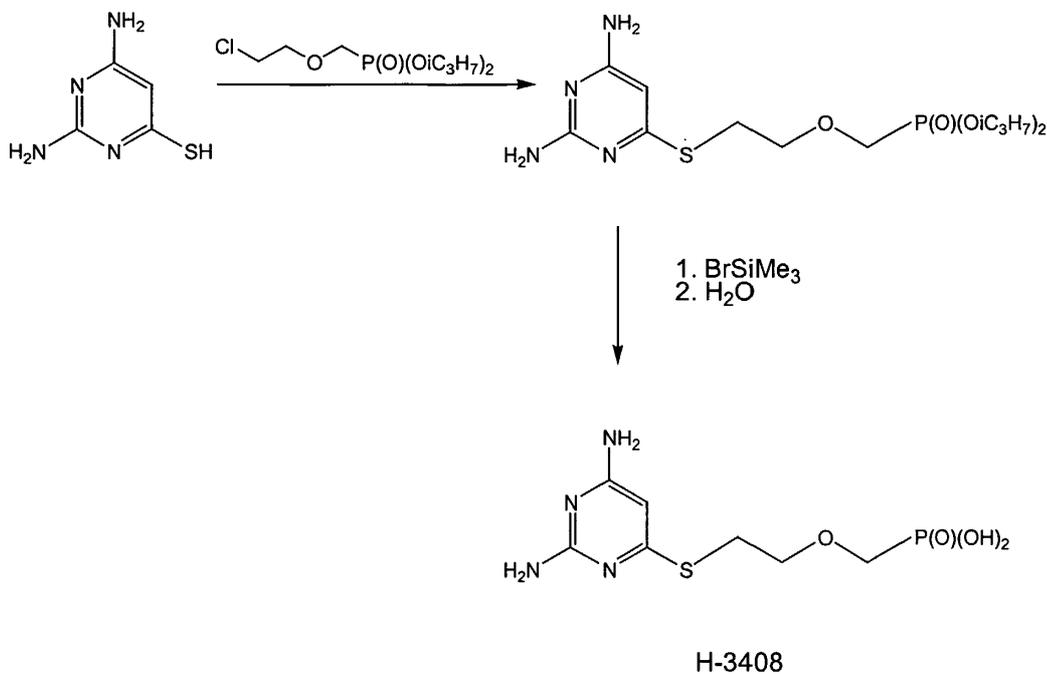
Se añadió (25,7 g, 63 mmol) en DMF (40 ml) a 90 °C a una mezcla agitada de 2,4-diamino-6-hidroxipirimidina (60 mmol), DMF (40 ml) y DBU (10,6 ml, 60 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 24 h y se evaporó al vacío. El residuo se recogió en cloroformo (200 ml), se filtró y se lavó con NaCl saturado (100 ml). El lavado acuoso se extrajo con cloroformo (5 x 50 ml), los extractos combinados se secaron con sulfato de magnesio y se evaporaron. La separación sobre columna de gel de sílice (150 ml) en cloroformo por gradiente de cloroformo-etanol dio el producto principal (isómero O6) en forma de un residuo oleoso que se secó al vacío sobre pentóxido de fósforo durante una noche. Se añadieron acetonitrilo (80 ml) y bromotrimetilsilano (20 ml) y la solución se dejó en reposo durante una noche en un matraz tapado. Los volátiles se evaporaron al vacío y el residuo se trató con agua (100 ml). Después de 10 min, a la reacción alcalina se le añadió amoníaco acuoso conc. y la mezcla se evaporó. El residuo se desionizó en una columna (100 ml) de Dowex 50 x 8 y el eluato de amoníaco de absorción UV se evaporó a sequedad. Este producto en agua (20 ml) se hizo alcalino mediante amoníaco acuoso conc. y se aplicó en una

columna (200 ml) Dowex 1 x 2 (forma acetato) prelavada con agua. La elución con agua seguida de gradiente lineal de ácido acético (0-0,5 M, 1,5 l cada vez) dio la fracción de absorción UV principal que se evaporó, el residuo se codestiló con agua (3 x 50 ml) y se cristalizó en agua. Rendimiento, 3,5 g (19,7 %), p.f. 281 °C. para $C_8H_{15}N_4O_5P \cdot H_2O$ monohidrato (296,22) calculado 32,44 % de C, 5,78 % de H, 18,91 % de N, 10,46 % de P; observado 32,67 % de C, 5,86 % de H, 19,40 % de N, 10,60 % de P. 1H RMN (D_2O + NaOD): 1,26 d, 3H, $J(3',2') = 6,4$ (H-3'); 3,51 dd, 1H, $J(CH_b,P) = 9,4$, $J(gem) = 12,2$ (CH_bP); 3,60 dd, 1H, $J(CH_a,P) = 9,4$, $J(gem) = 12,2$ (CH_aP); 3,92 m, 2H (H-2'); 4,06 dd, 1H, $J(1'b,2') = 5,5$, $J(gem) = 10,5$ (H-1'b); 4,14 dd, 1H, $J(1'a,2') = 3,7$, $J(gem) = 10,5$ (H-1'a); 5,41 s, 1 H (H-5). ^{13}C RMN (D_2O): 15,84 (C-3'); 66,99 d, $J(CH_2-P) = 149,9$ (P-C); 69,68 (C-1'); 75,14 d, $J(2',P) = 11,2$ (C-2'); 76,84 (C-5); 166,74 (C-2); 162,83 (C-4); 171,05 (C-6).

(b) 2,4-Diamino-6-(R)-[2-(fosfonometoxi)propoxi]pirimidina (H-3567)

El enantiómero (R) se preparó de forma análoga al Ejemplo 3(a) a partir de (R)-2-(4-toluenosulfoniloxi)propiloximetilfosfonato de isopropilo (50 mmol), 2,4-diamino-6-hidroxipirimidina (60 mmol) y DBU (60 mmol) en DMF (70 ml). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 24 h. Tratamiento adicional seguido del procedimiento descrito en el Ejemplo 4. Rendimiento, 24 %, sin fusión por debajo de 290 °C. Para $C_8H_{15}N_4O_5P \cdot H_2O$ monohidrato (296,22) calculado 32,44 % de C, 5,78 % de H, 18,91 % de N, 10,46 % de P; observado 32,54 % de C, 5,90 % de H, 19,10 % de N, 10,65 % de P. Los espectros 1H RMN y ^{13}C RMN son idénticos a los del enantiómero (S).

Ejemplo 4



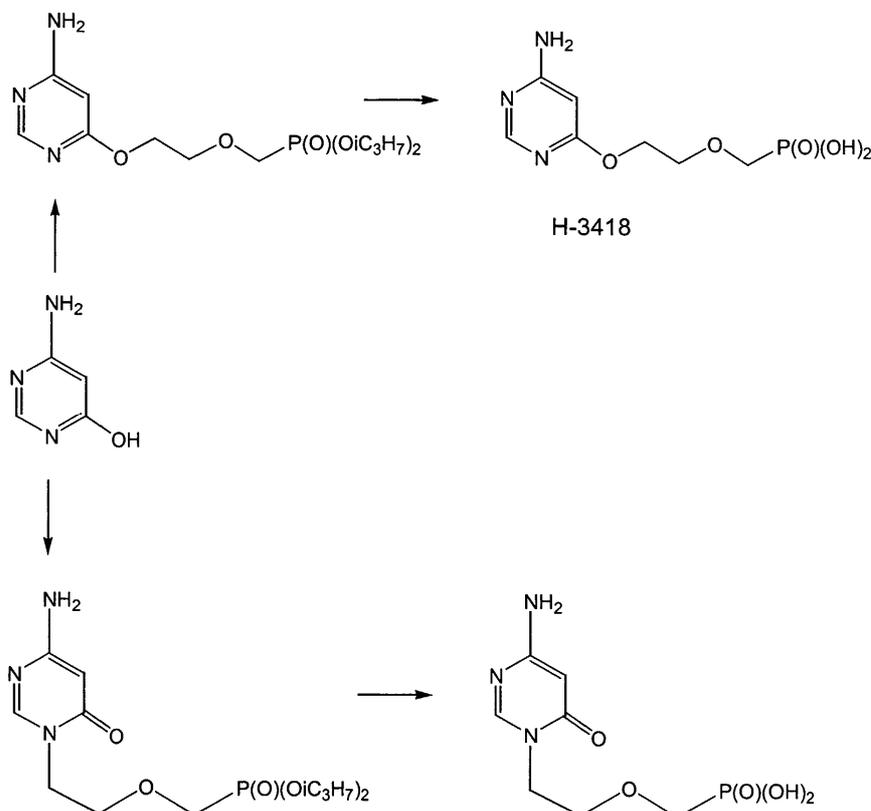
25 2,4-Diamino-6-[2-(fosfonometoxi)etilsulfanil]pirimidina

Como una suspensión de 2,4-diamino-6-sulfanilpirimidina hemisulfato (2,616 g, 13,7 mmol) en DMF (40 ml) se trató con hidruro sódico (1,0855 g, 27 mmol, dispersión al 60 % en aceite de parafina) durante 1 h en agitación seguido de 2-cloroetoximetilfosfonato de diisopropilo (9 ml, 17,2 mmol). La mezcla se agitó durante 8 h a 80 °C, se filtró a través de lecho de celite y se evaporó al vacío. El residuo en cloroformo se purificó sobre columna de gel de sílice (150 ml) en cloroformo-etanol (49:1) para proporcionar 2,4-diamino-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etilsulfanil]pirimidina (4,0 g, 80 %), p.f. 109 °C. Para $C_{13}H_{25}N_4O_4PS$ (364,40) calculado 42,85 % de C, 6,91 % de H, 15,38 % de N, 8,50 % de P, 8,80 % de S; observado 42,48 % de C, 6,94 % de H, 15,50 % de N, 8,63 % de P, 9,01 % de S. 1H RMN (CD_3SOCD_3): 1,24 d, 6 H y 1,25 d, 6 H, $J(CH_3,CH) = 6,1$ (CH_3); 3,17 t, 2H, $J(1',2') = 6,6$ (H-1'); 3,68 t, 2H, $J(2',1') = 6,6$ (H-2'); 3,77 d, $J(CH_2-P) = 8,3$ (CH_2-P); 4,60 m, 2 H (P-OCH); 5,60 s, 1 H (H-5); 5,95 s a, 2 H y 6,17 s a, 2H (NH_2).

Este compuesto en acetonitrilo (50 ml) se trató con bromotrimetilsilano (5 ml) durante una noche y los volátiles se evaporaron al vacío. El residuo se trató con agua (100 ml). Después de 10 min, a la reacción alcalina se le añadió amoníaco acuoso conc. y la mezcla se evaporó. El residuo se desionizó en una columna (100 ml) de Dowex 50 x 8 y el eluato de amoníaco de absorción UV se evaporó a sequedad. Este producto en agua (20 ml) se hizo alcalino mediante amoníaco acuoso conc. y se aplicó en una columna (100 ml) Dowex 1 x 2 (forma acetato) prelavada con agua. La elución con agua seguida de gradiente lineal de ácido acético (0-0,5 M, 1,5 l cada vez) dio la fracción de absorción UV principal que se evaporó, el residuo se codestiló con agua (3 x 50 ml) y el residuo se cristalizó en

agua. Rendimiento, 2,8 g (91 %) 2,4-diamino-6-[2-(fosfonometoxi)etilsulfanil]pirimidina, p.f. 246 °C. Para $C_7H_{13}N_4O_4PS$ (280,24) calculado 30,00 % de C, 4,68 % de H, 19,99 % de N, 11,05 % de P, 11,44 %S; observado 30,27 % de C, 4,80 % de H, 19,74 % de N, 10,98 % de P, 11,60 %S. 1H RMN ($D_2O + NaOD$): 3,18t, 2H, $J(1',2') = 6,8$ (H-1'); 3,56 d, 2H, $J(CH_2,P) = 8,7$; (CH₂P); 3,68 t, 2H, $J(2',1') = 6,8$ (H-2'); 5,70 s, 1 H (H-5); 6,32 s a, 2H (2-NH₂); 6,48 s a, 2H (4-NH₂).

Ejemplo 5



4-Amino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina y 04-amino-1-[2-(fosfono-metoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona

Se trató 4-amino-6-hidroxi-2-sulfanilpirimidina (20 g) en etanol en ebullición (300 ml) en agitación con Raney-Ni hasta que el material de partida desapareció. La suspensión se filtró mientras estaba caliente, el precipitado se lavó con etanol caliente (300 ml) y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo proporcionó en cristalización en etanol (éter añadido hasta turbidez) 4-amino-6-hidroxipirimidina, p.f. 272 °C. Rendimiento, 10,0 g (64,4 %). Para $C_4H_5N_3O$ (111,10) calculado 43,24 % de C, 4,54 % de H, 37,82 % de N; observado 43,40 % de C, 4,65 % de H, 38,01 % de N. Espectro de masas: 112 (MH⁺). 1H RMN (CD_3SOCD_3): 4,97 s, 1H (H-5); 6,42 s a, 2H (NH₂); 7,77 s, 1H (H-2); 11,41 s a, 1H (OH).

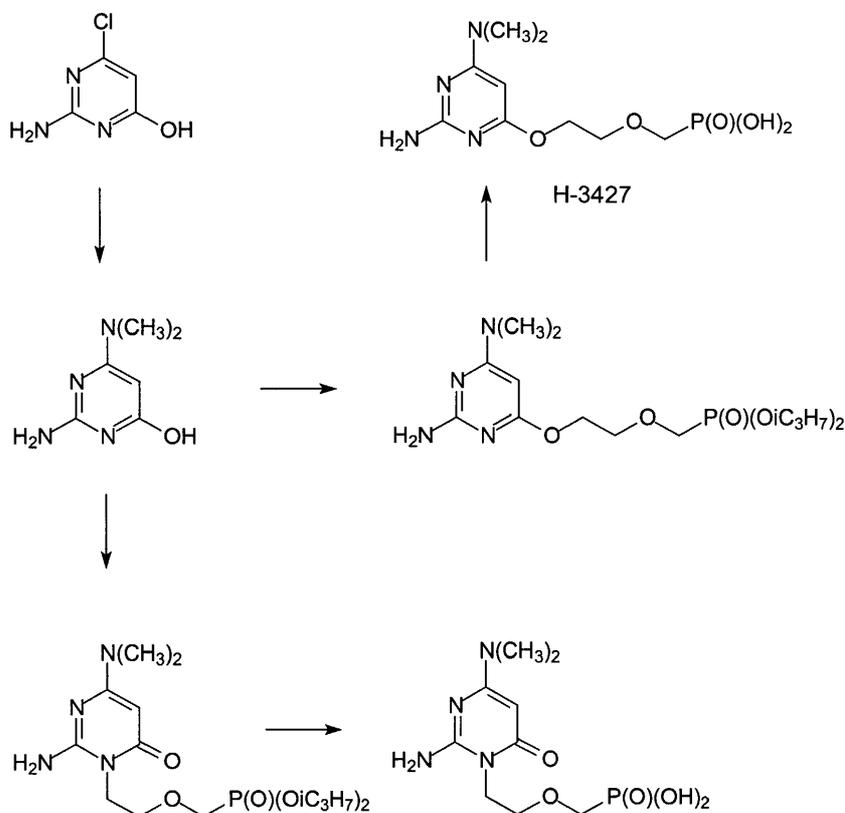
Este compuesto (3,6 g, 33,6 mmol) en DMF (70 ml) se trató con NaH (1,36 g, 34 mmol, dispersión al 60 % en aceite de parafina) durante 0,5 h en agitación, y se añadió 2-cloroetoximetilfosfonato de diisopropilo (9,4 ml, 40,5 mmol). La mezcla se agitó durante 8 h a 80 °C, se filtró a través de un lecho de celite y se evaporó al vacío. El residuo en cloroformo se purificó sobre gel de sílice; la elución con cloroformo-etanol (97,5:2,5) proporcionó 4-amino-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]pirimidina que se cristalizó en acetato de etilo-éter de petróleo. Rendimiento, 3,0 g (26,8 %), p.f. 112 °C. Para $C_{13}H_{24}N_3O_5P$ (333,32) calculado 46,84 % de C, 7,26 % de H, 12,61 % de N, 9,29 % de P; observado 46,69 % de C, 7,38 % de H, 12,45 % de N, 9,40 % de P. 1H RMN (CD_3SOCD_3): 1,22 d, 6 H y 1,23 d, 6 H, $J(CH_3,CH) = 6,1$ (4xCH₃); 3,78 t a, 2 H, $J(2',1') = 4,5$ (H-2'); 3,78 d, $J(CH_2-P) = 8,4$ (CH₂-P); 4,31 t a, 2H, $J(1',2') = 4,5$ (H-1'); 4,59 m, 2 H (P-OCH); 5,67 s, 1 H (H-5); 6,62 s a, 2H (NH₂); 8,07 s, 1H (H-2). ^{13}C RMN (CD_3SOCD_3): 64,42 (C-1').

