



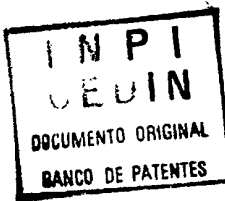
República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0112646-6 A**

(22) Data de Depósito: 20/07/2001  
(43) Data de Publicação: **24/06/2003**  
(RPI 1694)



(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:  
C07H 21/00



(54) Título: **PRÓ-DROGAS DE ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEO DE FOSFONATO E MÉTODOS PARA SELECIONAR E PREPARAR AS MESMAS**

(30) Prioridade Unionista: 21/07/2000 US 60/220,021

(71) Depositante(s): Gilead Sciences, INC. (US)

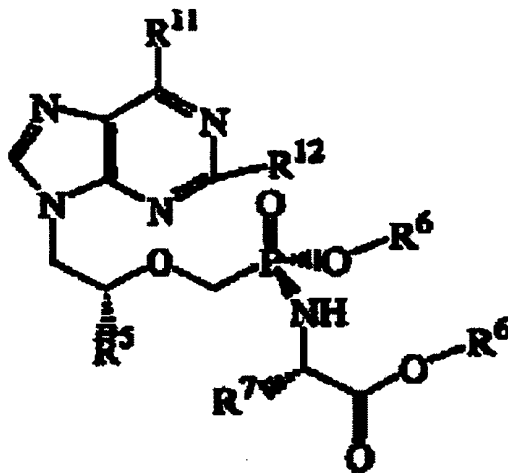
(72) Inventor(es): Mark W. Becker, Harlan H. Chapman, Tomas Cihlar, Eugene J. Eisenberg, Gong-Xin He, Michael R. Kernan, William A. Lee, Ernest J. Prisbe, John C. Rohloff, Mark L. Sparacino

(74) Procurador: Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US01/23104 de 20/07/2001

(87) Publicação Internacional: WO 02/08241 de 31/01/2002

(57) Resumo: "PRÓ-DROGAS DE ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEO DE FOSFONATO E MÉTODOS PARA SELECIONAR E PREPARAR AS MESMAS". A presente invenção refere-se a método que é fornecido para avaliar pró-drogas de análogos de nucleotídeo de metoxifosfonato para identificar pró-drogas seletivamente alvejando tecidos desejados com atividade antiviral ou antitumor. Este método tem induzido à identificação de novos éster-amidatos misturados de PMPA para terapia retroviral ou hepadnaviral, incluindo compostos de estrutura (5a) tendo grupos substituintes como aqui definido. Composições destes compostos em excipientes farmacologicamente aceitáveis e seu uso em terapia e profilaxia são fornecidas. Também fornecido é um método para o uso de alcóxido de magnésio para a preparação de materiais de partida e compostos para uso aqui.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PRÓ-DROGAS DE ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEO DE FOSFONATO E MÉTODOS PARA SELECIONAR E PREPARAR AS MESMAS**".

5 Este pedido refere-se às pró-drogas de análogos de nucleotídeo de metoxifosfonato. Em particular refere-se aos métodos melhorados para preparar e identificar tais pró-drogas.

Muitos análogos de nucleotídeo de metoxifosfonato são conhecidos. Em geral, tais compostos tem a estrutura  $A-OCH_2P(O)(OR)_2$  onde A é o resíduo de um análogo de nucleosídeo e R independentemente é hidrogênio ou várias funcionalidades de pró-drogas ou proteção. Observe Patente U.S. nº 5.663.159, 5.977.061 e 5.798.340, Oliyai e outros, "Pharmaceutical Research" 16(11):1687-1693 (1999), Stella e outro, "J. Med. Chem." 23(12):1275-1282 (1980), Aarons, L., Boddy, A. e Petrak, K. (1989) *Novel Drug Delivery and Its Therapeutic Application* (Prescott, L. F. and Nimmo, W. S., ed.), pp. 121-126; Bundgaard, H. (1985) *Design of Prodrugs* (Bundgaard, H., ed.) pp. 70-74 e 79-92; Banerjee, P.K. e Amidon, G.L. (1985) *Design of Prodrugs* (Bundgaard, H., ed.) pp. 118-121; Notari, R.E. (1985) *Design of Prodrugs* (Bundgaard, H., ed.) pp. 135-156; Stella, V. J. e Himmelstein, K. J. (1985) *Design of Prodrugs* (Bundgaard, H., ed.) pp. 177-198; Jones, G. (1985) *Design of Prodrugs* (Bundgaard, H., ed.) pp. 199-241; Connors, T. A. (1985) *Design of Prodrugs* (Bundgaard, H., ed.) pp. 291-316. Toda literatura e citações de patente aqui são expressamente incorporadas por referência.

Sumário da Invenção

25 Pró-drogas de análogos de nucleotídeo de metoxifosfonato destinadas para terapia antiviral ou antitumor, ao mesmo tempo que conhecidas, tradicionalmente foram selecionadas para o seu efeito sistêmico. Por exemplo, tais pró-drogas foram selecionadas para biodisponibilidade realçada, isto é, capacidade de ser absorvidos do trato gastrointestinal e rapidamente convertidos em droga origem para garantir que a droga origem  
30 está disponível para todos os tecidos. Entretanto, as requerentes então tem constatado que é possível selecionar pró-drogas que tornem-se enriquecidas em sítios terapêuticos, como ilustrado pelos estudos descritos aqui

onde os análogos são enriquecidos em sítios focais localizados de infecção por HIV. O objetivo desta invenção é, entre outras vantagens, produzir menos toxicidade em tecidos circunstantes e potências maiores da droga original em tecidos que são os alvos da terapia com o análogo de nucleotídeo de metoxifosfonato original.

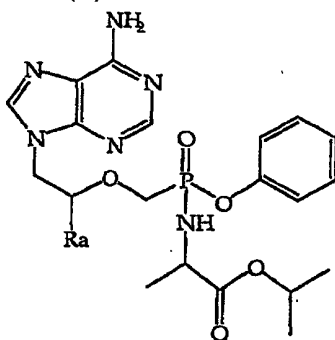
Conseqüentemente, perseguidor a estas observações, um método de avaliação é fornecido para identificar uma pró-droga de análogos de nucleotídeo de metoxifosfonato conferindo a atividade realçada em um tecido alvo compreendendo:

- 10 (a) fornecer pelo menos uma das referidas pró-drogas;
- (b) selecionar pelo menos um tecido alvo terapêutico e pelo menos um tecido não-alvo;
- (c) administrar a pró-droga ao tecido alvo e ao referido pelo menos um tecido não-alvo; e
- 15 (d) determinar a atividade antiviral relativa conferida pela pró-droga nos tecidos na etapa (c).

Em modalidades preferidas, o tecido alvo são sítios onde o HIV é ativamente replicado e /ou que serve como um reservatório de HIV, e o tecido não-alvo é um animal intacto. Inesperadamente, constatou-se que

20 selecionar o tecido linfóide como o tecido alvo para a prática deste método para HIV levou a identificação de pró-drogas que realçam a liberação da droga ativa para tais tecidos.

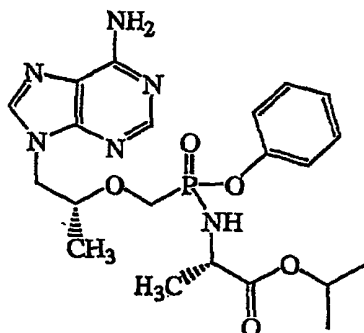
Um composto preferido desta invenção, que foi identificado por este método tem a estrutura (1),



(1)

onde Ra é H ou metila, e composições quiralmente enriquecidas destes, sais, sua base livre e solvatos destes.

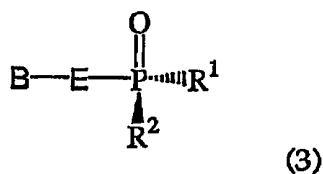
Um composto preferido desta invenção tem a estrutura (2)



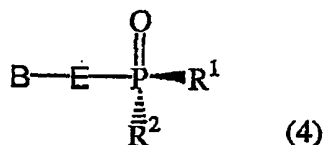
(2)

e seus diastêromeros enriquecidos, sais, base livre e solvatos.

- 5 Em adição, inesperadamente constatou-se que a quiralidade de substituintes sobre o átomo de fósforo e/ou o substituinte de amidato são influencias no enriquecimento observado na prática desta invenção. Desse modo, em outra modalidade desta invenção, forneceu-se compostos diastereomericamente enriquecidos desta invenção tendo a estrutura (3)



- 10 que são substancialmente livres do diastereômero (4)



onde

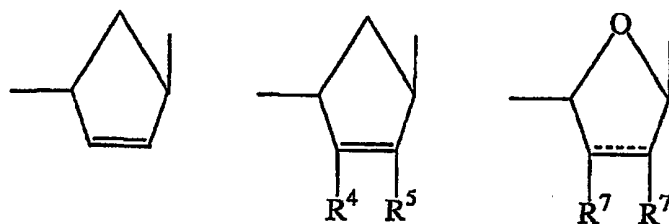
R<sup>1</sup> é um oxiéster que é hidrolisável *in vivo*, ou hidroxila;

B é uma base heterocíclica;

R<sup>2</sup> é hidroxila, ou o resíduo de um aminoácido ligado ao átomo P através de um grupo de amino do aminoácido tendo cada substituinte de carbóxi do aminoácido opcionalmente esterificado, porém não ambos de R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> são hidroxila;

15

E é  $-(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{F})\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2-$ ,  
 $-\text{CH}(\text{CH}=\text{CH}_2)\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{C}\equiv\text{CH})\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{N}_3)\text{CH}_2-$ ,



5  $-\text{CH}(\text{R}^6)\text{OCH}(\text{R}^6)-$ ,  $-\text{CH}(\text{R}^9)\text{CH}_2\text{O}-$  ou  $-\text{CH}(\text{R}^8)\text{O}-$ , onde a ligação de mão direita é ligada à base heterocíclica;

a linha tracejada representa uma ligação dupla opcional;

$\text{R}^4$  e  $\text{R}^5$  são independentemente hidrogênio, hidróxi, halo, amino ou um substituinte tendo de 1-5 átomos de carbono selecionados de acilóxi, alquilóxi, alquiltio, alquilamino e dialquilamino;

10  $\text{R}^6$  e  $\text{R}^{6'}$  são independentemente H,  $\text{C}_1-$   $\text{C}_6$  alquila,  $\text{C}_1-$   $\text{C}_6$  hidroxialquila, ou  $\text{C}_2-$   $\text{C}_7$  alcanóila;

$\text{R}^7$  é independentemente H,  $\text{C}_1-$   $\text{C}_6$  alquila, ou são tomados juntos para formar  $-\text{O}-$  ou  $-\text{CH}_2-$ ;

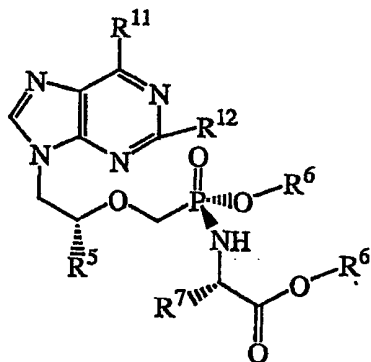
$\text{R}^8$  é H,  $\text{C}_1-$   $\text{C}_6$  alquila,  $\text{C}_1-$   $\text{C}_6$  hidroxialquila ou  $\text{C}_1-$   $\text{C}_6$  haloalquila; e

15  $\text{R}^9$  é H, hidroximetila ou aciloximetila;

e seus sais, base livre, e solvatos.

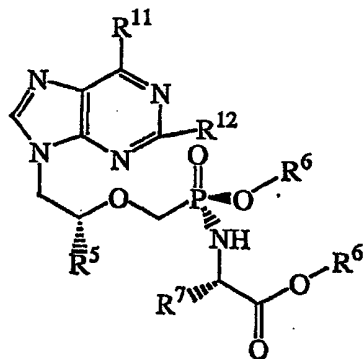
Os diastereômeros da estrutura (3) são designados os isômeros (S) no centro quiral de fósforo .

20 Modalidades preferidas desta invenção são os compostos diastereomericamente enriquecidos tendo a estrutura (5a)



(5a)

que é substancialmente livre de diastereômero (5b)



(5b)

R<sup>5</sup> é metila ou hidrogênio;

R<sup>6</sup> independentemente é H, alquila, alquenila, alquinila, arila ou arilalquila, ou R<sup>6</sup> independentemente é alquila, alquenila, alquinila, arila ou arilalquila que é substituída com de 1 a 3 substituintes selecionados de alquilamino, alquilaminoalquila, dialquilaminoalquila, dialquilamino, hidroxila, oxo, halo, amino, alquil-tio, alcóxi, alcoxialquila, arilóxi, ariloxialquila, arilalcóxi, arilalco-xialquila, haloalquila, nitro, nitroalquila, azido, azidoalquila, al-  
 5 quilacila, alquilacilalquila, carboxila, ou alquilacilamino;

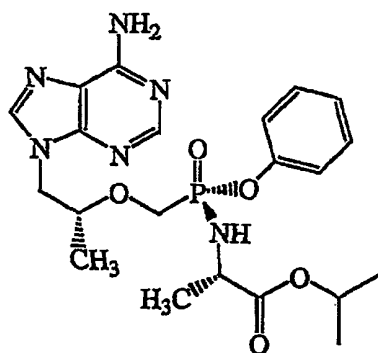
R<sup>7</sup> é a cadeia lateral de qualquer aminoácido farmacologicamente aceitável ou de ocorrência natural e que, se a cadeia lateral compreende carboxila, o grupo de carboxila é opcionalmente esterificado com um grupo de alquila ou arila;

15 R<sup>11</sup> é amino, alquilamino, oxo, ou dialquilamino; e

R<sup>12</sup> é amino ou H;

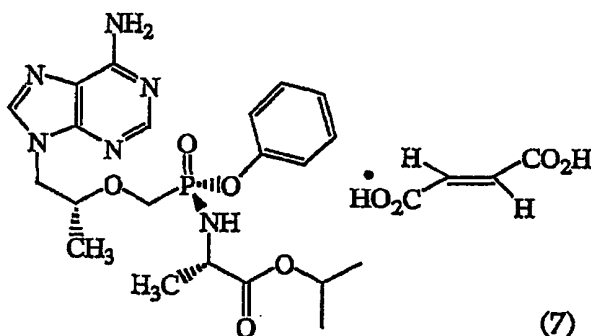
e seus sais, tautômeros, base livre e solvatos.

Uma modalidade preferida desta invenção é o composto da es-  
 20 trutura (6), 9-[(R)-2-[(S)-[(S)-1-(isopropoxycarbonil)etil]amino]fenoxifosfinil]-metóxi]propil]adenina, também designada aqui GS-7340



(6)

Outra modalidade preferida desta invenção é o sal de fumarato da estrutura (5) (estrutura (7)), fumarato de 9-[(*R*)-2-[[(*S*)-[[(*S*)-1-(isopropoxicarbonil)etil]amino]fenoxifosfinil]metóxi]propil]-adenina (1:1), também designado aqui GS-7340-2



(7)

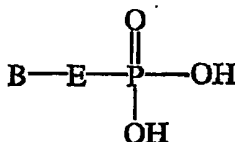
5 Os compostos das estruturas (1)-(7) opcionalmente são formulados em composições contendo excipientes farmacologicamente aceitáveis. Tais composições são empregadas em doses eficazes na terapia ou profilaxia de infecções virais (particularmente HIV ou hepadnaviral).

10 Em uma outra modalidade, um método é fornecido para a fácil fabricação de 9[2-(fosfometóxi)propil]adenina (a seguir "PMPA" ou 9-[2-(fosfometóxi)etil]adenina (a seguir "PMEA") empregando alcóxido de magnésio, que compreende combinar 9-(2-hidroxi)propil]adenina ou 9-(2-hidroxi)etil]adenina, *p*-toluenossulfonilóxi-metilfosfonato protegido e alcóxido de magnésio, e recuperar PMPA ou PMEa, respectivamente.

