

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 903**

51 Int. Cl.:

C07F 9/6561 (2006.01)

C07H 19/20 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2001** **E 13164300 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2682397**

54 Título: **Profármacos de análogos de nucleótidos de fosfonato y métodos para seleccionar y preparar los mismos**

30 Prioridad:

21.07.2000 US 220021 P

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

01.08.2017

73 Titular/es:

GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)
333 Lakeside Drive
Foster City, California 94404, US

72 Inventor/es:

BECKER, MARK, W.;
CHAPMAN, HARLAN, H.;
CIHLAR, TOMAS;
EISENBERG, EUGENE, J.;
HE, GONG-XIN;
KERNAN, MICHAEL, R.;
LEE, WILLIAM, A.;
PRISBE, ERNEST, J.;
ROHLOFF, JOHN, C. y
SPARACINO, MARK, L.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 627 903 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).

Profármacos de análogos de nucleótidos de fosfonato y métodos para seleccionar y preparar los mismos**Descripción**

5 Esta solicitud se refiere a profármacos de análogos de nucleósidos de metoxifosfonato. En particular, esta se refiere a métodos mejorados para preparar e identificar dichos profármacos.

10 Se conocen muchos análogos de nucleótidos de metoxifosfonato. En general, dichos compuestos tienen la estructura $A-OCH_2P(O)(OR)_2$ donde A es el resto de un análogo de nucleósido y R es independientemente hidrógeno o diversas funcionalidades protectoras o de profármacos. Véanse las Patentes de los Estados Unidos N° 5.663.159, 5.977.061 y 5.798.340, Oliyai *et al.*, "Pharmaceutical Research" 16(11):1687-1693 (1999), Stella *et al.*, (J. M ed. Chem, 23(12):1275-1282 (1980). Aarons, L., Boddy, A, y Petrak, K. (1989) Novel Drug Delivery and Its Therapeutic Application (Prescott, L. F. y Nimmo, W. S., ed., páginas. 121-126; Bundgaard, H. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H., ed.) páginas 70-74 y 79-92; Banerjee, P. K. y Amidon, G. L. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H., ed.) páginas. 118-121; Notari, R. E. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H., ed.) páginas 135-156; Stella, V. J. arid Himmelstein, K. J. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H., ed.) páginas 177-198; Jones, G. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H., ed.) páginas 199-241; Connors, T. A. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H., ed.) páginas 291-316. El documento US 5.977.089 describe la síntesis de 9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina. El documento WO 00/35460 describe la síntesis de 9-[2-(fosfonometoxi)etil]adenina

Sumario de la invención

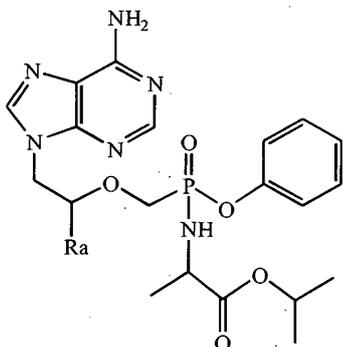
25 Los profármacos de análogos de nucleótidos de metoxifosfonato que se destinan a la terapia antiviral o antitumoral, aunque son conocidos, se han seleccionado tradicionalmente por su efecto sistémico. Por ejemplo, dichos profármacos se han seleccionado por su biodisponibilidad potenciada, es decir, su capacidad para ser absorbidos del tracto gastrointestinal y convertirse rápidamente en el fármaco parental para asegurar que el fármaco parental está disponible en todos los tejidos. Sin embargo, los solicitantes han descubierto actualmente que es posible seleccionar profármacos que se enriquecen en los sitios terapéuticos, tal como se ilustra por los estudios que se describen en el presente documento en los que los análogos están enriquecidos en sitios focales localizados de infección por VIH. El objetivo de esta invención es, entre otras ventajas, producir menos toxicidad para los tejidos circundantes y mayor potencia del fármaco parental en tejidos que son las dianas de la terapia con el análogo de nucleótidos de metoxifosfonato parental.

35 Por consiguiente, en virtud de estas observaciones, se usó un método de exploración para identificar un profármaco de un análogo de nucleótido de metoxifosfonato que confería una actividad potenciada en un tejido diana que comprende:

- 40 (a) proporcionar al menos uno de dichos profármacos;
 (b) seleccionar al menos una diana tisular terapéutica y al menos un tejido no diana;
 (c) administrar el profármaco al tejido diana y a dicho al menos un tejido no diana; y
 (d) determinar la actividad antiviral relativa conferida por el profármaco en los tejidos en la etapa (c).

45 En realizaciones preferentes, los tejidos diana son sitios donde el VIH se replica activamente y/o que sirven como reservorio del VIH, y el tejido no diana es un animal intacto. Inesperadamente, se descubrió que la selección del tejido linfóide como tejido diana para la puesta en práctica de este método para VIH condujo a la identificación de profármacos que potencian el suministro de fármaco activo a dichos tejidos.

50 Un compuesto preferido de esta divulgación, que se ha identificado por este método tiene la estructura (1),



(1)

65

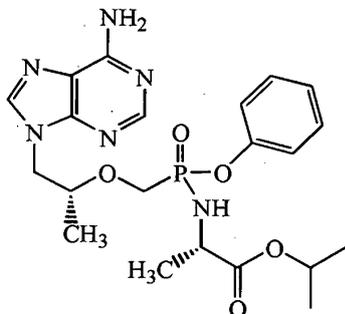
donde Ra es H o metilo,
y composiciones quiralmente enriquecidas del mismos, sales, su base libre y solvatos de los mismos.

Un compuesto preferido de esta divulgación tiene la estructura (2)

5

10

15



20

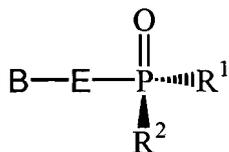
(2)

Y sus diastereómeros, sales, base libre y solvatos enriquecidos.

25

Además, se descubrió inesperadamente que la quiralidad de los sustituyentes del átomo de fósforo y/o el sustituyente amidato influyen en el enriquecimiento observado en la puesta en práctica de esta divulgación. Así, en otra realización de la divulgación, se proporcionan compuestos enriquecidos diastereoméricamente que tienen la estructura (3)

30

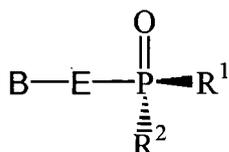


35

(3)

que están sustancialmente libres del diastereómero (4)

40



45

(4)

en la que

50

R¹ es un oxiestero que es hidrolizable *in vivo*, o hidroxilo;

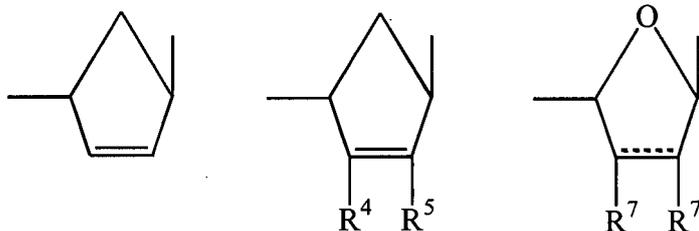
B es una base heterocíclica;

R² es hidroxilo, o el resto de un aminoácido unido al átomo de P a través de un grupo amino del aminoácido y que tiene cada sustituyente carboxi del aminoácido opcionalmente esterificado, pero ambos R¹ y R² no son hidroxilo;

55

E es -(CH₂)₂-, -CH(CH₃)CH₂-, -CH(CH₂F)CH₂-, -CH(CH₂OH)CH₂-, -CH(CH=CH₂)CH₂-, -CH(C≡CH)CH₂-, -CH(CH₂N₃)CH₂-,

60



65

-CH(R⁶)OCH(R⁶)-, -CH(R⁹)CH₂O- o -CH(R⁸)O-, en el que el enlace de la derecha está unido a la base heterocíclica;

la línea discontinua representa un doble enlace opcional;

5 R⁴ y R⁵ son independientemente hidrógeno, hidroxilo, halo, amino o un sustituyente que tiene 1-5 átomos de carbono seleccionados de aciloxi, alquiloxi, alquiltio, alquilamino y dialquilamino;

R⁶ y R⁶ son independientemente H, alquilo C₁-C₆, hidroxialquilo C₁-C₆ o alcanoilo C₂-C₇;

R⁷ es independientemente H, alquilo C₁-C₆, o se toman conjuntamente para formar -O- o -CH₂-;

R⁸ es H, alquilo C₁-C₆, hidroxialquilo C₁-C₆ o haloalquilo C₁-C₆; y

R⁹ es H, hidroximetilo o aciloximetilo;

10

y sus sales, bases libres, y solvatos.

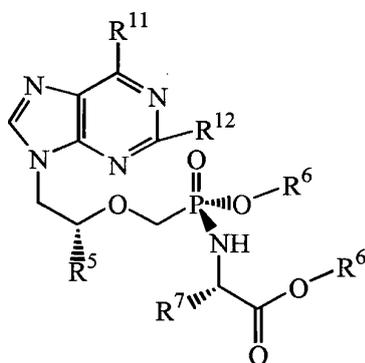
Los diastereómeros de estructura (3) se designan como isómeros (S) en el centro quiral del fósforo.

15 Las realizaciones preferidas de esta divulgación son los compuestos enriquecidos diastereoméricamente que tienen la estructura (5a)

20

25

30



(5a)

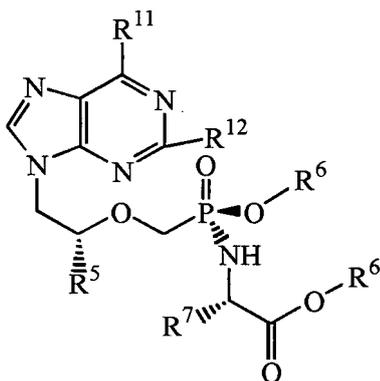
que está sustancialmente libre del diastereómero (5b)

35

40

45

50



(5b)

en la que

55

R⁵ es metilo o hidrógeno;

R⁶ es independientemente H, alquilo, alqueno, alquino, arilo o arilalquilo, o R⁶ es independientemente alquilo, alqueno, alquino, arilo o arilalquilo que se sustituye con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados de alquilamino, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, dialquilamino, hidroxilo, oxo, halo, amino, alquiltio, alcoxi, alcóxialquilo, ariloxi, ariloxialquilo, arilalcoxi, arilalcoxialquilo, haloalquilo, nitro, nitroalquilo, azido, azidoalquilo, alquilacilo, alquilacilalquilo, carboxilo o alquilacilamino;

60

R⁷ es la cadena lateral de cualquier aminoácido de origen natural o farmacéuticamente aceptable y en el cual, si la cadena lateral comprende un carboxilo, el grupo carboxilo está esterificado opcionalmente con un grupo alquilo o arilo;

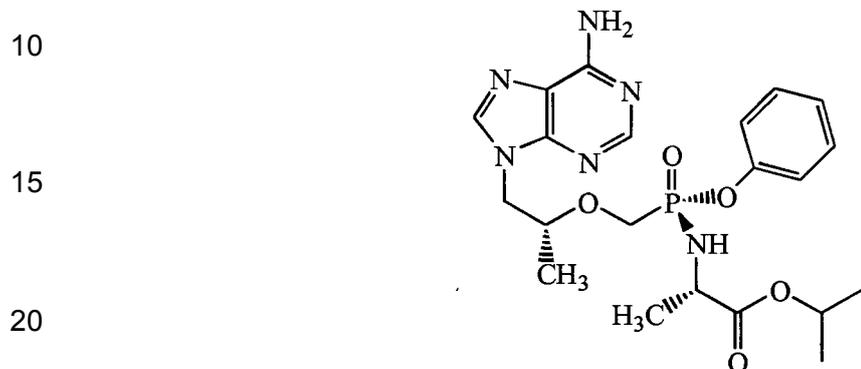
65

R¹¹ es amino, alquilamino, oxo, o dialquilamino; y

R¹² es amino o H,

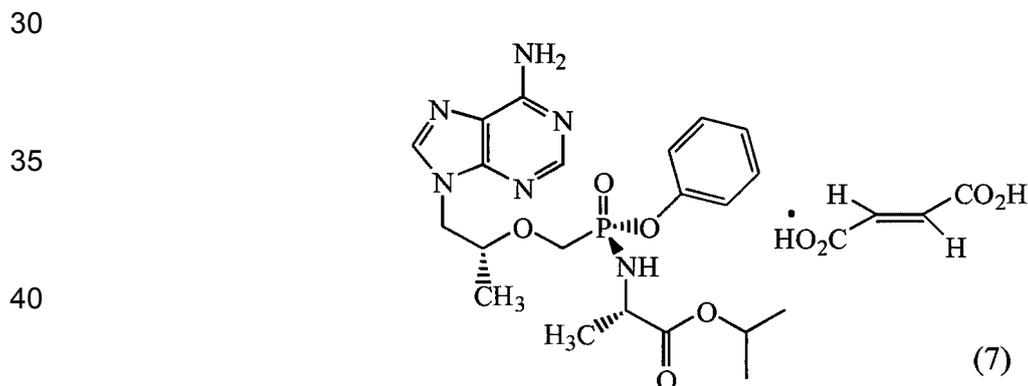
y sus sales, tautómeros, bases libres y solvatos.

5 Una realización preferida de esta divulgación es el compuesto de estructura (6), 9-[(R)-2-[(S)-[(S)-1-(isopropoxycarbonil)etil]amino]fenoxifosfinil]metoxi]propil]adenina, también denominado en el presente documento como GS-7340.



(6)

25 Otra realización preferida de esta divulgación es la sal de fumarato de la estructura (5) (estructura (7)), fumarato de 9-[(R)-2-[(S)-[(S)-1-(isopropoxycarbonil)etil]amino]fenoxifosfinil]metoxi]propil]adenina (1:1), también denominada en el presente documento como GS-7340-2.



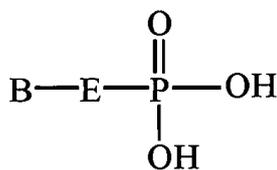
(7)

45 Los compuestos de las estructuras (1)-(7) se formulan opcionalmente en composiciones que contienen excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones se usan en dosis eficaces en la terapia o profilaxis de las infecciones virales (particularmente por VIH y hepadnavirales).

50 La presente invención proporciona un método para la fabricación fácil de 9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina (en lo sucesivo "PMPA" o 9-[2-(fosfonometoxi)etil] adenina (en lo sucesivo "PMEA") usando alcóxido de magnesio, que comprende combinar 9-(2-hidroxipropil)adenina o 9-(2-hidroxietil)adenina, p-toluenosulfoniloximetilfosfonato protegido y alcóxido de magnesio, y recuperar PMPA o PMEa, respectivamente.

55 **Descripción detallada de la invención**

Los fármacos parentales de los análogos de nucleótidos de metoxifosfonato para su uso en este método de exploración son compuestos que tienen la estructura A-CH₂P(O)(OH)₂ en la que A es el resto de un análogo de nucleósido. Estos compuestos se conocen de por sí y no son parte de esta invención. Más en particular, los compuestos parentales comprenden una base heterocíclica B y un aglucón E, que en general tiene la estructura



5 en la que el grupo B se define más adelante y el grupo E se define anteriormente. Se describen ejemplos en las Patentes de los Estados Unidos N° 4.659.825, 4.808.716, 4.724.233, 5.142.051, 5.130.427, 5.650.510, 5.663.159, 5.302.585, 5.476.938, 5.696.263, 5.744.600, 5.688.778, 5.386.030, 5.733.896, 5.352.786 y 5.798.340 y los documentos EP 821.690 y 654.037.