Este compuesto se trató con bromotrimetilsilano (10 ml) en acetonitrilo (70 ml) durante una noche a temperatura ambiente. Después de la evaporación al vacío, el residuo se trató con agua (100 ml). Después de 10 min, a la reacción alcalina se le añadió amoníaco acuoso conc. y la mezcla se evaporó. El residuo se desionizó en una columna (100 ml) de Dowex 50 x 8 y el eluato de amoníaco de absorción UV se evaporó a sequedad. Este producto en agua (20 ml) se hizo alcalino mediante amoníaco acuoso conc. y se aplicó en una columna (150 ml) Dowex 1 x 2 (forma acetato) prelavada con agua. La elución con agua seguida de gradiente lineal de ácido acético (0-1 M, 1 l

cada vez) dio la fracción de absorción UV principal que se evaporó, el residuo se codestiló con agua (3 x 50 ml) y el residuo se cristalizó en agua. Rendimiento, 1,8 g (80 %) 4-amino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina, p.f. 254 °C. Para $C_7H_{12}N_3O_5P$ (249,16) calculado 33,74 % de C, 4,85 % de H, 16,86 % de N, 12,43 % de P; observado 34,02 % de C, 4,80 % de H, 16,88 % de N, 12,58 % de P.

5 La elución adicional de la mezcla de reacción en bruto sobre columna de gel de sílice con cloroformo-etanol (95:5) dio la 4-amino-1-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)-etil]pirimidin-6(1H)-ona oleosa que se secó al vacío. Rendimiento, 4,6 g (41,1 %). Este compuesto se trató con bromotrimetilsilano (10 ml) en acetonitrilo (70 ml) durante una noche a temperatura ambiente. Después de la evaporación al vacío, el residuo se trató con agua (100 ml). Después de
10 10 min, a la reacción alcalina se le añadió amoníaco acuoso conc. y la mezcla se evaporó. El residuo se aplicó sobre una columna (100 ml) Dowex 50 x 8 y se eluyó con agua. La fracción de absorción UV principal se evaporó y el residuo se cristalizó en etanol acuoso al 70 % (éter añadido hasta turbidez). Rendimiento, 2,8 g (91 %) 4-amino-1-[2-(fosfonometoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona, p.f. 233 °C. Para $C_7H_{12}N_3O_5P$ (249,16) calculado 33,74 % de C, 4,85 % de H, 16,86 % de N, 12,43 % de P; observado 34,02 % de C, 4,80 % de H, 16,88 % de N, 12,58 % de P. 1H RMN (CD_3SOCD_3): 3,56 d, 2H, $J(CH_2,P) = 8,8$ (CH_2P); 3,64 t, 2H, $J(2',1') = 4,9$ ($H-2'$); 3,90t, 2H, $J(1',2') = 4,9$ ($H-1'$); 5,06 s, 1 H ($H-5$); 6,45 s a, 2H (NH_2); 6,90 s a, 2H ($P-OH$); 7,98 s, 1H ($H-2$). ^{13}C RMN (CD_3SOCD_3): 44,44 ($C-1'$).

Ejemplo 6



20 **2-Amino-4-dimetilamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina (fosfonometoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona**

y 2-Amino-4-dimetilamino-1-[2-

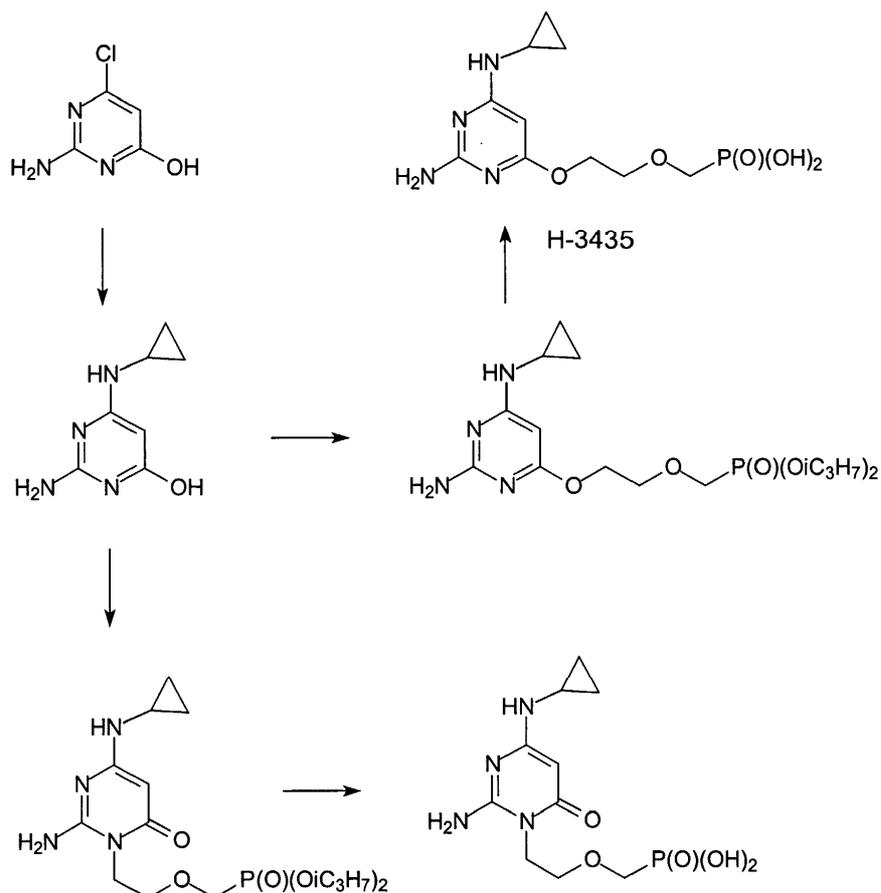
25 Se agitó 2-amino-4-cloro-6-hidroxipirimidina monohidrato (5,0 g) con dimetilamina al 30 % en etanol (180 ml) a 100 °C en un autoclave durante 16 h. El producto cristalino se filtró, se lavó con agua, acetona, éter y se secó al vacío para proporcionar 2-amino-4-dimetilamino-6-hidroxipirimidina, sin fusión por debajo de 300 °C. Rendimiento, 4,3 g (81 %). Para $C_6H_{10}N_4O$ (154,17) calculado 46,34 % de C, 6,54 % de H, 36,34 % N; observado 46,38 % de C, 6,65 % de H, 36,68 % N. 1H RMN (CD_3SOCD_3): 2,89 s, 6H ($N-CH_3$); 4,51 s, 1H ($H-5$); 6,18 s a, 2H (NH_2); 9,75 s a, 1H (OH).
30

Este compuesto (4,0 g, 26 mmol) y carbonato de cesio (4,22 g, 13 mmol) en DMF (60 ml) se agitaron a 100 °C durante 1 h y se añadió 2-cloroetoximetilfosfonato de diisopropilo (8 ml). La mezcla se agitó a 100 °C durante 24 h, se filtró mientras estaba caliente y se evaporó al vacío. El residuo se extrajo con cloroformo caliente (100 ml), se filtró y se purificó por cromatografía sobre columna de gel de sílice (200 ml). La elución con cloroformo dio 2-amino-4-dimetilamino-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]pirimidina en forma de un aceite pegajoso (4,6 g). Se trató con bromotrimetilsilano (5 ml) y acetonitrilo (50 ml) durante una noche a temperatura ambiente. Después de la
35

evaporación al vacío, el residuo se trató con agua (100 ml). Después de 10 min, a la reacción alcalina se le añadió amoníaco acuoso conc. y la mezcla se evaporó. El residuo se desionizó en una columna (100 ml) de Dowex 50 x 8 y el eluato de amoníaco de absorción UV se evaporó a sequedad. Este producto en agua (20 ml) se hizo alcalino mediante amoníaco acuoso conc. y se aplicó en una columna (150 ml) Dowex 1 x 2 (forma acetato) prelavada con agua. La elución con agua seguida de gradiente lineal de ácido acético (0-0,4 M, 1 l cada vez) dio la fracción de absorción UV principal que se evaporó, el residuo se codestiló con agua (3 x 50 ml) y el residuo se cristalizó en agua. Rendimiento, 1,1 g 2-amino-4-dimetilamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina, p.f. 168 °C. Para $C_9H_{17}N_4O_5P$ (292,23) calculado 36,99 % de C, 5,86 % de H, 19,17 % de N, 10,60 % de P; observado 37,05 % de C, 5,80 % de H, 18,98 % de N, 10,51 % de P. 1H RMN (DMSO): 6,69 s a, 2H (NH₂); 4,69 s, 1H (H-5); 3,98 t, J = 6,0 Hz, 2H (2xH-1'); 3,61 t, J = 6,0 Hz, 2H (2xH-2'); 3,59 d, 2H, J(H,P) = 8,3 Hz (P-CH₂); 2,89 s, 6H (N(CH₃)₂). ^{13}C RMN (DMSO): 162,37, 161,94 y 154,67 (C-2, C-4 y C-6); 75,79 (C-5); 69,82 d, J(C,P) = 10,3 Hz (C-2'); 66,76 d, J(C,P) = 158,7 Hz (P-CH₂); ~40,0 (C-1', solapado con DMSO); 36,93 (N(CH₃)₂).

La elución adicional de la columna sobre gel de sílice con gradiente de cloroformo-etanol proporcionó 2-amino-4-dimetilamino-1-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona en forma de un aceite pegajoso (2,0 g) que se trató con bromotrimetilsilano (5 ml) y acetonitrilo (50 ml) durante una noche y se trató de forma similar. Después de la cromatografía en Dowex 1, el producto dio en cristalización en agua 2-amino-4-dimetilamino-1-[2-(fosfonometoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona, p.f. 235 °C. Para $C_9H_{17}N_4O_5P$ (292,23) calculado 36,99 % de C, 5,86 % de H, 19,17 % de N, 10,60 % de P; observado 37,15 % de C, 5,92 % de H, 19,28 % de N, 10,66 % de P. 1H RMN (DMSO): 6,03 s a, 2H (NH₂); 5,20 s, 1H (H-5); 4,26 m, 2H (2xH-1'); 3,74 m, 2H (2xH-2'); 3,58 d, 2H, J(H,P) = 8,8 Hz (P-CH₂); 2,93 s, 6H (N(CH₃)₂). ^{13}C RMN (DMSO): 169,93, 164,91 y 161,92 (C-2, C-4 y C-6); 75,02 (C-5); 70,89 d, J(C,P) = 11,4 Hz (C-2'); 66,96 d, J(C,P) = 160,7 Hz (P-CH₂); 64,28 (C-1'); 36,95 (N(CH₃)₂).

Ejemplo 7



2-Amino-4-ciclopropilamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina y 2-Amino-4-ciclopropilamino-1-[2-(fosfonometoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona

Se calentó 2-amino-4-cloro-6-hidroxipirimidina monohidrato (5,0 g) a reflujo en etanol (150 ml) con ciclopropilamina durante 12 h. La mezcla se evaporó al vacío, se codestiló con etanol (3 x 50 ml), se adsorbió en metanol sobre gel de sílice y se aplicó sobre una columna de gel de sílice (200 ml) en cloroformo. La elución con gradiente de cloroformo-etanol proporcionó un producto cristalino que se filtró del éter y se secó al vacío para proporcionar 2-

amino-4-ciclopropilamino-6-hidroxipirimidina, p.f. 229 °C. Rendimiento, 3,0 g. Para $C_7H_{10}N_4O$ (166,18) calculado 50,59 % de C, 6,07 % de H, 33,71 % N; observado 50,49 % de C, 6,25 % de H, 33,61 % N. 1H RMN (DMSO): 9,73 s a, 1H (OH); 6,55 s a, 2H (NH); 6,08 s a, 2H (NH₂); 4,66 s, 1H (H-5); 2,30 m, 1H y 0,62 m, 2H y 0,40, m, 2H (C-CH₂, N-CH).

5

La mezcla de este compuesto (3,0 g, 18 mmol) y carbonato de cesio (2,92 g, 9 mmol) en DMF (50 ml) se agitó a 100 °C durante 1 h y se añadió 2-cloroetoximetilfosfonato de diisopropilo (6 ml). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 24 h, se filtró mientras estaba caliente y se evaporó al vacío. El residuo se extrajo con cloroformo caliente (100 ml), se filtró, se concentró al vacío y se purificó por cromatografía sobre columna de gel de sílice (2 x 200 ml). La elución con cloroformo dio 2-amino-4-ciclopropilamino-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]pirimidina en forma de un aceite pegajoso (1,8 g). Se trató con bromotrimetilsilano (5 ml) y acetonitrilo (50 ml) durante una noche a temperatura ambiente. Después de la evaporación al vacío, el residuo se trató con agua (100 ml). Después de 10 min, a la reacción alcalina se le añadió amoniaco acuoso conc. y la mezcla se evaporó. El residuo se desionizó en una columna (100 ml) de Dowex 50 x 8 y el eluato de amoniaco de absorción UV se evaporó a sequedad. Este producto en agua (20 ml) se hizo alcalino mediante amoniaco acuoso conc. y se aplicó en una columna (150 ml) Dowex 1 x 2 (forma acetato) prelavada con agua. La elución con agua seguida de gradiente lineal de ácido acético (0-0,4 M, 1 l cada vez) dio la fracción de absorción UV principal que se evaporó, el residuo se codestiló con agua (3 x 50 ml) y el residuo se cristalizó en agua. Rendimiento, 1,0 g 2-amino-4-ciclopropilamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina, p.f. 244 °C. Para $C_{10}H_{17}N_4O_5P$ (304,24) calculado 39,48 % de C, 5,63 % de H, 18,42 % de N, 10,18 % de P; observado 39,65 % de C, 5,70 % de H, 18,59 % de N, 10,11 % de P. 1H RMN (D₂O + NaOD): 0,54 m, 2H y 0,80 m, 2H (C-CH₂); 2,53 m, 1H (N-CH); 3,57 d, 2H, J(CH₂,P) = 8,4 (CH₂P); 3,91 m, 2H (H-2'); 4,32 m, 2H (H-1'); 5,61 s, 1 H (H-5).

10

15

20

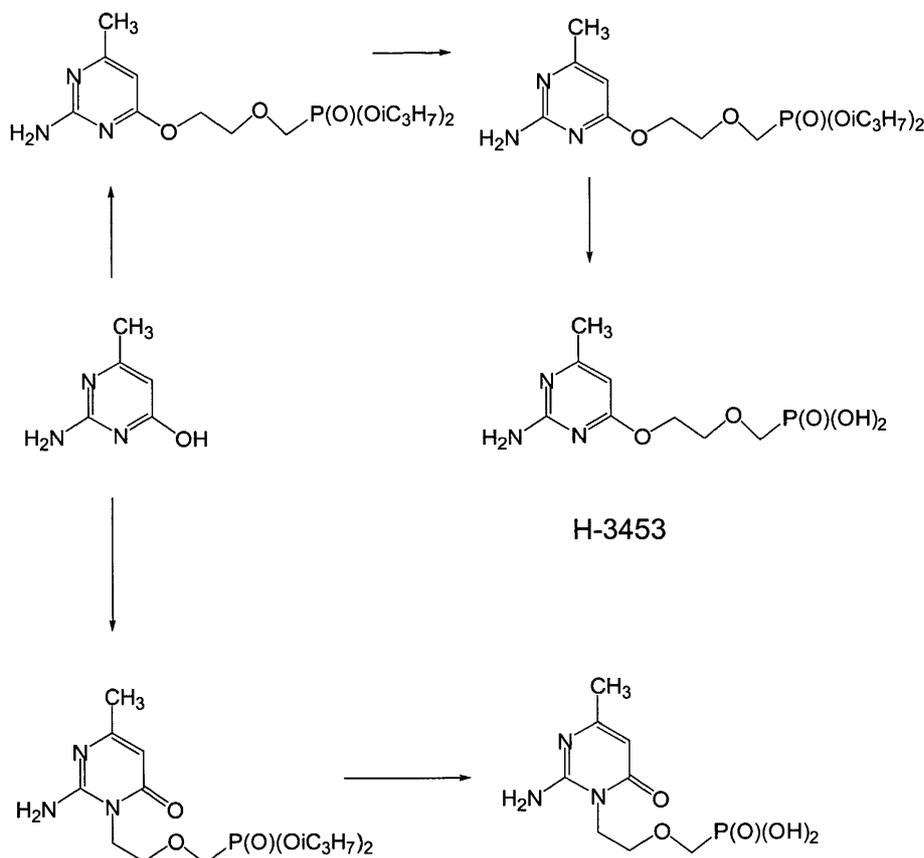
La elución adicional de la columna sobre gel de sílice con gradiente de cloroformo-etanol proporcionó (después de la cristalización en etanol-éter) 2-amino-4-ciclopropilamino-1-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona de color amarillo (1,6 g) que se trató con bromotrimetilsilano (5 ml) y acetonitrilo (50 ml) durante una noche y se trató de forma similar. En cromatografía sobre columna Dowex 50, el producto se eluyó con agua y se evaporó al vacío. El residuo dio en cristalización en agua 2-amino-4-ciclopropilamino-1-[2-(fosfonometoxi)etil]pirimidin-2-ona, sin fusión por debajo de 290 °C. Rendimiento, 0,90 g. Para $C_{10}H_{17}N_4O_5P$ (304,24) calculado 39,48 % de C, 5,63 % de H, 18,42 % de N, 10,18 % de P; observado 39,70 % de C, 5,78 % de H, 18,69 % de N, 10,32 % de P. ^{13}C RMN (D₂O+NaOD): 173,71, 170,07 y 165,53 (C-2, C-4 y C-6); 78,75 (C-5); 73,31 d, J(C,P) = 10,3 Hz (C-2'); 72,19 d, J(C,P) = 149,4 Hz (P-CH₂); 69,14 (C-1'); 25,96 (N-CH); 9,43 (2xCH₂ de ciclopropilo).