### 15 Descrição Detalhada da Invenção

As drogas origem do análogo de nucleotídeo de metoxifosfonato para uso neste método de avaliação são compostos tendo a estrutura A-

$\text{OH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$  onde A é o resíduo de um análogo de nucleosídeo. Estes compostos são conhecidos por si próprio e não são parte desta invenção. Mais particularmente, os compostos origem compreendem uma base B heterocíclica e uma aglicona E, em geral tendo a estrutura



- 5 onde o grupo B é definido abaixo e o grupo E é definido acima. Exemplos são descritos na Patente U.S. 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, e 5.798.340, e EP 821.690 e 654.037.
- 10 As pró-drogas para uso no método de avaliação desta invenção são análogos covalentemente modificados dos análogos de nucleotídeo de metoxifosfonato origem descritos no parágrafo precedente. Em geral, o átomo de fósforo da droga origem é o sítio preferido para modificação, porém outros sítios são encontrados na base heterocíclica B ou na aglicona E.
- 15 Muitas tais pró-drogas são anteriormente conhecidas. Primeiramente, eles são ésteres ou amidatos do átomo de fósforo, porém também incluem substituições na base e aglicona. Nenhuma destas modificações por si próprias são parte desta invenção e nenhuma são para ser consideradas limitantes no escopo da invenção aqui.
- 20 O átomo de fósforo dos análogos de nucleotídeo de metoxifosfonato contém duas valências para a modificação covalente tal como amidação ou esterificação (exceto uma hidroxila de fosforila é esterificada em um substituinte de hidroxila de aglicona E, em que apenas uma valência de fósforo está livre para substituição). Os ésteres são tipicamente arilóxi. Os
- 25 amidatos ordinariamente são ácidos de monoamino de ocorrência natural tendo grupo(s) carboxila livre(s) esterificado(s) com um grupo alquila ou arila, usualmente grupos fenila, cicloalquila, ou  $\underline{t}$ -,  $\underline{n}$ - ou  $\underline{s}$ - alquila. Pró-drogas adequadas para uso no método de avaliação desta invenção são descritas na Patente U.S. n° 5.798.340. Entretanto, qualquer pró-droga que



é potencialmente acreditada ser capaz de ser convertida *in vivo* sem células de tecido alvo à droga origem de análogo de nucleotídeo de metoxifosfonato livre, por exemplo, seja por hidrólise, oxidação, ou outra transformação covalente resultante da exposição aos tecidos biológicos, é adequada para usar no método desta invenção. Tais pró-drogas não podem ser conhecidas neste momento porém são identificadas no futuro e desse modo tornam-se candidatas adequadas disponíveis para testar no método desta invenção. Uma vez que as pró-drogas são simples candidatas para avaliar nos métodos, suas estruturas não são pertinentes a praticar ou permitir o método de avaliação, embora claro suas estruturas ultimamente são dispositivos de se ou não uma pró-droga se mostrará seletiva no ensaio.

As proporções ligadas à droga origem podem ser as mesmas ou diferentes. Entretanto, cada pró-droga a ser empregada no ensaio de avaliação diferenciará estruturalmente das outras pró-drogas a serem testadas. Distinto, isto é estruturalmente diferentes, pró-drogas geralmente são selecionadas sobre a base de ou sua estereoquímica ou sua estrutura covalente, ou estes aspectos são variados em combinação. Cada pró-droga testada, entretanto, desejavelmente é estruturalmente e estereoquimicamente substancialmente pura, de maneira diferente a produção do ensaio de avaliação será menos útil. Está claro dentro do escopo desta invenção testar apenas uma droga simples em uma modalidade individual do método desta invenção, embora tipicamente em seguida alguém compararia os resultados com estudos anteriores com outras pró-drogas.

Tem-se constatado que a estereoquímica das pró-drogas é capaz de influenciar o enriquecimento em tecidos alvos. Sítios quirais estão no átomo de fósforo e são também encontrados em seus substituintes. Por exemplo, aminoácido empregado na preparação de amidatos podem ser formas D ou L, e os ésteres de fosfonato ou os ésteres de aminoácido podem conter centros quirais também. Os sítios quirais são também encontrados sobre a porção de análogo de nucleosídeo das moléculas, porém estes tipicamente são anteriormente ditados pela estereoquímica da droga origem e não serão variados como parte da avaliação. Por exemplo o isômero R de

PMPA é preferido quando ele é mais ativo do que o isômero S correspondente. Tipicamente estes diastêromos ou enantiômeros serão quiralmente enriquecidos se não puros em cada sítio a fim de que os resultados da avaliação sejam mais significativos. Como observado, a distinção dos estereoisômeros é conferida por enriquecer ou purificar o estereoisômero (tipicamente este será um diastereômero em vez de um enantiômero no caso de mais análogos de nucleotídeo de metoxifosfonato) livre de outros estereoisômeros no centro quiral em questão, a fim de que cada composto teste seja substancialmente homogêneo. Por substancialmente homogêneo ou quiralmente enriquecido, entende-se que o estereoisômero desejado constitui-se mais do que cerca de 60% em peso do composto, ordinariamente mais do que cerca de 80% e preferivelmente mais do que 95%.

#### Novo Método de Avaliação

Logo que pelo menos uma pró-droga candidata foi selecionada, as etapas restantes do método de avaliação desta invenção são empregadas para identificar uma pró-droga possuindo a seletividade requerida para o tecido alvo. Mais convenientemente as pró-drogas são rotuladas com um grupo detectável, por exemplo radiorrotulado, a fim de facilitar a detecção mais tarde em tecidos ou células. Entretanto, um rótulo não é requerido uma vez que outros ensaios adequados para a pró-droga ou seus metabólitos (incluindo a droga origem) possam também ser empregados. Estes ensaios incluiriam a espectrometria de massa, HPLC, bioensaios ou imunensaios por exemplo. O ensaio pode detectar a pró-droga e qualquer um ou mais de seus metabólitos, porém preferivelmente o ensaio é conduzido para detectar apenas a geração da droga origem. Isto é com base na suposição (que pode não ser assegurado em todos os casos) que o grau e taxa de conversão da pró-droga para difosfato origem antiviralmente ativo é o mesmo sobre todos os tecidos testados. De outra maneira, alguém pode testar para o difosfato.

O tecido alvo preferivelmente será o tecido linfóide quando avaliando quanto às pró-drogas úteis no tratamento da infecção por HIV. O tecido linfóide será conhecido ao técnico e inclui as células CD4, linfócitos,

5 nodos de linfa, macrófagos e células tipo macrófago incluindo monócitos tal como células monocíticas de sangue periféricos (PBMCs) e células gliais. O tecido linfóide também inclui tecidos não-linfóides que são enriquecidos em tecidos linfóides ou células, por exemplo pulmão, pele e baço. Outros alvos para outras pró-drogas antivirais, claro, serão os sítios primários de replica-  
10 ção ou latência para o vírus particular concernido, por exemplo, fígado para hepatite e nervos periféricos para HSV. Similarmente, os tecidos alvos para tumores de fato serão os tumores sozinhos. Estes tecidos são todos bem-conhecidos pelo técnico e não requerem experimentação indevida para se-  
15 lecionar. Quando avaliando quanto aos compostos antivirais, o tecido alvo pode ser infectado pelo vírus.

Tecidos não-alvos ou células também são avaliados como parte do método aqui. Qualquer número ou identidade de tais tecidos ou células podem ser empregados a este respeito. Em geral, os tecidos para qual a  
15 droga origem é esperada ser tóxica serão empregados como tecidos não-alvo. A seleção de um tecido não-alvo é totalmente dependente da natureza da pró-droga e a atividade da origem. Por exemplo, tecidos não-hepáticos seriam selecionados para pró-drogas contra a hepatite, e células não-transformadas do mesmo tecido como o tumor bastariam para a avaliação  
20 de pró-droga seletiva de antitumor.

Deveria ser observado que o método desta invenção é distinto dos estudos tipicamente compreendidos a determinar a biodisponibilidade oral de pró-drogas. Em estudos da biodisponibilidade oral, o objetivo é iden-  
25 tificar uma pró-droga que passa na circulação sistêmica substancialmente convertida em droga origem. Na presente invenção, o objetivo é encontrar pró-drogas que não sejam metabolizáveis no trato gastrointestinal ou circu-  
30 lação. Desse modo, os tecidos alvo a serem avaliados no método desta invenção geralmente não inclui o intestino delgado ou, se os intestinos são incluídos, então os tecidos também incluem os tecidos adicionais exceto o intestino delgado.

Os tecidos alvos e não-alvos empregados no método de avaliação desta invenção tipicamente serão um animal vivo intacto. As pró-drogas

contendo ésteres são mais desejavelmente testadas em cachorros, macacos ou outros animais do que roedores; camundongos e plasma de rato contem níveis altos de circulação de esterases que podem produzir um resultado enganoso se o objetivo terapêutico desejado é um ser humano ou mamífero mais importante.

5 Não é necessário praticar este método com animais intactos. Esta também no escopo desta invenção empregar órgãos perfundidos, cultura *in vitro* de órgãos (por exemplo enxertos de pele) ou linhagens de células mantidas em várias formas ou cultura de célula, por exemplo frascos em cilindro ou sistemas de suspensão de gravidade zero. Por exemplo, as células MT-2 podem ser empregadas como um tecido alvo para selecionar pró-drogas de HIV. Desse modo, o termo "tecido" não seria construído para requerer as estruturas celulares organizadas, ou as estruturas de tecidos quando elas podem ser encontradas na natureza, embora tal seria preferido.

10 De preferência, o termo "tecido" seria construído para ser sinônimo com células de uma fonte particular, origem ou estágio de diferenciação.

O tecido alvo e não-alvo pode de fato ser o mesmo tecido, porém os tecidos serão em diferentes estados biológicos. Por exemplo, o método aqui pode ser empregado para selecionar quanto às pró-drogas que conferem atividade em tecido viralmente infectado (tecido alvo) porém que permaneçam substancialmente inativos em células viralmente não-infectadas (tecido não-alvo correspondente). A mesma trajetória seria empregada para selecionar pró-drogas profiláticas, isto é, pró-drogas metabolizadas em formas antiviralmente ativas incidentais para infecção viral porém que permaneçam substancialmente não-metabolizadas em células não infectadas. Similarmente, as pró-drogas podem ser avaliados em células transformadas e o tecido contraparte não-transformado. Isto seria particularmente útil em testagem comparativa para selecionar pró-drogas para o tratamento de malignidades hematológicas, por exemplo leucemias.

30 Sem ser limitado por qualquer teoria particular de operação, as pró-drogas seletivas de tecido são todavia para ser seletivamente apreendidas por células alvo e/ou seletivamente metabolizadas dentro da célula,

quando comparado a outros tecidos ou células. A única vantagem das pró-  
drogas de metoxifosfonato aqui é que seu metabolismo para o diânion em  
pH fisiológico garante que eles serão incapazes de difundirem-se recuando  
da célula. Eles portanto permanecem eficazes durante longos períodos de  
5 tempo e são mantidos em concentrações intracelulares elevadas, desse  
modo exibindo potência aumentada. Os mecanismos para atividade realça-  
da no tecido alvo acredita-se incluírem captação realçada pelas células  
alvo, retenção intracelular realça, ou ambos os mecanismos de funciona-  
10 mento juntos. Entretanto, a maneira em que a seletividade ou liberação re-  
alçada ocorre no tecido alvo não é importante. Também não é importante  
que toda a conversão metabólica da pró-droga para o composto origem  
ocorre dentro do tecido alvo. Apenas a conversão de conferência de ativi-  
dade de droga final necessita ocorrer no tecido alvo; o metabolismo em ou-  
15 tros tecidos pode fornecer intermediários finalmente convertidos em formas  
antiviral no tecido alvo.

O grau de seletividade ou liberação realçada que é desejada  
variará com o composto origem e a maneira em que é avaliada (% de distri-  
buição de dose ou concentração de droga origem). Em geral, se a droga  
origem anteriormente possui uma janela terapêutica generosa, um baixo  
20 grau de seletividade pode ser suficiente para a pró-droga desejada. Por ou-  
tro lado, os compostos tóxicos podem requerer mais avaliação extensiva  
para identificar as pró-drogas seletivas. A despesa relativa do método desta  
invenção pode ser reduzida avaliando-se apenas no tecido alvo e tecidos  
contra que o composto origem é conhecido para ser relativamente tóxico,  
25 por exemplo para PMEA, que é nefrotóxica em doses mais altas, o foco pri-  
mário será no rim e tecidos linfóides.

A etapa de determinar a atividade antiviral relativa de uma pró-  
droga nos tecidos selecionados ordinariamente é concluída ensaiando-se os  
tecidos alvo e não-alvo para a presença relativa ou atividade de um meta-  
30 bólito da pró-droga, cujo metabólito é conhecido por ter, ou é convertido em,  
um metabólito tendo atividade antiviral ou antitumor. Desse modo, tipica-  
mente um determinaria a quantidade relativa da droga origem nos tecidos

em substancialmente o mesmo curso de tempo a fim de identificar as pró-  
drogas que são preferencialmente metabolizadas no tecido alvo em um  
metabólito ativo de antitumor ou antiviralmente ou precursor deste que no  
tecido alvo ultimamente produz o metabólito ativo. No caso dos compostos  
5 antivirais, o metabólito ativo é o difosfato dos compostos origem de fosfo-  
nato. É este metabólito que é incorporado no ácido nucléico viral, desse  
modo truncando o alongamento de filamento de ácido nucléico e fazendo  
parar a replicação viral. Os metabólitos da pró-droga podem ser metabólitos  
anabólicos, metabólitos catabólicos, ou o produto de anabolismo e catabo-  
10 lismo juntos. A maneira em que o metabólito é produzido não é importante  
na prática do método desta invenção.

O método desta invenção não é limitado a ensaiar um metabó-  
lito que por si próprio possui atividade antiviral ou antitumor. Em vez de, um  
pode ensaiar precursores inativos dos metabólitos ativos. Os precursores do  
15 metabólito de difosfato antiviralmente ativo incluem o monofosfato da droga  
origem, monofosfatos de outros metabólitos da droga origem (por exemplo,  
uma modificação intermediária de um substituinte sobre a base heterocícli-  
ca), a origem propriamente dita e metabólitos gerados pela célula na con-  
versão da pró-droga para a origem antes da fosforilação. As estruturas pre-  
20 cursoras podem variar consideravelmente quando elas são o resultado do  
metabolismo celular. Entretanto, esta informação é anteriormente conhecida  
ou pode ser facilmente determinada por alguém versado na técnica.

Se a pró-droga a ser ensaiada não exhibe atividade antitumor ou  
antiviral por si própria então os ajustes para os resultados de ensaio bruto  
25 podem ser requeridos. Por exemplo, se o procedimento intracelular do me-  
tabólito inativo em um metabólito ativo ocorre em diferentes taxas entre os  
tecidos sendo testados, os resultados de ensaio bruto com o metabólito ina-  
tivo necessitariam ser ajustados às das diferenças entre os tipos de células  
porque o parâmetro pertinente é a geração da atividade no tecido alvo, não-  
30 acumulação de metabólitos inativos. Entretanto, a determinação dos própri-  
os ajustes estaria na experiência ordinária. Desse modo, quando a etapa (d)  
do método aqui chama-se para determinar a atividade, a atividade pode ser

ou avaliada diretamente ou extrapolada. Não significa que o método aqui seja limitado a apenas ensaiar intermediários que são ativos por si próprio. Por exemplo, a ausência ou declínio da pró-droga nos tecidos teste pode ser ensaiado. A etapa (d) apenas requer a taxação da atividade conferida  
5 pela pró-droga quando ela interage com o tecido concernido, e esta pode ser com base na extrapolação ou outras medidas indiretas.

A etapa (d) do método desta invenção chama-se para determinar a atividade "relativa" da pró-droga. Será entendido que isto não requer que cada e todos os ensaios ou séries de ensaios necessariamente deve  
10 também conter fusões com o tecido não-alvo selecionado. No contrário, está no escopo desta invenção empregar controles históricos dos tecidos ou tecido não-alvo, ou algoritmos representando resultados a serem esperados a partir de tais tecidos não-alvo, a fim de fornecer a atividade não-alvo *benchmark*.

Os resultados obtidos na etapa (d) são em seguida empregados  
15 idealmente para selecionar ou identificar uma pró-droga que produza atividade antiviral maior no tecido alvo do que no tecido não-alvo. É esta pró-droga que é selecionada para outro desenvolvimento.

Será apreciado que alguma pré-taxação dos candidatos de pró-  
20 droga pode ser empreendida antes da prática do método desta invenção. Por exemplo, a pró-droga necessitará ser capaz de passar largamente não-metabolizada em todo o trato gastrointestinal, ele necessitará ser substancialmente estável no sangue, e deveria ser capaz de penetrar as células pelo menos em algum grau. Na maioria dos casos também necessitaria completar um primeiro passo da circulação hepática sem metabolismo substancial.  
25 Tais pré-estudos são opcionais, e são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica.

A mesma razão como é descrita acima quanto a atividade antiviral é aplicável em pró-drogas de antitumor de análogos de nucleotídeo de  
30 metoxifosfonato também. Estes incluem, por exemplo, pró-drogas de PMEG, o análogo de guanila de PMEAs. Neste caso, fosfonatos citotóxicos tal como PMEG são candidatos de valor para prosseguir quando sua citotoxicidade de

fato confere sua atividade antitumor.

Um composto identificado por este novo método de avaliação então pode ser admitido em um programa clínico ou pré-clínico tradicional para confirmar que os objetivos desejados alcançados. Tipicamente, uma  
5 pró-droga é considerada ser seletiva se a atividade ou concentração de droga origem no tecido alvo (% de distribuição de dose) é maior do que 2x, e preferivelmente 5x, aquela do composto origem em tecido não-alvo. Alternativamente, um candidato de pró-droga pode ser comparado contra uma  
10 pró-droga de marca de nível. Neste caso, a seletividade é relativa em vez de absoluta. As pró-drogas seletivas serão aquelas resultando em mais do que cerca de 10x de concentração ou atividade no tecido alvo quando comparado com o protótipo, embora o grau de seletividade seja uma matéria de descrição.