10 Los profármacos para su uso en el método de exploración de esta divulgación son análogos covalentemente modificados de los análogos de nucleótidos de metoxifosfonato parentales descritos en el párrafo anterior. En general, el átomo de fósforo del fármaco parental es el sitio preferido para la modificación del profármaco, pero se encuentran otros sitios en la base heterocíclica B o del aglucón E. Muchos de dichos profármacos ya se conocen. Principalmente, estos son ésteres o amidatos del átomo de fósforo, pero también incluyen sustituciones en la base y el aglucón. Ninguna de estas modificaciones de por sí son parte de esta invención y ninguna se considerará limitante del alcance de la invención del presente documento.

15 El átomo de fósforo de los análogos de nucleótidos de metoxifosfonato contiene dos valencias para las modificaciones covalentes tales como la amidación o esterificación (a menos que un fosforil hidroxilo se esterifique con un sustituyente hidroxilo del aglucón E, después de lo cual solamente queda una valencia del fósforo libre para la sustitución). Los ésteres son normalmente ariloxi. Los amidatos generalmente son monoaminoácidos de origen natural que tienen grupo(s) carboxilo(s) libre(s) esterificados con un grupo alquilo o arilo, habitualmente grupos fenilo, cicloalquilo, o grupos t-, n- o s- alquilo. Se divulgan profármacos adecuados para su uso en el método de exploración, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 5.798.340. Sin embargo, cualquier profármaco que se crea que es potencialmente capaz de convertirse *in vivo*, dentro de las células del tejido diana, en el fármaco parental del análogo de nucleótido de metoxifosfonato libre, por ejemplo, bien mediante hidrólisis, oxidación, u otra transformación covalente que sea el resultado de la exposición a tejidos biológicos, es adecuado para su uso en el método de esta invención. Puede que dichos profármacos no se conozcan en este momento, pero se identifiquen en el futuro y, por lo tanto, se conviertan en candidatos adecuados disponibles para ensayarlos en el método. Dado que los profármacos son simplemente candidatos para la exploración en los métodos, sus estructuras no son relevantes para practicar o permitir el método de exploración, aunque, por supuesto, sus estructuras finalmente disponen si un profármaco mostrará o no selectividad en el ensayo.

20 Los pro-restos unidos al fármaco parental pueden ser los mismos o distintos. Sin embargo, cada profármaco que se va a usar en el ensayo de exploración diferirá estructuralmente de los otros profármacos a ensayar. En general, se seleccionan profármacos diferentes, es decir, distintos estructuralmente, basándose bien en su estereoquímica o en su estructura covalente, o estas características varían en combinación. Cada profármaco ensayado, sin embargo, de modo deseable, es estructural y estereoquímicamente sustancialmente puro, de lo contrario el resultado del ensayo de exploración será de menos utilidad. Está, por supuesto, dentro del alcance de esta invención ensayar únicamente un solo profármaco en una realización individual del método de esta invención, aunque normalmente después se compararían los resultados con estudios anteriores con otros profármacos.

25 Se ha descubierto que la estereoquímica de los profármacos es capaz de influir en el enriquecimiento en los tejidos diana. Los sitios quirales están en el átomo de fósforo y también se encuentran en sus sustituyentes. Por ejemplo, los aminoácidos que se usan en la preparación de amidatos pueden estar en las formas D o L, y los ésteres de fosfonato o los ésteres de aminoácidos también pueden contener centros quirales. También se encuentran sitios quirales en la parte del análogo de nucleósido de las moléculas, pero estos normalmente ya están dictados por la estereoquímica del fármaco parental y no variarán como parte de la exploración. Por ejemplo, se prefiere el isómero R de PMPA, ya que éste es más activo que el isómero S correspondiente. Normalmente, estos diastereómeros o enantiómeros se enriquecerán quiralmente si no puros en cada sitio de modo que los resultados de la exploración serán más significativos. Tal como ha indicado, la distinción de los estereoisómeros se confiere mediante enriquecimiento o purificación del estereoisómero (normalmente este será un diastereómero más que un enantiómero en el caso de la mayor parte de los análogos de nucleótidos de metoxifosfonato) libre de otros estereoisómeros en el centro quiral en cuestión, de modo que cada compuesto de ensayo sea sustancialmente homogéneo. Por sustancialmente homogéneo o quiralmente enriquecido, se entiende que el estereoisómero deseado constituye más de aproximadamente el 60 % en peso del compuesto, generalmente más de aproximadamente el 80 % y preferentemente más de aproximadamente el 95 %.

Nuevo Método de Exploración

30 Una vez que se ha seleccionado al menos un profármaco candidato, se usan las etapas restantes del método de exploración para identificar un profármaco que posea la selectividad requerida para el tejido diana. Más convenientemente, se marcan los profármacos con un grupo detectable, por ejemplo, se marcan radiactivamente, con el fin de facilitar la detección más tarde en los tejidos o células. Sin embargo, no se requiere un marcador dado que pueden emplearse también otros ensayos adecuados para el profármaco o sus metabolitos (incluyendo el fármaco parental). Estos ensayos podrían incluir, por ejemplo, espectrometría de masas, HPLC, bioensayos o inmunoensayos. El ensayo puede detectar el profármaco y uno cualquiera o más de sus metabolitos, pero

preferentemente se lleva a cabo el ensayo para detectar únicamente la generación del fármaco parental. Esto se basa en la asunción (que podría no estar garantizada en todos los casos) de que el grado y la velocidad de conversión del profármaco en el difosfato parental antiviralmente activo es la misma en todos los tejidos ensayados. Por otra parte, se puede ensayar para el difosfato.

5 El tejido diana será preferentemente tejido linfoide cuando la exploración sea para profármacos útiles en el tratamiento de una infección por VIH. El tejido linfoide se conocerá por el experto e incluye células CD4, linfocitos, ganglios linfáticos, macrófagos y células similares a macrófagos incluyendo monocitos tales como células monocíticas de sangre periférica (PBMC) y células gliales. El tejido linfoide también incluye tejidos no linfoides que
10 están enriquecidos en tejidos o células linfoides, por ejemplo, pulmón, piel y bazo. Otras dianas para otros fármacos antivirales serán, por supuesto, los sitios principales de replicación o latencia del virus particular concerniente, por ejemplo, hígado para la hepatitis y nervios periféricos para el VHS. De manera similar, los tejidos diana para los tumores serán, de hecho, los tumores en sí. Estos tejidos se conocen bien por el experto y podrían no requerir
15 experimentación excesiva para la selección. Cuando se hace la exploración para compuestos antivirales, el tejido diana puede estar infectado por el virus.

También se exploran los tejidos o células no diana como una parte del método del presente documento. Puede emplearse cualquier número o identidad de dichos tejidos o células a este respecto. En general, se usarán los tejidos para los cuales se espera que el fármaco parental sea tóxico como tejidos no diana. La selección de un tejido
20 no diana depende completamente de la naturaleza del profármaco y de la actividad del parental. Por ejemplo, los tejidos no hepáticos se seleccionarían para los profármacos contra la hepatitis, y las células no transformadas del mismo tejido como el tumor bastarán para la exploración selectiva de profármacos antitumorales.

Cabe destacar que el método es diferente del que se estudia normalmente para llevarse a cabo en la determinación de la biodisponibilidad oral de profármacos. En los estudios de biodisponibilidad oral, el objetivo es
25 identificar un profármaco que pasa a la circulación sistémica sustancialmente convertido en el fármaco parental. En la presente invención, el objetivo es encontrar profármacos que no se metabolizan en el tracto gastrointestinal o la circulación. Por lo tanto, los tejidos diana a evaluar en el método generalmente no incluyen al intestino delgado o, si se incluyera el intestino, entonces los tejidos también incluirían otros tejidos adicionales distintos al intestino delgado.

Los tejidos diana y no diana que se usan en el método de exploración normalmente estarán en un animal vivo intacto. Los profármacos que contienen ésteres se ensayan más deseablemente en perros, monos u otros
30 animales distintos de roedores; el plasma de ratones y ratas contiene altos niveles circulantes de esterases que pueden producir un resultado engañoso si el sujeto terapéutico es un ser humano o un mamífero superior.

No es necesario practicar este método con animales intactos. También se encuentra dentro del alcance de esta invención emplear órganos perfundidos, cultivo *in vitro* de órganos (por ejemplo, injertos de piel) o líneas
40 celulares mantenidas en diversas formas de cultivo celular, por ejemplo, frascos rotatorios o sistemas de suspensión de gravedad cero. Por ejemplo, pueden usarse células MT-2 como una diana tisular para seleccionar profármacos para VIH. Por lo tanto, no debe interpretarse que el término "tejido" requiera de estructuras celulares organizadas, o las estructuras de tejidos tal como estos pueden encontrarse en la naturaleza, aunque tales serían preferibles. Más bien, el término "tejido" debe interpretarse como un sinónimo de células de una fuente, origen o estadio de diferenciación particular.

El tejido diana y el no diana pueden ser de hecho el mismo tejido, pero los tejidos estarán en un estado biológico distinto. Por ejemplo, podría usarse el método del presente documento para seleccionar profármacos que confieren actividad en un tejido infectado con virus (tejido diana), pero que permanecen sustancialmente inactivos en
45 células no infectadas con virus (correspondientes al tejido no diana). Podría emplearse la misma estrategia para seleccionar profármacos profilácticos, es decir, profármacos que se metabolizan a formas activas antivirales incidentales para la infección viral, pero que siguen sin metabolizarse sustancialmente en las células no infectadas. De manera similar, podrían explorarse los profármacos en células transformadas y en el tejido homólogo no transformado. Esto sería particularmente útil en el ensayo comparativo para seleccionar profármacos para el
50 tratamiento de neoplasias hematológicas, por ejemplo, leucemias.

Sin quedar limitados por ninguna teoría particular del funcionamiento, se cree que los profármacos tisulares selectivos se toman selectivamente por las células diana y/o se metabolizan selectivamente dentro de la célula, en
55 comparación con otros tejidos o células. La ventaja que es única de los profármacos de metoxifosfonato del presente documento es que su metabolismo para el dianión a pH fisiológico asegura que estos serán incapaces de volver a difundirse hacia el exterior de la célula. Por lo tanto, estos siguen siendo eficaces durante largos periodos de tiempo y se mantienen a concentraciones intracelulares elevadas, mostrando de este modo una potencia aumentada. Se cree que los mecanismos para aumentar la actividad en el tejido diana incluyen la captación aumentada por las células diana, retención intracelular potenciada, o ambos mecanismos trabajando conjuntamente. Sin embargo, el modo mediante el cual ocurre la selectividad o suministro potenciado en el tejido diana no es importante. Tampoco es importante que todas las conversiones metabólicas del profármaco al compuesto parental ocurran dentro del
60 tejido diana. Solo es necesario que ocurra la última conversión que confiere actividad en el tejido diana; el

metabolismo en otros tejidos puede proporcionar intermediarios que se convierten en formas antivirales en el tejido diana.

5 El grado de selectividad o del suministro potenciado deseado variará dependiendo del compuesto parental y del modo en el que se mida (% de distribución de dosis o concentración de fármaco parental). En general, si el fármaco parental ya posee una ventana terapéutica generosa, puede ser suficiente un bajo grado de selectividad para el profármaco deseado. Por otra parte, los compuestos tóxicos pueden requerir una exploración más exhaustiva para identificar profármacos selectivos. Puede reducirse el gasto relativo del método de esta invención explorando solamente en el tejido diana y en tejidos contra los cuales se sabe que el compuesto parental es relativamente tóxico, por ejemplo, para PMEAs, que es nefrotóxico a dosis más altas, el foco principal estará en el riñón y los tejidos linfoides.

10 La etapa de determinación de la actividad antiviral relativa de un profármaco en los tejidos seleccionados se lleva a cabo generalmente ensayando los tejidos diana y no diana para la presencia o actividad relativa de un metabolito del profármaco, cuyo metabolito se conoce por tener, o se convierte en, un metabolito que tiene actividad antiviral o antitumoral. Por lo tanto, normalmente se podría determinar la cantidad relativa del fármaco parental en los tejidos a lo largo de sustancialmente el mismo curso temporal con el fin de identificar profármacos que se metabolizan preferentemente en el tejido diana en un metabolito antiviral o antitumoralmente activo o en un precursor del mismo que produce finalmente el metabolito activo en el tejido diana. En el caso de los compuestos antivirales, el metabolito activo es el difosfato de los compuestos de fosfonato parentales. Este metabolito es el que se incorpora en el ácido nucleico viral, truncando de este modo la elongación de la cadena de ácido nucleico e interrumpiendo la replicación viral. Los metabolitos del profármaco pueden ser metabolitos anabólicos, metabolitos catabólicos, o el producto conjunto del anabolismo y catabolismo. El modo mediante el cual se produce el metabolito no es importante en la práctica del método de esta invención.

15 El método no se limita a ensayar un metabolito que posee de por sí actividad antiviral o antitumoral. En su lugar, se pueden ensayar los precursores inactivos de los metabolitos activos. Los precursores del metabolito de difosfato antiviralmente activo incluyen el monofosfato del fármaco parental, monofosfatos de otros metabolitos del fármaco parental (por ejemplo, una modificación intermedia de un sustituyente en la base heterocíclica), el parental en sí mismo y metabolitos generados por la célula en la conversión del profármaco en el parental antes de la fosforilación. Las estructuras precursoras pueden variar considerablemente ya que estas son el resultado del metabolismo celular. Sin embargo, esta información ya se conoce o podría determinarse fácilmente por un experto en la materia.

20 Si el profármaco que se está ensayando no muestra actividad antitumoral o antiviral de por sí, entonces, pueden requerirse ajustes en los resultados en bruto del ensayo. Por ejemplo, si el procesamiento intracelular del metabolito inactivo a un metabolito activo sucede a distintas velocidades entre los tejidos ensayados, los resultados en bruto con el metabolito inactivo necesitarían un ajuste para tener en cuenta las diferencias entre los tipos celulares que se deben a que el parámetro relevante es la generación de actividad en el tejido diana, no la acumulación de metabolitos inactivos. Sin embargo, la determinación de los ajustes adecuados podría estar dentro de la capacidades generales. Por lo tanto, cuando la etapa (d) del método del presente documento requiere la determinación de la actividad, la actividad puede medirse bien directamente o extrapolarse. Esto no significa que el método del presente documento esté limitado a ensayar únicamente intermediarios que son activos de por sí. Por ejemplo, también podría ensayarse la ausencia o disminución del profármaco en los tejidos ensayados. La etapa (d) únicamente requiere la evaluación de la actividad conferida por el profármaco en tanto este interactúa con el tejido concerniente, y esta puede basarse en la extrapolación u otra medición indirecta.

25 La etapa (d) del método requiere la determinación de la actividad "relativa" del profármaco. Se entenderá que esta no requiere que cada uno y todos los ensayos o series de ensayos deban contener también necesariamente ejecuciones con el tejido no diana seleccionado. Por el contrario, se encuentra dentro del alcance de esta invención emplear controles históricos del tejido o tejidos no diana, o algoritmos que representan resultados esperables de dichos tejidos no diana, con el fin de proporcionar el punto de referencia de la actividad no diana.

30 Los resultados obtenidos en la etapa (d) se usan entonces para seleccionar o identificar de un modo óptimo un profármaco que produce mayor actividad antiviral en el tejido diana que en el tejido no diana. Este es el profármaco que se selecciona para el desarrollo posterior.

35 Se apreciará, que puede realizarse alguna evaluación preliminar de los fármacos candidatos antes de la puesta en práctica del método de esta invención. Por ejemplo, se necesitará que el profármaco sea capaz de pasar sin metabolizarse en gran medida a lo largo del tracto gastrointestinal, se necesitará que sea sustancialmente estable en sangre, y debería ser capaz de permear las células al menos hasta cierto grado. En la mayor parte de los casos también se necesitará que complete un primer paso por la circulación hepática sin metabolismo sustancial. Dichos estudios preliminares son opcionales y se conocen bien por los expertos en la materia.

