

Ця заявка стосується проліків метоксифосфонатнуклеотидних аналогів. Зокрема, він стосується удосконалених способів одержання та ідентифікації таких проліків.

Відомо багато метоксифосфонатнуклеотидних аналогів. Загалом, такі сполуки мають структуру $A-OCH_2P(O)(OR)_2$, де A позначає залишок нуклеозидного аналога, а R незалежно позначає гідроген або захисні групи чи функціональності проліків. Див., наприклад, [патенти США №№ 5663159, 5977061 та 5798340, Oliyai et al., Pharmaceutical Research, 16(11): 1687-1693(1999); Stella et al., J. Med. Chem., 23(12): 1275-1282 (1980); Aarons, L. Boddy, A. and Petrak, K. (1989) Novel Drug Delivery and Its Therapeutic Application (Prescott, L.F. and Nimmo, W.S., eds.), pp.121-126; Bundgaard, H. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H., ed.), pp.70-74 та 79-82; Banerjee, P.K. and 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. and 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]. Уся згадана література та патентні посилання незаперечно включені сюди за посиланнями.

Сутність винаходу

Проліки метоксифосфонатнуклеотидних аналогів, призначені для антивірусної чи протипухлинної терапії, з того часу, коли вони стали відомими, традиційно відбиралися за їхнім системним ефектом. Наприклад, такі проліки відбиралися за їхньою підвищеною біодоступністю, тобто здатністю до всмоктування зі шлунково-кишкового тракту та швидкого перетворення на вихідну лікарську речовину для забезпечення присутності вихідної лікарської речовини в усіх тканинах. Однак, заявники знайшли, що можливо відбирати проліки, які накопичуються у терапевтичних ділянках, як ілюструють описані тут дослідження, у яких аналоги накопичувалися у локалізованих вогнищах ВІЛ-інфекції. Метою цього винаходу є, крім інших переваг, забезпечення меншої токсичності для

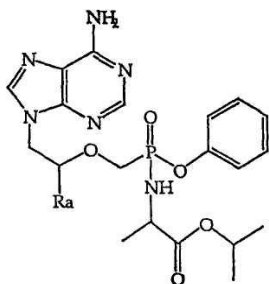
навоколишніх тканин та більшої активності вихідної лікарської речовини у тканинах, які є мішенями терапії вихідним метоксифосфонатнуклеотидним аналогом.

Отже, у відповідності до цих спостережень, пропонується спосіб скринінгу для ідентифікації проліків метоксифосфонатнуклеотидного аналога, які забезпечують підвищену активність у цільовій тканині, що включає:

- (a) одержання щонайменше одного з таких проліків,
- (b) вибір щонайменше однієї терапевтично цільової тканини та щонайменше однієї нецільової тканини,
- (c) введення проліків до вказаної цільової тканини та вказаної щонайменше однієї нецільової тканини, і
- (d) визначення відносної антивірусної активності, яку виявляють проліки у тканинах за стадією (c).

В кращих варіантах втілення цільовою тканиною є ділянки, у яких відбувається активна реплікація ВІЛ та/або такі, що є джерелом ВІЛ, а нецільовою тканиною є неуражена тварина. Несподівано автори знайшли, що вибір лімфоїдної тканини як цільової тканини у практиці цього способу для ВІЛ приводить до ідентифікації проліків, які посилюють доставку активного лікарського засобу до таких тканин.

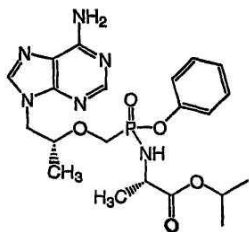
Кращою сполукою за цим винаходом, що була ідентифікована у такий спосіб, є така, що має структуру (1)



(1)

де Ra означає H чи метил,

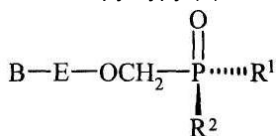
та композиції, хіральні збагачені нею, її солі, їхня вільна основа та її сольвати. Кращою сполукою за цим винаходом є така, що має структуру (2)



(2)

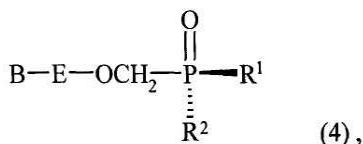
та її збагачені діастереомери, солі, вільна основа та сольвати.

Крім того, несподівано було знайдено, що хіральність замісників атомів фосфору та/або амідатний замісник впливають на збагачення, що спостерігається у практиці цього винаходу. Таким чином, в іншому варіанті втілення цього винаходу пропонуються діастереомерно збагачені сполуки за цим винаходом, що мають структуру (3)



(3)

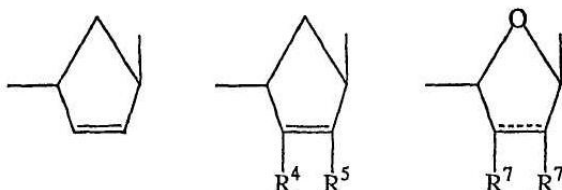
які по суті не містять діастереомеру (4)