#### Novo Método para Preparação de Materiais de Partida ou Intermediários.

15 Da mesma forma aqui incluída é um método melhorado para fabricação de materiais de partida (drogas origem) desta invenção, PMEA e (R)-PMPA. Tipicamente, este método compreende reagir 9-(2-hidroxiopropil)-adenina (HPA) ou 9-(2-hidroxietil)adenina (HEA) com um alcóxido de magnésio, depois disso adicionar o *p*-tolueno-sulfoniloximetilfosfonato sintona  
20 aglicona protegido (tosilato) à mistura de reação, e recuperar PMPA ou PMEA, respectivamente.

Preferivelmente, HPA é o enantiômero R isolado ou enriquecido. Se uma mistura de HPA quiral é usada, R-PMPA pode ser isolada da mistura de PMPA quiral após a síntese ser concluída.

25 Tipicamente o tosilato é protegido por grupos alquila inferior, porém outros grupos adequados serão evidentes para o técnico. Pode ser conveniente empregar o tosilato pré-substituído com os substituintes de fosfonato de pró-droga que são capazes de agir como grupos de proteção na reação de tosilação, desse modo permitindo alguém desviar a etapa de  
30 desproteção e diretamente recuperar a pró-droga ou um intermediário portanto.

O grupo alquila do alcóxido de magnésio não é crítico e pode

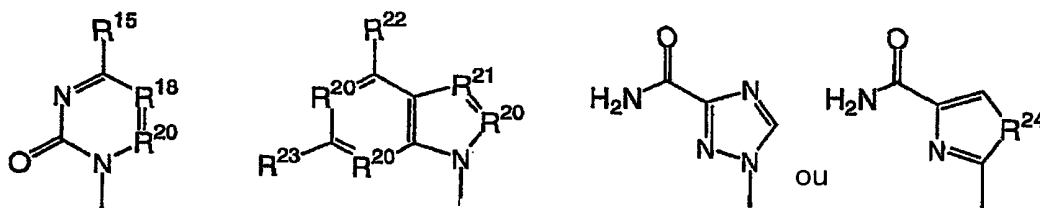


ser qualquer C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> alquila normal ou ramificada, porém é preferivelmente t-butila (para PMPA) ou isopropila (para PMEa). As condições de reação da mesma forma não são críticas, porém preferivelmente compreendem aquecer a mistura de reação a cerca de 70 - 75°C com agitação ou outra agitação moderada.

Se não existe interesse em reter os substituintes de fosfonato, o produto é desprotegido (usualmente com bromotrimetilsilano onde o grupo de proteção de tosilato é alquila), e o produto então recuperado por cristalização ou outro método convencional como será evidente para o técnico.

#### 10 Base Heterocíclica

Nos compostos desta invenção representados nas estruturas (3) e (4), a base heterocíclica B é selecionada das estruturas



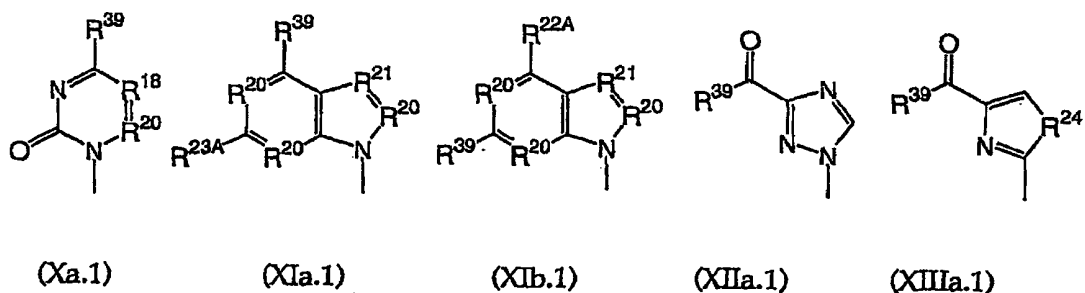
onde

- R<sup>15</sup> é H, OH, F, Cl, Br, I, OR<sup>16</sup>, SH, SR<sup>16</sup>, NH<sub>2</sub>, ou NHR<sup>17</sup>;
- 15 R<sup>16</sup> é C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> alquila ou C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> alquenila incluindo CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CCH, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>;
- R<sup>17</sup> é C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> alquila ou C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> alquenila incluindo CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CCH, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>;
- R<sup>18</sup> é N, CF, CCl, CBr, Cl, CR<sup>19</sup>, CSR<sup>19</sup>, ou COR<sup>19</sup>;
- 20 R<sup>19</sup> é H, C<sub>1</sub> - C<sub>9</sub> alquila, C<sub>2</sub> - C<sub>9</sub> alquenila, C<sub>2</sub> - C<sub>9</sub> alquinila, C<sub>1</sub> - C<sub>9</sub> alquil-C<sub>1</sub> - C<sub>9</sub> alcóxi, ou C<sub>7</sub> - C<sub>9</sub> aril-alquila não substituída ou substituída por OH, F, Cl, Br, ou I, R<sup>19</sup> portanto incluindo -CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CHCH<sub>2</sub>, -CHCHBr, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>CCH, -CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH<sub>2</sub>OCCH, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCCH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>, e
- 25 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>;

- $R^{20}$  é N ou CH;  
 $R^{21}$  é N, CH, CCN, CCF<sub>3</sub>, CC≡CH ou CC(O)NH<sub>2</sub>;  
 $R^{22}$  é H, OH, NH<sub>2</sub>, SH, SCH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>CCH, SCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>, SC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, NH(CH<sub>3</sub>), N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH(CH<sub>2</sub>CCH), NH(CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), NH(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>), halogênio (F, Cl, Br, ou I) ou X onde X é  $-(CH_2)_m(O)_n(CH_2)_mN(R^{10})_2$  onde cada m é independentemente 0 - 2, n é 0 - 1, e
- $R^{10}$  independentemente é H,
- $C_1 - C_{15}$  alquila,  $C_2 - C_{15}$  alquenila,  $C_6 - C_{15}$  arilalquenila,  $C_6 - C_{15}$  arilalquinila,  $C_2 - C_{15}$  alquinila,  $C_1 - C_6$ -alquilamino- $C_1 - C_6$  alquila,  $C_5 - C_{15}$  aralquila,  $C_6 - C_{15}$  heteroaralquila,  $C_5 - C_6$  arila,  $C_2 - C_6$  heterocicloalquila,  $C_2 - C_{15}$  alquila,  $C_3 - C_{15}$  alquenila,  $C_6 - C_{15}$  arilalquenila,  $C_3 - C_{15}$  alquinila,  $C_7 - C_{15}$  arilalquinila,  $C_1 - C_6$ -alquilamino- $C_1 - C_6$  alquila,  $C_5 - C_{15}$  aralquila,  $C_6 - C_{15}$  heteroalquila,  $C_3 - C_6$  heterocicloalquila onde metileno na porção alquila não-adjacente a N<sup>6</sup> foi substituída por -O-,
- opcionalmente ambos  $R^{10}$  são unidos com N para formar um heterociclo de  $C_2 - C_5$  saturada ou não-saturada contendo um ou dois heteroátomos N e opcionalmente um heteroátomo S ou O adicional,
- ou um dos grupos  $R^{10}$  anteriores que é substituído por 1 a 3 halo, CN ou N<sub>3</sub>; porém opcionalmente pelo menos um grupo  $R^{10}$  não é H;
- $R^{23}$  é H, OH, F, Cl, Br, I, SCH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, SCH<sub>2</sub>CCH, SCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>, SC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, OR<sup>16</sup>, NH<sub>2</sub>, NHR<sup>17</sup> ou R<sup>22</sup>; e
- $R^{24}$  é O, S ou Se.
- B da mesma forma inclui igualmente as bases heterocíclicas protegidas ou não-protegidas, particularmente bases de pirimidina e purina. Os grupos de proteção para aminas exocíclicas e outros grupos lábeis são conhecidos (Greene e outros. "Protective Groups in Organic Synthesis") e incluem N-benzoíla, isobutirila, 4,4'-dimetoxitritila (DMT) e outros. A seleção do grupo de proteção será evidente para o versado na técnica e depende da natureza do grupo lábil e da química que o grupo de proteção é esperado encontrar, por exemplo ácido, básico, oxidativo, redutivo ou outras condi-

ções. Espécies protegidas exemplares são N<sup>4</sup>-benzoilcitosina, N<sup>6</sup>-benzoiladenina, N<sup>2</sup>-isobutirilguanina e outros.

Bases protegidas tem as fórmulas Xa.1, XIa.1, XIb.1, XIIa.1 ou XIIIa.1



5 onde R<sup>18</sup>, R<sup>20</sup>, R<sup>21</sup>, R<sup>24</sup> tem os significados previamente definidos; R<sup>22A</sup> é R<sup>39</sup> ou R<sup>22</sup> contanto que R<sup>22</sup> não seja NH<sub>2</sub>; R<sup>23A</sup> é R<sup>39</sup> ou R<sup>23</sup> contanto que R<sup>23</sup> não seja NH<sub>2</sub>; R<sup>39</sup> é NHR<sup>40</sup>, NHC(O)R<sup>36</sup> ou CR<sup>41</sup>N(R<sup>38</sup>)<sub>2</sub> onde R<sup>36</sup> é C<sub>1</sub> - C<sub>19</sub> alquila, C<sub>1</sub> - C<sub>19</sub> alquenila, C<sub>3</sub> - C<sub>10</sub> arila, adamantóila, alquilanila, ou C<sub>3</sub> - C<sub>10</sub> arila substituída por 1 ou 2 átomos ou grupos selecionados de halogênio, metila, etila, metóxi, etóxi, hidróxi e ciano; R<sup>38</sup> é C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub> alquila, ou ambos R<sup>38</sup> juntos são 1-morfolino, 1-piperidina ou 1-pirrolidina; R<sup>40</sup> é C<sub>1</sub> - C<sub>1a</sub> alquila, incluindo metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutyla, t-butyla, pentila, hexila, octila, e decanila,; e R<sup>41</sup> é hidrogênio ou CH<sub>3</sub>.

10

15 Para bases de estruturas XIa.1 e XIb.1, se R<sup>39</sup> está presente em R<sup>22A</sup> ou R<sup>23A</sup>, ambos os grupos R<sup>39</sup> na mesma base geralmente serão os mesmos. R<sup>36</sup> exemplares são fenila, fenila substituída por um dos substituintes de arila de R<sup>36</sup> anteriores, -C<sub>10</sub>H<sub>15</sub> (onde C<sub>10</sub>H<sub>15</sub> é 2-adamantoíla), -CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, metila, butila, t-butyla, heptanila, nonanila, undecanila, ou undecenila.

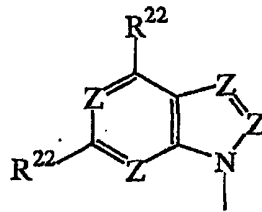
20 Bases específicas incluem hipoxantina, guanina, adenina, citosina, inosina, timina, uracila, xantina, derivados de 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina e xantina; derivados de 7-deaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina e xantina; derivados de 1-deaza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina e xantina; derivados de 7-deaza de 2-

25

aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina e xantina; derivados de 3-deaza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina e xantina; 6-azacitosina; 5-fluorocitosina; 5-clorocitosina; 5-iodocitosina; 5-bromocitosina; 5-metilcitosina; 5-bromoviniluracila; 5-fluorouracila; 5-clorouracila; 5-iodouracila; 5-bromouracila; 5-trifluorometiluracila; 5-metoximetiluracila; 5-etiniluracila e 5-propiniluracila.

Preferivelmente, B é um resíduo de 9-purinila selecionado de guanila, 3-deazaguanila, 1-deazaguanila, 8-azaguanila, 7-deazaguanila, adenila, 3-dezaadenila, 1-dezaadenila, 8-azaadenila, 7-dezaadenila, 2,6-diaminopurinila, 2-aminopurinila, 6-cloro-2-aminopurinila e 6-tio-2-aminopurinila, ou um B' é um resíduo de 1-pirimidinila selecionado de citosinila, 5-halocitosinila, e 5-(C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>-alquil)citosinila.

Grupos preferidos tem a fórmula



15 onde

R<sup>22</sup> independentemente é halo, oxigênio, NH<sub>2</sub>, X ou H, porém opcionalmente pelo menos um R<sup>22</sup> é X;

X é -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(O)<sub>n</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub> onde cada m é 0 - 2, n é 0 - 1, e

R<sup>10</sup> independentemente é

20

H,

C<sub>1</sub> - C<sub>15</sub> alquila, C<sub>2</sub> - C<sub>15</sub> alquenila, C<sub>6</sub> - C<sub>15</sub> arilalquenila, C<sub>6</sub> - C<sub>15</sub> arilalquinila, C<sub>2</sub> - C<sub>15</sub> alquinila, C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>-alquilamino-C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> alquila, C<sub>5</sub> - C<sub>15</sub> aralquila, C<sub>6</sub> - C<sub>15</sub> heteroaralquila, C<sub>5</sub> - C<sub>6</sub> arila, C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> heterocicloalquila,

C<sub>2</sub> - C<sub>15</sub> alquila, C<sub>3</sub> - C<sub>15</sub> alquenila, C<sub>6</sub> - C<sub>15</sub> arilalquenila, C<sub>3</sub> - C<sub>15</sub> alquinila, C<sub>7</sub> - C<sub>15</sub> arilalquinila, C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>-alquilamino-C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> alquila, C<sub>5</sub> - C<sub>15</sub> aralquila, C<sub>6</sub> - C<sub>15</sub> heteroalquila ou C<sub>3</sub> - C<sub>6</sub> heterocicloalquila onde metileno na porção alquila não-adjacente a N<sup>6</sup> foi substituída por -O-,

25

opcionalmente igualmente R<sup>10</sup> são unidos com N para formar um

heterociclo de C<sub>2</sub> - C<sub>5</sub> saturado ou não-saturado contendo um ou dois heteroátomos N e opcionalmente um heteroátomo S ou O adicional,

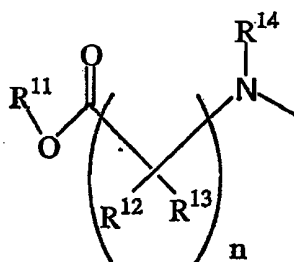
ou um dos grupos R<sup>10</sup> anteriores é substituído por 1 a 3 halo, CN ou N<sub>3</sub>; porém opcionalmente pelo menos um grupo R<sup>10</sup> não é H; e

5 Z é N ou CH, contanto que o núcleo heterocíclico varie de purina por não mais do que um Z.

Os grupos E representam os aglicons empregados nos análogos de nucleotídeo de metoxifosfonato. Preferivelmente, o grupo E é -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>- ou -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. Da mesma forma, é preferido que os grupos laterais em centros quirais no aglicon estejam substancialmente somente na configuração (R) (exceto para hidroximetila, que é o enantiômero enriquecido (S)).

R<sup>1</sup> é um oxiéster hidrolisável *in vivo* tendo a estrutura -OR<sup>35</sup> ou -OR<sup>6</sup> onde R<sup>35</sup> é definido na coluna 64, linha 49 da patente U.S. de Nº 15 5.798.340, aqui incorporado por referência, e R<sup>6</sup> é acima definido. Preferivelmente R<sup>1</sup> é arilóxi, fenóxi ordinariamente não substituído ou para-substituído (como definido em R<sup>6</sup>).