El mismo razonamiento que se ha descrito anteriormente para la actividad antiviral, es también aplicable a los profármacos antitumorales de análogos de nucleótidos de metoxifosfonato. Estos incluyen, por ejemplo, profármacos de PMEG, el análogo de guanilo de PMEAs. En este caso, los fosfonatos citotóxicos tales como PMEG, son candidatos valiosos en virtud de que su citotoxicidad confiere, de hecho, su actividad antitumoral.

Un compuesto identificado mediante este nuevo método de exploración puede introducirse entonces en un programa preclínico o clínico tradicional para confirmar que se cumplen los objetivos deseados. Normalmente, se considera que un profármaco es selectivo si la actividad o concentración del fármaco parental en el tejido diana (% de distribución de la dosis) es 2x, y preferentemente 5x mayor que la del compuesto parental en el tejido no diana. Como alternativa, un profármaco candidato puede compararse contra un profármaco de referencia. En este caso, la selectividad es relativa en vez de absoluta. Los profármacos selectivos serán aquellos que dan como resultado una concentración o actividad aproximadamente 10x mayor en el tejido diana en comparación con el prototipo, aunque el grado de selectividad es un aspecto discrecional.

Nuevo Método para la Preparación de los Materiales de Partida o Intermediarios

También se incluye en el presente documento un método mejorado para la fabricación de los materiales de partida preferidos (fármacos parentales) de esta invención, PMEAs y (R)-PMPAs. Normalmente, este método comprende hacer reaccionar 9-(2-hidroxiopropil)adenina (HPA) o 9-(2-hidroxietil)adenina (HEA) con un alcóxido de magnesio, añadir posteriormente el aglucón sintón *p*-tolueno-sulfoniloximetilfosfonato (tosilato) protegido a la mezcla de reacción, y recuperar PMPA o PMEAs, respectivamente.

Preferentemente, el HPA es el enantiómero R enriquecido o aislado. Si se usa una mezcla quiral de HPA, puede aislarse el R-PMPA de la mezcla quiral de PMPA después de completar la síntesis.

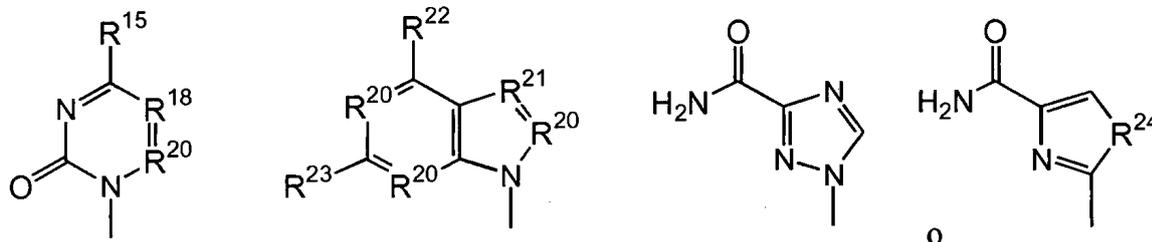
Normalmente el tosionato está protegido por grupos alquilo inferiores, pero otros grupos adecuados serán evidentes para el experto. Puede ser conveniente emplear el tosionato presustituido con los sustituyentes del profármaco de fosfonato que son capaces de actuar como grupos protectores en la reacción de tosiliación, permitiendo de este modo evitar la etapa de desprotección y recuperar, por lo tanto, directamente el profármaco o un intermedio.

El grupo alquilo del alcóxido de magnesio no es crítico y puede ser cualquier alquilo C₁-C₆ ramificado o normal, pero preferentemente es *t*-butilo (para PMPA) o isopropilo (para PMEAs). Tampoco son críticas las condiciones de reacción, pero preferentemente comprenden calentar la mezcla de reacción a aproximadamente 70-75 °C con agitación u otra agitación moderada.

Si no hay un interés en la retención de los sustituyentes de fosfonato, se desprotege el producto (habitualmente con bromotrimetilsilano cuando el grupo protector del tosionato es alquilo), y después se recupera el producto mediante cristalización u otro método convencional tal como será evidente para el experto.

Base Heterocíclica

En los compuestos de esta divulgación representados en las estructuras (3) y (4), la base heterocíclica B se selecciona de las estructuras



en las que

R¹⁵ es H, OH, F, Cl, Br, I, OR¹⁶, SH, SR¹⁶, NH₂, o NHR¹⁷;

R¹⁶ es alquilo C₁-C₆ o alqueno C₂-C₆ incluyendo CH₃, CH₂CH₃, CH₂CCH, CH₂CHCH₂ y C₃H₇;

R¹⁷ es alquilo C₁-C₆ o alqueno C₂-C₆ incluyendo CH₃, CH₂CH₃, CH₂CCH, CH₂CHCH₂, y C₃H₇;

R¹⁸ es N, CF, CCl, CBr, Cl, CR¹⁹, CSR¹⁹ o COR¹⁹;

R¹⁹ es H, alquilo C₁-C₉, alqueno C₂-C₉, alquino C₂-C₉, alquil-C₁-C₉-alcoxi C₁-C₉, o aril-alquilo C₇-C₉ no sustituido o sustituido por OH, F, Cl, Br o I, incluyendo R¹⁹ por lo tanto -CH₃, -CH₂CH₃, -CHCH₂, -CHCHBr, -CH₂CH₂Cl, -CH₂CH₂F, -CH₂CCH, -CH₂CHCH₂, -C₃H₇, -CH₂OH, -CH₂OCH₃, -CH₂OC₂H₅, -CH₂OCCH, -CH₂OCH₂CHCH₂, -CH₂C₃H₇, CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂OCH₃, -CH₂CH₂OC₂H₅, -CH₂CH₂OCCH, -

CH₂CH₂OCH₂CHCH₂ y -CH₂CH₂OC₃H₇;

R²⁰ es N o CH;

R²¹ es N, CH, CCN, CCF₃, CC≡CH o CC(O)NH₂;

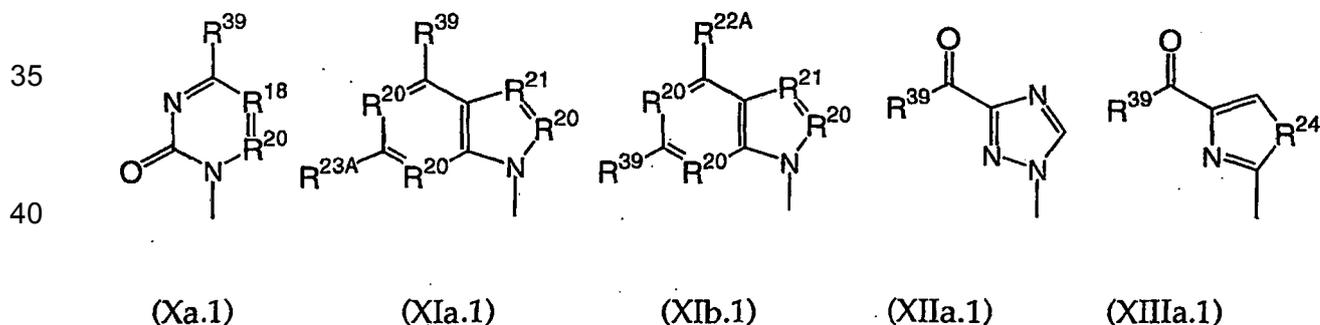
5 R²² es H, OH, NH₂, SH, SCH₃, SCH₂CH₃, SCH₂CCH, SCH₂CHCH₂, SC₃H₇, NH(CH₃), N(CH₃)₂, NH(CH₂CH₃), N(CH₂CH₃)₂, NH(CH₂CCH), NH(CH₂CHCH₂), NH(C₃H₇), halógeno (F, Cl, Br o I) o X en el que X es - (CH₂)_m(O)_n(CH₂)_mN(R¹⁰)₂ en el que cada m es independientemente 0-2, n es 0-1, y

R¹⁰ independientemente es

10 H,
alquilo C₁-C₁₅, alquenilo C₂-C₁₅, arilalquenilo C₆-C₁₅, arilalquinilo C₆-C₁₅, alquinilo C₂-C₁₅, alquilamino C₁-C₆-alquilo C₁-C₆, aralquilo C₅-C₁₅, heteroaralquilo C₆-C₁₅, arilo C₅-C₆, heterocicloalquilo C₂-C₆,
15 alquilo C₂-C₁₅, alquenilo C₃-C₁₅, arilalquenilo C₆-C₁₅, alquinilo C₃-C₁₅, arilalquinilo C₇-C₁₅, alquilamino C₁-C₆-alquilo -C₁-C₆, aralquilo C₅-C₁₅, heteroaralquilo C₆-C₁₅ o heterocicloalquilo C₃-C₆ en el que el metileno del resto alquilo no adyacente a N⁶ se ha reemplazado por -O-,
20 opcionalmente ambos R¹⁰ están unidos entre sí con N para formar un heterociclo C₂-C₅ saturado o insaturado que contiene uno o dos heteroátomos de N y opcionalmente un heteroátomo de O o S adicional,
o uno de los grupos R¹⁰ anteriores que está sustituido con de 1 a 3 halo, CN o N₃; pero opcionalmente al menos un grupo R¹⁰ no es H;
R²³ es H, OH, F, Cl, Br, I, SCH₃, SCH₂CH₃, SCH₂CCH, SCH₂CHCH₂, SC₃H₇, OR¹⁶, NH₂, NHR¹⁷ o R²²; y
R²⁴ es O, S o Se.

25 B también incluye bases heterocíclicas tanto protegidas como no protegidas, particularmente bases de purina y de pirimidina. Se conocen grupos protectores para aminas exocíclicas y otros grupos lábiles (Greene *et al.* "Protective Groups in Organic Synthesis") e incluyen N-benzoilo, isobutirilo, 4,4'-dimetoxitritilo (DMT) y similares. La selección del grupo protector será evidente para el experto habitual y dependerá de la naturaleza del grupo lábil y de la química que se espera encontrar para el grupo protector, por ejemplo ácida, básica, oxidativa, reductora u otras condiciones. Las especies protegidas ilustrativas son N⁴-benzoilcitosina, N⁶-benzoiladenina, N²-isobutirilguanina y similares.

30 Las bases protegidas tienen las fórmulas Xa.1, XIa.1, Xlb.1, XIIa.1 o XIIIa.1



50 en las que R¹⁸, R²⁰, R²¹, R²⁴ tienen los significados que se definen anteriormente; R^{22A} es R³⁹ o R²² siempre que R²² no sea NH₂; R^{23A} es R³⁹ o R²³ siempre que R²³ no sea NH₂; R³⁹ es NHR⁴⁰, NHC(O)R³⁶ o CR⁴¹N(R³⁸)₂ en el que R³⁶ es alquilo C₁-C₁₉, alquenilo C₁-C₁₉, arilo C₃-C₁₀, adamantoiólo, alquilanilo, o arilo C₃-C₁₀ sustituido con 1 o 2 átomos o grupos seleccionados de halógeno, metilo, etilo, metoxi, etoxi, hidroxilo y ciano; R³⁸ es alquilo C₁-C₁₀, o ambos R³⁸ conjuntamente son 1-morfolino, 1-piperidina o 1-pirrolidina; R⁴⁰ es alquilo C₁-C₁₀, incluyendo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, hexilo, octilo y decanilo; y R⁴¹ es hidrógeno o CH₃.

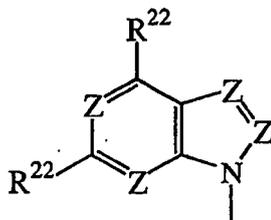
55 Para las bases de estructuras XIa.1 y Xlb.1, si R está presente en R^{22A} o R^{23A}, ambos grupos R³⁹ en la misma base generalmente serán el mismo. Los R³⁶ ilustrativos son fenilo, fenilo sustituido con uno de los sustituyentes arilo R³⁶ anteriores, -C₁₀H₁₅ (donde C₁₀H₁₅ es 2-adamantoiólo), -CH₂C₆H₅ -C₆H₅, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH₃, metilo, butilo, *t*-butilo, heptanilo, nonanilo, undecanilo, o undecenilo.

60 Las bases específicas incluyen hipoxantina, guanina, adenina, citosina, inosina, timina, uracilo, xantina, derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-desaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 1-desaza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-desaza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 3-desaza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitosina; 5-fluorocitosina, 5-clorocitosina; 5-yodocitosina; 5-bromocitosina; 5-metilcitosina, 5-bromoviniluracilo, 5-fluorouracilo, 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo;

5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo y 5-propiniluracilo.

Preferentemente, B es un resto de 9-purinilo seleccionado de guanilo, 3-desazaguanilo, 1-desazaguanilo, 8-azaguanilo, 7-desazaguanilo, adenilo, 3-desazaadenilo, 1-desazadenilo, 8-azaadenilo, 7-desazaadenilo, 2,6-diaminopurinilo, 2-aminopurinilo, 6-cloro-2-aminopurinilo y 6-tio-2-aminopurinilo o un B' es un resto de 1-pirimidinilo seleccionado de citosinilo, 5-halocitosinilo, y 5-(alquilo C₁-C₃)citosinilo.

Los grupos B preferidos tienen la fórmula



en la que

R²² independientemente es halo, oxígeno, NH₂, X o H, pero opcionalmente al menos un R²² es X; X es -(CH₂)_m(O)_n(CH₂)_mN(R¹⁰)₂ en el que m es 0-2, n es 0-1, y R¹⁰ independientemente es

H,

alquilo C₁-C₁₅, alqueno C₂-C₁₅, arilalqueno C₆-C₁₅, arilalquino C₆-C₁₅, alqueno C₂-C₁₅, alquilamino C₁-C₆-alquilo-C₁-C₆, aralquilo C₅-C₁₅, heteroaralco C₆-C₁₅, arilo C₅-C₆, heterocicloalquilo C₂-C₆, alquilo C₂-C₁₅, alqueno C₃-C₁₅, arilalqueno C₆-C₁₅, alquino C₃-C₁₅, arilalquino C₇-C₁₅, alquilamino C₁-C₆-alquilo-C₁-C₆, aralquilo C₅-C₁₅, heteroalquilo C₆-C₁₅ o heterocicloalquilo C₃-C₆ en el que el metileno en el resto alquilo no adyacente a N⁶ se ha reemplazado por -O-, opcionalmente ambos R¹⁰ están unidos entre sí con N para formar un heterociclo C₂-C₅ saturado o insaturado que contiene uno o dos heteroátomos de N y opcionalmente un heteroátomo de O o S adicional,

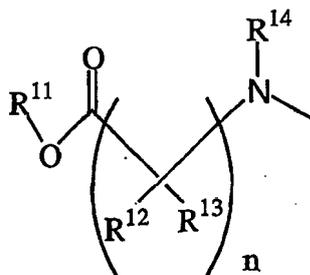
o uno de los grupos R¹⁰ anteriores se sustituye con de 1 a 3 halo, CN o N₃; pero opcionalmente al menos un grupo R¹⁰ no es H;

y Z es N o CH, siempre que los núcleos heterocíclicos varíen de la purina en no más de un Z.

Los grupos E representan los aglucos empleados en los análogos de nucleótidos de metoxifosfonato. Preferentemente, el grupo E es -CH(CH₃)CH₂- o -CH₂CH₂-. También, se prefiere que los grupos laterales en los centros quirales en el aglucón estén sustancialmente únicamente en la configuración (R) (excepto para el hidroximetilo, que es el enantiómero (S) enriquecido).