25

30

Ejemplo 8

35



2-Amino-4-metil-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina y 2-Amino-4-metil-1-[2-(fosfonometoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona

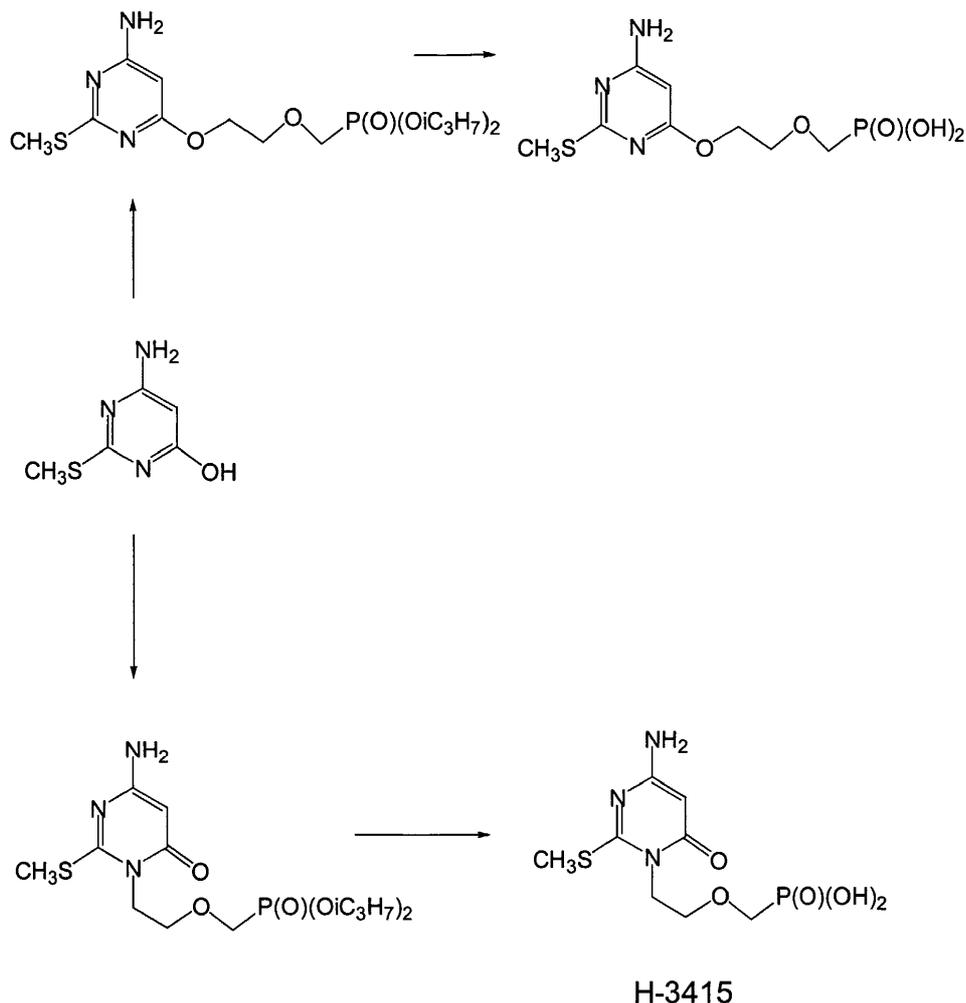
5 Se añadió 2-cloroetoximetilfosfonato de diisopropilo (15 ml, 62,5 mmol) a una mezcla de 2-amino-6-hidroxi-4-metilpirimidina (6,25 g, 50 mmol) y carbonato de cesio (11,3 g, 25 mmol) en DMF (70 ml), que se ha agitado antes de la adición, a 100 °C durante 1 h. Después, la mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 14 h, se filtró mientras estaba caliente y se evaporó al vacío. El residuo dio en la extracción con cloroformo y la purificación posterior sobre columna de gel de sílice (250 ml) 2-amino-4-metil-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]pirimidina que se cristalizó en acetato de etilo - éter de petróleo. Rendimiento, 5,75 g, p.f. 72-73 °C. Para C₁₄H₂₆N₃O₅P (347,35) calculado 48,41 % de C, 7,54 % de H, 12,10 % de N, 8,92 % de P; observado 48,70 % de C, 7,60 % de H, 12,32 % de N, 9,14 % de P. ¹H RMN (CDCl₃): 5,95 q, 1H, J = 0,6 Hz (H-5); 4,90 b, 2H (NH₂); 4,76 dh, 2H, J(H,P) = 7,6 Hz y J(H,H) = 6,2 Hz (2xOCH (iPr)); 4,42 m, 2H (2xH-1'); 3,90 m, 2H (2xH-2'); 3,82 d, 2H, J(H,P) = 8,2 Hz (P-CH₂); 2,26 d, 3H, J = 0,6 Hz (CH₃); 1,34 d, 6H, J = 6,2 Hz y 1,33 d, 6H, J = 6,2 Hz (4xCH₃ (iPr)). ¹³C RMN (CDCl₃): 170,36, 168,27 y 162,48 (C-2, C-4 y C-6); 97,03 (C-5); 71,17 d, J(C,P) = 10,8 Hz (C-2'); 71,06 d, J(C,P) = 6,8 Hz (OCH (iPr)); 65,99 d, J(C,P) = 167,6 Hz (P-CH₂); 64,60 (C-1'); 24,04 d, J(C,P) = 3,9 Hz y 23,90 d, J(C,P) = 4,9 Hz (4xCH₃ (iPr)); 23,61 (CH₃).

20 Este compuesto se trató con bromotrimetilsilano (5 ml) en acetonitrilo (50 ml) a temperatura ambiente durante una noche y los volátiles se evaporaron al vacío. El residuo se disolvió en agua (100 ml), a la reacción alcalina se añadió amoniaco acuoso conc. y la mezcla se evaporó. El residuo se desionizó en una columna (100 ml) de Dowex 50 x 8 y el eluato de amoniaco de absorción UV se evaporó a sequedad. Este producto en agua (20 ml) se hizo alcalino mediante amoniaco acuoso conc. y se aplicó en una columna (150 ml) Dowex 1 x 2 (forma acetato) prelavada con agua. La elución con agua seguida de gradiente lineal de ácido acético (0-0,4 M, 1 l cada vez) dio la fracción de absorción UV principal que se evaporó, el residuo se codestiló con agua (3 x 50 ml) y el residuo se cristalizó en agua. Rendimiento, 3,67 g de 2-amino-4-metil-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina, p.f. 245 °C. Para C₈H₁₄N₃O₅P (263,19) calculado 36,51 % de C, 5,36 % de H, 15,97 % de N, 11,77 % de P; observado 36,65 % de C, 5,60 % de H, 15,69 % de N, 11,92 % de P. ¹H RMN (D₂O+NaOD): 6,13 s, 1H (H-5); 4,39 m, 2H (2xH-1'); 3,92 m, 2H (2xH-2'); 3,57 d, 2H, J(H,P) = 8,5 Hz (P-CH₂); 2,26 s, 3H (CH₃). ¹³C RMN (D₂O+NaOD): 173,63, 172,80 y 165,50 (C-2, C-4 y C-6); 98,75 (C-5); 73,09 d, J(C,P) = 10,2 Hz (C-2'); 72,06 d, J(C,P) = 149,4 Hz (P-CH₂); 68,85 (C-1'); 25,42 (CH₃).

30 La elución adicional de la columna sobre gel de sílice seguido de cristalización en acetato de etilo-éter de petróleo dio 2-amino-4-metil-1-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona (4,2 g), p.f. 88 °C. Para C₁₄H₂₆N₃O₅P (347,35) calculado 48,41 % de C, 7,54 % de H, 12,10 % de N, 8,92 % de P; observado 48,49 % de C, 7,62 % de H, 12,30 % de N, 9,08 % de P. ¹H RMN (CDCl₃): 5,79 q, 1H, J = 0,8 Hz (H-5); 5,62 b, 2H (NH₂); 4,72 dh, 2H, J(H,P) = 7,6 Hz y J(H,H) = 6,2 Hz (2xOCH (iPr)); 4,20 m, 2H (2xH-1'); 3,90 m, 2H (2xH-2'); 3,74 d, 2H, J(H,P) = 8,6 Hz (P-CH₂); 2,12 d, 3H, J = 0,8 Hz (CH₃); 1,32 d, 6H, J = 6,2 Hz y 1,29 d, 6H, J = 6,2 Hz (4xCH₃ (iPr)). ¹³C RMN (CDCl₃): 164,33, 162,93 y 156,37 (C-2, C-4 y C-6); 102,22 (C-5); 72,88 d, J(C,P) = 11,7 Hz (C-2'); 71,27 d, J(C,P) = 6,8 Hz (OCH (iPr)); 66,17 d, J(C,P) = 168,1 Hz (P-CH₂); 43,06 (C-1'); 23,97 d, J(C,P) = 3,9 Hz y 23,91 d, J(C,P) = 4,9 Hz (2xCH₃ (iPr)); 23,64 (CH₃).

40 Este producto se trató de forma análoga con bromotrimetilsilano (5 ml) en acetonitrilo (50 ml) para proporcionar, después de la cromatografía de la mezcla de reacción desionizada sobre columna Dowex 1 x 2 y cristalización en agua, 2-amino-4-metil-1-[2-(fosfonometoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona. Rendimiento, 2,3 g, p.f. 283 °C. Para C₈H₁₄N₃O₅P (263,19) calculado 36,51 % de C, 5,36 % de H, 15,97 % de N, 11,77 % de P; observado 36,40 % de C, 5,23 % de H, 15,77 % de N, 12,00 % de P. ¹H RMN (D₂O+ NaOD): 5,77 s, 1H (H-5); 4,18 t, 2H, J = 5,3 Hz (2xH-1'); 3,82 t, 2H, J = 5,3 Hz (2xH-2'); 3,50 d, 2H, J(H,P) = 8,7 Hz (P-CH₂); 2,12 s, 3H (CH₃). ¹³C RMN (D₂O+NaOD) 169,48, 168,32 y 160,25 (C-2, C-4 y C-6); 102,40 (C-5); 73,17 (C-2'); 72,55 d, J(C,P) = 142,0 Hz (P-CH₂); 45,60 (C-1'); 25,43 (CH₃).

Ejemplo 9



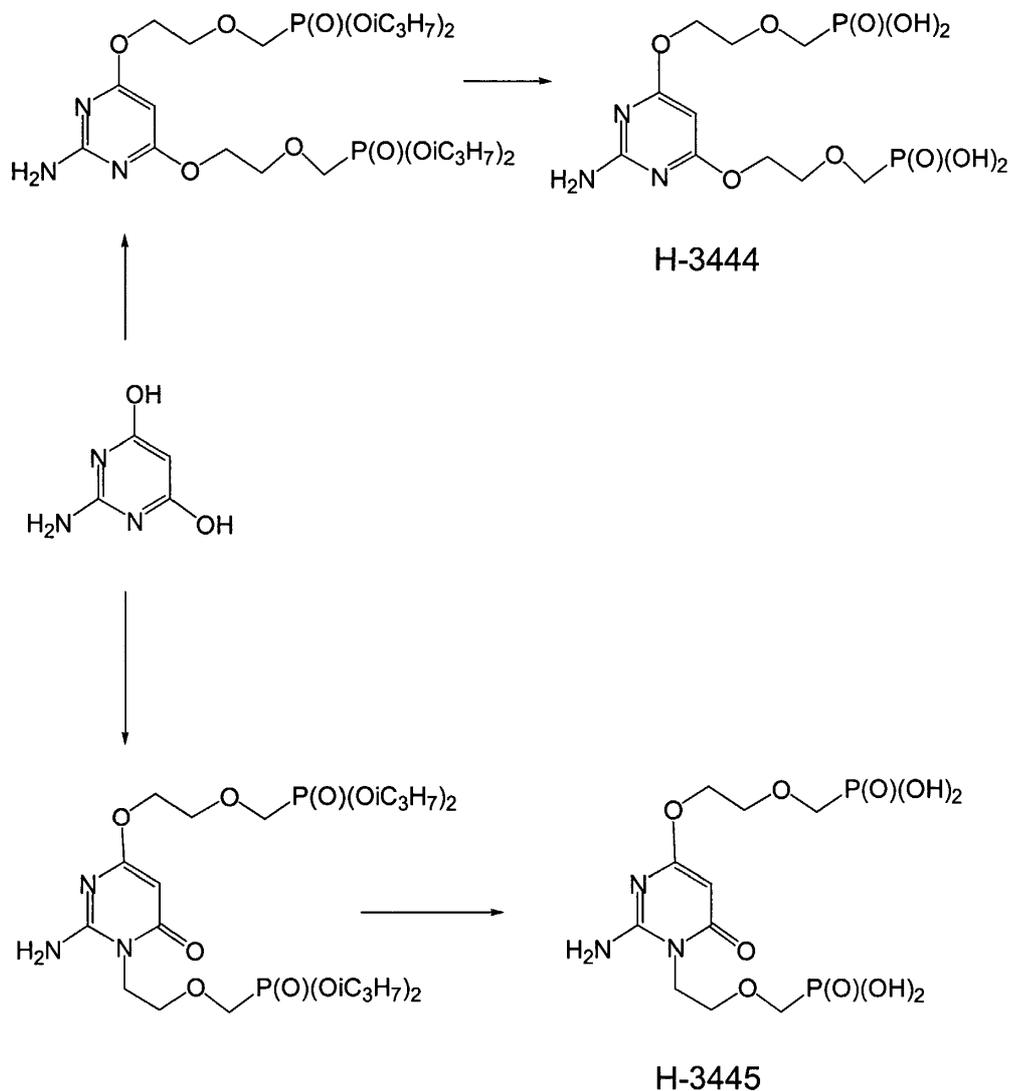
5 4-Amino-2-metilsulfanil-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina

Se trató 2-hidroxietilfosfonato de dietilo (5,3 g, 25 mmol) en DMF (40 ml) a 0 °C con NaH (1,0 g, dispersión al 60 % en aceite de parafina) y, después de 1 h en agitación a 0 °C, se añadió en una porción 4-amino-6-cloro-2-metilsulfanilpirimidina (3,5 g, 20 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h a 100 °C, se evaporó a sequedad al vacío y se extrajo con cloroformo caliente (300 ml). El extracto se evaporó al vacío y el residuo se trató con bromotrimetilsilano (10 ml) en acetonitrilo (50 ml) a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se evaporó a sequedad al vacío y el residuo se desionizó en una columna (100 ml) de Dowex 50 x 8 y el eluato de amoníaco de absorción UV se evaporó a sequedad. Este producto en agua (20 ml) se disolvió mediante la adición de amoníaco acuoso conc. y se acidificó por HCl a pH 3-3,5. El precipitado se recogió, se lavó con agua, etanol y se secó al vacío.

10 Rendimiento, 0,8 g de 4-amino-2-metilsulfanil-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina, p.f. 210-211 °C. Para C₈H₁₄N₃O₅P (263,19) calculado 32,54 % de C, 4,78 % de H, 14,23 % de N, 10,49 % de P, 10,86 %S; observado 32,42 % de C, 4,93 % de H, 14,07 % de N, 10,62 % de P, 11,04 %S. ¹H RMN (D₂O): 5,68 s, 1H (H-5); 4,36 m, 2H (2xH-1'); 3,94 m, 2H (2xH-2'); 3,72 d, 2H, J(H,P) = 8,5 Hz (P-CH₂); 2,48 s, 3H (SCH₃). ¹³C RMN (D₂O): 173,70, 172,13 y 167,93 (C-2, C-4 y C-6); 84,82 (C-5); 73,53 d, J(C,P) = 10,7 Hz (C-2'); 70,01 d, J(C,P) = 156,3 Hz (P-CH₂); 69,20 (C-1'); 16,02

20 (SCH₃).

Ejemplo 10



5 **2-Amino-4,6-bis[2-(fosfometoxi)etoxi]pirimidina** y **2-amino-4-[2-(fosfometoxi)etoxi]-1-[2-**
(fosfometoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona

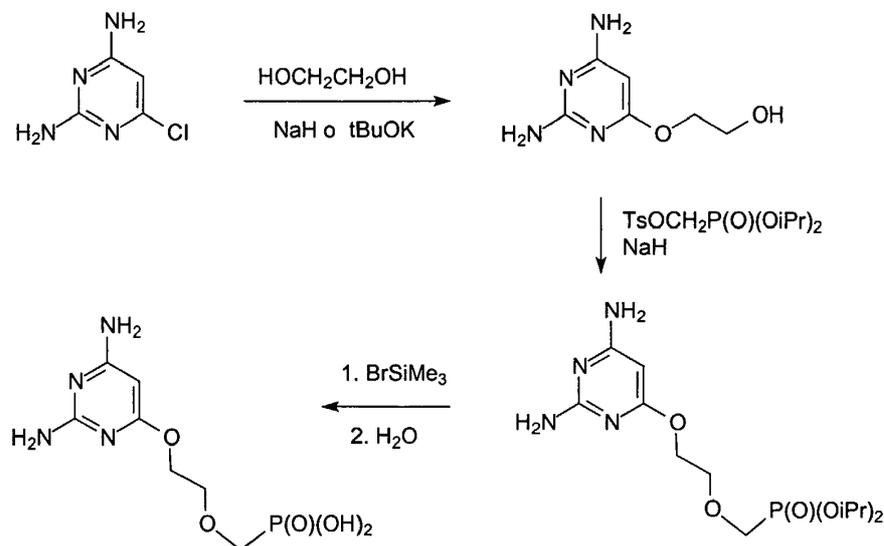
Se agitaron 2-amino-4,6-dihidroxipirimidina (12,7 g, 0,1 mol) y carbonato de cesio (27,8 g (85 mmol) en DMF (200 ml) durante 1 h a 100 °C y se añadió 2-cloroetoximetilfosfonato de diisopropilo (30 ml). La mezcla se agitó durante 16 h a 100 °C, se filtró mientras estaba caliente y se evaporó al vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (200 ml de columna) para proporcionar 2,8 g del residuo oleoso que después se trató con bromotrimetilsilano (7 ml) en acetonitrilo (50 ml) durante una noche. El residuo se disolvió en agua (100 ml), a la reacción alcalina se añadió amoníaco acuoso conc. y la mezcla se evaporó. El residuo se desionizó en una columna (100 ml) de Dowex 50 x 8 y el eluato de amoníaco de absorción UV se evaporó a sequedad. Este producto se codestiló con etanol y se filtró del etanol. Rendimiento, 1,4 g de 2-amino-4,6-bis[2-(fosfometoxi)etoxi]pirimidina, p.f. 127 °C. Para C₁₀H₁₉N₃O₁₀P₂ (403,22) calculado 29,79 % de C, 4,75 % de H, 10,42 % de N, 15,36 % de P; observado 29,90 % de C, 4,87 % de H, 10,24 % de N, 15,64 % de P. ¹H RMN (DMSO): 6,55 b, 2H (NH₂); 5,36 s, 1H (H-5); 4,29 m, 2H (2xH-1'); 3,76 m, 2H (2xH-2'); 3,58 d, 2H, J(H,P) = 8,6 Hz (P-CH₂). ¹³C RMN (DMSO): 171,30 (C-4, C-6), 162,76 (C-2); 78,60 (C-5); 70,70 d, J(C,P) = 11,7 Hz (C-2'); 66,86 d, J(C,P) = 160,2 Hz (P-CH₂); 64,81 (C-1').