R<sup>2</sup> é um resíduo de aminoácido, opcionalmente contanto que qualquer grupo de carbóxi ligado por menos do que cerca de 5 átomos ao N de amidato seja esterificada. R<sup>2</sup> tipicamente tem a estrutura



(8)

onde

n é 1 ou 2;

R<sup>11</sup> é R<sup>6</sup> ou H; preferivelmente R<sup>6</sup> = C<sub>3</sub> - C<sub>9</sub> alquila; C<sub>3</sub> - C<sub>9</sub> alquila substituída independentemente com OH, halogênio, O ou N; C<sub>3</sub> - C<sub>6</sub> arila; C<sub>3</sub> - C<sub>6</sub> arila que é independentemente substituído com OH, halogênio, O ou N; ou C<sub>3</sub> - C<sub>6</sub> que é independentemente

25

- substituída com OH, halogênio, O ou N;
- 5  $R^{12}$  independentemente é H ou  $C_1 - C_9$  alquila que é não-substituída ou substituída por substituintes independentemente selecionados do grupo consistindo em OH, O, N,  $COOR^{11}$  e halogênio;  $C_3 - C_6$  arila que é não-substituída ou substituída por substituintes independentemente selecionados do grupo consistindo em OH, O, N,  $COOR^{11}$  e halogênio; ou  $C_3 - C_9$  aril-alquila que é não-substituída ou substituída por substituintes independentemente selecionados do grupo consistindo em OH, O, N,  $COOR^{11}$  e halogênio;
- 10  $R^{13}$  independentemente é  $C(O)-OR^{11}$ ; amino; amida; guanidinila; imidazolila; indolila; sulfóxido; fosforila;  $C_1-C_3$ -alquilamino,  $C_1 - C_3$  alquildiamino;  $C_1 - C_6$  alquenilamino; hidróxi; tiol;  $C_1 - C_3$  alcóxi;  $C_1 - C_3$  alquitol;  $(CH_2)_nCOOR^{11}$ ;  $C_1 - C_6$  alquila que é não-substituído ou substituído com OH, halogênio, SH,  $NH_2$ , fenila, hidroxifenila ou  $C_7 - C_{10}$  alcoxifenila;  $C_2 - C_6$  alquenila que é não-substituído ou substituído com OH, halogênio, SH,  $NH_2$ , fenila, hidroxifenila ou  $C_7 - C_{10}$  alcoxifenila; e  $C_6 - C_{12}$  arila que é não-substituída ou substituída com OH, halogênio, SH,  $NH_2$ , fenila, hidroxifenila ou  $C_7 - C_{10}$  alcoxifenila; e
- 20  $R^{14}$  é H ou  $C_1 - C_9$  alquila ou  $C_1 - C_9$  alquila independentemente substituída com OH, halogênio,  $COOR^{11}$ , O ou N;  $C_3 - C_6$  arila;  $C_3 - C_6$  arila que é independentemente substituída com OH, halogênio,  $COOR^{11}$ , O ou N; ou  $C_3 - C_6$  arilalquila que é independentemente substituída com OH, halogênio,  $COOR^{11}$ , O ou N .
- 25 Preferivelmente,  $R^{11}$  é  $C_1 - C_6$  alquila, mais preferivelmente isopropila,  $R^{13}$  é a cadeia lateral de um aminoácido de ocorrência natural,  $n = 1$ ,  $R^{12}$  é H e  $R^{14}$  é H. No composto de estrutura (2), a invenção inclui metabólitos nos quais os ésteres de isopropila e fenóxi foram hidrolisados em
- 30 -OH. Similarmente, os metabólitos de fosfonoamidato enriquecido desesterificado dos compostos (5a), 5(b) e (6) são incluídos dentro do escopo desta invenção.

Arila e a substituição de "O" ou "N" são definidos na coluna 16, linhas 42 - 58, da Patente U.S. Nº 5.798.340.

Tipicamente, os aminoácidos estão em estado natural ou L aminoácidos. Os exemplos específicos adequados são mencionados na Patente U.S. Nº 5.798.340, por exemplo Tabela 4 e col. 8 - 10 da mesma.

Alquila como aqui empregado, a menos que estabelecido ao contrário, é um hidrocarboneto normal, secundário, terciário ou cíclico. A menos que estabelecido ao contrário a alquila é C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>. Exemplos são

5 -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  
 10 -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,  
 -CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  
 -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,  
 -CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,  
 -CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  
 15 -CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, e -CH(CH<sub>3</sub>)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Alquenila e alquinila são definidos no mesmo estilo, porém contém pelo menos uma ligação dupla ou tripla, respectivamente.

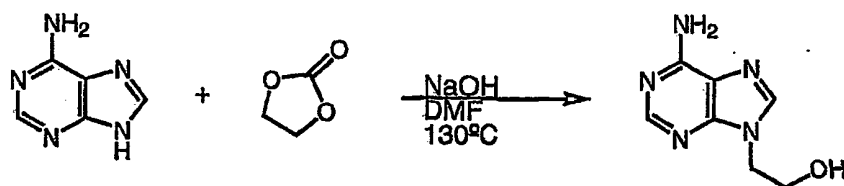
Onde os grupos de enol ou ceto são descritos, os tautômeros correspondentes devem ser construídos como ensinado também.

20 Os compostos de pró-droga desta invenção são fornecidos na forma de base livre ou os vários sais enumerados na Patente U.S. Nº 5.798.340, e são formulados com excipientes farmacologicamente aceitáveis ou diluentes de solvação para uso como produtos farmacêuticos também como mencionado na Patente U.S. Nº 5.798.340. Estas pró-drogas têm as

25 utilidades antivirais já estabelecidas para as drogas origem (veja a Patente U.S. Nº 5.798.340 e outras citações referentes aos análogos de nucleotídeo de metoxifosfonato). Será entendido que o diastereômero de estrutura (4) pelo menos é útil como um intermediário na produção química da droga origem por hidrólise *in vitro*, independente de seu caráter relativamente não-

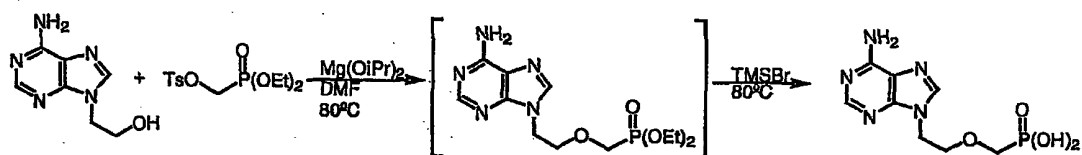
30 seletivo como descrito nos estudos inclusos.

A invenção será mais totalmente entendida por referência aos seguintes exemplos :

Exemplo 1aAdenina para PMEAs empregando-se Isopropóxido de Magnésio.

A uma suspensão de adenina (16,8 g, 0,124 mol) em DMF (41,9 ml) foi adicionado carbonato de etileno (12,1 g, 0,137 mol) e hidróxido de sódio (100 g, 0,0025 mol). A mistura foi aquecida a 130°C durante a noite. A reação foi resfriada para baixo de 50°C e tolueno (62,1 ml) foi adicionado. A pasta fluida foi também resfriada para 5°C durante 2 horas, filtrada, e enxaguada com tolueno ( 2 vezes). O sólido úmido foi seco em vácuo a 65°C para produzir 20,0 g (90%) de 9-(2-hidroxi-etil)adenina como um sólido esbranquiçado.

10 Ponto de fusão : 238 a 240°C .



9-(2-Hidroxi-etil)adenina (HEA) (20,0 g, 0,112 mol) foi suspenso em DMF (125 ml) e aquecido para 80°C. Isopropóxido de magnésio (11,2 g, 0,0784 mol), ou alternativamente t-butóxido de magnésio, foi adicionado à mistura seguido por *p*-toluenossulfoniloximetilfosfonato de dietila (66,0 g, 0,162 mol) durante uma hora. A mistura foi agitada a 80°C durante 7 horas. 30 ml de voláteis foram removidos por meio de destilação a vácuo e a reação foi recarregada com 30 ml de DMF fresco. Após o resfriamento para a temperatura ambiente, bromotrimetilsilano (69,6 g, 0,450 mol) foi adicionado e a mistura aquecida para 80°C durante 6 horas. A reação foi concentrada para produzir uma goma espessa. A goma foi dissolvida em 360 ml de água, extraída com 120 ml de diclorometano, ajustada pra pH 3,2 com hidróxido de sódio, e a pasta fluida resultante agitada em temperatura ambiente durante a noite. A pasta fluida foi resfriada para 4°C durante uma hora. Os sólidos foram isolados por filtragem, lavados com água (2 vezes), e secos em vácuo em 56°C para produzir 20 g (65,4%) de 9-[2-(fosfonometoxi)-]

15

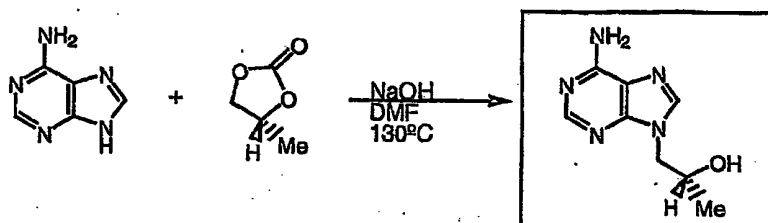
20

25

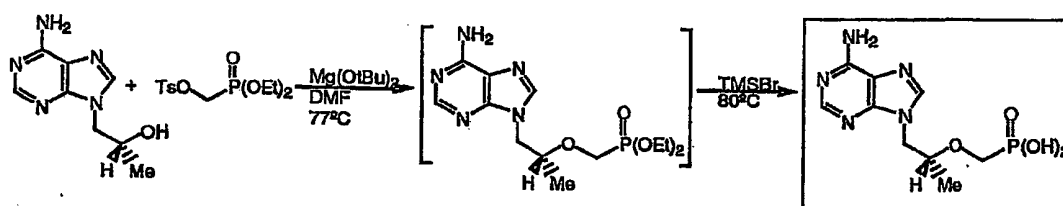


etil]adenina (PMEA) como um sólido branco. Ponto de fusão: > 200°C dec.  
 $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) • 3,49 (t, 2H); 3,94 (t, 2H); 4,39 (t, 2H); 8,13 (s, 1H); 8,22 (s, 1H).

### Exemplo 1b



5                    Adenina em PMPA empregando t-Butóxido de Magnésio. Em uma suspensão de adenina (40 g, 0,296 mol) em DMF (41,9 ml) foi adicionado carbonato de (*R*)-propileno (34,5 g, 0,338 mol) e hidróxido de sódio (480 g, 0,012 mol). A mistura foi aquecida em 130°C durante a noite. A reação foi resfriada em 100°C e tolueno (138 ml) foi adicionado seguido por  
 10 ácido metanossulfônico (4,7 g, 0,049 mol) ao mesmo tempo que mantendo a temperatura de reação entre 100 - 110°C. Tolueno adicional (114 ml) foi adicionado para criar uma solução homogênea. A solução foi resfriada em 3°C durante 7 horas e em seguida sustentados em 3°C durante uma hora. O sólido resultante foi isolado por filtração e enxagüado com acetona (2x). O  
 15 sólido úmido foi seco *in vacuo* em 80°C para produzir 42,6 g (75%) de (*R*)-9-[2-(hidróxi)propil]adenina (HPA) como um sólido esbranquiçado. Ponto de fusão: 188 - 190°C.



(*R*)-9-[2-(hidróxi)propil]adenina (HPA) (20,0 g, 0,104 mol) foi suspensa em DMF (44,5 ml) e aquecida em 65°C. t-Butóxido de magnésio (14,2 g, 0,083 mol), ou alternativamente isopropóxido de magnésio, foi adicionado à mistura durante uma hora seguido por *p*-toluenossulfoniloximetilfosfonato de dietila (66,0 g, 0,205 mol) durante duas horas ao mesmo tempo que a temperatura foi mantida em 78°C. A mistura foi agitada em 75°C du-

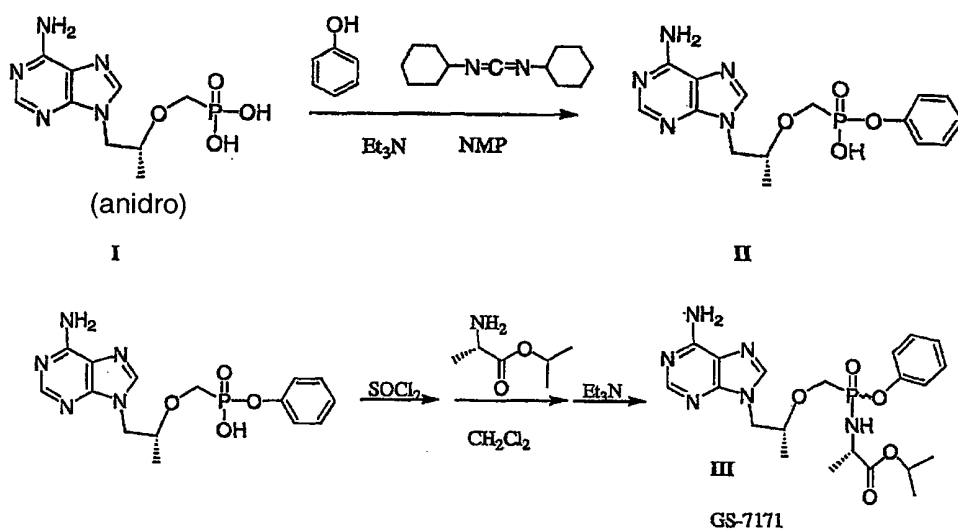
rante 4 horas. Após o resfriamento abaixo de 50°C, bromotrimetilsilano (73,9 g, 0,478 mol) foi adicionado e a mistura aquecida em 77°C durante 3 horas. Quando completa, a reação foi aquecida em 80°C e os voláteis foram removidos por meio de destilação atmosférica. O resíduo foi dissolvido em água (120 ml) em 50°C e em seguida extraído com acetato de etila (101 ml). O pH da fase aquosa foi ajustado para pH de 1,1 com hidróxido de sódio, semeado com (*R*)-PMPA, e o pH da camada aquosa foi reajustado para pH de 2,1 com hidróxido de sódio. A pasta fluida resultante foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. A suspensão foi resfriada em 4°C durante três horas. O sólido foi isolado por filtração, lavado com água (60 ml), e seco em vácuo em 50°C para produzir 18,9 g (63,5%) de (*R*)-9-[2-(fosfonometóxi)propil]adenina bruta (PMPA) como um sólido esbranquiçado.

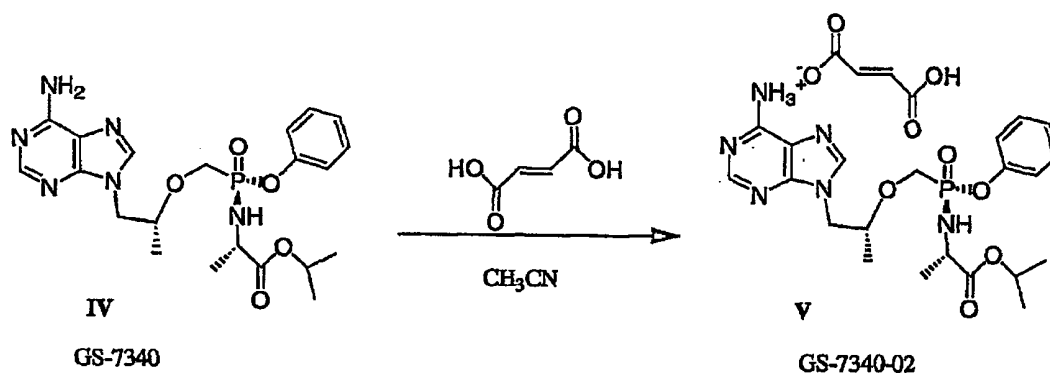
(*R*)-9[2-(fosfonometóxi)propil]adenina bruta foi aquecida em refluxo em água (255 ml) até todos os sólidos dissolvidos. A solução foi resfriada em temperatura ambiente durante 4 horas. A pasta fluida resultante foi resfriada em 4°C durante três horas. O sólido foi isolado pr filtração, lavado com água (56 ml) e acetona (56 ml) e seco *in vacuo* em 50°C para produzir 15,0 g (50,4%) de (*R*)-9[2-(fosfonometóxi)propil]adenina (PMPA) como um sólido branco. Ponto de fusão: 278 - 280°C.

## 20 Exemplo 2

### Preparação de GS-7171 (III)

#### Esquema 1





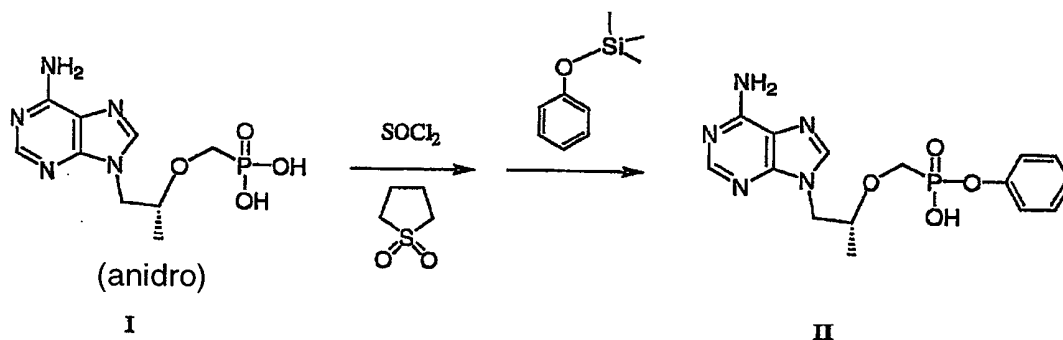
Um reator alinhado de vidro foi carregado com PMPA anidra, (I) (14,6 kg, 50,8 moles), fenol (9,6 kg, 102 moles), e 1-metil-2-pirrolidinona (39 kg). A mistura foi aquecida em 85°C e trietilamina (6,3 kg, 62,3 moles) foi adicionada. Uma solução de 1,3-dicicloexilcarbodiimida (17,1 kg, 82,9 moles) em 1-metil-2-pirrolidona (1,6 kg) foi em seguida adicionada durante 6 horas em 100°C. O aquecimento foi prosseguido durante 16 horas. A reação foi resfriada em 45°C, água (29 kg) adicionada, e resfriada em 25°C. Os sólidos foram removidos da reação por filtração e enxaguados com água (15,3 kg). O filtrado combinado e enxaguado foi concentrado em uma pasta fluida castanha sob ressonância reduzida, água (24,6 kg) adicionada, e ajustada para pH = 11 com NaOH (25% em água). Os finos foram removidos por filtragem através de terra diatomácea (2 kg) seguidos por um enxágüe com água (4,4 kg). O filtrado combinado e enxaguado foi extraído com acetato de etila (28 kg). A solução aquosa foi ajustada para pH = 3,1 com HCl (37% em água) (4 kg). O bruto II foi isolado por filtração e lavado com metanol (12,7 kg). A torta úmida bruta II foi fluidizada em pasta em metanol (58 kg). Os sólidos foram isolados por filtração, lavados com metanol (8,5 kg), e secos sob pressão reduzida para produzir 9,33 kg de II como um pó branco: <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O) δ 1,2 (d, 3H), 3,45 (q, 2H), 3,7 (q, 2H), 4 (m, 2H), 4,2 (q, 2H), 4,35 (dd, 2H), 6,6 (d, 2H), 7 (t, 1H), 7,15 (t, 2H), 8,15 (s, 1H), 8,2 (s, 1H); <sup>31</sup>P RMN (D<sub>2</sub>O) δ 15,0 (desacoplado).