R¹ es un oxiéster hidrolizable *in vivo* que tiene la estructura -OR³⁵ u -OR⁶ en la que R³⁵ se define en la columna 64, línea 49 de la Patente de los Estados Unidos 5.798.340, incorporada al presente documento a modo de referencia, y R⁶ se define anteriormente. Preferentemente R¹ es ariloxi, generalmente fenoxi no sustituido o para-sustituido (tal como se define en R⁶).

R² es un resto de aminoácido, opcionalmente siempre que cualquier grupo carboxi unido por menos de 5 átomos al amidato de N este esterificado. R² normalmente tiene la estructura



(8)

en la que

n es 1 o 2;

R¹¹ es R⁶ o H; preferentemente R⁶ = alquilo C₃-C₉; alquilo C₃-C₉ independientemente sustituido con OH, halógeno, O o N; arilo C₃-C₆; arilo C₃-C₆ que está sustituido independientemente con OH, halógeno, O o N; o C₃-C₆ arilalquilo que está sustituido independientemente con OH, halógeno, O o N;

R¹² independientemente es H o alquilo C₁-C₉ que está no sustituido o sustituido por sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en OH, O, N, COOR¹¹ y halógeno; arilo C₃-C₆ que está no sustituido o sustituido por sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en OH, O, N, COOR¹¹ y halógeno; o aril-alquilo C₃-C₉ que está no sustituido o sustituido por sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en OH, O, N, COOR¹¹ y halógeno;

R¹³ independientemente es C(O)-OR¹¹; amino; amida, guanidinilo; imidazolilo, indolilo, sulfóxido; fosforilo; alquilamino C₁-C₃, alquildiamino C₁-C₃; alquenilamino C₁-C₆; hidroxilo; tiol, alcoxi C₁-C₃, alctiol C₁-C₃; (CH₂)_nCOOR¹¹; alquilo C₁-C₆ que está no sustituido o sustituido con OH, halógeno, SH, NH₂, fenilo, hidroxifenilo o alcoxifenilo C₇-C₁₀; alquenilo C₂-C₆, que está no sustituido o sustituido con OH, halógeno, SH, NH₂, fenilo, hidroxifenilo o alcoxifenilo C₇-C₁₀; y arilo C₆-C₁₂ que está no sustituido o sustituido con OH, halógeno, SH, NH₂, fenilo, hidroxifenilo o alcoxifenilo C₇-C₁₀; y

R¹⁴ es H o alquilo C₁-C₉ o alquilo C₁-C₉ sustituido independientemente con OH, halógeno, COOR¹¹, O o N; arilo C₃-C₆; arilo C₃-C₆ que está sustituido independientemente con OH, halógeno, COOR¹¹, O o N; o arilalquilo C₃-C₆ que está sustituido independientemente con OH, halógeno, COOR¹¹, O o N.

Preferentemente, R¹¹ es alquilo C₁-C₆, más preferentemente isopropilo, R¹³ es la cadena lateral de un aminoácido de origen natural, n = 1, R¹² es H y R¹⁴ es H. En el compuesto de estructura (2), la invención incluye metabolitos en los cuales los ésteres de fenoxi y de isopropilo se han hidrolizado a -OH. De manera similar, los metabolitos desesterificados enriquecidos de fosfonoamidato de los compuestos (5a), 5(b) y (6) están incluidos dentro del alcance de esta invención.

Arilo y sustitución de "O" o "N" se definen en la columna 16, líneas 42-58, de la patente de los Estados Unidos Nº 5.798.340.

Normalmente, los aminoácidos están en los aminoácidos naturales o l. Se exponen ejemplos específicos adecuados en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.798.340, por ejemplo la Tabla 4 y col. de 8-10 del mismo.

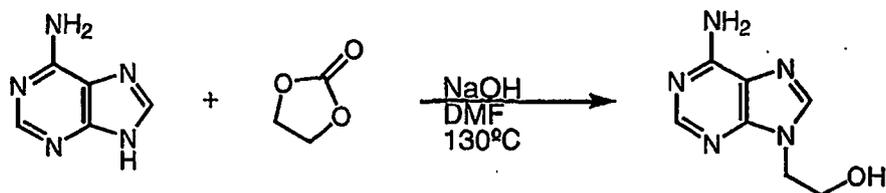
Alquilo tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, es un hidrocarburo secundario, terciario o cíclico normal. A menos que se indique lo contrario alquilo es C₁-C₁₂. Los ejemplos son -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH₂CH₂CH₃, -CH₂CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)CH₂CH₃, -C(CH₃)₃, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₂CH₃, -C(CH₃)₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH(CH₃)₂, -CH₂CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃), -C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₂CH₂CH₃, -CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₂CH(CH₃)₂ y -CH(CH₃)C(CH₃)₃. El alquenilo y alquinilo se definen del mismo modo, pero contienen al menos un doble o triple enlace, respectivamente.

En los casos donde se divulgan grupos enol o ceto, debe interpretarse que también se enseñan los tautómeros correspondientes.

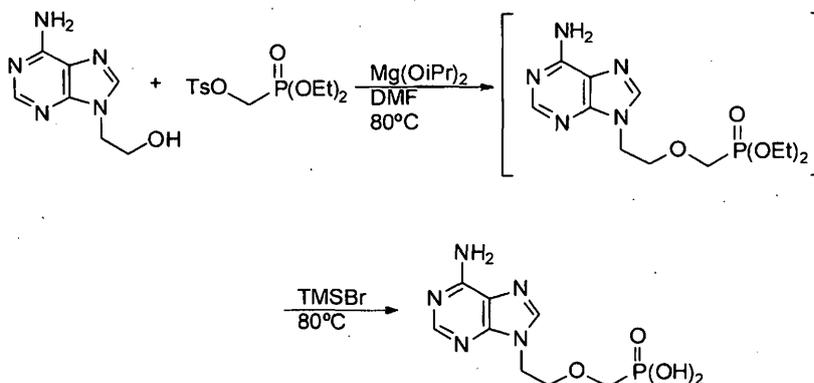
Los compuestos de profármacos de esta invención se proporcionan en la forma de base libre o las diversas sales enumeradas en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.798.340, y se formulan con excipientes farmacéuticamente aceptables o diluyentes solvatantes para su uso como productos farmacéuticos también como se expone en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.798.340. Estos profármacos tienen las utilidades antivirales y las anteriormente establecidas para los fármacos parentales (véase la Patente de los Estados Unidos 5.798.340 y otras citas relacionadas con los análogos de nucleótidos de metoxifosfonato). Se entenderá que el diastereómero de estructura (4) al menos es útil como un intermedio en la producción química del fármaco parental mediante hidrólisis *in vitro*, sin importar su carácter relativamente no selectivo tal como se revela en los estudios del presente documento.

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

Ejemplo 1 a:

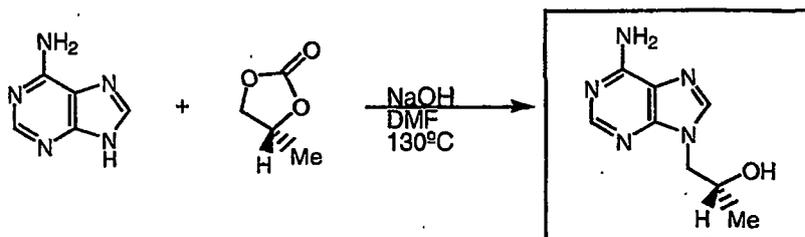


De adenina a PMEA usando Isopropóxido de Magnesio. A una suspensión de adenina (16,8 g, 0,124 moles) en DMF (41,9 ml) se le añadió carbonato de etileno (12,1 g, 0,137 moles) e hidróxido sódico (0,100 g, 0,0025 moles). La mezcla se calentó a 130 °C durante toda la noche. La reacción se enfrió por debajo de 50 °C y se le añadió tolueno (62,1 ml). La suspensión se enfrió adicionalmente a 5 °C durante 2 horas, se filtró y se enjuagó con tolueno (2x). El sólido húmedo se secó *in vacuo* a 65 °C para producir 20,0 g (90 %) de 9-(2-hidroxietil)adenina en forma de un sólido de color blanquecino. Pf: 238-240 °C.

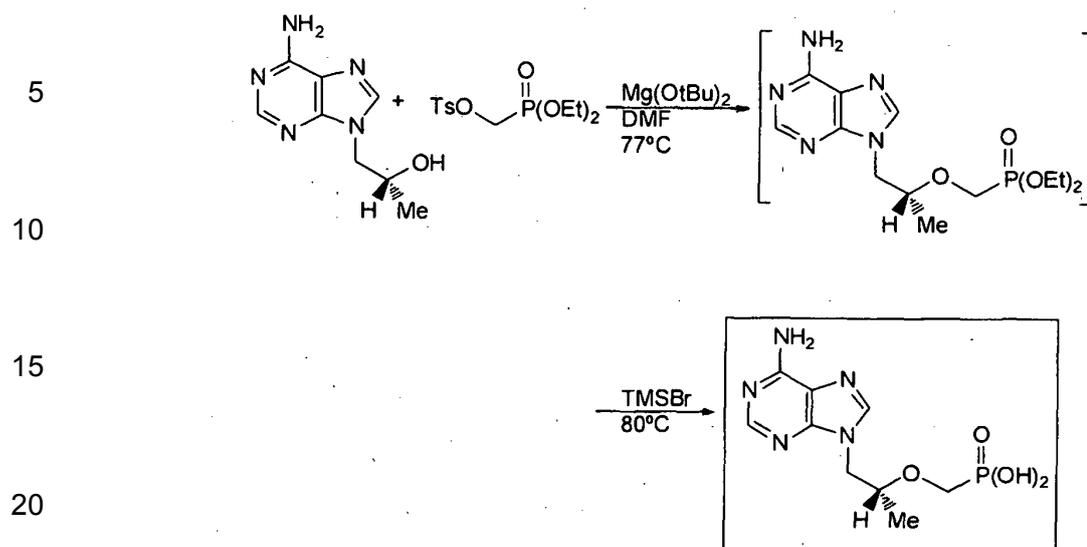


La 9-(2-Hidroxietil)adenina (HEA) (20,0 g, 0,112 moles) se suspendió en DMF (125 ml) y se calentó a 80 °C. Se añadió Isopropóxido de Magnesio (11,2 g, 0,0784 moles), o como alternativa *t*-butóxido de magnesio, a la mezcla seguido de dietil *p*-toluenosulfoniloximetilfosfonato (66,0 g, 0,162 moles) a lo largo de una hora. La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 7 horas. Se retiraron 30 ml de volátiles por medio de destilación al vacío y se recargó la reacción con 30 ml de DMF reciente. Después de enfriarse a temperatura ambiente, se añadió bromotrimetilsilano (69,9 g, 0,450 moles), y la mezcla se calentó a 80 °C durante 6 h. La reacción se concentró para producir una goma espesa. La goma se disolvió en 360 ml de agua, se extrajo con 120 ml de diclorometano, se ajustó a pH 3,2 con hidróxido sódico, y la suspensión resultante se removió a temperatura ambiente durante toda la noche. La reacción se enfrió a 4 °C durante 1 hora. Los sólidos se eliminaron mediante filtración, se lavó con agua (2x), y se secó *in vacuo* a 56 °C para producir 20 g (65,4 %) de 9-[2-(fosfonometoxi)etil]adenina (PMEA) en forma de un sólido de color blanco. Pf: > 200 °C dec. RMN ¹H (D₂O) • 3,49 (t, 2H); 3,94 (t, 2H); 4,39 (t, 2H); 8,13 (s, 1H); 8,22 (s, 1H).

Ejemplo Ib



De adenina a PMPA usando *t*-Butóxido de Magnesio. A una suspensión de adenina (40 g, 0,296 moles) en DMF (41,9 ml) se le añadió carbonato de (R)-propileno (34,5 g, 0,338 moles) e hidróxido sódico (0,480 g, 0,012 moles). La mezcla se calentó a 130 °C durante toda la noche. La reacción se enfrió a 100 °C y se añadió tolueno (138 ml) seguido de ácido metanosulfónico (4,7 g, 0,049 moles) mientras se mantenía la temperatura de reacción a 100-110 °C. Se añadió tolueno adicional (114 ml) para crear una solución homogénea. La solución se enfrió a 3 °C a lo largo de 7 horas y después de llevó a 3 °C durante de una hora. El sólido resultante se aisló mediante filtración y se enjuagó con acetona (2x). El sólido húmedo se secó *in vacuo* a 80 °C para producir 42,6 g (75 %) de 9-[2-(hidroxi)propil]adenina (HPA) en forma de un sólido de color blanquecino. Pf: 188-190 °C.



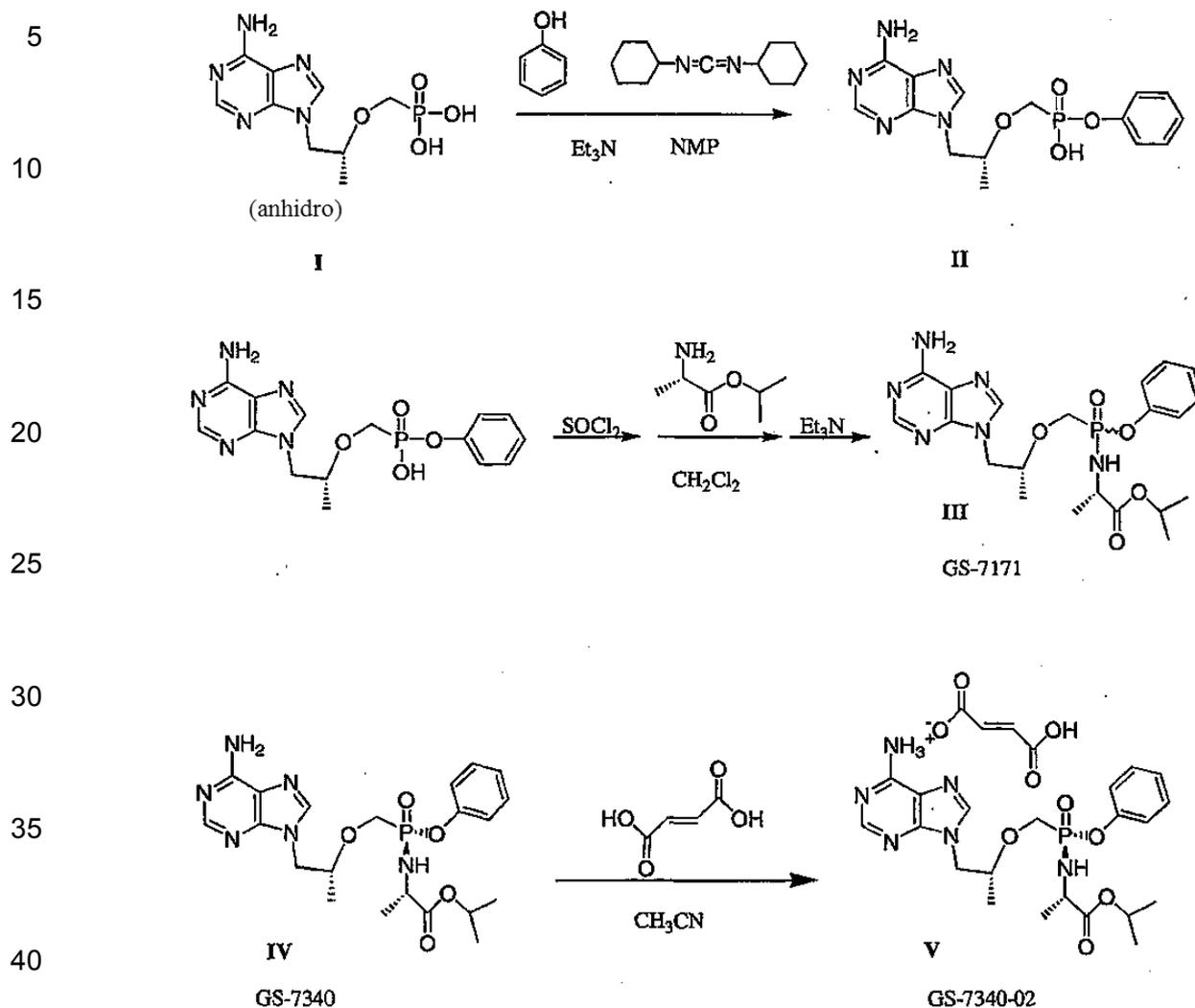
La (R)-9-[2-(hidroxi)propil]adenina (HPA) (20,0 g, 0,104 moles) se suspendió en DMF (44,5 ml) y se calentó a 65 °C. Se añadió t-butóxido de magnesio (14,2 g, 0,083 moles) o como alternativa isopropóxido de magnesio, a la mezcla a lo largo de una hora seguido por dietil *p*-toluenosulfoniloximetilfosfonato (66,0 g, 0,205 mol) a lo largo de dos horas mientras que se mantuvo la temperatura a 78 °C. La mezcla se removió a 75 °C durante 4 horas. Después de enfriarse por debajo de 50 °C, se añadió bromotrimetilsilano (73,9 g, 0,478 moles) y se calentó la mezcla a 77 °C durante 3 horas. Cuando se completó, la reacción se calentó a 80 °C y se retiraron los volátiles mediante destilación atmosférica. El residuo se disolvió en agua (120 ml) a 50 °C y después se extrajo con acetato de etilo (101 ml). El pH de la fase acuosa se ajustó a 1,1 con hidróxido sódico, se sembró con (R)-PMPA auténtico y se reajustó el pH de la capa acuosa a pH 2,1 con hidróxido sódico. La solución resultante se removió a temperatura ambiente durante toda la noche. La reacción se enfrió a 4 °C durante 6 horas. El sólido aisló por filtración. Se lavó con agua (60 ml), y se secó *in vacuo* a 50 °C para producir 18,9 g (63,5 %) de (R)-9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina (PMPA) en bruto en forma de un sólido de color blanquecino.