La elución adicional de la columna sobre gel de sílice dio un aceite espeso (4,8 g) que se trató con bromotrimetilsilano (10 ml) en acetonitrilo (70 ml) durante una noche y se evaporó al vacío. El residuo se pasó a través de una columna Dowex 50 x 8 (forma H⁺) (150 ml) y la columna se eluyó con agua. Después retirar por lavado los ácidos inorgánicos, el producto eluyó con retención. Su fracción se evaporó y el residuo se agitó con una mezcla de etanol-acetona (1:1, 100 ml). El producto de color amarillento se filtró, se lavó con éter y se secó. Rendimiento, 1,8 g de 2-amino-4-[2-(fosfometoxi)etoxi]-1-[2-(fosfometoxi)etil]pirimidin-6(1H)-ona, p.f. 108 °C. Para

$C_{10}H_{19}N_3O_{10}P_2$ (403,22) calculado 29,79 % de C, 4,75 % de H, 10,42 % de N, 15,36 % de P; observado 29,90 % de C, 4,87 % de H, 10,24 % de N, 15,64 % de P.

Ejemplo 11

5



(a) 2,4-Diamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina

- 10 Se añadió con precaución en porciones hidruro sódico (suspensión al 60 % en aceite de parafina) (2,4 g, 60 mmol) a etilenglicol destilado de nuevo (50 ml) en exclusión de humedad hasta su disolución. Después, se añadió en una porción 2,4-diamino-6-cloropirimidina (2,89 g, 20 mmol) y la mezcla se agitó durante 6 h a 80 °C. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con agua (200 ml) y se pasó a través de una columna (200 ml) de Dowex 50 x 8 en ciclo de ácido. La columna se lavó con agua (1 l) y la resina se suspendió en agua (300 ml). Esta suspensión se hizo
- 15 alcalina con amoniaco acuoso conc., se filtró y la resina se lavó con agua en ebullición (1 l). Los filtrados combinados se evaporaron a sequedad y el residuo se cristalizó en agua para proporcionar 2,4-diamino-6-(2-hidroxietoxi)pirimidina, p.f. 190 °C. Rendimiento, 2,3 g (79,4 %). Para $C_6H_{10}N_4O_2$ (170,18) calculado 42,34 % de C, 5,92 % de H, 30,37 % de N; observado 42,09 % de C, 5,89 % de H, 30,63 % de N. Espectro de masas: 171,3 (MH⁺). ¹H RMN (CD₃SOCD₃): 3,67 c a, 2H, J(CH₂,CH₂) = J(CH₂,OH) = 4,8 (O-CH₂); 4,10 t, 2H, J(CH₂,CH₂) = 5,0 (O-CH₂); 4,79 t, 1H, J(OH,CH₂) = 4,5 (OH); 5,05 s, 1H (H-5); 5,89 s a, 2H y 6,01 s a, 2H (NH₂).
- 20

Este compuesto (4,25 g, 25 mmol) y p-toluenosulfoniloximetilfosfonato de diisopropilo (8,75 g, 25 mmol) en DMF (50 ml) se trató con NaH al 60 % (3,5 g, 3,5 equivalentes). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 días y se añadió gota a gota ácido acético (4 ml). El disolvente se retiró por destilación al vacío y el residuo se extrajo con cloroformo. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para proporcionar, después de la cristalización en acetato de etilo-éter de petróleo, 2,4-diamino-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]pirimidina, p.f. 159 °C. Rendimiento, 6,45 g (74 %). Para $C_{13}H_{25}N_4O_5P$ (348,3) calculado 44,83 % de C, 7,23 % de H, 16,08 % de N, 8,89 % de P; observado 44,86 % de C, 7,15 % de H, 16,21 % de N, 9,05 % de P. Espectro de masas: 349,3 (MH⁺). El espectro ¹H RMN (CD₃SOCD₃) es idéntico al descrito en el

25

30 Ejemplo 1.

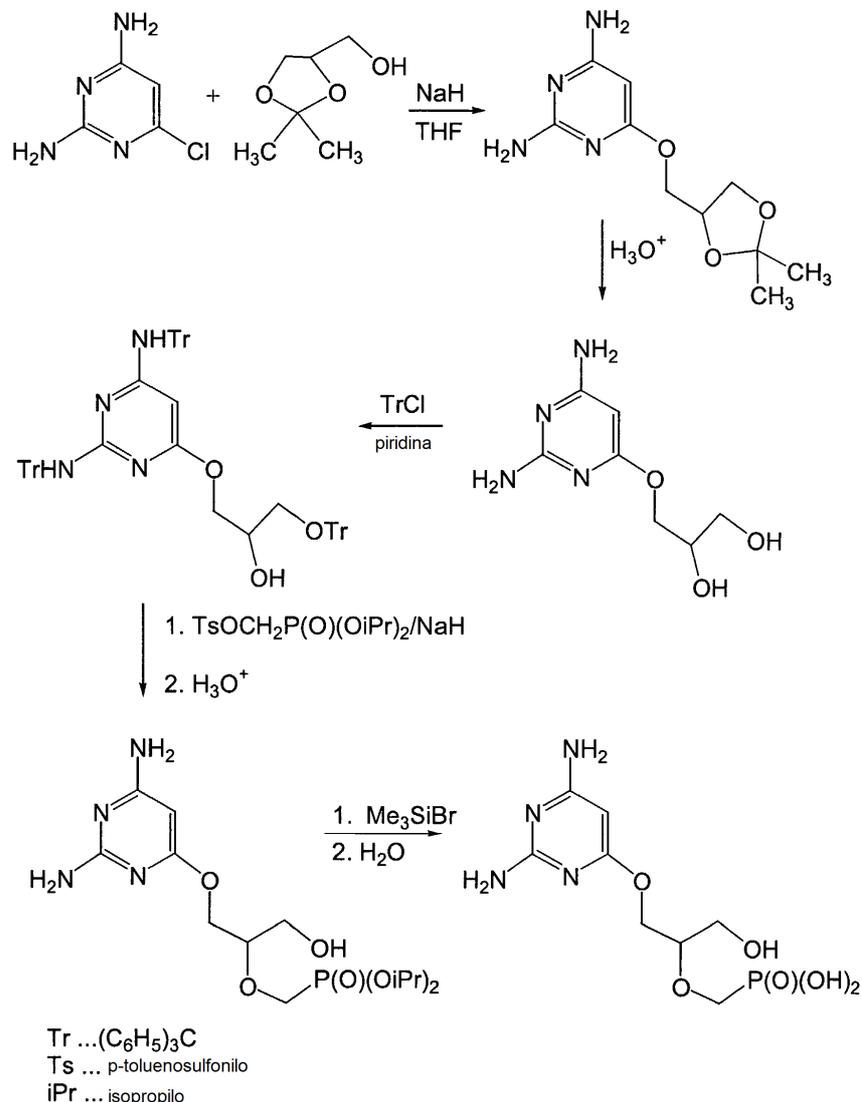
La conversión de este compuesto en 2,4-diamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina se realizó básicamente como se ha descrito en el Ejemplo 1 y proporcionó un compuesto idéntico con este material auténtico de acuerdo con la RMN y los espectros de masas.

35

(b) 2,4-Diamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina

- La reacción se realizó básicamente como se describe en el punto (a), excepto que se reemplazó NaH por la misma cantidad molar de terc-butóxido potásico. El rendimiento de 2,4-diamino-6-(2-hidroxietoxi)pirimidina fue del 81 %. El procedimiento adicional permaneció inalterado.
- 40

Ejemplo 12



5 (a) 2,4-Diamino-6-[(RS)-3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propoxi]pirimidina

Se añadió gota a gota 4-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxolano (13,2 g, 0,1 mol) en tetrahidrofurano recién destilado de nuevo (100 ml) en una suspensión de NaH (0,2 mol) en tetrahidrofurano (400 ml). La mezcla se agitó hasta su disolución y se añadió 2,4-diamino-6-cloropirimidina (14,46 g, 0,1 mol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo en agitación en una atmósfera de argón durante 12 h y se neutralizó con ácido acético. La suspensión se filtró, se lavó con tetrahidrofurano y el filtrado se evaporó a sequedad al vacío. La purificación sobre una columna de gel de sílice (300 ml) en cloroformo dio, después de la cristalización en acetato de etilo-éter de petróleo, 2,4-diamino-6-[2,2-dimetil-1,3-dioxolanil-4-metoxi]pirimidina, p.f. 128 °C. Rendimiento, 16,0 g (66,6 %). Para C₁₀H₁₆N₄O₃ (240,3) calculado 49,99 % de C, 6,71 % de H, 23,32 % de N; observado 49,95 % de C, 6,84 % de H, 23,05 % de N. Espectro de masas: 241,3 (MH⁺). ¹H RMN (CD₃SOCD₃): 1,27 s, 3 H y 1,33 s, 3 H (CH₃); 3,68 dd, 1H, J(3'b,2') = 6,2, J(gem) = 8,3 (H-3'b); 4,02 dd, 1H, J(1'a,2') = 6,6, J(gem) = 8,3 (H-3'a); 4,19 m, 2H (H-1'a); 4,10 dd, 1H, J(1'b,2') = 6,0, J(gem) = 11,0 (H-1'b); 4,13 dd, 1H, J(1'a,2') = 5,0, J(gem) = 11,0 (H-1'a); 4,30 m, 1H (H-2'); 5,06 s, 1H (H-5); 5,94 s a, 2H y 6,06 s a, 2H (NH₂). ¹³C RMN (CD₃SOCD₃): 25,75 y 26,94 (CH₃); 65,72 (C-3'); 66,22 (C-1'); 74,00 (C-2'); 76,58 (C-5); 109,06 (C_{iPr}); 163,23 y 166,38 y 170,11 (C-6, C-2, C-4).

Este compuesto (14,4 g, 60 mmol) en H₂SO₄ 0,25 M (250 ml) se dejó en reposo durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se neutralizó mediante una solución saturada de hidróxido de bario, se filtró, y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo dio en recristalización en etanol al 90 % (éter añadido hasta turbidez) 2,4-diamino-6-(2,3-dihidroxi)propoxi]pirimidina, p.f. 160 °C. Rendimiento, 10,0 g (83,3 %). Para C₇H₁₂N₄O₃ (200,2) calculado 42,00 % de C, 6,04 % de H, 27,99 % de N; observado 41,84 % de C, 6,24 % de H, 28,06 % de N. Espectro de masas: 201,2 (MH⁺). ¹H RMN (CD₃SOCD₃): 3,40 d, 2H, J(3',2') = 5,4 (H-3'); 3,72 m, 1H (H-2'); 4,01 dd, 1H, J(1'b,2') = 6,2, J(gem) = 10,9 (H-1'b); 4,10 dd, 1H, J(1'a,2') = 4,4, J(gem) = 10,9 (H-1'a); 4,73 s a, 1H y 5,02 s a, 1H (OH); 5,09 s,

1H (H-5); 5,99 s a, 2H y 6,07 s a, 2H (NH₂). ¹³C RMN (CD₃SOCD₃): 63,14 (C-3'); 67,16 (C-1'); 70,28 (C-2'); 76,64 (C-5); 163,19 y 166,27 (C-2, C-4); 170,62 (C-6).

5 La mezcla de este compuesto (8,0 g, 40 mmol), cloruro de tritilo (36,4 g, 131 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (2 g) en piridina (160 ml) se agitó durante 15 h a 50 °C y se vertió lentamente en agitación en agua (2 l). La suspensión se agitó durante 1 h, se decantó y, después de la agitación con una porción de agua potable (2 l), se filtró y se lavó con agua. El precipitado se recogió en cloroformo (600 ml), se secó con MgSO₄, se evaporó y se codestiló al vacío con tolueno (porciones 3 x 100 ml). La goma resultante se disolvió en un volumen mínimo de éter y se añadió por goteo, en agitación vigorosa, a éter de petróleo (1 l). El precipitado se filtró, se lavó con éter de petróleo y se secó.

10 Rendimiento, 33,4 g (91,5 %) de 6-[2-hidroxi-3-(tritoloxi)propoxi]-2,4-bis(tritilamino)pirimidina, p.f. 138 °C. Para C₆₄H₅₄N₄O₂ (911,1) calculado 6,15 % de N; observado 5,96 % de N. Este derivado de tritilo (27,3 g, 30 mmol) y p-toluenosulfoniloximetilfosfonato de diisopropilo (15,75 g, 45 mmol) en tetrahidrofurano (300 ml) se trató con NaH al 60 % (5,4 g, 3,5 equivalentes). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 días y se neutralizó con ácido acético. El disolvente se retiró por destilación al vacío, el residuo se disolvió en acetato de etilo (800 ml) y se extrajo con agua (3 x 200 ml). La fase orgánica se evaporó a sequedad y el residuo se calentó a reflujo en ácido acético acuoso al 80 % (300 ml) durante 30 min, se enfrió y se evaporó al vacío. Se añadió agua (300 ml) y la mezcla se extrajo con éter (4 x 100 ml). La fase acuosa se liberó de los volátiles al vacío y se aplicó sobre una columna Dowex 50 x 8 (200 ml) en forma ácida. La columna se lavó con agua hasta la caída de la acidez y la absorbancia UV y después se eluyó con amoniaco acuoso al 2,5 %. El eluato de amoniaco de absorción UV se recogió, se evaporó a sequedad al vacío, el residuo se codestiló con etanol (3 x 100 ml) y se secó sobre P₂O₅ al vacío durante una noche. Se añadieron acetronitrilo (100 ml) y bromotrimetilsilano (30 ml) y la mezcla se dejó en reposo durante una noche en exclusión de humedad. Después de la evaporación de los volátiles al vacío, al residuo se le añadió agua (200 ml) seguido de amoniaco acuoso conc. a una reacción alcalina. Esta solución se evaporó a sequedad y el residuo se desionizó en una columna Dowex 50 x 8 (200 ml) básicamente en las mismas condiciones. El eluato de amoniaco de absorción UV se retiró al vacío, el residuo se disolvió en una cantidad mínima de agua y se hizo alcalino a pH 10 mediante amoniaco. Esta solución se aplicó sobre una columna (200 ml) Dowex 1 x 2 (forma acetato) prelavada con agua. La columna se lavó con agua hasta la caída de la absorbancia UV del eluato y después con gradiente lineal de ácido acético (0-0,3 M, 1,5 l cada uno). La fracción de absorción UV principal se recogió, se evaporó al vacío y el residuo se codestiló con agua (2 x 100 ml). La cristalización del residuo en agua dio 2,4-diamino-6-[(RS)-3-hidroxi-2-

20 (fosfonometoxi)propoxi]pirimidina en forma de monohidrato. Rendimiento, 3,8 g (40,6 %), agujas de color blanco, p.f. 213 °C. Para C₈H₁₅N₄O₆P·H₂O (312,2) calculado 30,78 % de C, 5,49 % de H, 17,94 % de N, 9,92 % de P; observado 30,98 % de C, 5,52 % de H, 17,99 % de N, 9,82 % de P. Espectro de masas: 295,0 (MH⁺). ¹H RMN (D₂O + NaOD): 3,48 dd, 1H, J(P, CHb) = 9,8, J(gem) = 12,1 (P-CHb); 3,59 dd, 1H, J(P, CHa) = 8,9, J(gem) = 12,1 (P-CHa); 3,61 dd, 1H, J(3'b,2') = 6,8, J(gem) = 12,9 (H-3'b); 3,70 m, 1H (H-2'); 3,71 dd, 1H, J(3'a,2') = 3,6, J(gem) = 12,9 (H-3'a); 4,11 dd, 1H, J(1'b,2') = 5,0, J(gem) = 10,7 (H-1'b); 4,14 dd, 1H, J(1'a,2') = 4,6, J(gem) = 10,7 (H-1'a); 5,36 s, 1H (H-5); ¹³C RMN (D₂O + NaOD): 60,62 (C-3'); 65,58 (C-1'); 68,03 d, J(P,C) = 149,4 (P-C); 76,63 (C-5); 79,89 d, J(P,C) = 10,7 (C-2'); 162,63 y 166,54 (C-2, C-4); 170,78 (C-6).