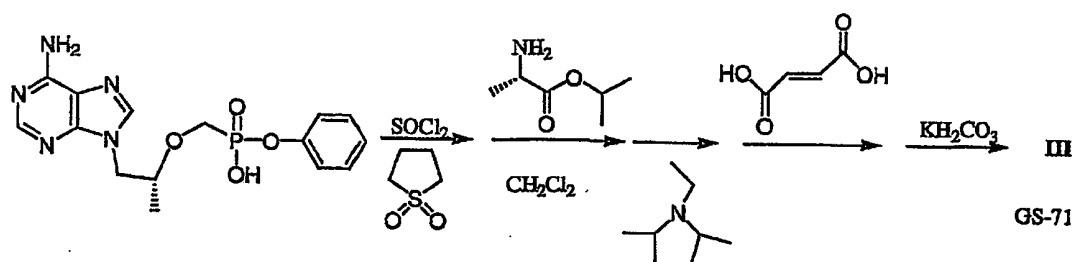
GS-7171 (III). (Esquema 1) Um reator alinhado de vidro foi carregado com PMPA de monofenila, (II), (9,12 kg, 25,1 moles) e acetonitrila (30,7 kg). Cloreto de tionila (6,57 kg, 56,7 moles) foi adicionado abaixo de 50°C. A mistura foi aquecida em 75°C até os sólidos dissolvidos. A tempe-

ratura de reação foi aumentada para 80°C e os voláteis (11,4 kg) coletados por destilação atmosférica sob nitrogênio. O resíduo de pote foi resfriado em 25°C, diclorometano (41 kg) adicionado, e resfriado em -29°C. Uma solução de isopropil éster de (L)-alanina (7,1 kg, 54,4 moles) em diclorometano (36 kg) foi adicionada durante 60 minutos e, -18°C seguido por trietilamina (7,66 kg, 75,7 moles) durante 30 minutos em -18°C a -11°C. A mistura de reação foi aquecida para temperatura ambiente e lavada cinco vezes com solução de diidrogenofosfato de sódio (10% em água, 15,7 cada lavagem). A solução orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (18,2 kg), filtrada, enxaguada com diclorometano (28 kg), e concentrada em um óleo sob pressão reduzida. Acetona (20 kg) foi carregada para o óleo e a mistura concentrada sob pressão reduzida. Acetona (18,8 kg) foi carregada para o óleo resultante. A metade da solução do produto foi purificada por cromatografia durante um leito de 38 x 38 cm de 22 kg de sílica-gel 60, 230 a 400 mesh. A coluna foi eluída com 480 kg de acetona. A purificação foi repetida na segunda metade do óleo empregando acetona e sílica-gel fresca. As frações suportando o produto limpo foram concentradas sob pressão reduzida em um óleo. Acetonitrila (19,6 kg) foi carregada ao óleo e a mistura concentrada sob pressão reduzida. Acetonitrila (66,4 kg) foi carregada e a solução esfriada em 0 a -5°C durante 16 horas. Os sólidos foram removidos por filtração e o filtrado concentrado sob pressão reduzida em 5,6 kg de III como um óleo escuro: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) 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); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,0, 22,5 (desacoplado).

## 25 Método Alternado para GS-7171 (III)

### Esquema 2





PMPA de Monofenila (II). Um frasco de base circular com condensador de refluxo e entrada de nitrogênio foi colocado em um banho de óleo a 70°C. O frasco foi carregado com PMPA (I) anidro (19,2 g, 67 mmoles), *N,N*-dimetilformamida (0,29 g, 3,3 mmoles), e sulfona de tetrametileno (40 mL). Cloreto de tionila (14,2 g, 119 mmoles) foi adicionado durante 4 horas. O aquecimento foi aumentado para 100°C durante o mesmo tempo. Uma solução homogênea resultou. Fenoxitrimetilsilano (11,7 g, 70 mmoles) foi adicionado à solução durante 5 minutos. O aquecimento no banho de óleo a 100°C continuou durante mais duas horas. A reação foi derramada em acetona agitando rapidamente (400 mL) com resfriamento a 0°C. Os sólidos foram isolados por filtragem, secos sob pressão reduzida, e dissolvidos em metanol (75 mL). O pH da solução foi ajustado para 3,0 com solução de hidróxido de potássio (45% aq.) com resfriamento em gelo/água. Os sólidos resultantes foram isolados por filtragem, enxaguados com metanol, e secos sob pressão reduzida para 20,4 g II (Esquema 2) como um pó branco.

GS-7171 (III). PMPA de Monofenila (II) (3 g, 8,3 mmoles), sulfona de tetrametileno (5 mL), e *N,N*-dimetilformamida (1 gota) foram combinados em um frasco de base circular em um banho de óleo a 40°C. Cloreto de tionila (1,96 g, 16,5 mmoles) foi adicionado. Após 20 minutos, a solução clara foi removida do aquecimento, diluída com diclorometano (10 ml), e adicionada a uma solução de isopropil éster de (L)-alanina (5 g, 33 mmoles) e diisopropiletilamina (5,33 g, 41 mmoles) em diclorometano (20 mL) a -10°C. A mistura de reação foi aquecida para a temperatura ambiente e lavada três vezes com solução de dihidrogenofosfato de sódio (10% aq., 10 mL de cada lavagem). A solução orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida para um óleo. O óleo foi combinado com ácido fumárico (0,77 g, 6,6 mmoles) e acetonitrila (40 mL) e aquecido ao refluxo

para produzir uma solução homogênea. A solução foi resfriada em um banho de gelo e os sólidos isolados por filtração. O sal de fumarato de GS-7171 sólido foi seco sob pressão reduzida a 3,7 g. O sal (3,16 g, 5,3 mmol) foi suspenso em diclorometano (30 mL) e agitado com solução de carbonato de potássio (5 mL, 2,5 M em água) até o sólido ser dissolvido. A camada orgânica foi isolada, em seguida, lavada com água (5 mL), seca em sulfato de sódio anidro, e concentrada sob pressão reduzida para proporcionar 2,4 g de III como uma espuma castanha.

### Exemplo 3

#### 10 A . Separação diastereômica por Cromatografia de Eluição de Batelada.

Os diastereômeros de GS-7171 (III) foram resolvidos por cromatografia de eluição de batelada empregando-se uma coluna HPLC semi-preparativa, de 21 x 250 mm, 20  $\mu$ m, Chiralpak AS comercialmente disponível com uma coluna protetora de 21 x 50 mm, 20  $\mu$ m, Chiralpak AS. A Chiralpak® AS é um material de embalagem patenteado fabricado pela Dia-

15 cel e vendido na América do Norte pela Chiral Technologies, Inc. (as Patentes U.S. N<sup>os</sup> 5.202.433, RE 35.919, 5.434.298, 5.434.299 e 5.498.752). A Chiralpak AS é uma fase estacionária quiral (CSP) compreendida de amiloretis[carbamato de (S)- $\alpha$ -metilbenzila] revestida sobre um suporte de sílica-

20 gel.

A mistura diastereomérica de GS-7171 foi dissolvida em fase móvel, e alíquotas de aproximadamente 1 g de GS-7171 foram bombeadas sobre o sistema cromatográfico. O diastereômero indesejado, designado GS-7339, foi o primeiro pico amplo maior (aproximadamente 15 minutos de du-

25 ração) para eluir da coluna. Quando o pico de GS-7339 tiver terminado de eluir, a fase móvel foi imediatamente mudada para 100% de álcool de metila, que causou o diastereômero desejado, designado GS-7340 (IV), para eluir como um pico agudo da coluna com a dianteira de solvente de álcool de metila. O álcool de metila foi empregado para reduzir o tempo total do

30 ciclo. Após o primeiro par de injeções, ambos os diastereômeros foram coletados como uma fração grande única contendo um dos diastereômeros purificados (>99,0% de diastereômero único). Os solventes de fase móvel

foram removidos em vácuo para produzir o diastereômero purificado como uma espuma friável.

Em torno de 95% da massa de GS-7171 de partida foram recuperados nas duas frações de diastereômero. A fração de GS-7340 compre-  
5 endia 50% do total de massa recuperada .

As condições cromatográficas foram como segue :

	Fase Móvel (Inicial)	:	GS-7171-Acetonitrila	:	Álcool de Isopropila (90:10)
	Fase Móvel (Final)	:	100% de Álcool de metila		
10	Fluxo	:	10 mL/minuto		
	Tempo de Desempenho	:	Cerca de 45 minutos		
	Detecção	:	UV a 275 nm		
	Temperatura	:	Ambiente		
	Perfil de eluição	:	GS-7339 (diastereômero B)		
15		:	GS-7340 (diastereômero A; (IV))		

#### B. Separação Diastereômera de GS-7171 por Cromatografia de SMB

Para uma descrição geral de cromatografia de leito móvel simulada (SMB), veja Strube e outro, "Organic Process Research and Deve-  
20 lopment" 2:305 - 319 (1998).

GS-7340 (IV). GS-7171 (III), 2,8 kg, foi purificado por cromato-  
grafia de leito móvel simulada sobre leitos de 10 cm por 5 cm de empacota-  
mento (Chiral Technologies Inc., 20 micron Chiralpak AS revestida sobre  
sílica-gel) (1,2 kg). As colunas foram eluídas com 30% de metanol em ace-  
tonitrila. As frações suportando o produto foram concentradas em uma solu-  
25 ção de **IV** em acetonitrila (2,48 kg). A solução solidificou-se em uma massa  
cristalina úmida com acetonitrila em descanso. A massa cristalina foi seca  
sob pressão reduzida em um pó cristalino castanho, 1.301 kg de **IV**, 98,7%  
de pureza diastereomérica : ponto de fusão 117 - 120°C; <sup>1</sup>H- RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ  
1,15 (m, 12H), 3,7 (t, 1H), 4,0 (m, 5H), 4,2 (dd, 1H), 5,0 (m, 1H), 6,05 (s, 2H),  
30 7,1 (m, 5H), 8,0 (s, 1H), 8,2 (s, 1H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,0 (desacoplados)

#### C. Separação Diastereômera por RP-HPLC C18

GS-7171 (III) foi cromatografado por HPLC de fase reversa para

separar os diastereômeros empregando-se o seguinte protocolo resumo.

Coluna cromatográfica : Phenomenex Luna<sup>®</sup> C18(2), 5 µm, 100 Å de tamanho de poro, (Phenomenex, Torrance, CA), ou equivalente.

5 Coluna Protetora : Pellicular C18 (Alltech, Deerfield, IL), ou equivalente.

Fase Móvel : A - 0,02% (85% ) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em água : acetonitrilo (95:5)

B - 0,02% (85% ) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em água : acetonitrilo (50:50)

10 Gradiente de Fase Móvel :

Tempo	% de fase móvel A	% de fase móvel B
0	100	0
5	100	0
7	70	30
32	70	30
40	0	100
50	0	100

Tempo de Desempenho : 50 minutos

Atraso do Equilíbrio : 10 minutos a 100% de fase móvel A

Taxa de Fluxo : 1,2 mL/min

Temperatura : Ambiente

15 Detecção : UV a 260 nm

Solução de Amostra : 20 mM de tampão de fosfato de sódio, pH 6

Tempos de Retenção : GS-7339, em torno de 25 minutos

GS-7340, em torno de 27 minutos

#### D. Separação Diastereômera por Cristalização

20 GS-7340 (IV). Uma solução de GS-7171 (III) em acetonitrila foi concentrada para uma espuma âmbar (14,9 g) sob pressão reduzida. A espuma foi dissolvida em acetonitrila (20 mL) e semeada com um cristal de IV. A mistura foi agitada durante a noite, resfriada para 5°C, e os sólidos isolados por filtragem. Os sólidos foram secos para 2,3 g de IV como cristais,

25 98% de pureza diastereomérica (<sup>31</sup>P RMN): <sup>1</sup>H- RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 1,15 (m,



12H), 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), 5,0 (s, 1H), 8,2 (s, 1H);  $^1\text{P-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$  19,5 (desacoplado). A análise de cristal de raio X de um cristal único selecionado deste produto produziu os seguintes dados:

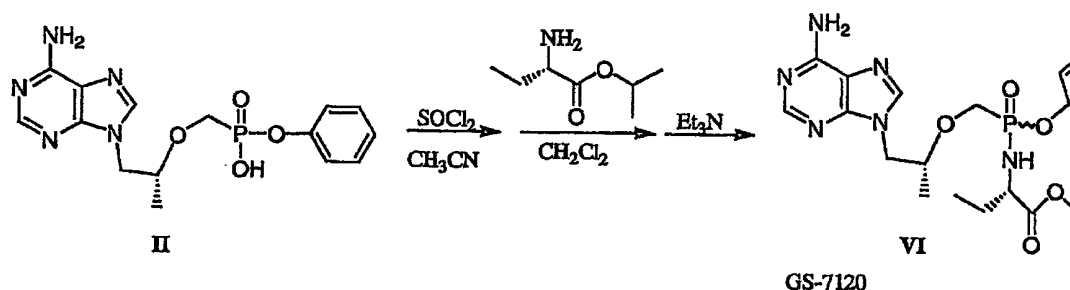
5	Cor cristal, Hábito	incolor, coluna
	Dimensões de cristal	0,25 x 0,12 x 0,08 mm
	Sistema Cristal	ortorrômbico
	Tipo Trelença	Primitivo
	Parâmetros de Trelença	a = 8.352(1) Å
10		b = 15.574(2) Å
		c = 18.253(2) Å
		V = 2374.2(5) Å <sup>3</sup>
	Grupo de Espaço	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> (nº 19)
	Valor Z	4
15	D <sub>calc</sub>	1.333 g/cm <sup>3</sup>
	F <sub>000</sub>	1008,00
	$\mu(\text{MoK } \alpha)$	1,60 cm <sup>-1</sup>

#### Exemplo 4

##### Preparação de Sal de Fumarato de GS-7340

20                    GS-7340-02 (V). (Esquema 1) Um reator revestido de vidro foi carregado com GS-7340 (**IV**), (1.294 kg, 2,71 moles), ácido fumárico (284 g, 2,44 moles), e acetonitrila (24,6 kg). A mistura foi aquecida ao refluxo para dissolver os sólidos, filtrada enquanto quente e resfriada para 5°C durante 16 horas. O produto foi isolado por filtragem, enxaguado com acetonitrila

25 (9,2 kg), e seco para 1329 g (**V**) como um pó branco: ponto de fusão 119,7 - 121,1°C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  - 41,7° (c 1,0, ácido acético).

Exemplo 5Preparação de GS-7120 (VI)Esquema 3

Um frasco de base circular de 5 litros foi carregado com PMPA  
 5 de monofenila, (II), (200 g, 0,55 mol) e acetonitrila (0,629 kg). Cloreto de  
 tionila (0,144 kg, 1,21 mol) foi adicionado abaixo de 27°C . A mistura foi  
 aquecida a 70°C até os sólidos dissolverem-se. Os voláteis (0,45 L) foram  
 removidos por destilação atmosférica sob nitrogênio. O resíduo de pote foi  
 resfriado para 25°C, diclorometano (1,6 kg) foi adicionado e a mistura foi  
 -10 resfriada para -20°C . Uma solução de éster de etila de ácido (L)- $\alpha$  amino-  
 butírico (0,144 kg, 1,1 mol) em diclorometano (1,33 kg) foi adicionada du-  
 rante 18 minutos a -20 a -10°C seguido por trietilamina (0,17 kg, 1,65 mol)  
 durante 15 minutos a -8 a -15°C. A mistura de reação foi aquecida para a  
 temperatura ambiente e lavada quatro vezes com solução de dihidrogeno-  
 15 fosfato (10% aq., 0,3 L cada lavagem). A solução orgânica foi seca com  
 sulfato de sódio anidro (0,5 kg) e filtrada. Os sólidos foram enxaguados com  
 diclorometano (0,6 kg) e o filtrado combinado e enxaguado foi concentrado  
 para um óleo sob pressão reduzida. O óleo foi purificado por cromatografia  
 20 sobre um leito de 15 x 13 cm de 1,2 kg de sílica-gel 60, 230 a 400 mesh. A  
 coluna foi eluída com um gradiente de diclorometano e metanol. As frações  
 transportando o produto foram concentradas sob pressão reduzida para  
 proporcionar 211 g de VI (Esquema 3) como uma espuma castanha.