La (R)-9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina en crudo se calentó a reflujo en agua (255 ml) hasta que se disolvieron todos los sólidos. La solución se enfrió a temperatura ambiente a lo largo de cuatro 4 horas. La mezcla resultante se agitó a 4 °C durante tres horas. El sólido se aisló por filtración, se lavó con agua (56 ml) y acetona (56 ml), y se secó *in vacuo* a 50 °C para producir 15,0 g, (50,4 %) de (R)-9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina (PMPA) en forma de un sólido de color blanco. Pf: 278-280 °C.

Ejemplo 2

Preparación de GS-7171 (III)

Esquema 1



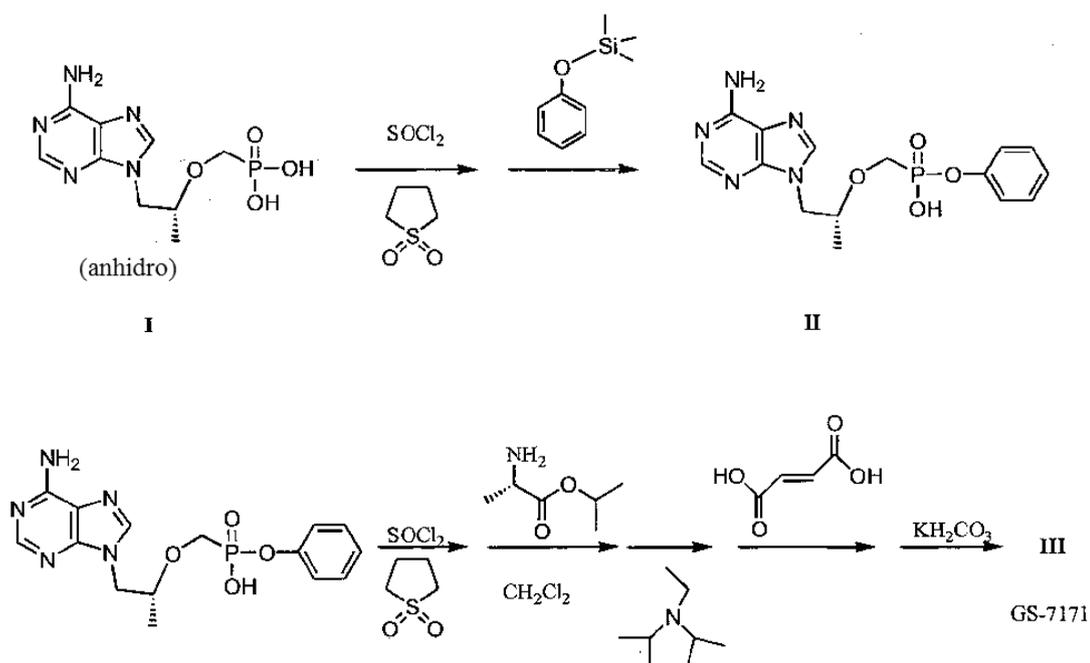
45 Se cargó un reactor revestido de vidrio con PMPA anhidro, (I) (14,6 kg, 50,8 moles) fenol (9,6 kg, 102 moles) y 1-metil-2-pirrolidinona (39 kg). La mezcla se calentó a 85 °C y se añadió trietilamina (6,3 kg, 62,3 mol) Después se añadió una solución de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (17,1 kg, 82,9 moles) en 1-metil-2-pirrolidinona (1,6 kg) a lo largo de 6 horas a 100 °C. Se continuó calentando durante 16 horas. La reacción se enfrió a 45 °C, se añadió agua (29 kg), y se enfrió a 25 °C. Se retiraron los sólidos de la reacción mediante filtración y se enjuagaron con agua (15,3 kg). El combinado filtrado y enjuagado se concentró hasta una suspensión de color canela bajo presión reducida, se añadió agua (24,6 kg), y se ajustó a pH = 11 con NaOH (25 % en agua). Se retiraron los finos mediante filtración a través de tierra de diatomeas (2 kg) seguidas por un enjuagado en agua (4,4 kg). El filtrado combinado y enjuagado se extrajo con etilacetato (28 kg). La solución acuosa se ajustó a pH = 3,1 con HCl (37 % en agua) (4 kg). El crudo II se aisló mediante filtración y se lavó con metanol (12,7 kg). La torta húmeda de crudo II se suspendió en metanol (58 kg). Los sólidos se aislaron mediante filtración, se lavaron con metanol (8,5 kg), y se secaron bajo presión reducida para obtener 9,33 kg de II en forma de un polvo de color blanco: RMN ¹H (CD₂OD) δ 1,2 (d, 3H), 3,45 (c, 2H), 3,7 (c, 2H), 4 (m, 2H), 4,2 (c, 2H), 4,35 (dd, 2H), 6,6 (d, 2H), 7 (t, 1H), 7,15 (t, 2H), 8,15 (s, 1H), 8,2 (s, 1H); RMN ³¹P (D₂O) δ 15,0 (desacoplado).

60 **GS-7171 (III)**. (Esquema 1) Se cargó un reactor revestido con vidrio con monofenil PMPA, (II) (9,12 kg, 25,1 moles) y acetonitrilo (30,7 kg). Se añadió cloruro de tionilo (6,57 kg, 56,7 moles) por debajo de los 50 °C. La mezcla se calentó a 75 °C hasta que se disolvieron los sólidos. La temperatura de reacción aumentó hasta 80 °C y los volátiles (11,4 kg) se recogieron mediante destilación atmosférica bajo nitrógeno. El residuo del recipiente se enfrió a 25 °C se añadió diclorometano (41 kg), y se enfrió a -29 °C. Se añadió una solución de éster isopropílico de (L)-alanina (7,1 kg, 54,4 moles) en diclorometano (36 kg) a lo largo de 60 minutos a -18 °C seguida de trietilamina (7,66 kg, 75,7 moles) a lo largo de 30 minutos de -18 a -11 °C. La mezcla de reacción se calentó a temperatura

ambiente y se lavó cinco veces con una solución de dihidrogenofosfato (10 % en agua, 15,7 kg en cada lavado). La solución orgánica se secó con sulfato sódico anhidro (18,2 kg), se filtró, se enjuagó con diclorometano (28 kg), y se concentró hasta un aceite bajo presión reducida. Se cargó acetona (29 kg) en el aceite y se concentró la mezcla bajo presión reducida. Se cargó acetona (18,8 kg) en el aceite resultante. Se purificó la mitad del producto mediante cromatografía a lo largo de un lecho de 38 x 38 cm de 22 kg de gel de sílice con una malla de 60.230 a 400. Se eluyó la columna con 480 kg de acetona. Se repitió la purificación en la segunda mitad del aceite usando gel de sílice reciente y acetona. El producto limpio que portaba fracciones se concentró bajo presión reducida hasta un aceite. Se cargó acetonitrilo (19,6 kg) en el aceite y se concentró la mezcla bajo presión reducida. Se cargó acetonitrilo (66,4 kg) y se enfrió la solución a de 0 a -5 °C durante 16 horas. Se retiraron los sólidos por filtración y se concentró el filtrado bajo presión reducida a 5,6 kg III en forma de un aceite de color oscuro: RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,1 (m 12H), 3,7 (m, 1H), 4,0 (m, 5H), 4,2 (m, 1H), 5,0 (m, 1H), 6,2 (s, 2H), 7,05 (m, 5H), 8,0 (s, 1H), 8,25 (d, 1H); RMN ³¹P (CDCl₃) δ 21,0, 22,5 (desacoplado).

Método alternativo para GS-7171 (III)

Esquema 2



Monofenil PMPA (II). Se colocó un matraz de fondo redondo con condensador de reflujo y una entrada de nitrógeno en un baño de aceite a 70 °C. Se cargó el matraz con PMPA anhidro (I) (19,2 g, 67 mmoles), se añadieron *N,N*-dimetilformamida (0,29 g, 3,3 mmoles) y sulfona de tetrametileno (40 ml). Se añadió cloruro de tionilo (14,2 g, 119 mmoles) a lo largo de 4 horas. Se aumentó el calor a 100 °C a lo largo del mismo tiempo. Se obtuvo como resultado una solución homogénea. Se añadió fenoxitrimetilsilano (11,7 g, 70 mmoles) a la solución a lo largo de 5 minutos. El calentamiento en el baño de aceite a 100 °C continuó durante dos horas más. La se vertió reacción en acetona que se removió rápidamente (400 ml) con enfriamiento a 0 °C. Se aislaron los sólidos mediante filtración, se secaron bajo presión reducida, y se disolvieron en metanol (75 ml). El pH de la solución se ajustó a 3,0 con una solución de hidróxido potásico (45 % ac.) con enfriamiento en hielo/agua. Los sólidos resultantes se aislaron mediante filtración, se lavaron con metanol, y se secaron bajo presión reducida a 20,4 g II (Esquema 2) en forma de un polvo de color blanco.

GS-7171 (III). Se combinaron monofenil PMPA (II) (3 g, 8,3 mmoles), sulfona de tetrametileno (5 ml) y *N,N*-dimetilformamida (1 gota) en un matraz de fondo redondeado en un baño de aceite a 40 °C. Se añadió cloruro de tionilo (1,96 g, 16,5 mmoles). Después de 20 minutos se retiró la solución clara del calor, se diluyó con diclorometano (10 ml) y se añadió a una solución de éster isopropílico de (L)-alanina (5 g, 33 mmoles) y diisopropiletilamina (5,33 g, 41 mmoles) en diclorometano (20 ml) a -10 °C. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se lavó tres veces con una solución de dihidrogenofosfato de sodio (1 % ac., 10 ml cada lavado). La solución orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró bajo presión reducida hasta un aceite. El aceite se combinó con ácido fumárico (0,77 g, 6,6 mmoles) y acetonitrilo (40 ml) y se calentó hasta el reflujo para dar una solución homogénea. La solución se enfrió en un baño con hielo y se aislaron los sólidos mediante filtración. La sal de fumarato sólida de GS-7171 se secó bajo presión reducida hasta 3,7 g. La sal (3,16 g,

5,3 mmoles) se suspendió en diclorometano (30 ml) y se removió junto con una solución de carbonato potásico (5 ml, 2,5 M en agua) hasta que se disolvió el sólido. Se aisló la capa orgánica, después se lavó con agua (5 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró bajo presión reducida para proporcionar 2,4 g de **III** en forma de una espuma de color canela.

5

Ejemplo 3

A. Separación de Diastereómeros mediante Cromatografía de Elución en Semi-discontinua

10 Los diastereómeros de GS-7171 (**III**) se resolvieron por cromatografía de elución semi-discontinua usando un una columna de HPLC semi-preparativa comercialmente disponible Chiralpak AS, 20 μ m, de 21 x 250 mm con una columna de seguridad Chiralpak AS, 20 μ m, de 21 x 50 mm. Chiralpak® AS es un material de empaquetado patentado fabricado por Diacel y vendido en Norteamérica por Chiral Technologies, Inc. (Patentes de los Estados Unidos 5.202.433, RE 35.919, 5.434.298, 5.434.299 y 5.498.752). Chiralpak AS es una fase estacionaria quiral (FEQ) comprendida por amiloetris[(S)- α -metilbencil carbamato] que recubre un soporte de gel de sílice.

15

20 La mezcla diastereomérica de GS-7171 se disolvió en la fase móvil, y se bombearon alícuotas de aproximadamente 1 g de GS-7171 en el sistema cromatográfico. El diastereómero no deseado, designado como GS-7339, fue el primer pico de mayor amplitud (aprox. 15 min. de duración) en eluirse de la columna. Cuando el pico de GS-7339 había terminado de eluirse, la fase móvil se conmutó inmediatamente por alcohol metílico al 100 %, que causó que el diastereómero deseado, designado como GS-7340 (**IV**), se eluyera como un pico agudo de la columna con el frente de disolvente de alcohol metílico. El alcohol metílico se usó para reducir el tiempo de ciclo total. Después del primer par de inyecciones, se recogieron ambos diastereómeros como una sola fracción grande que contenía uno de los diastereómeros purificados (>99,0 % de un solo diastereómero). Los disolventes de la fase móvil se retiraron *in vacuo* para producir el diastereómero en forma de una espuma desmenuzable.

25

Aproximadamente el 95 % de la masa del GS-7171 de partida se recuperó en las dos fracciones diastereoméricas. La fracción de GS-7340 comprendió aproximadamente el 50 % de la masa total recuperada.

30 Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

	Fase móvil (Inicial)	:GS-7120 - Acetonitrilo: Alcohol Isopropílico (90:10)
35	(Final)	: Alcohol Metílico al 100 %
	Flujo	: 10 ml/minuto
	Tiempo de Ejecución	: aproximadamente 45 minutos,
	Detección	: UV a 275 nm.
	Temperatura:	: Ambiente
40	Perfil de Elución	: GS-7115 (diastereómero B) : GS-7340 (diastereómero A; (IV))

B. Separación de los Diastereómeros de GS-7171 mediante Cromatografía LMS

45 Para una descripción general de la cromatografía de lecho de movimiento simulado (LMS), véase Strube *et al.*, "Organic Process Research and Development" 2:305-319 (1998).

50 El **GS-7340 (IV)**. GS-7171 (**III**), 2,8 kg, se purificó mediante cromatografía de lecho de movimiento simulado a lo largo de 10 cm mediante lechos de 5 cm de empaquetado (Chiral Technologies Inc., Chiralpak AS de 20 micrómetros que recubre el gel de sílice) (1,2 kg). Las columnas se eluyeron con metanol al 30 % en acetonitrilo. Las fracciones que portaban el producto se concentraron hasta una solución de **IV** en acetonitrilo (2,48 kg). La solución se solidificó hasta una masa cristalina húmeda con acetonitrilo en reposo. La masa cristalina se secó bajo presión reducida hasta un polvo cristalino de color canela, 1,301 kg de **IV**, pureza diastereomérica del 98,7 %: pf 117 - 120 °C; RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,15 (s, 3,7 (t, 1H), 4,0 (m, 5H), 4,2 (dd, 1H), 5,0 (m, 1H), 6,05 (s, 2H), 7,1 (m, 5H), 8,0 (s, 1H), 8,2 (s, 1H); RMN ³¹P (CDCl₃) δ 21.0 (desacoplado).