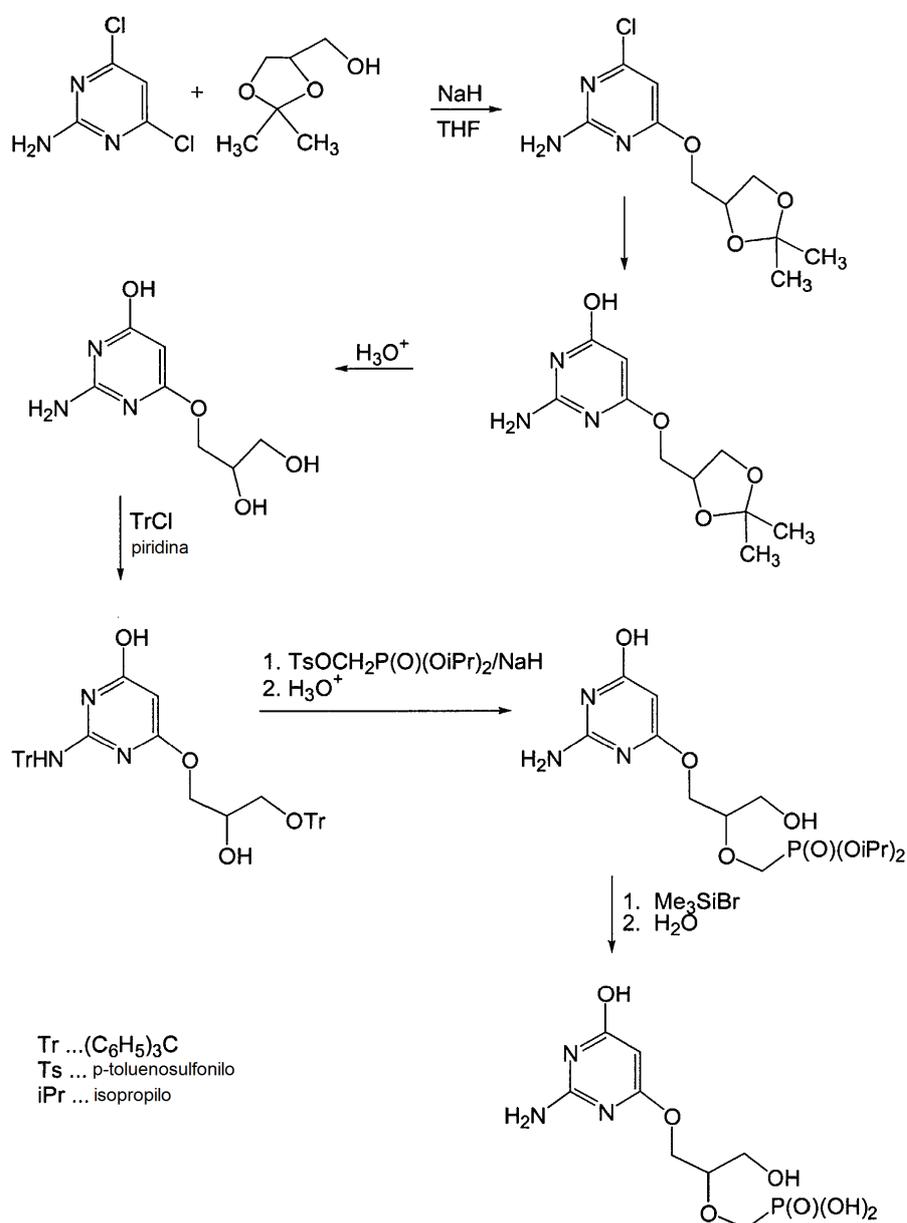
(b) 2,4-Diamino-6-[(S)-3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propoxi]pirimidina.

40 Se destiló al vacío y se añadió gota a gota (S)-2,2-Dimetil-4-hidroximetil-1,3-dioxolano (40 g, 0,3 mol) recién preparado a partir de 1,2:5,6-diisopropilideno-D-manitol en una suspensión de NaH (0,3 mol) en tetrahidrofurano (600 ml). La mezcla se agitó durante 30 min y se añadió 2,4-diamino-6-cloropirimidina (36,2 g, 0,25 mol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo en agitación en una atmósfera de argón durante 12 h y se neutralizó con ácido acético. La suspensión se filtró, se lavó con tetrahidrofurano y el filtrado se evaporó a sequedad al vacío. La purificación sobre una columna de gel de sílice (600 ml) en cloroformo dio, después de la cristalización en acetato de etilo-éter de petróleo, 2,4-diamino-6-(S)-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ilmetoxi)pirimidina. Rendimiento, 46,0 g (76,6 %). Este compuesto (43,3 g, 0,18 mol) en H₂SO₄ 0,25 M (800 ml) se dejó en reposo durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se neutralizó mediante una solución saturada de hidróxido de bario, se filtró, y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo dio en recristalización en etanol al 90 % (éter añadido hasta turbidez) 2,4-diamino-6-(S)-(2,3-dihidroxipropoxi)pirimidina, p.f. 149 °C. Rendimiento, 32,0 g (89 %). Para C₇H₁₂N₄O₃ (200,2) calculado 42,00 % de C, 6,04 % de H, 27,99 % de N; observado 41,94 % de C, 6,35 % de H, 27,75 % de N. Espectro de masas: 201,2 (MH⁺). Los espectros de RMN eran idénticos a los del compuesto racémico.

55 La mezcla de este compuesto (32,0 g, 0,16 mmol), cloruro de tritilo (140 g, 0,5 mol) y 4-dimetilaminopiridina (3 g) en piridina (500 ml) se agitó durante 24 h a 80 °C y se vertió lentamente en agitación a agua (5 l). La suspensión se agitó durante 1 h, se decantó y, después de la agitación con una porción de agua potable (2 l), se filtró y se lavó con agua. El precipitado se recogió en cloroformo (2 l), se secó con MgSO₄, se evaporó y se codestiló al vacío con tolueno (porciones 3 x 200 ml). La goma resultante se disolvió en un volumen mínimo de éter y se añadió por goteo, en agitación vigorosa, a éter de petróleo (2,5 l). El precipitado se filtró, se lavó con éter de petróleo y se secó al aire durante una noche. El secado al vacío dio 99,5 g (69 %) de 6-(S)-[2-hidroxi-3-(tritoloxi)propoxi]-2,4-bis(tritilamino)pirimidina. Para C₆₄H₅₄N₄O₂ (911,1) calculado 6,15 % de N; observado 5,96 % de N. Este derivado de tritilo (99,5 g, 0,11 mol) y p-toluenosulfoniloximetilfosfonato de diisopropilo (42 g, 0,12 mol) en tetrahidrofurano recién secado (600 ml) se trató con NaH al 60 % (14,4 g, 0,36 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 días, se filtró sobre un lecho de celite y el filtrado se trató con etanol (20 ml). El disolvente se retiró por destilación al vacío, el residuo se calentó a reflujo en ácido acético acuoso al 80 % (500 ml) durante 30 min, y se dejó en reposo

durante una noche a temperatura ambiente. El producto cristalino se filtró, se lavó con ácido acético al 80 % y el filtrado se evaporó al vacío. Se añadió agua (700 ml) y la mezcla se extrajo con éter (4 x 200 ml). La fase acuosa se concentró al vacío y se aplicó en una columna Dowex 50 x 8 (250 ml) en forma ácida. La columna se lavó con metanol acuoso al 20 % hasta la caída de la acidez y la absorbancia UV y después se eluyó con amoníaco al 2,5 % en metanol acuoso al 20 %. El eluato de amoníaco de absorción UV se recogió, se evaporó a sequedad al vacío, el residuo se codestiló con etanol (3 x 100 ml) y se secó sobre P₂O₅ al vacío durante una noche. Se añadieron acetonitrilo (200 ml) y bromotrimetilsilano (50 ml) y la mezcla se dejó en reposo durante una noche en exclusión de humedad. Después de la evaporación de los volátiles al vacío, al residuo se le añadió agua (300 ml) seguido de amoníaco acuoso conc. a una reacción alcalina. Esta solución se evaporó a sequedad y el residuo se desionizó en una columna Dowex 50 x 8 (250 ml) en condiciones idénticas. El eluato de amoníaco de absorción UV se retiró al vacío, el residuo se disolvió en una cantidad mínima de agua y se hizo alcalino a pH 10 mediante amoníaco. Esta solución se aplicó sobre una columna (250 ml) Dowex 1 x 2 (forma acetato) prelavada con agua. La columna se lavó con agua hasta la caída de la absorbancia UV del eluato y después con gradiente lineal de ácido acético (0-0,3 M, 2 l cada vez). La fracción de absorción UV principal se evaporó al vacío y el residuo se codestiló con agua (2 x 100 ml). La recristalización en agua dio 2,4-diamino-6-(S)-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)-propoxi]pirimidina en forma de un monohidrato. Rendimiento, 13,8 g (40 %), agujas de color blanco, p.f. Para C₈H₁₅N₄O₆P·H₂O (312,2) calculado 30,78 % de C, 5,49 % de H, 17,94 % de N, 9,92 % de P; observado 31,00 % de C, 5,70 % de H, 17,79 % de N, 9,75 % de P. Espectro de masas: 295,0 (MH⁺). Los espectros de RMN eran idénticos a los del compuesto racémico.

20 Ejemplo 13



2-Amino-4-hidroxi-6-[2 (fosfonometoxi)etoxi]pirimidina

Se añadió gota a gota 4-hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxolano (15 ml, 0,12 mol) durante 30 min a una suspensión agitada de NaH (dispersión al 60 % en aceite de parafina, 4,8 g, 0,12 mol) en tetrahidrofurano (250 ml). Después de 1 h en agitación a temperatura ambiente, se añadió 2-amino-4,6-dicloropirimidina (16,4 g, 0,1 mol) y la mezcla se mantuvo a la temperatura de reflujo, hasta que el material de partida desapareció básicamente (TLC sobre placas de gel de sílice; sistema metanol-cloroformo, 1:9). La mezcla se enfrió, se neutralizó mediante la adición de ácido acético, se filtró sobre celite, se lavó con tetrahidrofurano y se evaporó al vacío. El residuo se decantó dos veces con éter (100 ml cada vez), se disolvió en cloroformo (100 ml) y se filtró a través de una columna corta de gel de sílice (lavado con 1 l de cloroformo). El filtrado se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en acetato de etilo caliente; a la solución caliente se le añadió con precaución un volumen equivalente de éter seguido de éter de petróleo hasta turbidez. El producto que cristalizó en un refrigerador, se recogió por filtración, se lavó con una mezcla de éter/petróleo (1:1) y se secó al vacío. Rendimiento, 20,5 g (79 %) de 2-amino-4-cloro-6-[2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ilmetoxi]pirimidina, p.f. 152 °C. Para C₁₀H₁₄ClN₃O₃ (259,7) calculado 46,25 % de C, 5,43 % de H, 13,65 % de Cl, 16,18 % de N; observado 46,45 % de C, 5,46 % de H, 13,90 % de Cl, 15,95 % de N. ¹H RMN (CD₃SOCD₃): 1,28 s, 3 H y 1,33 s, 3 H (CH₃); 3,71 dd, 1H, J(3'b,2') = 6,1, J(gem) = 8,4 (H-3'b); 4,05 dd, 1H, J(3'a,2') = 6,6, J(gem) = 8,4 (H-3'a); 4,22 dd, 1H, J(1'b,2') = 6,3, J(gem) = 11,2 (H-1'b); 4,28 dd, 1H, J(1'a,2') = 4,5, J(gem) = 11,2 (H-1'a); 4,35 m, 1H (H-2'); 6,10 s, 1H (H-5); 7,08 s a, 2H (NH₂). ¹³C RMN (CD₃SOCD₃): 25,48 y 26,76 (CH₃); 65,82 y 66,84 (C-1', C-3'); 73,35 (C-2'); 94,48 (C-5); 109,05 (C_{IPr}); 160,21 (C-2); 162,95 (C-4); 170,48 (C-6).

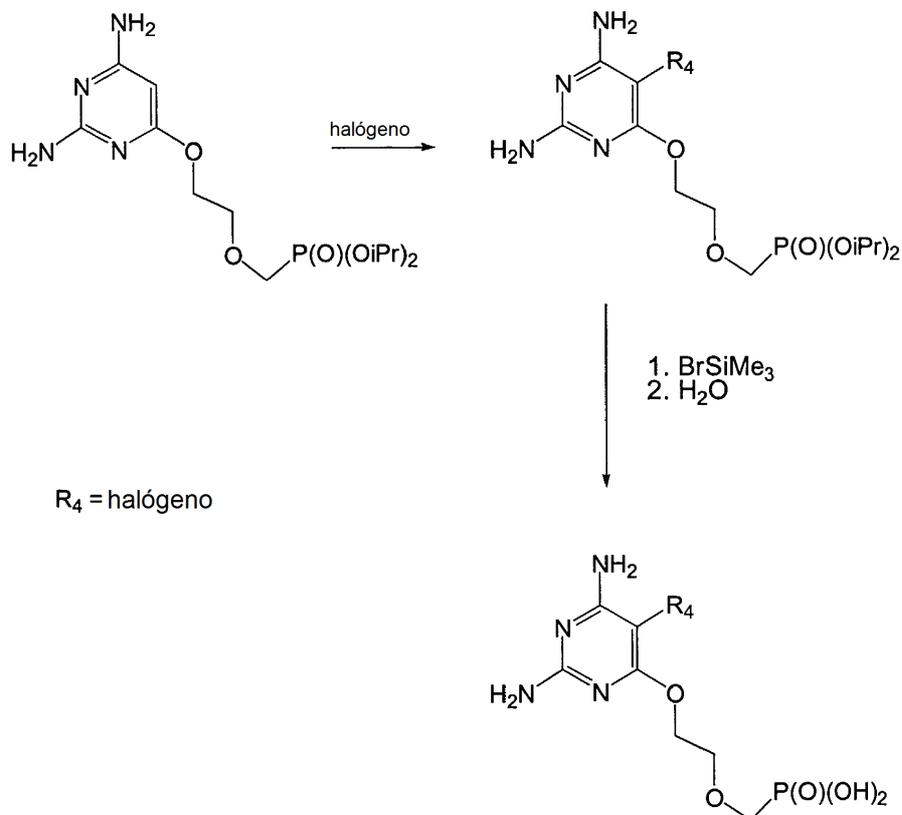
La mezcla de este compuesto (13 g, 50 mmol), DABCO (12 g) y K₂CO₃ (21,5 g) en agua (300 ml) se agitó durante 3 horas a la temperatura de reflujo. Después de enfriar a la temperatura ambiente, se añadió en porciones Dowex 50 x 8 (forma ácida) en agitación a pH ~6, para descomponer el carbonato y neutralizar DABCO. Después, la suspensión se hizo ligeramente alcalina añadiendo amoníaco acuoso conc., se filtró, se lavó con agua y el filtrado se evaporó al vacío. La resina se suspendió de nuevo en amoníaco acuoso diluido (1:20) (300 ml), se filtró y la resina se lavó posteriormente con agua en ebullición (4 x 200 ml). El filtrado y los lavados se evaporaron al vacío. Ambos residuos se secaron por codestilación con etanol y se extrajeron con cloroformo. El sólido semicristalino se filtró, se lavó con cloroformo y se adsorbió en una solución metanólica sobre gel de sílice (50 ml). Este material se aplicó sobre una columna corta (150 ml) en cloroformo y el producto se eluyó con una mezcla cloroformo-metanol (9:1). La cristalización en etanol (éter añadido hasta turbidez) dio 2-amino-4-hidroxi-6-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]pirimidina, p.f. 258 °C. Rendimiento, 8,2 g (68 %). Para C₁₀H₁₅N₃O₄ (241,2) calculado 46,25 % de C, 5,43 % de H, 13,65 % de Cl, 16,18 % de N; observado 46,45 % de C, 5,46 % de H, 13,90 % de Cl, 15,95 % de N. Espectro de masas: 242 (M+H). ¹H RMN (CD₃SOCD₃): 1,27 s, 3 H y 1,32 s, 3 H (CH₃); 3,67 dd, 1H, J(3'b,2') = 6,2, J(gem) = 8,4 (H-3'b); 4,02 dd, 1H, J(3'a,2') = 6,6, J(gem) = 8,4 (H-3'a); 4,05 dd, 1H, J(1'b,2') = 6,1, J(gem) = 11,0 (H-1'b); 4,10 dd, 1H, J(1'a,2') = 4,6, J(gem) = 11,0 (H-1'a); 4,30 cd, 1H, J(1'a,2') = 4,6, J(2',1') = 6,3 (H-2'); 4,78 s, 1H (H-5); 6,67 s a, 2H (Hz), 10,47 s a, 1H (NH). ¹³C RMN (CD₃SOCD₃): 25,54 y 26,78 (CH₃); 65,83 (C-3'); 66,70 (C-1'); 73,63 (C-2'); 79,99 (C-5); 108,94 (C_{IPr}); 164,25 y 155,69 (C-2, C-6).