Exemplo 5a

25 Separação Diastereômera de GS-7120 por Cromatografia de Eluição de  
Batelada.

A mistura diastereomérica foi purificada empregando-se as con-

dições descritas para **GS-7171** no Exemplo 3A exceto para o seguinte :

- Fase Móvel (Inicial) : GS-7120 - Acetonitrila : Álcool de Isopropila  
(98:2)
- Fase Móvel (Final) : 100% de Álcool de metila
- 5 Perfil de eluição : GS-7341 (diastereômero B)  
: GS-7342 (diastereômero A)

#### Exemplo 6

##### Separação Diastereômera de **GS-7120** por Cristalização

Um frasco de base circular de 1 litro foi carregado com PMPA de monofenila, (II), (50 g, 0,137 mol) e acetonitrila (0,2 L). Cloreto de tionila (0,036 kg, 0,303 mol) foi adicionado com uma exoterma a 10°C. A mistura foi aquecida ao refluxo até os sólidos dissolverem-se. Os voláteis (0,1 L) foram removidos por destilação atmosférica sob nitrogênio. O resíduo de pote foi resfriado a 25°C, diclorometano (0,2 kg) foi adicionado, e a mistura foi resfriada a -20°C. Uma solução de éster de etila de ácido (L)- $\alpha$  aminobutírico (0,036 kg, 0,275 mol) em diclorometano (0,67 kg) foi adicionada durante 30 minutos a -20 a -8°C seguido por trietilamina (0,042 kg, 0,41 mol) durante 10 minutos em até -6°C. A mistura de reação foi aquecida para a temperatura ambiente e lavada quatro vezes com solução de diidrogenofosfato de sódio (10% aq., 0,075 L cada lavagem). A solução orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (0,1 kg) e filtrada. Os sólidos foram enxaguados com acetato de etila (0,25 L, e o filtrado combinado e enxaguado foi concentrado em um óleo sob pressão reduzida. O óleo foi diluído com acetato de etila (0,25 L), semeado, agitado durante a noite, e resfriado para -15°C. Os sólidos foram isolados por filtragem e secos sob pressão reduzida para proporcionar 17,7 g de GS-7342(Tabela 5) como um pó castanho:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,95 (t, 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);  $^{31}\text{P}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (desacoplado).

#### 30 Exemplo 7

##### Separação Diastereômera de **GS-7097**.

A mistura diastereomérica foi purificada empregando-se as con-

dições descritas para **GS-7171** (Exemplo 3A) exceto para o seguinte :

- Fase Móvel (Inicial) : GS-7120 - Acetonitrila : Álcool de Isopropila  
(95:5)
- Fase Móvel (Final) : 100% de Álcool de metila
- 5 Perfil de eluição : GS-7115 (diastereômero B)  
: GS-7114 (diastereômero A)

### Exemplo 8

#### Procedimento Alternativo para a Preparação de **GS-7097**

GS-7097: PMPA de Fenila, Amidato de L-alanila de Etila. PMPA  
10 de Fenila (15,0 g, 41,3 mmoles), hidrocloreto de éster de etila de L-alanina  
(12,6 g, 83 mmoles) e trietilamina (11,5 mL, 83 mmoles) foram suspensos  
juntamente em 500 mL de piridina sob N<sub>2</sub> seco. Esta suspensão foi combi-  
nada com uma solução de trifenilfosfina (37,9 g, 145 mmoles), Aldritiol 2  
(2,2'-dissulfeto de dipiridila) (31,8 g, 145 mmoles), e 120 mL de piridina. A  
15 mistura foi aquecida em uma temperatura interna de 57°C durante 15 horas.  
A reação concluída foi concentrada sob vácuo para uma pasta amarela, 100  
g. A pasta foi purificada por cromatografia de coluna sobre um leito de 25 x  
11 cm de 1,1 kg de sílica-gel 60, 230 a 400 mesh. A coluna foi eluída com 8  
litros de metanol a 2% em diclorometano seguido por um gradiente linear  
20 durante um curso de eluente de 26 litros até uma composição final de 13%  
de metanol. As frações transportando o produto claro foram concentradas  
para produzir 12,4 g de (5) cru, 65% de teoria. Este material foi contaminado  
com cerca de 15% (peso) de hidrocloreto de trietilamina por <sup>1</sup>H RMN. A  
contaminação foi removida dissolvendo-se o produto em 350 mL de acetato  
25 de etila, extraindo-se com 20 mL de água, secando-se a solução orgânica  
sobre sulfato de sódio anidro, e concentrando-se para produzir 11,1 g de  
GS-7097 puro como um sólido branco, 58% de produção. O processo tam-  
bém é empregado para sintetizar a mistura diastereomérica de GS-7003a e  
GS-7003b (o amidato de fenilalanila) e a mistura de GS-7119 e GS-7335 (o  
30 amidato de glicila). Estes diastereômeros são separados empregando-se um  
procedimento de eluição em batelada, tal como mostrado no Exemplo 3A, 6  
e 7.

Exemplo 9Estudos *In Vitro* de Diastereômeros de Pró-droga

A atividade anti-HIV-1 *in vitro* e citotoxicidade em células MT-2 e estabilidade em plasma humano e extratos de célula MT-2 de GS-7340 (base livre) e fumarato de diisoproxila de tenofovir (TDF), são conhecidos na Tabela 1. A GS-7340 mostra um aumento de 10 vezes e atividade antiviral relativa a TDF e um aumento de 20 vezes em estabilidade de plasma. Esta estabilidade de plasma maior espera-se que resulte em maiores níveis de circulação de GS-7340 do que TDF após a administração oral.

10 Tabela 1. Atividade e Estabilidade *In Vitro*.

	Atividade HIV-1	Citotoxicidade	Estabilidade T 1/2 (min)		
	IC <sub>50</sub> <sub>μM</sub>	CC <sub>40</sub> <sub>μM</sub>	Plasma Humano	Extrato de Célula 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	--	--	--

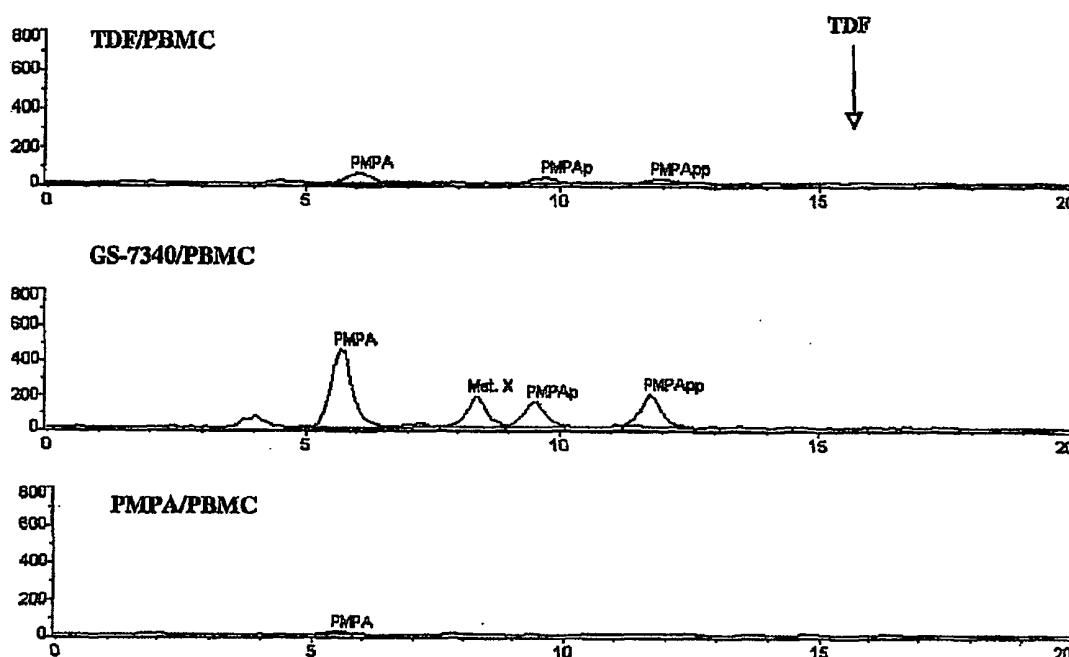
A fim de estimar o PMPA intracelular relativo resultante do metabolismo intracelular de TDF quando comparado àquele de GS-7340, igualmente as pró-drogas e PMPA foram radiorotulados e impedidos em contato com todo o sangue humano em concentrações equimolares. Após 1 hora, plasma, células vermelhas do sangue (RBCs) e células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isolados e analisados por HPLC com detecção radiométrica. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Após 1 hora, GS-7340 resulta em 10x e 30x a concentração intracelular total de espécies de PMPA em PBMCs quando comparado a TDF e PMPA, respectivamente. Em plasma após 1 hora, 84% da radioatividade é devido ao GS-7340 intacto, ao passo que nenhum TDF é detectado em 1 hora. Uma vez que nenhum TDF intacto é detectado em plasma, a diferença de 10x em 1 hora entre TDF e GS-7340 é a diferença mínima esperada *in vivo*. O cromatograma de HPLC para todos os três compostos em PBMCs é mostrado na Figura 1.

Tabela 2. Metabólitos de PMPA em Plasma, PBMCs e RBCs Após 1 hora de Incubação de Pró-drogas de PMPA ou PMPA em Sangue Humano.

Composto	Matriz	Total de C-14 recuperado, µg-eq	Metabólitos (% de Área de Pico Total)					
			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	-	-
	RBD/FP	12,6	8	-	-	24	11	57
			PMPA	PMPAp	PMPApp	Mono-POC	GS-4331	
GS-4331 (TDF) (60 µg-eq)	Plasma/FP	48,1	11	-	-	89	-	-
	PBMC	0,133	50	25	18	7	-	-
	RBC/FP	10,5	93	7,0	-	-	-	-
			PMPA	PMPAp	PMPApp			
PMPA (60 µg-eq)	Plasma/FP	55,7	100	-	-	-	-	-
	PBMC	0,033	86	14	-	-	-	-
	RBC/FP	3,72	74	10	16	-	-	-

Figura 1. Traços de HPLC/C-14 de Extratos de PBMC de Sangue Humano Incubados durante 1 hora a 37°C com TDF, GS-7340 ou PMPA .



Met. X e Met Y (metabólitos X e Y) são mostrados na Tabela 5. "p" em caixa baixa designa fosforilação. Estes resultados foram obtidos após 1 hora em sangue humano. Com tempo crescente, as diferenças *in vitro* são supostos aumentarem, uma vez que 84% de GS-7340 são também intactos em plasma após uma hora. Porque o GS-7340 intacto está presente em plasma após administração oral, a eficácia clínica relativa deve ser relacionada aos valores  $IC_{50}$  observados *in vitro*.

Na Tabela 3 abaixo, os valores  $IC_{50}$  de tenofovir, TDF, GS-7340, diversos nucleosídeos e o inibidor de protease nelfinavir são listados. Como mostrado, nelfinavir e GS-7340 são 2 a 3 ordens de magnitude mais potentes do que todos os outros nucleotídeos ou nucleosídeos.

Tabela 3. Atividades Anti-HIV-1 *In Vitro* de Compostos Antiretrovirais.

Composto	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
Adefovir (PMEA)	$13,4 \pm 4,2^1$
Tenofovir (PMPA)	$6,3 \pm 3,3^1$
AZT	$0,17 \pm 0,08^1$
3TC	$1,8 \pm 0,25^1$
d4T	$8 \pm 2,5^1$

Continuação

Composto	IC <sub>50</sub> (μM)
Nelfinavir	0,006 ± 0,002 <sup>1</sup>
TDF	0,05
GS 7340	0,005

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

Estudos adicionais da atividade anti-HIV-1 de cultura de célula *in vitro* e CC<sub>50</sub> de diastereômeros separados desta invenção foram conduzidos e os resultados tabulados abaixo.

5

Tabela 4. Efeito do Diastereômero

Composto	Diastereômero	IC <sub>50</sub> (μM)	Quantidade de alterações	Atividade A/B	CC <sub>50</sub> (μM)
PMPA	-	5	1x	-	6000
Ala-metiléster	Mistura 1:1	0,025	200x	20x	80
GS-6957a	A	0,0075	670x		
GS-6957b		0,15	33x		
Phe-metiléster	Mistura 1:1	0,03	170x	10x	60
GS-7003a	A	0,01	500x		
GS-7003b	B	0,1	50x		
Gly-etiléster	Mistura 1:1	0,5	10x	20x	
GS-7119	A	0,05	100x		>100
GS-7335	B	1,0	5x		
Ala-isopropila	Mistura 1:1	0,01	500x	12x	
GS-7340	A	0,005	1,000x		40
GS-7339	B	0,06	83x		>100
ABA-etila	Mistura 1:1	0,008	625x	7,5x	>100
GS-7342	A	0,004	1,250x		
GS-7341	B	0,03	170x		
Ala-etila	Mistura 1:1	0,02	250x	10x	60
GS-7114	A	0,005	1,000x		
GS-7115	B	0,05	100x		

Referência de Ensaio : Arimilli, MN, e outro, (1997) Synthesis, avaliação biológica *in vitro* e biodisponibilidade oral de pró-drogas de 9-[2-



(fosfonometóxi)propil]adenina (PMPA). Química e Quimioterapia Antiviral 8(6): 557 - 564.

"Phe-metiléster" é o monoamidato de metilfenilalaninila, monoéster de fenila de tenofovir; "gly-metiléster" é o monoamidato de metilglicila, monoéster de fenila de tenofonir .

Em cada caso acima, o isômero A é acreditado ter a mesma estereoquímica absoluta como GS-7340 (S), e o isômero B acredita-se ter a mesma estereoquímica absoluta que o GS-7339.

A estabilidade e metabolismo *in vitro* de diastereômeros separados foram determinados em PLCE, extrato de MT-2 e plasma humano. Uma amostra biológica listada abaixo, 80 µL, foi transferida para um tubo centrífugo de tampa de rosca e incubada a 37°C durante 5 minutos. Uma solução contendo 0,2 mg/µL do composto teste em um tampão adequado, 20 µL, foi adicionada à amostra biológica e misturada. A mistura de reação, 20 µL, foi imediatamente tirada uma amostra e misturada com 60 µL de metanol contendo 0,015 mg/mL de 2-hidroximetilnaftaleno como um padrão interno para análise de HPLC. A amostra foi tomada como a amostra tempo zero. Em seguida, em pontos específicos do tempo, a mistura de reação, 20 µL, foi tirada amostra e misturada com 60 µL de metanol contendo o padrão interno. A mistura desse modo obtida foi centrifugada a 15.000 G durante 5 minutos e o sobrenadante foi analisado com HPLC sob as condições abaixo descritas.

As amostras biológicas avaliadas são como segue :

- (1) PLCE (carboxiesterase de fígado porcino de Sigma, 160 u/mg de proteína, 21 mg de proteína/mL) diluído 20 vezes com PBS (solução salina tamponada por fosfato).
- (2) Extrato de célula MT-2 foi preparado de células MT-2 de acordo com o procedimento [A . Pompon, I. Lefebvre. J.- L. Imbach, S. Kahn, e D. Farquhar, "Antiviral Chemistry & Chemotherapy", 5: 91 - 98 (1994)] exceto para empregar o tampão HEPES descrito abaixo como o veículo.
- (3) Plasma Humano (plasma humano normal agrupado de George

King Biomedical Systems, Inc.)

Os sistemas de tampão empregados nos estudos são como segue.

No estudo para PLCE, o composto teste foi dissolvido em PBS.

- 5 PBS (solução salina tamponada por fosfato, Sigma) contém 0,01 M de fosfato, 0,0027 M de cloreto de potássio, e 0,137 M de cloreto de sódio, pH 7,4 a 37°C.

- 10 No estudo para extratos de célula MT-2, o composto teste foi dissolvido em tampão HEPES. O tampão HEPES contém 0,010 M de HEPES, 0,05 M de cloreto de potássio, 0,005 M de cloreto de magnésio, e 0,005 M de *dl*-ditiotreitól. PH 7,4 a 37°C.

- 15 No estudo para plasma humano, o composto teste foi dissolvido em TBS. TBS (solução salina tamponada por tris, Sigma) contém 0,05 M de Tris, 0,0027 M de cloreto de potássio, e 0,138 M de cloreto de sódio. PH 7,5 a 37°C.