55

C. Separación de Diastereómeros mediante C18 RP-HPLC

60 El **GS-7171 (III)** se cromatografió mediante HPLC de fase inversa para separar los diastereómeros usando el siguiente protocolo resumido.

	Columna cromatográfica:	Phenomenex Luna™ C18(2), 5 μ m, tamaño de poro 100 Å, (Phenomenex, Torrance, CA), o equivalente
	Columna de Seguridad:	Pellicular C18 (Alltech, Deerfield, IL), o equivalente
65	Fase móvil:	A - 0,02 % (85 %) H ₃ PO ₄ en agua: acetonitrilo (95:5)

B - 0,02 % (85 %) H₃PO₄ en agua: acetonitrilo (50:50)

Gradiente de Fase Móvil:

Tiempo	% de Fase móvil A:	% de Fase móvil B:
0	100	0
5	100	0
7	70	30
32	70	30
40	0	100
50	0	100

Tiempo de Ejecución: 50 minutos
 Retraso en el equilibrado: 10 min al 100 % de la fase móvil A
 Velocidad de Flujo: 1,2 ml/min
 Temperatura: Ambiente
 Detección: UV a 260 nm.
 Solución de la Muestra: tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 6.
 Tiempos de retención: GS-7339, aproximadamente 25 minutos
 GS-7340, aproximadamente 27 minutos

D. Separación del Diastereómero mediante Cristalización

GS-7340 (IV). Una solución de GS-7171 (III) en acetonitrilo se concentró hasta una espuma de color ámbar (14,9 g) bajo presión reducida. Se disolvió la espuma en acetonitrilo (20 ml) y se sembró con un cristal de **IV**. La mezcla se removió durante toda la noche, se enfrió a 5 °C, y se aislaron los sólidos mediante filtración. Se secaron los sólidos hasta 2,3 g de **IV** en forma de cristales de color blanco del 98 % de pureza diastereomérica (RMN ³¹P: RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,15 (s, 3,7 (t, 1H), 3,95 (m, 2H), 4,05 (m, 2H), 4,2 (m, 2H), 5,0 (m, 1H), 6,4 (s, 2H), 7,1 (m, 5H), 8,0 (s, 1H), 8,2 (s, 1H); RMN ³¹P (CDCl₃) δ 19,5 (desacoplado) El análisis del cristal por rayos X de un solo cristal seleccionado de este producto dio los siguientes datos:

Color del cristal, Hábito	decolorado, columna
Dimensiones del Cristal	0,25 X 0,12 X 0,08 mm
Sistema Cristalina	ortorrómbico
Tipo de reticulación	Primitiva
	a = 8,352(1) Å
	b = 15,574(2) Å
	c = 18,253(2) Å
	V = 2374,2(5) Å ³
Parámetros de Reticulación	
Grupo Espaciador	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (#19)
valor Z	4
D _{calc}	1,333 g/cm ³
F ₀₀₀	1008,00
μ(MoKα)	1,60 cm ⁻¹

Ejemplo 4

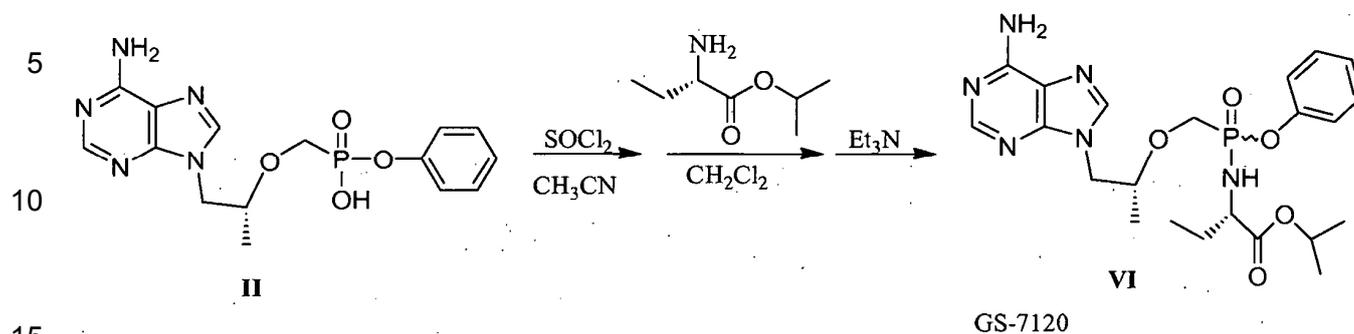
Preparación de la Sal de Fumarato de **GS-7340**

GS-7340-02 (V). (Esquema 1) Se cargó un reactor revestido de vidrio con GS-7340 (**IV**) (1,294 kg, 2,71 moles) con ácido fumárico (284 g, 2,44 moles) y acetonitrilo (24,6 kg). La mezcla se calentó hasta el reflujo para disolver los sólidos, se filtró mientras estaba caliente y se enfrió a 5 °C durante 16 horas. El producto se aisló mediante filtración, se enjuagó con acetonitrilo (9,2 kg), y se secó hasta 1329 g (**V**) en forma de un polvo de color blanco: pf 119,7 - 121,1 °C; [α]_D²⁰ -41,7° (c 1,0, ácido acético).

Ejemplo 5

Preparación de **GS-7120 (VI)**

Esquema 3



Se cargó un matraz de fondo redondeado de 5 l con monofenil PMPA, (II) (200 g, 0,55 moles) y acetonitrilo (20 ml). Se añadió cloruro de tionilo (0,144 kg, 1,21 moles) por debajo de 27 °C. La mezcla se calentó a 70 °C hasta que se disolvieron los sólidos. Se retiraron los volátiles (0,45 l) mediante destilación atmosférica bajo nitrógeno. El residuo del recipiente se enfrió a 25 °C, se añadió diclorometano (1,6 kg) y se enfrió la mezcla a 20 °C. Se añadió una solución de éster etílico del ácido (L)- α aminobutírico (0,144 kg, 1,1 moles) en diclorometano (1,33 kg) a lo largo de 18 minutos de -20 a -10 °C seguido de trimetilamina (0,17 kg, 1,65 moles) a lo largo de 15 minutos a de -8 a -15 °C. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se lavó cuatro veces con una solución de dihidrogenofosfato de sodio (10 % ac., 0,3 l cada lavado). La solución orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro (0,5 kg) y se filtró. Los sólidos se enjuagaron con diclorometano (0,6 kg) y el filtrado combinado y enjuagado se concentró hasta un aceite bajo presión reducida. El aceite se purificó mediante cromatografía a lo largo de un lecho de 15 x 13 cm de 1,2 kg de gel de sílice 60 con una malla de 230 a 400. La columna se eluyó con un gradiente de diclorometano y metanol. Las fracciones que portaban el producto se concentraron bajo presión reducida para proporcionar 211 g de VI (Esquema 3) en forma de una espuma de color canela.

Ejemplo 5a:

Separación de los Diastereómeros de **GS-7120** mediante Cromatografía de Elución Semi-discontinua

La mezcla diastereomérica se purificó usando las condiciones descritas para GS-7171 en el Ejemplo 3A excepto por lo siguiente:

Fase móvil (Inicial)	: GS-7120 - Acetonitrilo: Alcohol Isopropílico (98:2)
(Final)	: Alcohol M etílico al 100 %
Perfil de Elución	: GS-7341 (diastereómero B)
	: GS-7342 (diastereómero A)

Ejemplo 6

Separación de los Diastereómeros de **GS-7120** mediante Cristalización

Se cargó un matraz de fondo redondeado de 1 l con monofenil PMPA, (II) (50 g, 0,137 moles) y acetonitrilo (0,2 l). Se añadió cloruro de tionilo (0,036 kg, 0,303 moles) con una exoterma de 10 °C. La mezcla se calentó hasta el reflujo hasta que se disolvieron los sólidos. Se retiraron Los volátiles (0,1 l) mediante destilación atmosférica bajo nitrógeno. El residuo del recipiente se enfrió a 25 °C se añadió diclorometano (0,2 kg), y la mezcla se enfrió a -20 °C. Se añadió una solución de éster etílico del ácido (L)- α aminobutírico (0,036 kg, 0,275 moles) en diclorometano (0,67 kg) a lo largo de 30 minutos a de -20 a -8 °C seguido de trietilamina (0,042 kg, 0,41 moles) a lo largo de 10 minutos a hasta -6 °C. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se lavó cuatro veces con una solución de dihidrogenofosfato (10 % ac., 0,075 l cada lavado). La solución orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro (0,1 kg) y se filtró. Los sólidos se enjuagaron con acetato de etilo (0,25 l, y el filtrado combinado y enjuagado se concentró hasta un aceite bajo presión reducida. El aceite se diluyó con acetato de etilo (0,25 l), se sembró, se removió durante toda la noche y se enfrió hasta -15 °C. Los sólidos se aislaron mediante filtración y se desecaron bajo presión reducida para proporcionar 17,7 g de GS-7342 (Tabla 5) en forma de un polvo de color canela: RMN ^1H (CDCl_3) δ 0,95 (s, 3H), 1,3 (m, 6H), 1,7. (m, 2H), 3,7 (m, 2H), 4,1 (m, 6H), 4,4 (dd, 1H), 5,8 (s, 2H), 7,1 (m, 5H), 8,0 (s, 1H), 8,4 (s, 1H); RMN ^{31}P (CDCl_3) δ 21 (desacoplado).

Ejemplo 7

Separación de los Diastereómeros de **GS-7097**

La mezcla diastereomérica se purificó usando las condiciones descritas para GS-7171 (Ejemplo 3A) excepto por lo siguiente:

5	Fase móvil (Inicial)	: GS-7120 - Acetonitrilo: Alcohol Isopropílico (95:5)
	(Final)	: Alcohol Metílico al 100 %
	Perfil de Elución	: GS-7115 (diastereómero B)
		: GS-7114 (diastereómero A)

10

Ejemplo 8

Procedimiento Alternativo para la Preparación de **GS-7097**

15

El GS-7097: Fenil PMPA, Etil L-Alanil Amidato, Fenil PMPA (15,0 g, 41,3 mmoles) hidrocloreto de etil éster de L-alanina (12,6 g, 83 mmoles) y trietilamina (11,5 ml, 83 mmoles) se suspendieron conjuntamente en 500 ml de piridina bajo N₂ seco. Esta suspensión se combinó con una solución de trifetilfosfina (37,9 g, 145 mmoles), Aldritol 1 (2,2'-dipiridil disulfuro) (31,8 g, 145 mmoles) y 120 ml de piridina. La mezcla se calentó a una temperatura interna de 57 °C durante 15 horas. La reacción completa se concentró al vacío hasta una pasta amarilla 100 g. La pasta se purificó mediante cromatografía en columna a lo largo de un lecho de 25 x 11 cm de 1,1 kg de gel de sílice con una malla de 60.230 a 400. La columna se eluyó con 8 litros de metanol al 2 % en diclorometano seguidos de un gradiente lineal a lo largo de un curso de 26 litros de eluyente hasta una composición final de metanol al 13 %. Las fracciones limpias que portaban el producto se concentraron para producir 12,4 g de crudo (5), en teoría el 65 %. Este material estaba contaminado con aproximadamente el 15 % (en peso) de hidrocloreto de trimetilamina por la RMN ¹H. Se retiró la contaminación disolviendo el producto en 350 ml de acetato de etilo, extrayendo con 20 ml de agua, secando la solución orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, y concentrándolo para producir 11,1 g de GS-7097 puro en forma de un sólido de color blanco, rendimiento del 58 %. El proceso también se emplea para sintetizar la mezcla diastereomérica de GS-7003a y GS-7003b (el amidato de fenilalanilo) y la mezcla de GS-7119 y GS-7335 (el amidato de glicilo). Estos diastereómeros se separan usando un procedimiento de elución semi-discontinua tal como se muestra en el Ejemplo 3A, 6 y 7.

20

25

30

Ejemplo 9

Estudios *In vitro* de los Diastereómeros del Profármaco

35

La actividad anti-VIH-1 y la citotoxicidad *in vitro* en células y la estabilidad en plasma humano y extractos de células MT-2 de GS-7340 (base libre) y fumarato de tenofovir diisoproxil (TDF), se muestran en la Tabla 1. El GS-7340 muestra un aumento de 10 veces en la actividad antiviral con respecto a TDF y un aumento de 200 veces en la estabilidad en plasma. Se espera que esta mayor estabilidad en plasma sea el resultado de niveles más altos de GS-7340 en la circulación que los de TDF después de la administración oral.

40

Tabla 1. Actividad y Estabilidad *In vitro*

45

	Actividad para VIH-1	Citotoxicidad	Estabilidad T 1/2 (min)		
	CI ₅₀ µM	CC ₅₀ µM	Plasma Humano	Extracto de Células MT-2	(P/MT-2)
GS 7340	0,005	> 40	90,0	28,3	3,2
TDF	0,05	70	0,41	70,7	0,006
Tenofovir	5	6000	--	--	--

50

Con el fin de estimar el PMPA intracelular relativo que resulta del metabolismo intracelular del TDF en comparación con la del GS-7340, se marcaron radiactivamente tanto los profármacos como el PMPA y se enriquecieron dentro de la sangre completa humana a cantidades equimolares. Después de 1 hora, se aislaron el plasma, los glóbulos rojos (RBC) y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se analizaron mediante HPLC con detección radiométrica. Los resultados se muestran en la Figura 2.

55

Después de 1 hora, el GS-7340 da como resultado 10x y 30x la concentración de las especies de PMPA en los PBMC en comparación con TDF y PMPA, respectivamente. En plasma, después de 1 hora, el 84 % de la radioactividad se debe al GS-7340 intacto, mientras que no se detecta TDF después de 1 hora. Dado que no se detecta TDF intacto en plasma, la diferencia de 10x a 1 hora entre TDF y GS-7340 es la mínima diferencia esperada *in vivo*. El cromatograma de HPLC para los tres compuestos en los PBMC se muestra en la Figura 1. (HPLC/C-14 Trazas de Extractos de PBMC de Sangre Humana Incubada durante 1 h a 37°C con TDF, GS-7340 o PMPA).

60

65

Tabla 2. Metabolitos de PMPA en Plasma, PBMC y RBC Después de 1 h de Incubación de los Profármacos de PMPA o PMPA en Sangre Humana

Compuesto	Matriz,	C-14 Total Recuperado, µg-eq	Metabolitos (% de Área del Pico Total)					
			% de PMPA	PMPAp, %	PMPApp, %	Met, X %	Met, Y, %	GS 7340, %
GS-7340 (60 µg-eq)	Plasma/FP	43,0	1	-	-	2	13	84
	PBMC	1,25	45	16	21	18	-	-
	RBC/FP	12,6	8	-	-	24	11	57
GS-4331 (TDF) (60 µg-eq)	Plasma/FP	48,1	PMPA	PMPAp	PMPApp	Mono-POC	GS-4331	
	PBMC	0,133	11	-	-	89	-	
	RBC/FP	10,5	50	25	18	7	-	
PMPA (60 µg-eq)	Plasma/FP	55,7	PMPA	PMPAp	PMPApp			
	PBMC	0,033	100	-	-	-	-	
	RBC/FP	3,72	74	14	16	-	-	

Los Met, X y Met Y (metabolitos X e Y) se muestran en la Tabla 5. La "p" minúscula designa la fosforilación. Estos resultados se obtuvieron después de 1 hora en sangre humana. Aumentando el tiempo, se espera que aumenten las diferencias *in vitro*, dado que el 84 % del GS-7340 aún está intacto en el plasma después de una hora. Debido a que el GS-7340 está presente en plasma después de la administración oral, la eficacia clínica relativa debería estar relacionada con los valores de CI_{50} observados *in vitro*.