Ejemplo 14**2-amino-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]-4-hidroxipirimidina.**

Una mezcla de 2-amino-4-cloro-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi) etoxi]pirimidina (5,7 g), DABCO (3,6 g) y K₂CO₃ (9,0 g) en agua (100 ml) se calentó a reflujo durante 150 min en agitación, se enfrió y se acidificó mediante la adición de Dowex 50 x 8 (forma H⁺). La suspensión se hizo alcalina con amoníaco acuoso conc. y, después de 5 min en agitación, se filtró y la resina se lavó con metanol acuoso al 50 % (200 ml). El filtrado se evaporó a sequedad, se añadió etanol (50 ml) y la mezcla se evaporó a sequedad. El residuo dio en cromatografía sobre columna de gel de sílice (150 ml) con gradiente de cloroformo-etanol 2-amino-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]-4-hidroxipirimidina cristalina, p.f. 154 °C con un rendimiento del 78 %. Para C₁₃H₂₄N₃O₆P (349,3) calculado 44,70 % de C, 6,92 % de H, 12,03 % de N, 8,37 % de P; observado 44,58 % de C, 7,02 % de H, 11,95 % de N, 8,53 % de P. ¹H RMN (CD₃SOCD₃): 1,24 d, 6 H y 1,23 d, 6 H, J(CH₃,CH) = 6,2 (4xCH₃); 3,74 m, 2 H (H-2'); 3,76 d, J(CH₂-P) = 8,3 (CH₂-P); 4,19 m, 2H (H-1'); 4,59 m, 2 H (P-OCH); 4,75 s, 1 H (H-5); 6,65 s a, 2 H, 2H (NH₂); 10,45 s, 1H (OH). ¹³C RMN (CD₃SOCD₃): 23,87 d, 2C, J(CH₃,P) = 4,9 y 24,01 d, 2C, J(P,C) = 3,9 (CH₃); 65,03 d, J(P,C) = 164,6 (P-C); 65,04 (C-1'); 70,37 d, 2C, J(P,C) = 6,3 (P-OC); 70,87 d, J(P,C) = 11,7 (C-2'); 79,95 (C-5); 155,68 (C-4); 164,25 (C-2); 171,01 (C-6).

Este producto se trató con bromotrimetilsilano (10 ml) en acetonitrilo (80 ml) durante una noche, se evaporó al vacío y el residuo se trató con agua (50 ml). Después de 10 min, a la reacción alcalina se le añadió amoníaco acuoso conc. y la mezcla se evaporó. El residuo se desionizó en una columna (100 ml) de Dowex 50 x 8 y el eluato de amoníaco de absorción UV se evaporó a sequedad. Se disolvió en un mínimo de agua caliente mediante la adición de amoníaco acuoso conc. y se acidificó por HCl conc. a pH 3-3,5. El precipitado se recogió, se lavó con agua, etanol y se secó al vacío, para proporcionar 2-amino-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]-4-hidroxipirimidina. Rendimiento, 0,7 g, p.f. 227 °C. Para C₇H₁₂N₃O₆P (265,16) calculado 31,71 % de C, 4,56 % de H, 15,85 % de N, 11,68 % de P; observado 31,55 % de C, 4,62 % de H, 16,15 % de N, 11,51 % de P.

Ejemplo 15

5 **2,4-Diamino-5-bromo-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina**

Se agitó 2,4-diamino-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]pirimidina (4,3 g, 12,3 mmol) en DMF (40 ml) con solución de bromo en CCl_4 (0,3 M, 50 ml) durante 3 h a temperatura ambiente, se hizo alcalina con trietilamina y se evaporó. El producto en bruto se purificó sobre columna de gel de sílice (150 ml) en el sistema cloroformo-etanol y se cristalizó en acetato de etilo-éter de petróleo. Rendimiento, 3,9 g (11,9 mmol) del diéster que se trató con bromotrimetilsilano (20 ml) en acetonitrilo (50 ml) durante una noche, se evaporó al vacío y se descompuso por amoniaco-agua. Después de la desionización sobre Dowex 50 (columna de 100 ml), el residuo del eluato de amoniaco se purificó por columna Dowex 1 x 2 (100 ml) cromatografía con un gradiente de ácido acético (0-0,5 M, 1 l cada vez). La fracción principal se evaporó y se cristalizó en agua para proporcionar 3,1 g (84 %) del compuesto del título, p.f. 218 °C. Para $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{BrN}_4\text{O}_5\text{P}$ (343,07) calculado 24,51 % de C, 3,53 % de H, 23,29 % de Br, 16,33 % de N, 9,03 % de P; observado 24,56 % de C, 3,55 % de H, 23,51 % de Br, 16,07 % de N, 8,89 % de P.

Esta reacción se repite con 2-amino-6-[2-(diisopropilfosfonilmetoxi)etoxi]-4-hidroxipirimidina para proporcionar el análogo 5-halógeno.

Ejemplo 16

Las actividades antivirales de los compuestos de este documento se determinaron de acuerdo con los procedimientos generales descritos en J. Balzarini, et al. "9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) effectively inhibits retrovirus replication in vitro and simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys" AIDS 5:21-28, 1991 y J. Balzarini, et al. "Differential antiherspesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates: potent and selective in vitro and in vivo antiretrovirus activities of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurine" Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37:332-338, 1993.

Los resultados se muestran en la Tabla 1a, en la que se indica la mayor potencia por valores absolutos más bajos.

Ejemplo 17

Virus. Los orígenes de VSM, VIH tipo 1 (VIH-1) (cepa III_B y Ba-L), VIH-2 (cepa ROD) y VIF (cepa Petaluma) se han descrito previamente (Balzarini et al., AIDS 5: 21-28, 1991; De Clercq et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137:590-594, 1971; Egberink et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:3087-3091, 1990; Hartmann et al., Antiviral Chem. Chemother. 5:13-19, 1994; Popovic et al., Science 224:497-500, 1984). Se obtuvieron soluciones madre de VIH-1(III_B) y VIH-2(ROD)

de sobrenadantes de cultivos de células MT-4 infectadas con virus. VIH-1_{BaL} se expandió en M/M primarios humanos, cuyos sobrenadantes se recogieron, se filtraron y almacenaron a -80 °C antes de su uso. Las características de las soluciones madres virales usadas para este estudio fueron $2,1 \times 10^8$ genomas ARN de VIH/ml (correspondiente a 35 ng de antígeno p24) y 5.000 dosis infecciosas de cultivo tisular al 50 % por ml (DICT₅₀/ml) evaluado por titulación del virus en otros cultivos de M/M primarios. Se ha informado del aislamiento y caracterización de los aislados clínicos de VIH-1 L1S, L6S y L6S/PMEA (Thormar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3283-3287, 1995; Van Laethem et al., AIDS 15:553-561, 2001). El aislado clínico VIH-1/L1S se obtuvo de un paciente no tratado con NRTI (inhibidores nucleosídicos de transcriptasa inversa) o ANP y cultivado sin la presión selectiva de ningún fármaco. Por lo tanto, no contenía mutaciones obvias que fueran características para pacientes tratados con NRTI o ANP. VIH-1/L6S es un aislado clínico de un individuo tratado con fármaco, cultivado sin la presión selectiva de ningún fármaco. Como es característico para pacientes tratados con NRTI, contenía las mutaciones S68G, K70T, V75I, F77L, F116Y y Q151M en su RT. VIH-1/L6S/PMEA es el aislado clínico VIH-1/L6S que se ha aislado después de cultivar el virus durante 11 pases en presencia de concentraciones crecientes de PMEAs (adefovir). Obtuvo, además de las mutaciones mencionadas para VIH-1/L6S, también la mutación K65R característica de PMEAs en su transcriptasa inversa (RT).

Radioquímicos. Se obtuvieron [metil-³H]timidina (radiactividad específica 42 Ci/mmol), [5-³H]uridina (radiactividad específica: 26 Ci/mmol) y [4,5-³H]leucina (radiactividad específica: 52 Ci/mmol) de Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, R.U.).

Compuestos. Se usaron los siguientes compuestos en este estudio: **1**, 2,4-diamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina; **2**, 2,4-diamino-6-[[2-(fosfonometoxi)etil]-sulfanil]pirimidina; **3**, 4-amino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina; **4**, 2-amino-4-hidroxi-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina; **5**, 2-amino-4-hidroxi-6-[[2-(fosfonometoxi)etil]sulfanil]pirimidina; **6**, 2-amino-4-dimetilamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina; **7**, 2-amino-4-ciclopropilamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina; **8**, 4-amino-2-metilsulfanil-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina; **9**, 2-amino-4-metil-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina; **10**, 2,4-diamino-6-(S)-[2-(fosfonometoxi)propoxi]pirimidina; **11**, 2,4-diamino-6-(R)-[2-(fosfonometoxi)propoxi]pirimidina; PMEAs, 9-[[2-(fosfonometoxi)etil]adenina; (R)-PMPA, (R)-9-[[2-(fosfonometoxi)-propil]adenina.

Ensayos antivirales *in vitro*. Se examinó la actividad contra citopaticidad inducida por VIH-1 y VIH-2 en cultivos celulares MT-4 en el día 5 post-infección y basándose en la determinación de la viabilidad celular por tinción con colorante azul de tripano o en cultivos celulares CEM en el día 4 a 5 post-infección y basándose en el examen microscópico de la formación de gigantocitos inducida por virus. Se añadieron VIH-1 y VIH-2 a 100 DICC₅₀ a los cultivos celulares.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos por centrifugación en densidad (Lymphoprep; Nycomed Pharma, AS Diagnostics, Oslo, Noruega) y se estimularon con fitohemaglutinina (PHA) (Sigma Chemical Co., Bornem, Bélgica) durante 3 días. Las células activadas (blastos estimulados con PHA) se lavaron PBS y se hicieron infecciones víricas como se describe por los protocolos del grupo de ensayo clínico de SIDA. En resumen, se sembraron PBMC (2×10^5 /200 pocillo) en presencia de diluciones en serie del compuesto de ensayo y se infectaron con soluciones madre de VIH a 1000 DIHC₅₀ por ml. En el día 4 post-infección, se retiraron 125 µl del sobrenadante de los cultivos infectados y se reemplazaron con 150 µl de medio fresco que contenía los compuestos de ensayo a las concentraciones apropiadas. A los 7 días después de sembrar las células, se detectó antígeno p24 en el sobrenadante de cultivo por un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (NEN, París, Francia).

Se prepararon macrófagos primarios humanos (M/M) y se purificaron del siguiente modo. Se separaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC), obtenidas de donantes VIH-1-negativos sanos en un gradiente de Ficoll y se sembraron en placas de 48 pocillos a $1,8 \times 10^6$ células/pocillo en 1 ml de RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal inactivado por calor, libre de endotoxinas y micoplasma al 20 % (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT), L-glutamina 4 mM (Life Technologies), 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina (Life Technologies) (a partir de ahora en este documento mencionado como medio completo). Cinco días después de la siembra y el cultivo de las PBMC a 37 °C en una atmósfera humidificada enriquecida con CO₂ al 5 %, se retiraron cuidadosamente las células adherentes con lavados repetidos con RPMI-1640 caliente, dejando una monocapa de células adherentes que finalmente se incubaron en medio completo. Las células tratadas en estas condiciones han demostrado previamente ser >97 % M/M, determinadas por análisis citofluorimétrico. Los macrófagos se trataron durante 30 minutos con los compuestos, después se expusieron con 300 DICT₅₀/ml de VIH-1_{BaL}. Dos horas después de la exposición al virus, los M/M se lavaron para retirar el inóculo viral, se reemplazó el medio completo que contenía las concentraciones apropiadas del compuesto cuando fue necesario, y los M/M se cultivaron después mientras duraron los experimentos. Cada concentración de compuesto se ejecutó por triplicado, aunque los controles positivos se ejecutaron por sextuplicado. Por lo tanto, los compuestos se reemplazaron cada vez que se cambió el medio. Se recogieron los sobrenadantes en el día 14 después de la infección para evaluación de la producción de virus por análisis de antígeno p24 de VIH-1.

Para los ensayos anti-VIF, se sembraron 10^5 células CrFK en placas de cultivo tisular de 24 pocillos. Las células se cultivaron con 2 ml de medio de cultivo/pocillo que contenía un 2,5 % de suero fetal de ternero en presencia de

diversas concentraciones de fármaco. Los ensayos se realizaron por triplicado. Después de un período de incubación de 1 hora a 37 °C, las células se infectaron con VIF. El virus se dejó en contacto con los cultivos durante 1 día, después de lo cual se retiró el medio y se añadió nuevo medio que contenía las concentraciones apropiadas de fármaco. Después de 6 días, se examinó la presencia de antígeno p24 de VIF por un ensayo de captura de antígeno.

Se examinó el efecto inhibitorio de los compuestos de ensayo sobre la transformación inducida por VSM de cultivos celulares C3H/3T3 de fibroblastos embrionarios murinos de forma microscópica en el día 6 post-infección. Se añadió VSM a 75 unidades formadoras de focos a los cultivos celulares. Los procedimientos detallados para las evaluaciones anti-retrovirales se han descrito en detalle anteriormente (Balzarini et al., AIDS 5:21-28, 1991; Balzarini et al., Antimicrob. Agents Chemother. 37:332-338, 1993; De Clercq et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137:590-594, 1971).

Actividad anti-VSM *in vivo*. Los efectos inhibitorios de los compuestos sobre el inicio de la formación de tumor inducida por VSM y la supervivencia de ratones inoculados con VSM se evaluaron como se ha descrito previamente (Balzarini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:332-336, 1989; Balzarini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4961-4965, 1991; Balzarini et al., Antimicrob. Agents Chemother. 37:332-338, 1993). En resumen, se inocularon ratones NMRI de 2 a 3 días de edad cada uno de forma subcutánea en la pata trasera izquierda con VSM y se trataron de forma intraperitoneal con una única dosis de compuesto de ensayo a las 4 horas antes de la infección con virus (día 1) seguido por una única dosis de compuesto de ensayo en los días 2, 3, 4 y 5. Las dosis de fármaco fueron 50, 20, 8, 4 y/o 2 mg/kg/día para tenofovir [(R)-PMPA], adefovir (PMEA), **1** (denominado PMEO-2,4-di-NH₂-Pym), **2** (denominado PMES-2,4-di-NH₂-Pym) y **11** (denominado (R)-PMPO-2,4-di-NH₂-Pym). No se observó toxicidad para la dosis más alta del compuesto de ensayo. Se registró diariamente el aspecto y el crecimiento de tumores inducidos por VSM en el sitio de inoculación del virus, así como la supervivencia de los ratones durante hasta 30 días post-infección.

Efecto citostático y antimetabólico de fosfonatos de nucleósido acíclico *in vitro*.

Los ensayos para examinar la inhibición del crecimiento de células CEM por los compuestos de ensayo se han descrito previamente (Balzarini et al., AIDS 5:21-28, 1991). La concentración citostática al 50 % (CC₅₀) se definió como la concentración de compuesto que reducía la cantidad de células vivas en un 50 %. Para medir la toxicidad en células MT-4 de los compuestos de ensayo, se incubaron 5 x 10⁴ células MT-4 en los pocillos de microplacas de 96 pocillos en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de los compuestos de ensayo durante 5 días a 37 °C. Después se calculó la CC₅₀ a partir de la cantidad de células vivas contadas bajo un microscopio por el método de exclusión de azul de tripano.

También se midió la incorporación de [*metil*-³H]timidina, [³H]uridina y [³H]leucina en la fracción celular CEM insoluble en metanol en las microplacas. A cada pocillo se añadieron 10⁵ células CEM, 5,9 pmol (0,25 µCi) de [*metil*-³H]timidina, 38 pmol (1,0 µCi) de [³H]uridina y 19 pmol (1,0 µCi) de [4,5-³H]leucina, y una cantidad dada del compuesto de ensayo. Las células se dejaron proliferar durante 20 h a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ controlado. Al final de este período de incubación, los contenidos de los pocillos (200 µl) se pusieron en filtros de fibra de vidrio de 25 mm (tipo A/G; Gelman Instrument Co., Ann Arbor, MI) montados en un aparato colector de muestreo Millipore 3025. Los filtros se lavaron dos veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato) fría, dos veces con ácido tricloroacético al 10 % frío, dos veces con ácido tricloroacético al 5 % frío, una vez con etanol frío, y una vez con éter frío. Los filtros después se dejaron secar durante 10 min. a 60 °C y se ensayaron para la radiactividad en un centelleante basado en tolueno.

Actividad anti-VIH-1 de análogos fosfonato de nucleósido acíclico de pirimidina en cultivos celulares CEM.

Un requisito previo para la potente actividad anti-retroviral es la presencia de un grupo amino en C-2 del anillo pirimidina junto con un grupo amino en C-4 (es decir, compuestos **1**, **2**, **11**) o un grupo hidroxilo en C-4 (es decir, compuesto **4**) (Tabla 1). Estas estructuras de pirimidina 6-PMEO y 6-PMPO sustituidas provocaron una actividad anti-VIH con una CE₅₀ que varió entre 0,80 y 2,0 µg/ml. La ausencia de un grupo amino en C-2 (es decir, compuesto **3** u **8**), o la presencia de un dimetilamino o metilo o ciclopropilamino en C-4 (es decir, compuesto **6**, **9** y **7**, respectivamente) provocó destrucción completa de la actividad anti-retroviral (Tabla 1). Los derivados tioéter fueron, como norma, 5 a 10 veces menos activos que los derivados éter correspondientes (es decir, compárese el compuesto **2** con el compuesto **1**), o incluso completamente inactivos (es decir, compuesto **5**). De forma interesante, la actividad anti-retroviral de los nuevos ANP de pirimidina mostró marcada enantioespecificidad en su acción contra VIH-1. El derivado de pirimidina (R)-6-PMPO **11** fue marcadamente más inhibitorio para estos virus que el correspondiente derivado de pirimidina (S)-6-PMPO (**10**) (Tabla 1). La actividad antiviral residual observada para el enantiómero (S) podría deberse a la contaminación con enantiómero (R) originario del material quiral de partida (1-2 %).