A análise de HPLC foi realizada sob as seguintes condições:

- Coluna : Zorbax R<sub>x</sub>-C<sub>8</sub>, 4,6 x 250 mm, 5 μ  
(MAC-MOD Analytical, Inc. Chadds Ford, PA).
- 20 Detecção : UV a 260 nm
- Taxa de Fluxo : 1,0 mL/min
- Tempo de Desempenho : 30 minutos
- Volume de Injeção : 20 μL
- Temperatura de Coluna : Temperatura ambiente.
- 25 Fase Móvel A : 50 mM de fosfato de potássio (pH 6,0)/CH<sub>3</sub>CN  
= 95/5 (v/v)
- Fase Móvel B : 50 mM de fosfato de potássio (pH 6,0)/CH<sub>3</sub>CN  
= 50/50 (v/v)
- 30 Desempenho Gradiente : 0 min 100% de Fase móvel A  
25 min 100% de Fase móvel B  
30 min 100% de Fase móvel B

Os resultados são mostrados abaixo na Tabela 5 (também incluindo os dados de IC<sub>50</sub> selecionados da Tabela 4).

Tabela 5. Metabolismo *In Vitro* de Isômeros A e B de monoamidato de PMPA a 37°C.

Nº	Estrutura de monoamidato de PMPA	HIV IC <sub>50</sub> (µM)	Produto e taxa de hidrólise de PLCE	Produto e taxa de hidrólise de extrato de MT-2	Estabilidade de Plasma Humano (HP)
1	<p>Isômero A GS7114</p>	0,005	t <sub>1/2</sub> = 1,9 min Met.X & PMPA	t <sub>1/2</sub> = 2,9 min Met.X & PMPA	t <sub>1/2</sub> = 148 min Met.Y
2	<p>Isômero B GS7115</p>	0,05	t <sub>1/2</sub> = 8,0 min Met.X & PMPA	t <sub>1/2</sub> = 150,6 min Met.X & PMPA	t <sub>1/2</sub> = 495 min Met.Y
3	<p>Isômero A GS7340</p>	0,005	t <sub>1/2</sub> = 3,3 min Met.X & PMPA	t <sub>1/2</sub> = 28,3 min Met.X & PMPA	t <sub>1/2</sub> = 90,0 min Met.Y
4	<p>Isômero B GS7339</p>	0,06	t <sub>1/2</sub> = 10,1 min Met.X & PMPA	t <sub>1/2</sub> > 1000 min	t <sub>1/2</sub> = 231 min Met.Y
5	<p>Isômero A GS7342</p>	0,004	t <sub>1/2</sub> = 3,9 min Met.X	t <sub>1/2</sub> = 49,2 min Met.X & PMPA	t <sub>1/2</sub> = 103 min Met.Y
6	<p>Isômero B GS7341</p>	0,03	t <sub>1/2</sub> = 11,3 min Met.X	t <sub>1/2</sub> > 1000 min	t <sub>1/2</sub> = 257 min Met.Y
7	<p>GS4331</p>	0,05	t <sub>1/2</sub> < 0,14 min MonoPOC PMPA	t <sub>1/2</sub> = 70,7 min monoPOC PMPA	t <sub>1/2</sub> = 0,41 min mono-POC PMPA

Exemplo 10Exposição de PBMC e Plasma Seguindo Administração Oral de Diastereômeros de Pró-droga de Cães Beagles.

Os farmacocinéticos de GS 7340 foram estudados em cães após administração oral de uma dose de 10 mg-eq/kg.

Formulações. As pró-drogas foram formuladas como soluções em 50 mM de ácido cítrico dentro de 0,5 hora antes da dose. Todos os compostos empregados nos estudos foram sintetizados por Gilead Sciences. Os seguintes lotes foram empregados :

GSI	Aminoácido de Amidato	Éster de AA	Diastereoisômero	Número do Lote
GS-7340-2	Alanina	i-Propila	Isômero A	1504-187-19
GS-7339	Alanina	i-Propila	Isômero B	1509-185-31
GS7114	Alanina	Etila	Isômero A	1509-181-26
GS7115	Alanina	Etila	Isômero B	1509-181-22
GS7119	Glicina	Etila	Isômero A	1428-163-28
GS7342	Ácido $\alpha$ -Aminobutírico	Etila	Isômero A	1509-191-12
GS7341	Ácido $\alpha$ -Aminobutírico	Etila	Isômero B	1509-191-7

Administração de Dose e Coleção de Amostra. A fase em vida deste estudo foi conduzida de acordo com as recomendações do "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (publicação National Institutes of Health 86-23) e foi aprovada por um Institutional Animal Care e Use Committee. Os cães beagles macho em jejum ( $10 \pm 2$  kg) foram empregados para os estudos. Cada medicamento foi administrado como uma dose única por gavagem oral (1,5 - 2 ml/kg). A dose foi de 10 mg equivalentes de PMPA/kg. Para PBMCs, as amostras de sangue foram coletadas a 0 (pré-dose), 2, 8, e 24 horas após a dose. Para plasma, as amostras de sangue foram coletadas a 0 (pré-dose), 5, 15 e 30 minutos , e 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após a dose. O sangue (1,0 ml) foi processado imediatamente para plasma por centrifugação a 2,000 rpm durante 10 minutos. As amostras de plasma foram congeladas e mantidas a 70°C até serem analisadas.

Preparação de Célula Mononuclear de Sangue Periférico (PBMC). Todo o sangue (8 ml) retirado em pontos específicos do tempo foi

misturado em proporção igual com solução salina tamponada de fosfato (PBS), em camadas sobre 15 ml de solução Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) e centrifugado a 400 x g durante 40 minutos. A camada de PBMC foi removida e lavada uma vez com PBS. O pélete de PMBC formado foi reconstituído em 0,5 ml de PBS, as células foram ressuspensas, contadas empregando-se hemocitômetro e mantidas a 70°C até serem analisadas. O número de células multiplicado pelo volume de célula única médio foi empregado em cálculo de concentrações intracelulares. Um valor reportado de 200 fentolitros/célula foi empregado como o volume de PBMC em repouso (B. L. Robins, R. V. Srinivas, C. Kim, N. Bischofberger, e A. Fridland, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 612 (1998)).

Determinação de PMPA e Pró-drogas em plasma e PBMCs. A concentração de PMPA em amostras de plasma de cão foi determinada derivatizando-se PMPA com cloroacetaldeído para produzir um derivado de N<sup>1</sup>, N<sup>6</sup>-etenoadenina altamente fluorescente (L. Naesens, J. Balzarini, e E. De Clercq, *Clin. Chem.* 38, 480 (1992)). Resumidamente, o plasma (100 µl) foi misturado com 200 µl de acetonitrila para precipitar proteína. As amostras foram, em seguida, evaporadas até a secura sob pressão reduzida em temperatura ambiente. As amostras secas foram reconstituídas em 200 µl de coquetel de derivatização (0,34% de cloroacetaldeído em 100 mM de acetato de sódio, pH 4,5), vortexada, e centrifugada. O sobrenadante foi, em seguida, transferido para um tubo de tampa de rosca transparente e incubado a 95°C durante 40 minutos. As amostras derivatizadas foram, em seguida, evaporadas até a secura e reconstituídas em 100 µl de água para análise HPLC.

Antes que o PMPA intracelular pudesse ser determinado por HPLC, as grandes quantidades de adenina relacionadas com ribonucleotídeos presentes nos extratos de PBMC tiveram de ser removidas por oxidação seletiva. Empregamos um procedimento modificado de Tanaka e outro (K. Tanaka, A. Yoshioka, S. Tanaka, e Y. Wataya, *Anal. Biochem.*, 139, 35 (1984)). Resumidamente, as amostras de PBMC foram misturadas 1:2 com metanol e evaporadas até a secura sob pressão reduzida. As amostras se-

cas foram derivatizadas como descrito no ensaio de plasma. As amostras derivatizadas foram misturadas com 20  $\mu$ L de ramnose 1M e 30  $\mu$ L de periodato de sódio 1M e incubadas a 37°C durante 5 minutos. Seguindo a incubação, 40  $\mu$ L de 4M de metilamina e 20  $\mu$ L de 0,5M de inosina foram adicionados. Após a incubação a 37°C durante 30 minutos, as amostras foram evaporadas até a secura sob pressão reduzida e reconstituídas em água para análise de HPLC.

Nenhuma pró-droga intacta foi detectada em quaisquer amostras de PBMC. Para amostras de plasma potencialmente contendo pró-drogas intactas, experiências foram realizadas para verificar que nenhuma outra conversão em PMPA ocorreu durante a derivatização. Os padrões de pró-droga foram adicionados ao plasma sem droga e derivatizados como descrito. Não houve nenhum nível detectável de PMPA presente em qualquer das amostras de plasma, e o percentual projetado de conversão foi menor do que 1%.

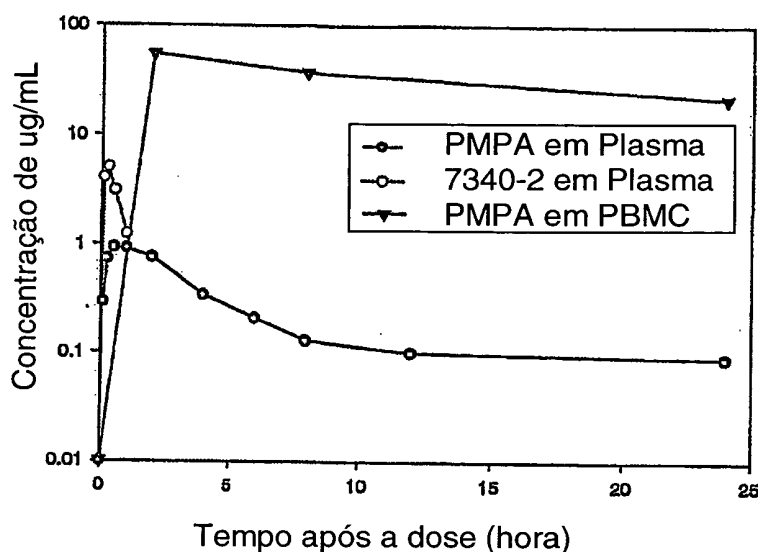
O sistema de HPLC foi compreendido de um sistema de liberação de solvente P4000 com auto-injetor AS3000 e detector de fluorescência F2000 (Thermo Separation, San Jose, CA). A coluna foi uma coluna Inertsil ODS-2 (4,6 x 150 mm). As fases móveis empregadas foram: A, 5% de acetonitrila em 25 mM de tampão de fosfato de potássio com 5 mM de brometo de amônio de tetrabutila (TBABr), pH 6,0; B, 60% de acetonitrila em 25 mM de tampão de fosfato de potássio com 5 mM de TBABr, pH 6,0. A taxa de fluxo foi de 2 ml/min e a temperatura de coluna foi mantida a 35°C por um forno de coluna. O perfil gradiente foi de 90% de A/10% de B durante 10 minutos para PMPA e 65% de A/ 35% de B durante 10 minutos para a pró-droga. A detecção foi por fluorescência com excitação a 236 nm e emissão a 420 nm, e o volume de injeção foi de 10  $\mu$ L. Os dados foram adquiridos e estocados por um sistema de aquisição de dados de laboratório (PeakPro, Beckman, Allendale, NJ).

Cálculos Farmacocinéticos. As exposições a PMPA e pró-droga foram expressas como áreas sob curvas de concentração em plasma ou PBMC de zero a 24 horas (AUC). Os valores AUC foram calculados empre-

gando-se a norma trapezoidal.

Concentrações de Plasma e PBMC. Os resultados deste estudo são mostrados nas Figuras 2 e 3. A Figura 2 mostra o curso de tempo de resumo do metabolismo de GS 7340-2 de exposições de plasma e PBMC seguindo a administração oral e diastereoisômeros puros das pró-drogas de PMPA.

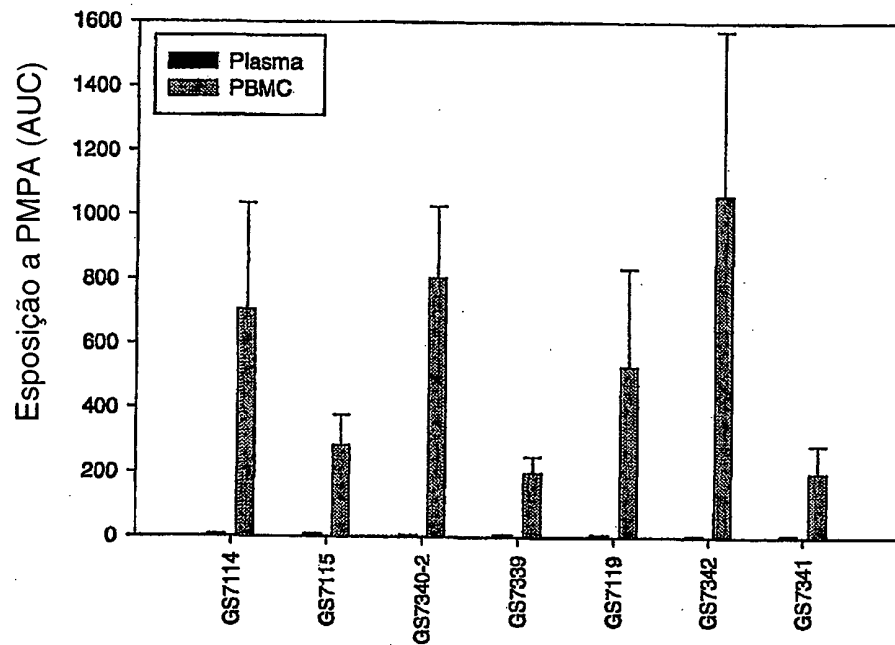
Figura 2. Concentração de PMPA e Pró-droga em Plasma e PBMCs Seguindo a Administração Oral de GS 7340-2 a Cães a 10 mg-eq./kg.



O gráfico de barras na Figura 2 mostra a AUC (0 a 24 horas) de tenofovir em cão de PBMCs e plasma após a administração de PMPA s.c., TDF e pró-drogas de éster de amidato. Todas as pró-drogas de amidato exibiram aumentos em exposição a PBMC. Por exemplo, GS 7340 resulta em um aumento de ~ 21 vezes em exposição a PBMC quando comparado a PMPA s.c. e TDF; e um decréscimo de 6,25 vezes e 1,29 vezes em exposição ao plasma, respectivamente.

Figura 3. Representa Exposição a Tenofovir em PBMCs e Plasma em Administração de 10 mg-eq./kg em cães.

AUC (0 a 24 horas) para PMPA em PBMC e Plasma Seguindo uma Dose Oral de 10 mg-eq/kg de Pró-drogas de PMPA a Cães



Estes dados estabelecem *in vivo* que o GS 7340 pode ser liberado oralmente, minimiza a exposição sistêmica a PMPA e realça enormemente a concentração intracelular de PMPA nas células primariamente responsáveis pela replicação de HIV.



Exposição de PMPA em PBMC e Plasma de Pró-drogas Oraís de PMPA em Cães.

GS#	Porção	AUC de PMPA em Plasma			AUC de PMPA em PBMC			Pró-droga em plasma	Relação de posição de PBMC/Plasma
		Média	Desvio padrão	N	Média	Desvio padrão	N		
GS-7114	Mono-Ala-Et-A	5,8	0,9	2	706	331	5	SIM	122
GS-7115	Mono-Ala-Et-B	6,6	1,5	2	284	94	5	SIM	43
GS-7340-2	Mono-Ala-iPr-A	5,0	1,1	5	805	222	5	SIM	161
GS-7339	Mono-Ala-iPr-A	6,4	1,3	2	200	57	5	SIM	31
GS-7119	Mono-Gly-Et-A	6,11	1,86	2	530	304	5	SIM	87
GS-7342	Mono-ABA-Et-A	4,6	1,2	2	1060	511	5	SIM	230
GS7341	Mono-ABA-Et-B	5,8	1,4	2	199	86	5	SIM	34

### Exemplo 11

#### Biodistribuição de GS-7340

Como parte da caracterização pré-clínica de GS-7340, sua biodistribuição em cães foi determinada. A distribuição do tecido de GS 7340 (monoamidato de alaninila de isopropila, monoéster de fenila de tenofovir) foi examinado seguindo administração oral a cães beagle. Dois animais machos foram dosados oralmente com  $^{14}\text{C}$  = GS-7340 (8,85 mg-equiv. de PMPA/kg, 33,2  $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ ; o carbono 8 de adenina é rotulado) em uma solução aquosa (50 mM de ácido cítrico, pH 2,2). As células mononucleares de sangue periférico e plasma (PBMCs) foram obtidas durante o período de 24 horas. Urina e fezes foram coletadas da gaiola durante 24 horas. Em 24 horas após a dose, os animais foram sacrificados e os tecidos removidos para análise. A radioatividade total em tecidos foi determinada por oxidação e contagem de cintilação líquida.