En la Tabla 3 a continuación, se enumeran los valores de CI_{50} de tenofovir, TDF, GS-7340, varios nucleósidos y del inhibidor de proteasas nelfinavir. Tal como se muestra, nelfinavir y GS-7340 son de 2-3 órdenes de magnitud más potentes que el resto de los nucleótidos o nucleósidos.

Tabla 3. Actividades Anti-VIH-1 de los Compuestos Antirretrovirales *In vitro*

Compuesto	CI_{50} (mM)
Adefovir (PMEA)	13,4 ± 4,21.
Tenofovir (PMPA)	6,3 ± 3,31.
AZT	0,17 ± 0,08 ¹
3TC	1,8 ± 0,25 ¹
d4T	8 ± 2,5
Nelfinavir	0,006 ± 0,002 ¹
TDF	0,05
GS 7340	0,005

1. A. S. Mulato y J.M. Cherrington, Antiviral Research 36, 91 (1997)

Se llevaron a cabo estudios de cultivos celulares adicionales *in vitro* de la actividad anti-VIH-1 y la CC_{50} de diastereómeros separados de esta invención y los resultados se tabulan a continuación.

Tabla 4. Efecto del Diastereómero

Compuesto	Diastereómero	CI_{50} (nM),	Cambio en la multiplicidad	Actividad de A/B	CC_{50} (μM)
PMPA	-	5	1x	-	6000
Ala-metiléster	Mezcla 1:1	0,025	200x	20x	80
GS-6957a	A	0,0075	670x		
GS-6957b		0,15	33x		
Phe-metiléster	Mezcla 1:1	0,03	170x	10x	60
GS-7003a	A	0,01	500x		
GS-7003b	B	0,1	50x		
Gly-etiléster	Mezcla 1:1	0,5	10x	20x	
GS-7119	A	0,05	100x		>100
GS-7335	B	1,0	5x		
Ala-isopropilo	Mezcla 1:1	0,01	500x	12x	
GS-7340	A	0,005	1.000x		40
GS-7339	B	0,06	83x		>100
ABA-etilo	Mezcla 1:1	0,008	625x	7,5x	>100
GS-7342	A	0,004	1,250x		
GS-7341	B	0,03	170x		
Ala-etilo	Mezcla 1:1	0,02	250x	10x	60
GS- 7114	A	0,005	1.000x		
GS- 7115	B	0,05	100x		

Referencia del ensayo: Arimilli, M N). *et al.*, 1997 & Synthesis, *in vitro* biological evaluation and oral bioavailability of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) prodrugs. Antiviral Chemistry and Chemotherapy 8(6):557-564.

"Phe-metiléster" es el metilfenilalaninil monoamidato, fenil monoéster de fenofovir; "Gly-metiléster" es el metigilicil monoamidato, fenil monoéster de tenofovir.

En cada caso anterior, se cree que el isómero A tiene la misma estereoquímica absoluta que GS-7340 (S), y se cree que el isómero B tiene la misma estereoquímica absoluta que la de GS-7339.

El metabolismo *in vitro* y la estabilidad de los diastereómeros separados se determinaron en PLCE, extracto de MT-2 y plasma humano. Una muestra biológica enumerada a continuación, 80 μl, se transfirió a un tubo de centrifuga con tapón de rosca y se incubó a 37 °C durante 5 min. Se añadió a la muestra biológica una solución que

5 contenía 0,2 mg/ml del compuesto de ensayo en un tampón adecuado, 20 µl, y se mezcló. La mezcla de reacción, 20 µl, se muestreó inmediatamente y se mezcló con 60 µl de metanol que contenían 0,015 mg/ml de 2-hidroximetilnaftaleno como un patrón interno para el análisis por HPLC. La muestra se tomó como la muestra de tiempo cero. Después, en puntos temporales específicos, la mezcla de reacción, 20 µl, se muestreó y se mezcló con 60 µl de metanol que contenía el patrón interno. La muestra obtenida de este modo se centrifugó a 15.000 G durante 5 min y se analizó el sobrenadante con HPLC en las condiciones que se describen a continuación.

Se evaluaron las muestras biológicas del siguiente modo.

- 10 (1) PLCE (carboxieterasa de hígado porcino de Sigma, 160 u/mg de proteína, 21 mg de proteína/ml) diluido 20 veces con PBS (fosfato salino tamponado).
 (2) Se preparó el extracto de células MT-2 a partir de células MT-2 de acuerdo con el procedimiento publicado [A. Pompon, I. Lefebvre, J.-L. Imbach, S. Kahn, y D. Farquhar, "Antiviral Chemistry & Chemotherapy", 5:91-98 (1994)] excepto en que se usó el tampón HEPES que se describe a continuación como el medio.
 15 (3) Plasma Humano (plasma humano normal combinado de George King Biomedical Systems, Inc.).

Los sistemas tampón usados en los estudios son los siguientes.

20 En el estudio para el PLCE, el compuesto de ensayo se disolvió en PBS. El PBS (fosfato salino tamponado, Sigma) contiene fosfato 0,01 M, cloruro potásico 0,0027 M y cloruro sódico 0,137 M, pH 7,4 a 37 °C.

25 En el estudio para los extractos de células MT-2, se disolvió el compuesto de ensayo en tampón HEPES. El tampón HEPES contiene HEPES 0,010 M, cloruro potásico 0,05 M, cloruro de magnesio 0,005 M, y dl-ditiotreitol 0,005 M, pH 7,4 a 37 °C. En el estudio para plasma humano, el compuesto de ensayo se disolvió en TBS. El TBS (solución salina tamponada con tris, Sigma) contiene Tris 0,05 M, cloruro potásico 0,0027 M y cloruro sódico 0,138 M, pH 7,5 a 37 °C.

30 El análisis por HPLC se llevó a cabo en las siguientes condiciones.

35	Columna:	Zorbax R _x -C ₈ , 4,6 x 250 mm. 5 µ (MAC-MOD Analytical, Inc. Chadds Ford, PA).
	Detección	UV a 260 nm.
	Velocidad de flujo:	1,0 ml/min
	Tiempo de Ejecución:	30 min
	Volumen de inyección:	20 µl,
	Temperatura de la Columna:	Temperatura Ambiente:
	Fase móvil A:	fosfato potásico 50 mM (pH 6,0)/CH ₃ CN = 95/5 (v/v)
	Fase móvil B:	fosfato potásico 50 mM (pH 6,0)/CH ₃ CN = 50/50 (v/v)
40	Gradiente de carrera:	0 min 100% Fase móvil A 25 min 100% Fase móvil B 30 min 100% Fase móvil B

Los resultados en la Tabla 5 (incluyendo también datos de las IC₅₀ seleccionadas a partir de la Tabla 4).

45

50

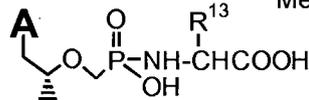
55

60

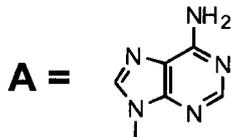
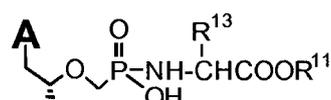
Tabla 5. Metabolismo *In vitro* de los Isómeros A y B del PMPA monoamidato a 37 °C

Nº	Estructura del PMPA monoamidato	Cl ₅₀ del VIH (µM)	velocidad de hidrólisis y producto de PLCE	velocidad de hidrólisis y producto del extracto de MT-2	Estabilidad en Plasma Humano (PH)
1	 Isómero A GS7114	0,005	t _{1/2} = 2,9 min Met. X & PMPA	t _{1/2} = 2,9 min Met. X & PMPA	t _{1/2} = 148 min Met. Y
2	 Isómero B GS7115	0,05	t _{1/2} = 8,0 min Met. X & PMPA	t _{1/2} = 150,6 min Met. X & PMPA	t _{1/2} = 495 min Met. Y
3	 Isómero A GS7340	0,005	t _{1/2} = 3,3 min Met. X & PMPA	t _{1/2} = 28,3 min Met. X & PMPA	t _{1/2} = 90,0 min Met. Y
4	 Isómero B GS7339	0,06	t _{1/2} = 10,1 min Met. X & PMPA	t _{1/2} > 1000 min	t _{1/2} = 231 min Met. Y
5	 Isómero A GS7342	0,004	t _{1/2} = 3,9 min Met. X	t _{1/2} = 49,2 min Met. X & PMPA	t _{1/2} = 103 min Met. Y
6	 Isómero B GS7341	0,03	t _{1/2} = 11,3 min Met. X	t _{1/2} > 1000 min	t _{1/2} = 257 min Met. Y
7	 GS4331	0,05	t _{1/2} < 0,14 min MonoPOC PMPA	t _{1/2} < 70,7 min MonoPOC PMPA	t _{1/2} < 0,41 min MonoPOC PMPA

Met. X:



Met. Y:



Ejemplo 10

5 Exposiciones a plasma y PBMC Después de la Administración oral de Diastereómeros de Profármacos a Perros Sabuesos

La farmacocinética de GS 7340 se estudió en perros después de la administración oral de una dosis de 10 mg-eq/kg.

10 **Formulaciones.** Los profármacos se formularon como soluciones en ácido cítrico 50 mM dentro de las 0,5 horas antes de la dosis. Todos los compuestos usados en los estudios se sintetizaron por Gilead Sciences. Se usaron los siguientes lotes:

15	GSI	Amidato de Aminoácido	Éster de AA	Diastereoisómero	Número de Lote
	GS-7340-2	Alanina	i-Propilo	Isómero A	1504:-187-19.
	GS-7339	Alanina	i-propilo,	Isómero B	1509:-185-31.
	GS7114	Alanina	Etilo	Isómero A	1509:-181-26.
20	GS7115	Alanina	Etilo	Isómero B	1509:-181-22.
	GS7119	Glicina	Etilo	Isómero A	1428:-163-28.
	GS7342	Ácido α -Aminobutírico	Etilo	Isómero A	1509:-191-12.
	GS7341	Ácido α -Aminobutírico	Etilo	Isómero B	1509:-191-7.

25 **Administración de Dosis y Recogida de Muestras.** La fase *in vivo* de este estudio se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones de la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" (Publicación de los Institutos Nacionales de Salud 86-23) y se aprobó por un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales. Se usaron perros sabuesos macho (10 ± 2 kg) en ayunas para los estudios. Se administró cada fármaco como una sola dosis mediante administración oral forzada (1,5-2 ml/kg). La dosis fue el equivalente a 10 mg de PMPA/kg. Para los PBMC, se recogieron muestras de sangre a las 0 (pre-dosis), 2, 8 y 24 h post-dosis. Para el plasma, se recogieron muestras de sangre a 0 (pre-dosis), 5, 15 y 30 min, y 1, 2, 3. 4. 6. 8. 12 y 24 h post-dosis. La sangre (1,0 ml) se procesó inmediatamente para el plasma mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 min. Las muestras de plasma se congelaron y se mantuvieron a 10 °C hasta el análisis.

35 **Preparación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC).** Se mezcló la sangre completa (8 ml) recogida en puntos temporales especificados en proporciones iguales con fosfato salino tamponado (PBS), se estratificó sobre 15 ml de solución de Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech,) y se centrifugó a 400 x g durante 40 min. Se retiró la capa de PBMC y se lavaron una vez con PBS. El sedimento de PMBC formado se reconstituyó en 0,5 ml de PBS, se resuspendieron las células, se contaron usando un hemocitómetro y se mantuvieron a 70 °C hasta el análisis. El número de células multiplicado por el volumen medio de una sola célula se usó para calcular las concentraciones intracelulares. Se usó un valor notificado de 200 femtolitros/célula como el volumen en reposo de los PMBC (B. L. Robins, R.V. Srinivas, Kim, N. Bischofberger, y A. Fridland, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:612 (1998)).

45 **Determinación de PMPA y Profármacos en plasma y PBMC.** La concentración de PMPA en las muestras de plasma de perros se determinó derivando el PMPA con cloracetaldehído para producir un derivado de N¹,N⁶-etenoadenina altamente fluorescente (L. Naesens, J. Balzarini, y E. De Clercq, *Clin. Chem.* 38:480 (1992)). Brevemente, se mezcló el plasma (100 μ l) con 200 μ l de acetonitrilo para precipitar las proteínas. Después, se evaporaron las muestras hasta la desecación bajo presión reducida a temperatura ambiente. Se reconstituyeron las muestras desecadas en 200 μ l de cóctel de derivación (cloracetaldehído al 0,34 % en acetato de sodio 100 mM, pH 4,5), se agitaron vorticialmente y se centrifugaron. Después se transfirió el sobrenadante a un tubo con tapón de rosca limpio y se incubó a 95 °C durante 40 min. Después, las muestras derivadas se evaporaron hasta la desecación y se reconstituyeron en 100 μ l de agua para el análisis por HPLC.

55 Antes de que el PMPA intracelular pudiera determinarse por HPLC, las grandes cantidades de ribonucleótidos de adenina relacionados presentes en los extractos de PBMC tuvieron que ser retiradas mediante oxidación selectiva. Se usó un procedimiento modificado de Tanaka *et al* (K. Tanaka, A. Yoshioka, S. Tanaka, y. Wataya, *Anal. Biochem.* 139. 35 (1984)). Brevemente, se mezclaron las muestras de PMBC 1:2 con metanol y se evaporaron hasta la desecación bajo presión reducida. Las muestras desecadas se derivaron tal como se describe en el ensayo del plasma. Las muestras derivadas se mezclaron con 20 μ l de ramnosa 1 M y 30 μ l de peryodato de sodio 0,1 M y se incubaron a 37 °C durante 5 min. Después de la incubación, se añadieron 40 μ l de metilamina 4 M y 20 μ l de inosina 0,5 M. Después incubación a 37 °C durante 30 min, se evaporaron las muestras hasta la desecación bajo presión reducida y se reconstituyeron en agua para el análisis por HPLC.

65 No se detectó el profármaco intacto en ninguna de las muestras de PBMC. Para las muestras de plasma

que contenían potencialmente profármacos intactos, se realizaron experimentos para verificar que no ocurrió conversión adicional a PMEA durante la derivación. Se añadieron los patrones de los profármacos al plasma libre de fármacos y se derivaron tal como se describe. No hubo niveles detectables de PMPA presentes en ninguna de las muestras de plasma, y el % de conversión proyectado fue menor del 1 %.

5 El sistema HPLC estaba comprendido por sistema de suministro de disolvente P4000 con un autoinyector AS3000 y un detector de fluorescencia F2000 (Thermo Separation, San José, CA). La columna era una columna Inertsil ODS-2 (4,6 x 150 mm). Las fases móviles usadas fueron: A, acetonitrilo al 5 % en tampón de fosfato potásico 25 mM con bromuro de tetrabutilamonio (TBABr) 5 mM, pH 6,0, B, acetonitrilo al 60 % en tampón de fosfato potásico 25 mM con TBABr 5 mM, pH 6,0. La velocidad de flujo fue de 2 ml/min y se mantuvo la temperatura de la columna a 35 °C mediante un horno de columna. El perfil de gradiente fue A al 90 %/B al 10 % durante 10 min para PMPA y A al 65 %/B al 35 % durante 10 min para el profármaco. La detección fue por fluorescencia con excitación a 236 nm y emisión a 420 nm y el volumen de inyección fue 10 µl. Se adquirieron los datos y se almacenaron en un sistema de adquisición de datos de laboratorio (PeakPro, Beckman, Allendale, NY).