Para la mayoría de los compuestos, se observó poca citotoxicidad, si es que había, a una concentración de 100 µg/ml, con una sorprendente excepción para el compuesto **4** (CC₅₀: 2,5 µg/ml para células CEM). El derivado de pirimidina 6-PMEO-2,4-di-NH₂ antiviralmente más activo (compuesto **1**) mostró una CC₅₀ de 11 µg/ml para células CEM, mientras que su correspondiente análogo tioéter **2** y el derivado de pirimidina (R)-6-PMPO-2,4-di-NH₂ **11**

obtuvieron valores de CC₅₀ de aproximadamente 60 µg/ml (Tabla 1). De forma interesante, el derivado 5-bromo de **1** fue activo contra VIH-1 en cultivos celulares CEM a 2,5 µg/ml, y no tóxico a 100 µg/ml. Ninguno de los compuestos **1** ni **2**, ni el compuesto **11** fueron inhibidores hacia la incorporación de [³H]dThd, [³H]Urd y [³H]Ieu en material celular CEM insoluble en TCA en un período de incubación de 12 horas a 200 µg/ml. Además, PMEA y (R)-PMPA no fueron inhibidores para la síntesis macromolecular a esta concentración de fármaco (datos no mostrados).

Actividad anti-retroviral de análogos fosfonato de nucleósido acíclico de pirimidina en varios sistemas virus/célula. Los derivados 6-PMEO **1** y **4**, el 6-PME tioéter (6-PMES) **2**, y el derivado (R)-6-PMPO **11** se evaluaron para su actividad inhibidora contra varios modelos de retrovirus *in vitro* (Tabla 2). Como norma, los valores de actividad antiviral de los compuestos de ensayo encontrados para VIH-1(III_B) en cultivos celulares CEM (Tabla 1) coincidieron muy estrechamente con los valores de actividad antiviral encontrados para VIH-2(ROD) en células CEM, VIH-1 y VIH-2 en cultivos celulares MT-4, y VIF en células renales Crandell felinas. Por tanto, los valores de CE₅₀ del compuesto **1** para VIH variaron entre 0,29 y 0,80 µg/ml, y para el compuesto **11** entre 1,3 y 3,0 µg/ml. Estos valores fueron parecidos a los observados para los compuestos de referencia PMEA (adefovir) (CE₅₀: 0,96-2,0 µg/ml) y (R)-PMPA (tenofovir) (CE₅₀: 0,36-0,52 µg/ml). Cuando se evaluaron los derivados 6-PMEO y 6-(R)-PMPO contra VIH-1 en células primarias [VIH-1(III_B) en PBL y VIH-1(Ba-L) en monocitos/macrófagos (M/M)], la potencia anti-retroviral fue incluso más pronunciada. De hecho, los compuestos **1** y **11** inhibieron el virus en PBL a una CE₅₀ de 0,07 y 0,12 µg/ml, respectivamente, en comparación con 1,9 y 0,33 µg/ml para los compuestos de referencia PMEA y (R)-PMPA. Los derivados 6-PMEO y (R)-6-PMPO fueron incluso más inhibidores contra VIH-1 (Ba-L) en M/M, como también se observó para PMEA y (R)-PMPA. Como norma, los compuestos demostraron ser menos citotóxicos en MT-4, en comparación con células CEM, y no tóxicos a 100 µg/ml en monocitos/macrófagos.

Como se ha demostrado previamente que PMEA y (R)-PMPA muestran actividad inhibidora pronunciada contra virus del sarcoma murino de Moloney (VSM) tanto en cultivo celular como en ratones recién nacidos, también se evaluaron los nuevos derivados 6-PMEO y (R)-6-PMPO para su actividad *in vitro* contra VSM. Los compuestos **1**, **11** y **4** fueron muy inhibidores contra la transformación de células C3H inducida por VSM. Los valores de CE₅₀ fueron tan bajos como de 0,05-0,15 µg/ml (Tabla 2).

Efecto de nucleósidos y nucleobases naturales sobre la actividad anti-VIH de los análogos fosfonato de nucleósido acíclico de pirimidina en cultivo celular. Es bien sabido que la actividad anti-VIH de análogos nucleosídicos de pirimidina tales como 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT, zidovudina) y 2',3'-didesoxicidina (ddC, zalcitabina) puede verse afectada (es decir, disminuida) en presencia de nucleósidos naturales tales como dThd y dCyd (Balzarini et al., Textbook of AIDS Medicine, capítulo 49, Broder, S., T.C. Merigan, y D. Bolognesi, eds. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, pág. 751-772, 1994; Balzarini et al., Antimicrob. Agents Chemother. 37:332-338, 1993). Por lo tanto, para estimar si la presencia de nucleósidos y nucleobases naturales podría influir en la actividad anti-VIH de los nuevos derivados de pirimidina 6-PMEO y (R)-6-PMPO, se examinó el efecto de concentraciones subtóxicas de los nucleósidos de pirimidina timidina (dThd) y 2'-desoxicidina (dCyd), los nucleósidos de purina adenosina (Ado) y guanosina (Guo), y la nucleobase adenina (Ade), (Tabla 3). Ninguno de los nucleósidos y nucleobases naturales tuvo ninguna influencia medible sobre la actividad anti-VIH-1 de los compuestos de ensayo en cultivos celulares CEM. En todos los casos, la actividad anti-retroviral de los compuestos se conservó completamente, como también fue el caso para los compuestos de referencia PMEA, (R)-PMPA y PMEG (Tabla 3).

Eficacia de análogos fosfonato de nucleósido acíclico de pirimidina contra la formación de tumor inducida por VSM en ratones NMRI recién nacidos. Se evaluaron el derivado 6-PMEO **1** y su análogo tioéter **2**, y el derivado (R)-6-PMPO **11** para su efecto inhibidor sobre la formación de tumor inducida por VSM y muerte asociada en ratones NMRI recién nacidos (Tabla 4). Se incluyeron PMEA (adefovir) y (R)-PMPA (tenofovir) como compuestos de referencia. De los nuevos derivados 6-PMEO y (R)-6-PMPO, el compuesto **1** demostró ser el más eficaz en la prevención de la formación de tumor inducida por VSM y muerte asociada de ratones NMRI recién nacidos (Tabla 4). Al menos el 80 % de los ratones estuvieron protegidos de la formación de tumor a 50 y 20 mg/kg, y los ratones restantes que desarrollaron tumores sobrevivieron durante más de 30 días post-infección. A una dosis tan baja como de 2 mg/kg, el compuesto **1** pudo aún prevenir la formación de tumor en un 5 % de los ratones y produjo un 15 % de supervivientes a largo plazo. El compuesto **1** tuvo una capacidad comparable de prevenir la formación de tumor y muerte asociada del animal a PMEA y (R)-PMPA (Tabla 4). En contraste, el derivado tioéter correspondiente **2** fue incapaz de prevenir la formación de tumor a todas las dosis ensayadas, y produjo un 20 % de supervivientes a largo plazo a una dosis de 8-50 mg/kg. La capacidad de derivado (R)-6-PMPO **11** de prevenir la formación de tumor y muerte asociada fue intermedia entre la observada para los compuestos **1** y **2**. Todos los fármacos retardaron la formación de tumor inducida por VSM de un modo dependiente de la dosis. El compuesto **1** tuvo un efecto inhibidor que fue comparable con el de (R)-PMPA y PMEA. El compuesto **11** fue inferior al compuesto **1**, y el compuesto **2** solamente mostró un retardo pronunciado en la formación de tumor a una dosis de 50 mg/kg. Como se observa para la formación de tumor, el retardo de muerte asociada del animal también se produjo de un modo dependiente de la dosis, y el compuesto **1** fue al menos tan eficaz en el retardo de la muerte como los fármacos de referencia PMEA y (R)-PMPA.

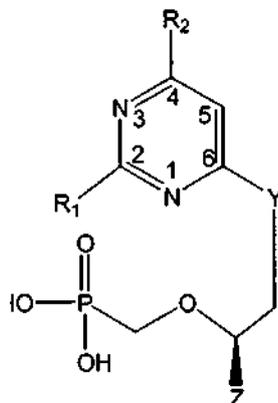
Sensibilidad de cepas mutadas de VIH-1 hacia análogos fosfonato de nucleósido acíclico de pirimidina en cultivos celulares CEM. Los compuestos **1**, **2** y **11** se evaluaron para su actividad inhibidora contra las cepas VIH-

1(III_B) que contenían las mutaciones L100I, K103N, Y181C e Y188H específicas de inhibidor no nucleosídico de RT (NNRTI) en la RT. Los tres compuestos retuvieron actividad completa contra estas cepas mutantes del virus (datos no mostrados). Los mismos compuestos también se evaluaron respecto a su efecto inhibitor sobre los aislados clínicos VIH-1/L1S, VIH-1/L6S y VIH-1/L6S/PMEA (Tabla 5). Se incluyeron PMEA y (R)-PMPA como compuestos de referencia. El compuesto **1** retuvo actividad antiviral pronunciada contra las tres cepas del virus. Los compuestos **2** y particularmente **11** mostraron actividad claramente disminuida contra el aislado VIH-1/L6S/PMEA y también lo hicieron PMEA y (R)-PMPA. Por tanto, las múltiples mutaciones de resistencia a NRTI (S68G, K70T, V75I, F77L, F116Y y Q151M) y la mutación K65R característica de PMEA presente en VIH-1/L6S/PMEA no afectaron de forma marcada a la potencia antiviral del compuesto **1** y PMEA (CE_{50} ~3,6 a 4,5 veces aumentada) aunque disminuyendo de forma más extensiva la sensibilidad a los otros ANP (Tabla 5).

Tabla 1a
Actividad antiviral (CE₅₀ µg/ml)
VYZ

Código	VHS-1 (KOS)	VHS-2 (G)	VHS-1 TK-VMW	1837	CMV						VSM	VIH-1	VIH-2
					AD-169	Davis	TK+OKA	TK+YS	TK-07/1	TK-YS/R			
H-3404	6,5	24	9,6	>50	>50	1,2	1,1	1,6	0,035±0,002	0,8±0	0,43±0,32		
H-3408	29	>80	48	>50	>50	7,5	7	20	1,70	5,5±2,1	3,0±1,4		
H-3415	>80	>80	>80	>50	>50	>50	>50	>50	>40	>100	>100		
H-3418	>16	>16	>16	>50	>50	>50	>50	>50	12,6±7,6	>100	>100		
H-3427	>400	>400	>400	>50	>50	>50	>50	>50	139±11	>100	>100		
H-3435	240	>80	240	>50	>50	>20	>50	>50	>40	>100	>100		
H-3444	240	>400	240	>50	>50	>50	>50	>50	4,26±0,75	56,7±37,9	80±34,6		
H-3445	>400	>400	>400	>50	>50	>50	>50	>50	107±10	>100	>100		
H-3453	>400	>400	>400	>50	>50	>50	>50	>50	89,4±37,6	>100	>100		
H-3560	>80	>80	>80	>50	>50	>50	>50	>50	6,1	51	33		
H-3567	16	48	9,6	>50	>50	3,8	5,9	6,3	0,05	1,9	1,3		
H-3574	9,6	9,6	9,6	14	16	1,1	0,9	0,6	0,08	>0,8	>0,8		

Tabla 1. Actividad anti-retroviral y citostática de fosfonatos de nucleósido acíclico de pirimidina en cultivos celulares CEM infectados con VIH-1



5

Número de código de compuesto	Análogo de pirimidina de	R ₁	R ₂	Y	Z	CE ₅₀ ^a (µg/ml) de VIH-1 (CEM)	CC ₅₀ ^b (µg/ml) (CEM)
1	PMEDAP	NH ₂	NH ₂	O	H	0,80	11
2	PMEDAP	NH ₂	NH ₂	S	H	5,5	64
3	PMEA	H	NH ₂	O	H	>100	>100
4	PMEG	NH ₂	OH	O	H	2,2	2,5
5	PMEG	NH ₂	OH	S	H	>100	>100
6	PMEDAP	NH ₂	N(CH ₃) ₂	O	H	>100	>100
7	PMEDAP	NH ₂	NH-Cp ^c	O	H	>100	>100
8	PMEA	SCH ₃	NH ₂	O	H	>100	>100
9	PME-6-Me-MAP	NH ₂	CH ₂	O	H	>100	>100
10	(S)-PMPDAP	NH ₂	NH ₂	O	CH ₃	51	>100
11	(R)-PMPDAP	NH ₂	NH ₂	O	CH ₃	1,8	62
<u>Fármacos de referencia</u>							
PMEA						0,96	16
(adefovir)							
(R)-PMPA							
(tenofovir)						0,36	125

^a Concentración eficaz al 50 %, o concentración de compuesto necesaria para inhibir la citopaticidad inducida por VIH-1 (III_B) en cultivos celulares CEM en un 50 %.

^b Concentración citostática al 50 %, o concentración de compuesto necesaria para inhibir la proliferación de células CEM en un 50 %.

^c CP, ciclopropilo.

Tabla 2. Actividad anti-retroviral de los derivados 6-PMEO y (R)-6-PMPO en diferentes tipos celulares

N° código compuesto	CE ₅₀ ^{a,d} (µg/ml)										
	VIH-1 (II _b) (CEM)	VIH-2 (ROD) (CEM)	VHS-1 (II _b) (MT-4)	VIH-2 (ROD) (MT-4)	VHS-1 (II _b) (PBL)	VIH-1 (BaL) (M/M)	VIF (CrFK)	VSM (C3H)			
1	0,9±0,4	0,66±0,19	0,34±0,03	0,29	0,07±0,02	0,002±0,001	0,25±0,01	0,16±0,04			
2	4,6±3,1	3,0±1,4	2,5±0,3	2,9	-	-	0,97±0,40	1,7±0,9			
11	1,9±0,5	1,3±0,4	3,0±0,4	1,6±0,6	0,12±0,01	0,005±0,0	0,66±0,14	0,05±0,01			
4	1,4±0,7	1,4±1,2	1,9±0,4	2,1	-	-	-	0,08±0,03			
PMEA	0,96±0,24	1,9±1,1	1,3±1,1	1,9	0,55±0,41	0,006	0,46±0,19	0,62±0,27			
(R)-PMPA	0,36±0,24	0,43±0,41	0,46±0,006	0,52	0,09±0,03	0,003±0,001	0,13	1,4±0,9			

N° código compuesto	CC ₅₀ ^{b,c,d} (µg/ml)			
	CEM	MT-4	PBL	CrFK C3H
1	11±2,0	46±7,4	2,2±0,8	11 >40 (200)
2	64±9,8	>100	-	42 >40 (200)
11	62±25	>100	9,6±2,5	>100 >40 (200)
4	2,5±0,2	10±2,2	-	- >16
PMEA	16±9,1	28±12	1,7±0,4	18 >40 (200)
(R)-PMPA	125±26	72±12	>100	>100 >200

^a Concentración eficaz al 50 %, o concentración de compuesto necesaria para inhibir la citopaticidad inducida por VIH (formación de gigantocitos) en células CEM y MT-4, o producción de antígeno p24 en PBL y M/M, o transformación de células C3H inducida por VSM en un 50 %.

^b Concentración citostática al 50 %, o concentración de compuesto necesaria para inhibir la proliferación celular (CEM) o para reducir la viabilidad celular (MT-4, PBL, M/M) en un 50 %.

^c Concentración inhibidora mínima, o concentración de compuesto necesaria para causar una alteración microscópicamente visible de la morfología celular. El símbolo ">" significa que no pudo registrarse toxicidad visible a la concentración indicada. Los valores entre paréntesis indican la concentración de compuesto a la que se observó toxicidad morfológica.

^d Los datos son la media (± DT) de 2 a 4 experimentos diferentes. Los datos sin un valor DT son el resultado de un único experimento realizado por duplicado.

Tabla 3. Efecto de nucleósidos y nucleobases naturales sobre la actividad antiviral de los derivados 6-PMEO y (R)-PMPO

N.º código compuesto	CE ₅₀ ^{a,b} (µg/ml)					
	Tras la adición de					
	tal cual	dThd (10 µM)	dCyd (1 mM)	Ado (400 µM)	Guo (10 µM)	Ade (100 µM)
1	0,77±0,25	0,35±0,07	0,55±0,35	0,63±0,29	0,65±0,21	0,26±0,16
2	1,9±0,75	1,4±0,21	2,1±1,7	4,4±2,8	1,9±0,49	3,3±3,2
11	1,2±0,25	0,83±0,35	1,1±0,51	1,5±0,70	0,77±0,38	0,35±0,17
4	1,4±0,71	1,0±0,3	2,4± 1,9	1,4±0,93	1,9±0,92	1,7± 1,2
PMEA	0,94±0,24	1,4±0,4	2,1±0,19	1,6±0,4	1,0±0,8	1,9± 1,3
(R)-PMPA	0,57±0,26	0,43±0,0	0,53±0,26	0,46±0,23	0,43±0,0	1,6± 1,6
PMEG	>0,05	>0,25	>0,25	>0,05	>0,05	>0,05

^a Concentración eficaz al 50 %, o concentración de compuesto necesaria para inhibir la citopaticidad inducida por VIH-1 (III_B) en cultivos celulares CEM.

^b Los datos representan la media (± DT) de al menos 2 o 3 experimentos diferentes.