A biodistribuição de PMPA após 24 horas após uma dose oral única de GS 7340 radiorrotulado é mostrada na Tabela 4 juntamente com os dados de um prévio estudo com TDF (GS 4331). No caso de TDF, a concentração de pró-droga no plasma é abaixo do nível de detecção de ensaio, e a espécie principal observada em plasma é a droga origem. Os níveis de PMPA nos tecidos linfáticos, medula óssea, e músculo esquelético são aumentados 10 vezes após a administração de GS 7340.

O acúmulo em tecidos linfáticos é consistente com os dados observados das análises de PBMC, uma vez que estes tecidos são compostos primariamente de linfócitos. Igualmente, o acúmulo em medula óssea é provavelmente devido à elevada percentagem de linfócitos (70%) neste tecido.

**Tabela 7.** Excreção e Distribuição de Tecido de GS 7340 Radiorrotulado em Cães (Média, N=2) Seguindo uma Dose Oral a 10 mg-eq. de PMPA/kg.

Tecido/Fluido	GS-4331		GS-7340		Relação de Concentração de Tecido de GS 7340 para GS 4331
	% de Dose	Concentração (ug-eq/g)	% de Dose	Concentração (ug-eq/g)	
Fígado	12,40	38,30	16,45	52,94	1,4
Rins	4,58	87,90	3,78	80,21	0,9
Pulmões	0,03	0,53	0,34	4,33	8,2
Nodos de Linfa Ilíaca	0,00	0,51	0,01	5,42	10,6
Nodos de Linfa Auxiliar	0,00	0,37	0,01	5,54	14,8
Nodos de Linfa Inguinal	0,00	0,28	0,00	4,12	15,0
Nodos de Linfa Mesentérica	0,00	1,20	0,04	6,88	5,7
Glândula da Tireóide	0,00	0,30	0,00	4,78	15,8
Glândula Pituitária	0,00	0,23	0,00	1,80	7,8
Glândula Salivar ( L + R)	0,00	0,45	0,03	5,54	12,3
Glândula Adrenal	0,00	1,90	0,00	3,47	1,8
Baço	0,00	0,63	0,17	8,13	12,8
Pâncreas	0,00	0,57	0,01	3,51	6,2
Próstata	0,00	0,23	0,00	2,14	9,1
Testículos (L + R)	0,02	1,95	0,02	2,01	1,0
Músculo Esquelético	0,00	0,11	0,01	1,12	10,1
Coração	0,03	0,46	0,15	1,97	4,3
Osso femoral	0,00	0,08	0,00	0,28	3,5
Medula Óssea	0,00	0,20	0,00	2,05	10,2
Pele	0,00	0,13	0,00	0,95	7,2
Gordura Abdominal	0,00	0,16	0,00	0,90	5,8
Olho ( L + R)	0,00	0,06	0,00	0,23	3,7
Cérebro	0,00	<LOD	0,00	<LOD	n.d.
Fluido Cerebroespinal	0,00	<LOD	0,00	0,00	n.d.
Coluna Espinal	0,00	<LOD	0,00	0,04	n.d.

## Continuação

Tecido/Fluido	GS-4331		GS-7340		Relação de Concentração de Tecido de GS 7340 para GS 4331
	% de Dose	Concentração (ug-eq/g)	% de Dose	Concentração (ug-eq/g)	
Estômago	0,11	1,92	0,26	2,68	1,4
Jejum	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 Grosso	1,63	5,97	2,65	47,20	7,9
<u>Vesícula Biliar</u>	0,00	3,58	0,04	25,02	7,0
Bílis	0,00	9,63	0,22	40,48	4,2
Fezes	40,96	n.d.	0,19	n.d.	n.a.
Conteúdo Total do Trato GI	5,61	n.d.	21,64	n.d.	n.a.
Urina	23,72	n.d.	14,73	n.d.	n.a.
Plasma a 24 horas	0,00	0,20	0,00	0,20	1,0
Plasma a 0,25 hora	n.a.	3,68	n.a.	3,48	0,9
PBMC*	0,00	n.d.	0,00	63,20	n.d.
Sangue total	0,00	0,85	0,16	0,20	0,2
Recuperação Total	81,10		68,96		

\* Calculado empregando-se recuperação típica de  $15 \times 10^6$  do total de células, e volume médio de PBMC de 0,2 picolitros/célula.

n.s. = nenhuma amostra, n.a. = não aplicável, n.d. = não determinado.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de avaliação para identificar uma pró-droga de análogo de nucleotídeo de metoxifosfonato conferindo a atividade realçada em um tecido alvo compreendendo:
  - 5 (a) fornecer pelo menos uma das referidas pró-drogas;
  - (b) selecionar pelo menos um tecido alvo terapêutico e pelo menos um tecido não-alvo;
  - (c) administrar a pró-droga ao tecido alvo e ao referido pelo menos um tecido não-alvo; e
  - 10 (d) determinar a atividade antiviral relativa conferida pela pró-droga nos tecidos na etapa (c).
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a atividade é atividade antiviral ou atividade antitumor.
3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que a atividade
  - 15 é atividade antiviral.
4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a atividade é atividade anti-HIV ou anti-HBV.
5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a pró-droga é uma pró-droga de PMPA ou PMEA.
- 20 6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que a pró-droga é um fosfonoamidato, fosfonoéster ou fosfonoamidato/fosfonoéster misturados.
7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que o amidato é um amidato de aminoácido.
- 25 8. Método de acordo com a reivindicação 6, em que o éster é um éster de arila.
9. Método de acordo com a reivindicação 1 também compreendendo selecionar uma pró-droga tendo uma atividade relativa no tecido alvo que é maior do que 10 vezes aquela do tecido não-alvo.
- 30 10. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o tecido alvo e não-alvo estão em um animal, a pró-droga é administrada ao animal e a atividade relativa é determinada por análise dos tecidos de animais após a

administração da pró-droga.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a atividade nos tecidos alvo e não-alvo é determinada ensaiando-se a quantidade de pelo e menos um metabólito da pró-droga nos tecidos.

5 12. Método de acordo com a reivindicação 12, em que o metabólito é a droga origem.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que o metabólito é o difosfato da droga origem.

10 14. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o tecido alvo é tecido viralmente infectado e o tecido não-alvo é o mesmo tecido que não é viralmente infectado.

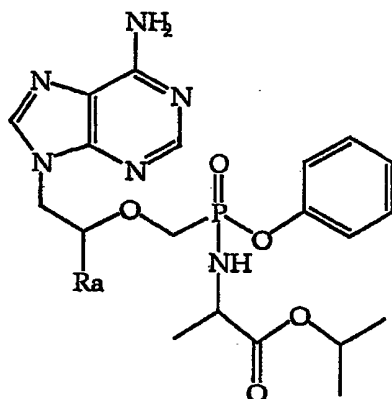
15 15. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o tecido alvo é tecido linfóide e a atividade é atividade anti-HIV.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o tecido alvo é fígado e a atividade é atividade anti-HBV.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o tecido alvo é hematológico e a atividade é atividade antitumor.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o tecido alvo é maligno e o tecido não-alvo é o mesmo tecido porém não maligno.

20 19. Composto tendo a estrutura (1)

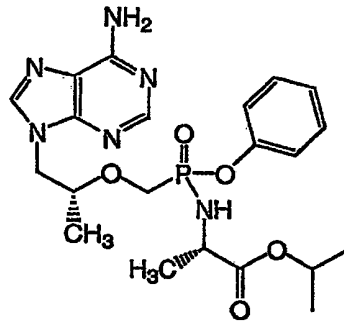


(1)

em que Ra é H ou metila,

e composições quiralmemente enriquecidas destes, sais, sua base livre e solvatos destes.

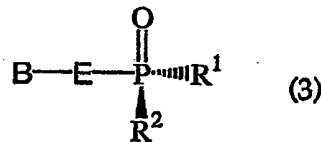
20. Composto tendo a estrutura (2)



(2)

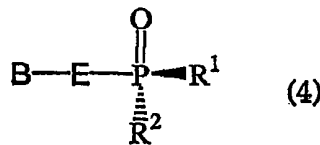
e seus diastereômeros enriquecidos, sais, base livre e solvatos.

21. Composto diastereomericamente enriquecido tendo a estrutura (3)



(3)

5 que é substancialmente livre do diastereômero (4)



(4)

em que

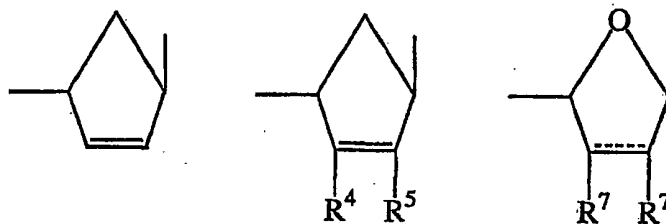
R<sup>1</sup> é um oxiéster que é hidrolizável *in vivo*, ou hidroxila;

B é uma base heterocíclica;

R<sup>2</sup> é hidroxila, ou o resíduo de um aminoácido ligado ao átomo P através de um grupo amino do aminoácido tendo cada substituinte de carbóxi do aminoácido opcionalmente esterificado, porém não ambos de R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> são hidroxila;

10

E é -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>2</sub>F)CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>2</sub>OH)CH<sub>2</sub>-, -CH(CH=CH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>-, -CH(C≡CH)CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-,



15

$-\text{CH}(\text{R}^6)\text{OCH}(\text{R}^{6'})-$ ,  $-\text{CH}(\text{R}^9)\text{CH}_2\text{O}-$  ou  $-\text{CH}(\text{R}^8)\text{O}-$ , em que a ligação de mão direita é ligada à base heterocíclica;

a linha interrompida representa uma ligação dupla opcional;

5  $\text{R}^4$  e  $\text{R}^5$  são independentemente hidrogênio, hidróxi, halo, amino ou um substituinte tendo de 1-5 átomos de carbono selecionados de acilóxi, alquilóxi, alquiltio, alquilamino e dialquilamino;

$\text{R}^6$  e  $\text{R}^{6'}$  são independentemente H,  $\text{C}_1-$   $\text{C}_6$  alquila,  $\text{C}_1-$   $\text{C}_6$  hidroxialquila, ou  $\text{C}_2-$   $\text{C}_7$  alcanoíla;

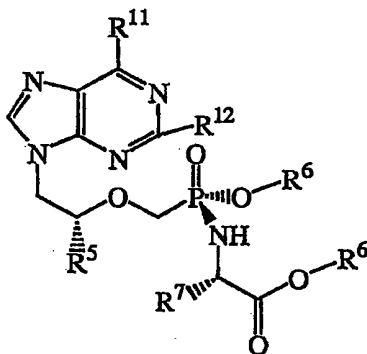
10  $\text{R}^7$  é independentemente H,  $\text{C}_1-$   $\text{C}_6$  alquila, ou são tomados juntos para formar  $-\text{O}-$  ou  $-\text{CH}_2-$ ;

$\text{R}^8$  é H,  $\text{C}_1-$   $\text{C}_6$  alquila,  $\text{C}_1-$   $\text{C}_6$  hidroxialquila ou  $\text{C}_1-$   $\text{C}_6$  haloalquila; e

$\text{R}^9$  é H, hidroximetila ou aciloximetila;

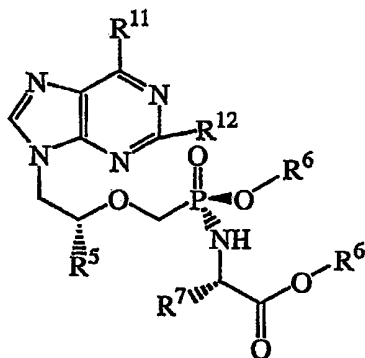
e seus sais, base livre, e solvatos.

15 22. Composto diastereomericamente enriquecido tendo a estrutura (5a)



(5a)

que é substancialmente livre de diastereômero (5b)



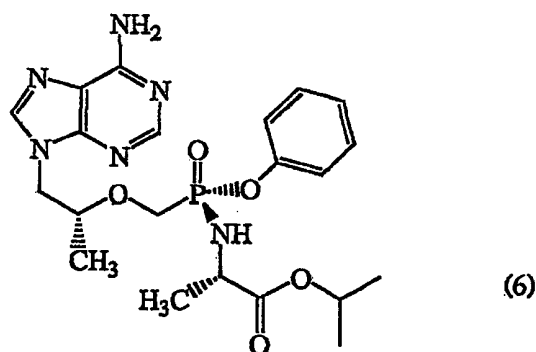
(5b)

em que:



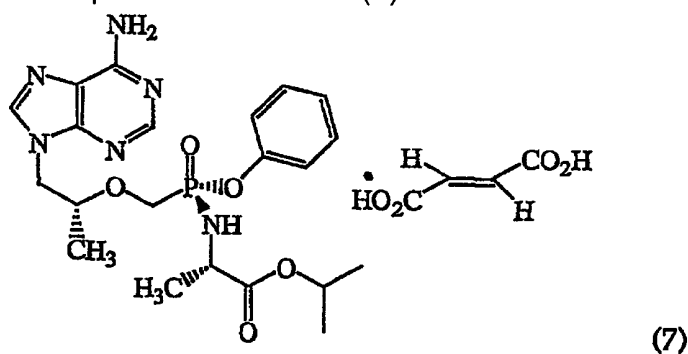
- $R^5$  é metila ou hidrogênio;
- $R^6$  independentemente é H, alquila, alquenila, alquinila, arila ou arilalquila, ou  $R^6$  independentemente é alquila, alquenila, alquinila, arila ou arilalquila que é substituída com de 1 a 3 substituintes selecionados de alquilamino, alquilaminoalquila, dialquilaminoalquila, dialquilamino, hidroxila, oxo, halo, amino, alquil-tio, alcóxi, alcoxialquila, arilóxi, ariloxialquila, arilalcóxi, arilalco-xialquila, haloalquila, nitro, nitroalquila, azido, azidoalquila, alquilacila, alquilacilalquila, carboxila, ou alquilacilamino;
- 5  $R^7$  é a cadeia lateral de qualquer aminoácido farmacologicamente aceitável ou de ocorrência natural e que, se a cadeia lateral compreende carboxila, o grupo carboxila é opcionalmente esterificado com um grupo alquila ou arila;
- $R^{11}$  é amino, alquilamino, oxo, ou dialquilamino; e
- 15  $R^{12}$  é amino ou H;
- e seus sais, tautômeros, base livre e solvatos.

## 23. Composto da estrutura (6)



e seus sais e solvatos.

## 24. Composto da estrutura (7)



25. Composição compreendendo um composto como definido em quaisquer das reivindicações 19 - 24 e um excipiente farmacologicamente eficaz.

5 26. Composição de acordo com a reivindicação 25, em que o excipiente é um gel.

27. Composição de acordo com a reivindicação 25, que é adequada para administração tópica.

10 28. Método para terapia antiviral ou profilaxia compreendendo administrar um composto como definido em quaisquer reivindicações 19 - 24 em uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz em um indivíduo em necessidade de tal terapia ou profilaxia.

29. Método para uso do alcóxido de magnésio compreendendo reagir 9-(2-hidroxi-propil)adenina (HPA) ou 9-(2-hidroxi-etil)adenina (HEA), alcóxido de magnésio, e *p*-toluenossulfoniloximetilfosfonato protegido.

15 30. Método de acordo com a reivindicação 29, também compreendendo recuperar PMPA ou PMEPA, respectivamente.

31. Método de acordo com a reivindicação 29, em que o fosfonato do *p*-toluenossulfoniloximetilfosfonato é protegido por éster de etila.

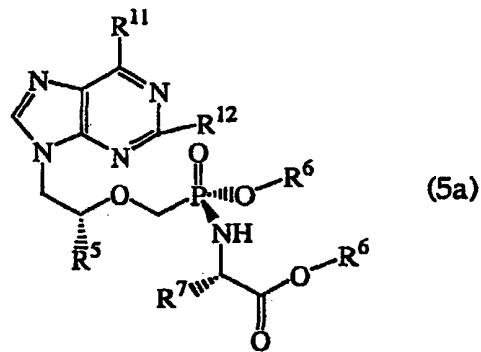
20 32. Método de acordo com a reivindicação 29, em que o alcóxido é um C<sub>1</sub>- C<sub>6</sub> alcóxido.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, em que o alcóxido é *t*-butila ou óxido de isopropila.

RESUMO

Patente de Invenção: "PRÓ-DROGAS DE ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEO DE FOSFONATO E MÉTODOS PARA SELECIONAR E PREPARAR AS MESMAS".

5           A presente invenção refere-se a método que é fornecido para avaliar pró-drogas de análogos de nucleotídeo de metoxifosfonato para identificar pró-drogas seletivamente alvejando tecidos desejados com atividade antiviral ou antitumor. Este método tem induzido à identificação de novos éster-amidatos misturados de PMPA para terapia retroviral ou hepadna-  
10           viral, incluindo compostos de estrutura (5a)



tendo grupos substituintes como aqui definido. Composições destes compostos em excipientes farmacologicamente aceitáveis e seu uso em terapia e profilaxia são fornecidas. Também fornecido é um método para o uso de alcóxido de magnésio para a preparação de materiais de partida e compostos para uso aqui.  
15