10 **Cálculos Farmacocinéticos.** Las exposiciones del PMPA y profármacos se expresaron como áreas bajo la curva de concentración en plasma o PMBC de las cero a las 24 horas (ABC). Los valores de ABC se calcularon usando la regla trapezoidal.

15 **Concentraciones en plasma y PMBC.** Los resultados de este estudio se muestran en las Figuras 2 y 3. La figura 2 muestra el curso temporal del metabolismo resumido del GS 7340-2 de las exposiciones de plasma y PMBC después de la administración oral de diastereoisómeros puros de los profármacos de PMPA.

20 La Figura 3 representa la exposición a Tenofovir en PMBCs y Plasma tras la administración de 10 mg-eq / kg en perros.

25 La gráfica de barras de la Figura 2 muestra la ABC (0-24 h) para el tenofovir en los PMBC y el plasma de perro después de la administración s.c. de PMPA, TDF y profármacos de ésteres de amidato. Todos los profármacos de amidato mostraron aumentos en la exposición a los PMBC. Por ejemplo, el GS 7340 da como resultado un aumento de ~21 veces en la exposición a los PMBC en comparación con el PMPA s.c. y TDF; y una disminución de 6,25 veces y 1,29 veces en la exposición a plasma, respectivamente.

30 Estos datos establecen *in vivo* que GS 7340 puede suministrarse por vía oral, minimizando la exposición sistémica a PMPA y potenciando en gran medida la concentración intracelular de PMPA en las células principalmente responsables de la replicación del VIH.

40

45

50

55

60

65

Tabla 6

Exposición a PMPA en PBMC y Plasma de Profármacos Orales de PMPA en Perros										
GS#	Resto	ABC de PMPA en Plasma			ABC de PMPA en PBMC			Profármaco en Plasma	Relación de la Exposición en PBMC/Plasma	
		Media	DevTi	N	Media	DevTi	N			
GS-7114	Mono-Ala-Et-A	5,8	0,9	2	706	331	5	Sí	122	
GS-7115	Mono-Ala-Et-B	6,6	1,5	2	284	94	5	Sí	43	
GS-7340-2	Mono-Ala-iPr-A	5,0	1,1	5	805	222	5	Sí	161	
GS-7339	Mono-Ala-iPr-A	6,4	1,3	2	200	57	5	Sí	31	
GS-7119	Mono-Gly-Et-A	6,11	1,86	2	530	304	5	Sí	87	
GS-7342	Mono-ABA-Et-A	4,6	1,2	2	1060	511	5	Sí	230	
GS7341	Mono-ABA-Et-B	5,8	1,4	2	199	86	5	Sí	34	

Ejemplo 11

Biodistribución de GS-7340

5 Como una parte de la caracterización preclínica de GS-7340, se determinó su biodistribución en perros. La
distribución en los tejidos de GS-7340 (monoamidato de alanilisopropilo, fenil monoéster de tenofovil) se examinó
después de la administración oral a perros sabuesos. A dos animales macho se les dosificó ¹⁴C=GS-7340 por vía
oral (8,85 mg-equiv. de PMPA/kg, 33,2 µCi/kg; el carbono 8 de la adenina está marcado) en una solución acuosa
10 (ácido cítrico 50 mM, pH 2,2). El plasma y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron a lo
largo de un periodo de 24 horas. Las heces y la orina se recogieron de la jaula a lo largo de 24 h. A las 48 h después
de la dosis, se sacrificaron los animales y se retiraron los tejidos para el análisis. Se determinó la radiactividad de los
tejidos mediante oxidación y recuento por centelleo líquido.

15 La biodistribución del PMPA tras 24 horas después de una sola dosis oral del GS 7340 marcado
radiactivamente se muestra en la Tabla 4 junto con los datos de un estudio anterior con TDF (GS-4331). En el caso
del TDF, la concentración de profármaco en el plasma está por debajo del nivel de detección del ensayo y la
principal especie observada en plasma es el fármaco parental. Los niveles de PMPA en los tejidos linfáticos, la
médula ósea y el músculo esquelético aumentan 10 veces después de la administración de GS-7340.

20 La acumulación en tejidos linfáticos es coherente con los datos observados a partir del análisis de los
PBMC, dado que estos tejidos están compuestos principalmente de linfocitos. Del mismo modo, la acumulación en
médula ósea probablemente se debe al alto porcentaje de linfocitos (70 %) en este tejido.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 7. Excreción y Distribución Tisular de GS-7340 Marcado Radiactivamente en Perros (Media, N=2) Después de una Dosis Oral a 10 mg-eq. PMPA/kg.

Tejido/Fluido	GS-4331		GS-7340		Conc. Tisular Relación de GS 7340 con respecto a GS-4331
	Dosificación	Conc. (ug- eq/g)	Dosificación	Conc. (ug- eq/g)	
Hígado	12,40	38,30	16,45	52,94	1,4
Riñón	4,58	87,90	3,78	80,21	0,9
Pulmones	0,03	0,53	0,34	4,33	8,2
Ganglios Linfáticos Iíacos	0,00	0,51	0,01	5,42	10,6
Linfáticos Axilares	0,00	0,37	0,01	5,54	14,8
Ganglios Linfáticos Inguinales	0,00	0,28	0,00	4,12	15,0
Ganglios Linfáticos Mesentéricos	0,00	1,20	0,04	6,88	5,7
Ganglios					
Glándula Tiroides	0,00	0,30	0,00	4,78	15,8
Glándula Pituitaria	0,00	0,23	0,00	1,80	7,8
Glándula Salivar	0,00	0,45	0,03	5,54	12,3
Glándula Adrenal (I+D)	0,00	1,90	0,00	3,47	1,8
Bazo	0,00	0,63	0,17	8,13	12,8
Páncreas	0,00	0,57	0,01	3,51	6,2
Próstata	0,00	0,23	0,00	2,14	9,1
Testículos (I+D)	0,02	1,95	0,02	2,01	1,0
Músculo esquelético	0,00	0,11	0,01	1,12	10,1
Corazón	0,03	0,46	0,15	1,97	4,3
Fémur	0,00	0,08	0,00	0,28	3,5
Médula Ósea	0,00	0,20	0,00	2,05	10,2
Piel	0,00	0,13	0,00	0,95	7,2
Grasa Abdominal	0,00	0,16	0,00	0,90	5,8
Ojo (I+D)	0,00	0,06	0,00	0,23	3,7
Cerebro	0,00	<LDD	0,00	<LDD	n.d.
Líquido Cefalorraquídeo	0,00	<LDD	0,00	0,00	n.d.
Columna Vertebral	0,00	<LDD	0,00	0,04	n.d.
Estómago	0,11	1,92	0,26	2,68	1,4
Yeyuno	1,34	3,01	0,79	4,16	1,4
Duodeno	0,49	4,96	0,44	8,77	1,8
Íleo	0,01	0,50	0,16	4,61	9,2
Intestino Grueso	1,63	5,97	2,65	47,20	7,9
Vesícula Biliar	0,00	3,58	0,04	25,02	7,0
Bilis	0,00	9,63	0,22	40,48	4,2
Heces	40,96	n.d.	0,19	n.d.	n.a.
Tracto GI total	5,61	n.d.	21,64	n.d.	n.a.
Contenidos en Orina	23,72	n.d.	14,73	n.d.	n.a.
Plasma a 24 h	0,00	0,20	0,00	0,20	1,0
Plasma a 0,25 h	n.a.	3,68	n.a.	3,48	0,9
PBMC*	0,00	n.d.	0,00	63,20	n.d.
Sangre completa	0,00	0,85	0,16	0,20	0,2
Recuperación Total	81,10		68,96		

* Calculada usando la recuperación típica de 15×10^6 células totales, y volumen un medio de PBMC de 0,2 picolitros/célula
s.m. = sin muestra, n.a. = no aplicable, n.d. = no determinado.

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para la fabricación de 9-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina (PMPA) o 9-[2-(fosfonometoxi)etil] adenina (PMEA) que comprende hacer reaccionar 9-(2-hidroxi)propil]adenina (HPA) o 9-(2-hidroxi)etil]adenina (HEA),, alcóxido de magnesio, y p-toluenosulfonoloxometilfosfonato protegido.
- 10 2. El método de la reivindicación 1 que comprende además recuperar PMPA o PMEa, respectivamente.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2 en el que el fosfonato del p-toluenosulfonoloxometilfosfonato está protegido por éster etílico.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el alcóxido es un alcóxido C₁-C₆.
5. El método de la reivindicación 4 en el que el alcóxido es t-butilo u óxido de isopropilo.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Figura 1.

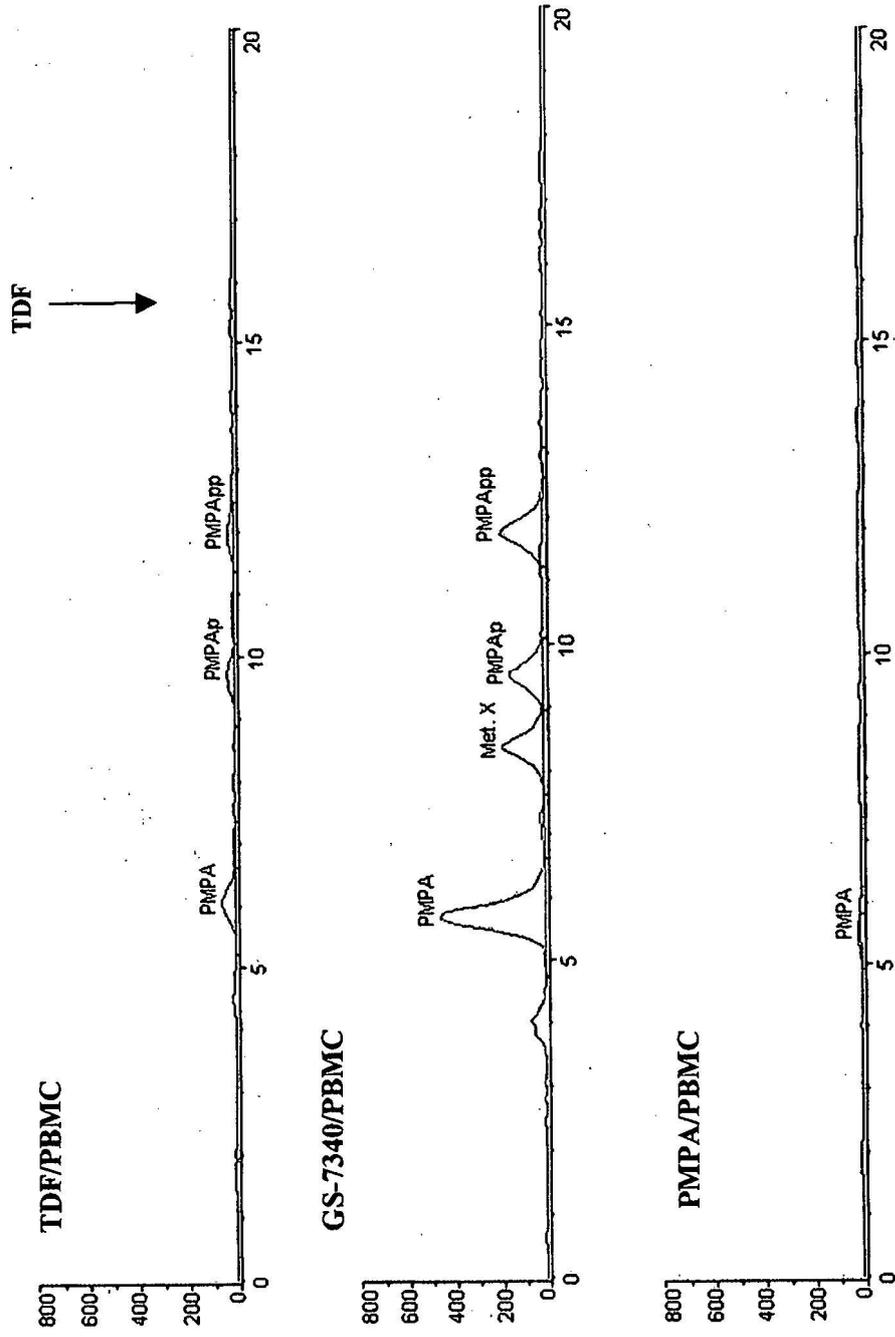


Figura 2

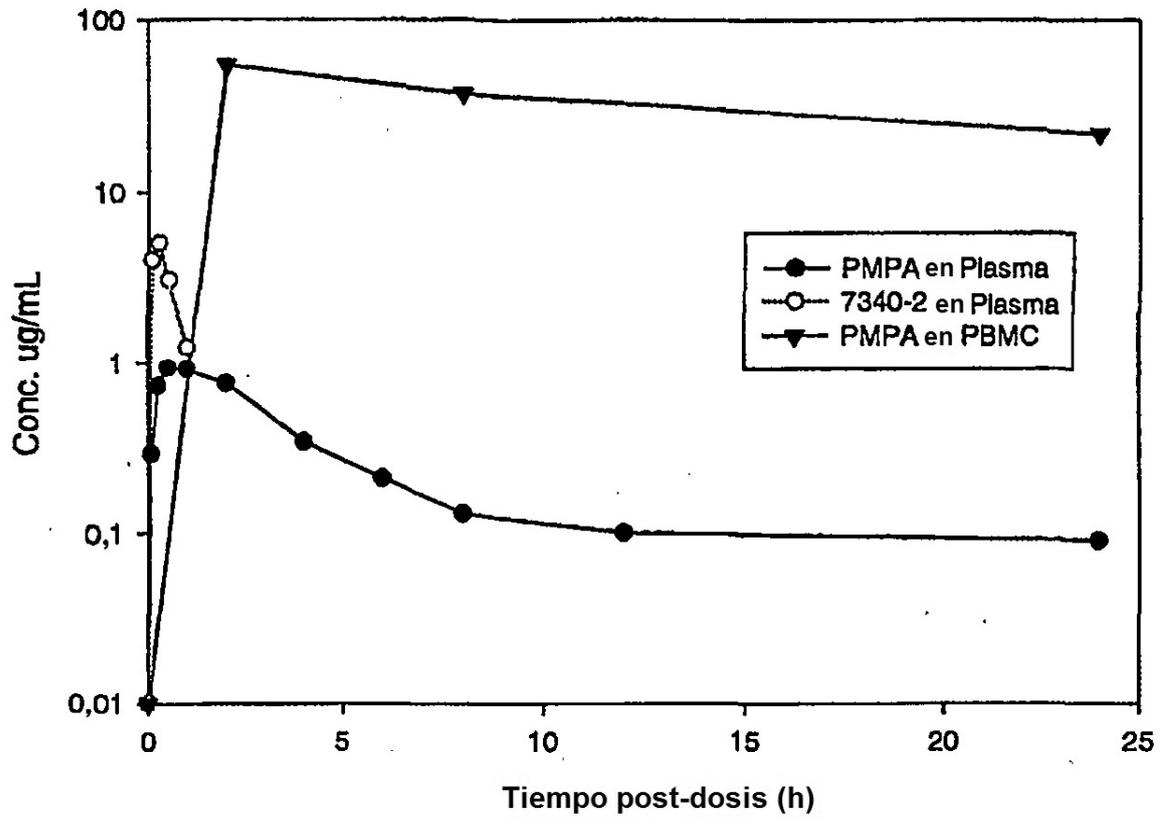


Figura 3

ABC (0-24 H) para el PMPA en PBMC y Plasma
Después de una Dosis Oral de 10 mg-eq/kg de los
profármacos de PMPA a Perros.