Tabla 4. Actividad anti-VSM de fosfonatos de nucleósido acíclico de pirimidina en ratones RMNI recién nacidos

Compuesto	Dosis (mg/kg) ^a	Cantidad total de ratones usados en los experimentos	Cantidad de ratones que no desarrollan un tumor (porcentaje)	Cantidad de supervivientes a largo plazo (%) (>30 días)
1 (PMEO-2,4-di-NH ₂ -Pym)	50	19	84	100 ^b
	20	20	80	100
	8	18	44	89
	2	20	5	15
2 (PMES-2,4-di-NH ₂ -Pym)	50	10	0	20
	20	10	0	20
	8	10	0	20
	2	8	0	0
11 (PMPO-2,4-di-NH ₂ -Pym)	20	10	20	40 ^c
	8	20	15	
	2	18	0	40 5
PMEA	100	10	100 ^d	d
	20	29	89	94
	8	30	44	77
	4	20	5	35
(R)-PMPA	50	10	100	100
	20	28	92	100
	8	27	65	83
	2	28	0	31

^a Dosis indicada de fármaco dada 2 horas antes de la infección por VSM seguida por 4 dosis diarias adicionales durante los 4 días posteriores post-infección. La media de días de desarrollo de tumor en ratones infectados con VSM de control fue 4,5 días, mientras que la media de días de muerte del animal en los ratones infectados con VSM fue 12,3 días.

^b A la dosis indicada de fármaco (50 mg/kg), el 16 % de los ratones murieron prematuramente (<24 días) probablemente debido a toxicidad del fármaco y sin signos de formación de tumor. La muerte prematura no se tuvo en cuenta al calcular el porcentaje de supervivientes a largo plazo.

^c A la dosis indicada de fármaco (20 mg/kg), el 50 % de los ratones murieron prematuramente (<6 días) probablemente debido a toxicidad del fármaco y sin signos de formación de tumor. La muerte prematura no se tuvo en cuenta al calcular el porcentaje de supervivientes a largo plazo.

^d Todos los ratones murieron antes del día 6 probablemente debido a toxicidad del fármaco. Ninguno de los ratones mostró formación de tumor antes de la muerte.

5

Tabla 5. Actividad inhibitoria de análogos fosfonato de nucleósido acíclico de pirimidina contra aislados clínicos de VIH-1

Número de código de compuesto	Factor de resistencia ^a		
	VIH-1/L1S ^b	HN-1/L6S ^c	VIH-1/L6S/PMEA ^d
1	0,8	1,5	3,6
2	2,1	1,4	14
11	1,9	3,5	30
PMEA	2,0	2,7	7,3
(R)-PMPA	2,3	11	54

^a Factor de resistencia medido contra una cepa de laboratorio de VIH-1/III_B en cultivos celulares CEM.

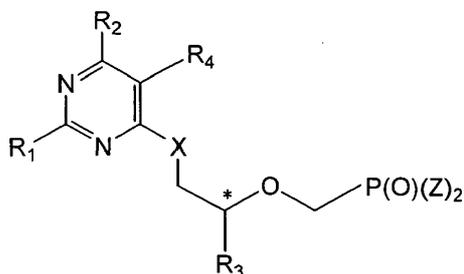
^b Aislado clínico obtenido de un paciente no relacionado con NRTI o ANP y que no contiene mutaciones específicas de NRTI o ANP en la RT.

^c Aislado clínico obtenido de un paciente tratado con fármaco. La RT contiene las mutaciones S68G, K70T, V75I, F77L, F116Y y Q151M.

^d Aislado VIH-1/L6S cultivado en presencia de PMEA y que contiene K65R además de las otras mutaciones específicas de NRTI como se ha mencionado según c.

REIVINDICACIONES

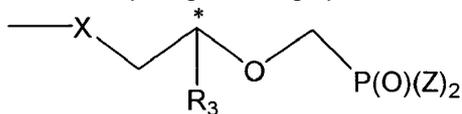
1. Un compuesto de la fórmula (I)



(I)

5 en la que

R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
R₂ es H, metilo, halo, -N(R₅)₂, hidroxilo, hidroxilo protegido o un grupo de la fórmula (Ia)



(Ia)

10

R₃ es independientemente H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;
R₄ es H o halo;
X es independientemente oxígeno, azufre o un enlace;
Z es independientemente hidroxilo, un éster o una amida;
R₅ es independientemente H, alquilo C₁-C₈ o un grupo protector; y
* designa un átomo de carbono quiral; y

15

sales y solvatos del mismo.

20

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₁ y R₂ son amino, R₃ es hidrógeno y X es oxígeno.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₁ y R₂ son simultáneamente amino, R₃ es metilo, X es oxígeno y la configuración R₃ es (R).

25

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₁ y R₂ son simultáneamente amino, R₃ es hidroximetilo, X es oxígeno y la configuración R₃ es (R).

5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₁ y R₂ son simultáneamente amino, R₃ es hidrógeno y X es azufre.

30

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₁ es amino, R₂ es hidroxilo, R₃ es hidrógeno y X es oxígeno.

7. El compuesto de la reivindicación 1, que es cristalino.

35

8. El compuesto de la reivindicación 1, que es un enantiómero sustancialmente en el carbono quiral.

9. El compuesto de la reivindicación 8, que está en la configuración (R).

10. El compuesto de la reivindicación 8, que está en la configuración (S).

40

11. El compuesto de la reivindicación 1 seleccionado entre:

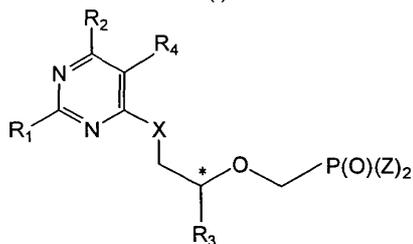
2,4-diamino-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina.
2,4-diamino-6-(R)-[2-(fosfonometoxi)propoxi]pirimidina.
2-amino-4-hidroxilo-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina.
2,4-diamino-6-[(S)-3-hidroxilo-2-(fosfonometoxi)propoxi]pirimidina.

45

- 2,4-diamino-6-[(RS)-3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propoxi]pirimidina.
 2-amino-4-hidroxi-6-[(R)-2-(fosfonometoxi)propoxi]pirimidina.
 2-amino-4-hidroxi-6-[(RS)-3-hidroxi-2 (fosfonometoxi)propoxi]pirimidina.
 2-amino-4-hidroxi-6-[(S)-3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propoxi]pirimidina.
 2,4-diamino-5-bromo-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina.
 2-amino-5-bromo-4-hidroxi-6-[2-(fosfonometoxi)etoxi]pirimidina.

12. Una composición que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

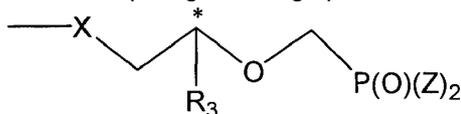
13. Un método de preparación de compuestos de fórmula (I)



(I)

en la que

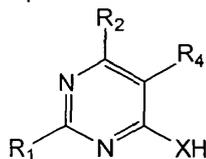
- R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
 R₂ es H, metilo, halo, -N(R₅)₂, hidroxi, hidroxi protegido o un grupo de la fórmula (Ia)



(Ia)

- R₃ es independientemente H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;
 R₄ es H o halo;
 X independientemente es oxígeno, azufre o un enlace;
 Z es independientemente hidroxi, un éster o una amida;
 R₅ es independientemente H, alquilo C₁-C₈ o un grupo protector; y
 * designa un átomo de carbono quiral; y

que comprende (a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II)

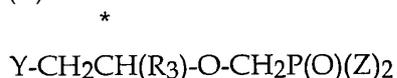


(II)

en la que

- R₂ es H, metilo, halo, -N(R₅)₂, hidroxi o hidroxi protegido; y
 X es O o S;

con un compuesto de la fórmula (III)



(III)

en la que

- Z es un éster o una amida;
 * designa un átomo de carbono quiral;
 R₃ es H, metilo, halometilo o hidroximetilo protegido; y
 Y es un grupo saliente

en disolvente aprótico dipolar en presencia de una base.

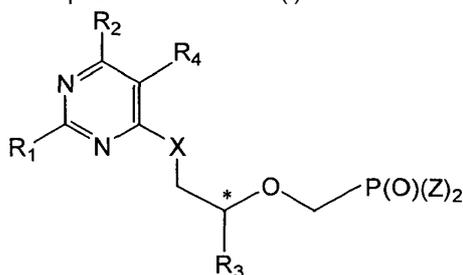
5 14. El método de la reivindicación 13, que comprende adicionalmente aislar el compuesto resultante de la fórmula (I).

15. El método de la reivindicación 13, en el que Z es éster o amida e hidroliza adicionalmente uno o ambos grupos Z para producir el compuesto de fórmula (I) en donde al menos un Z es hidroxilo.

10 16. El método de la reivindicación 13, en el que Z es (OR₄)₂ y R₄ es isopropilo.

17. El método de la reivindicación 13, en el que R₃ es metilo e Y es *p*-toluenosulfonilo.

18. Un método para la preparación de compuestos de fórmula (I)



(I)

15 en la que

R₁ es H, amino o metilsulfanilo;

R₂ es -N(R₅)₂;

20 R₃ es independientemente H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;

R₄ es H o halo;

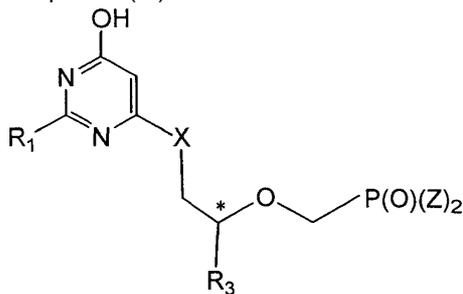
X es oxígeno o azufre;

Z independientemente es hidroxilo, éster o amida;

R₅ es independientemente H, alquilo C₁-C₈ o un grupo protector; y

25 * designa un átomo de carbono quiral

que comprende hacer reaccionar un compuesto (IV)



(IV)

en la que

30 R₃ es H, metilo, halometilo o hidroximetilo protegido;

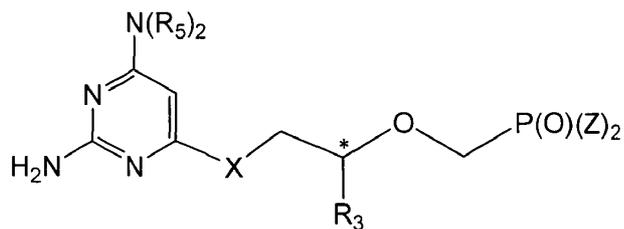
X es O o S; y

Z es amidato o éster;

35 con N(R₅)₂.

19. El método de la reivindicación 18, que comprende adicionalmente hidrolizar uno o ambos grupos Z para producir el compuesto de fórmula (I) en la que uno o ambos de Z son hidroxilo.

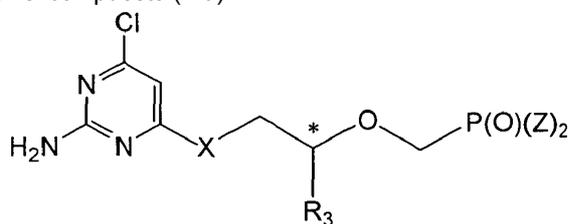
40 20. Un método para la preparación de compuestos de fórmula (V)



en la que

- 5 R_3 es H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;
 R_5 independientemente es H, alquilo C_1-C_8 o un grupo protector;
X es oxígeno o azufre;
Z es independientemente hidroxilo, un éster o una amida; y
* designa un átomo de carbono quiral;

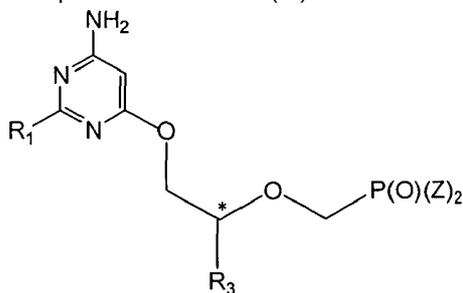
- 10 que comprende hacer reaccionar el compuesto (IVa)



(IVa)

con $N(R_5)_2$ en disolvente anhidro, hidróxido alcalino o carbonato alcalino en solución acuosa.

21. Un método de preparación de los compuestos de fórmula (VI)

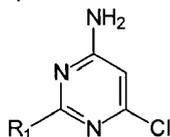


(VI)

- 15 en la que

- 20 R_1 es H, amino o metilsulfanilo;
 R_3 es H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;
Z es independientemente hidroxilo, un éster o una amida; y
* designa un átomo de carbono quiral;

que comprende (a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (VII)



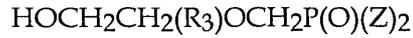
(VII)

- 25 en la que

R_1 es H, amino o metilsulfanilo

con un compuesto de la fórmula (VIII)

*



(VIII)

en la que

Z es amida o éster

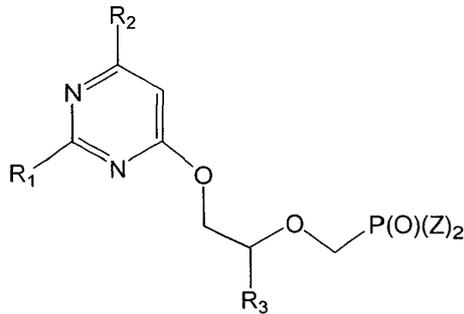
5

en presencia de una base.

22. El método de la reivindicación 21, que comprende adicionalmente hidrolizar el grupo Z para producir un compuesto de fórmula (VI) en la que 1 o 2 grupos Z son hidroxilo.

10

23. Un método de preparación de compuestos de fórmula (XIII)



(XIII)

en la que

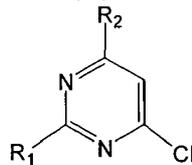
15

R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
 * es un átomo de carbono quiral;
 R₂ es H, cloro, hidroxilo o amino;
 R₃ es H, metilo, halometilo o hidroximetilo;
 Z es amida o éster

20

que comprende

(a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (IX)



(IX)

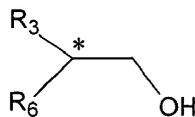
25

en la que

R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
 R₂ es H, cloro o amino;

30

con un compuesto de la fórmula (X)



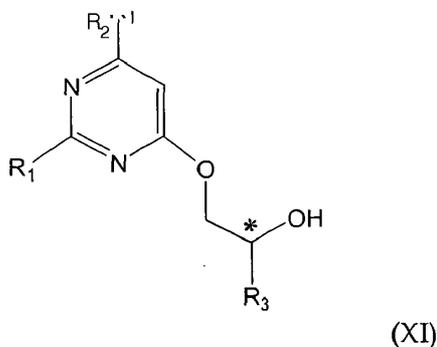
(X)

en la que

R₃ es H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;

* es un átomo de carbono quiral;
 R₆ es hidroxilo o hidroxilo protegido;
 o R₃ y R₆ se unen por un grupo protector acetal o cetal cíclico;

5 en presencia de una base sin disolvente o en presencia de un disolvente aprótico, para producir un compuesto de fórmula (XI)



en la que

10 R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
 * es un átomo de carbono quiral;
 R₂ es H, cloro o amino; y
 R₃ es H, metilo, halometilo o hidroximetilo protegido; y

15 (b) hacer reaccionar el compuesto (XI) con un compuesto de la fórmula (XII)



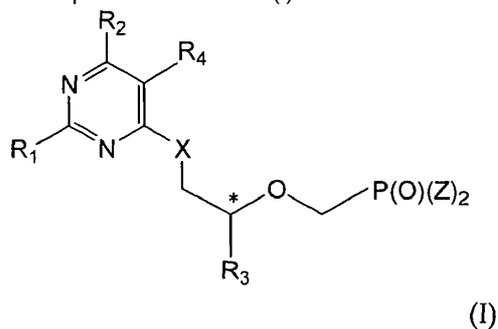
en la que

20 Y es un grupo saliente;
 Z es amida o éster

en presencia de una base en dimetilformamida o tetrahidrofurano para producir un compuesto de fórmula (XIII).

25 24. El método de la reivindicación 23, que comprende adicionalmente hidrolizar el grupo Z para producir un compuesto de fórmula (XIII), en la que 1 o 2 grupos Z son hidroxilo.

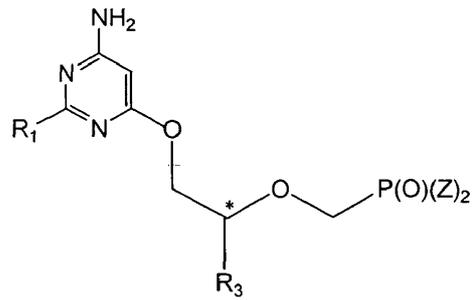
25. Un método de preparación de un compuesto de fórmula (I)



30 en la que

R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
 R₂ es amino;
 35 R₃ es H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;
 R₄ es halo;
 X es oxígeno;
 Z es independientemente hidroxilo, un éster o una amida; y
 * designa un átomo de carbono quiral;

40 que comprende (a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (VI)



(VI)

en la que

- 5 R₁ es H, amino o metilsulfanilo;
 R₃ es H, metilo, hidroximetilo, halometilo o hidroximetilo protegido;
 Z es independientemente un éster; y
 * designa un átomo de carbono quiral;

con un halógeno elemental en un disolvente inerte para producir un compuesto de fórmula (I).

- 10 26. El método de la reivindicación 25, que comprende adicionalmente hidrolizar el grupo Z para producir un compuesto de fórmula (I) en la que 1 o 2 grupos Z son hidroxilo.
- 15 27. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento de una infección vírica.
28. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el virus es un virus ADN.
29. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el virus es un retrovirus o hepadnavirus.