де R^1 означає оксифір, здатний гідролізуватися *in vivo*, або гідроксил,

B означає гетероциклічну основу,

R^2 означає гідроксил або амінокислотний залишок, зв'язаний з атомом P через аміногрупу амінокислоти, причому кожен карбоксильний замісник амінокислоти є необов'язково етерифікованим, але R^1 та R^2 не можуть бути обидва гідроксилами, E означає $-(\text{CH}_2)_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{F})\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}=\text{CH}_2)\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{C}=\text{CH})\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{N}_3)\text{CH}_2-$,



$-\text{CH}(\text{R}^6)\text{OCH}(\text{R}^6)-$, $-\text{CH}(\text{R}^9)\text{CH}_2\text{O}-$ або $-\text{CH}(\text{R}^8)\text{O}-$, де зв'язок, зображений праворуч,

зв'язаний з гетероциклічною основою,

пунктирна лінія означає необов'язково подвійний зв'язок,

R^4 та R^5 позначають незалежно гідроген, гідроксильну групу, галоген, аміногрупу чи замісник, що має 1-5 атомів карбону, обраний з ацилоксигрупи, алкілоксигрупи, алкілтіогрупи, алкіламіногрупи та діалкіламіногрупи,

R^6 та R^6 позначають незалежно H , $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкіл, $\text{C}_1\text{-i-C}_6$ -гідроксіалкіл або $\text{C}_2\text{-C}_7$ -алканол,

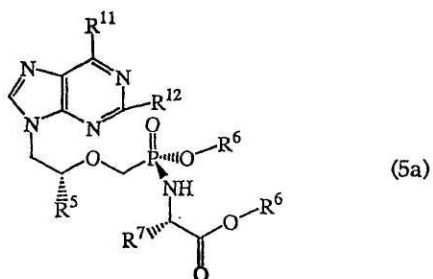
R^7 позначають незалежно H , $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкіл або разом утворюють $-\text{O}-$ чи $-\text{CH}_2-$,

R^8 означає H , $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкіл, $\text{C}_1\text{-C}_6$ -гідроксіалкіл або $\text{C}_1\text{-C}_6$ -галогідалкіл, і

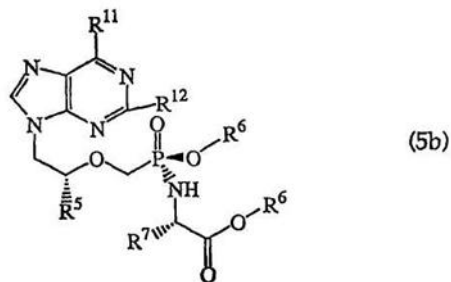
R^9 означає H , гідроксиметил чи ацилоксиметил, та їхні солі, вільну основу та сольвати.

Діастереомери структурної формули (3) позначені як (3)-ізомери відносно хірального центра на атомі фосфору.

Кращими варіантами втілення даного винаходу є діастереомерно збагачені сполуки структурної формули (5a)



які по суті не містять діастереомеру (5b)



Де

R^5 означає метил чи гідроген,

R^6 незалежно позначають H , алкіл, алкеніл, алкініл, арил чи аралкіл, або R^6 незалежно позначають алкіл, алкеніл, алкініл, арил чи аралкіл, заміщені 1-3 замісниками, обраними з алкіламіногрупи, алкіламіноалкілу, діалкіламіноалкілу, діалкіламіногрупи, гідроксиду, оксогрупи, галогену, аміногрупи, алкілтіогрупи, алкоксигрупи, алкоксиалкілу, арилоксигрупи, арилоксиалкілу, арилалкоксигрупи, арилалкоксиалкілу, галогідалкілу, нітрогрупи, нітроалкілу, азидогрупи, азидоалкілу, алкілацилу, алкілацилалкілу, карбоксилу чи алкілациламіногрупи,

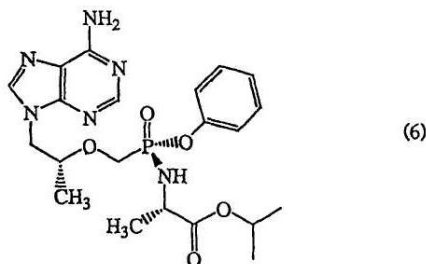
R^7 означає бічний ланцюг будь-якої природної і фармацевтично прийнятої амінокислоти, причому, якщо бічний ланцюг включає карбоксил, то карбоксильна група є необов'язково етерифікованою алкільною чи арильною групою,

R^{11} означає аміногрупу, алкіламіногрупу, оксогрупу чи діалкіламіногрупу, і

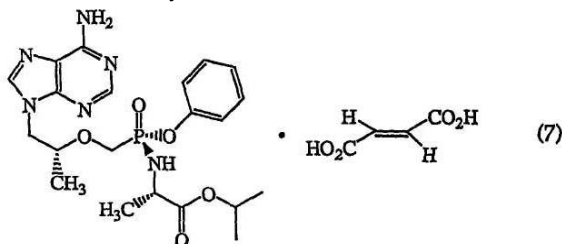
R^{12} означає аміногрупу чи H , та їхні солі, таутомери, вільні основи і сольвати.

Кращим варіантом втілення даного винаходу є сполука структурної формули (6): 9-[(R)-2-[(S)-[(S)-1-

(ізопроттоксикарбоніл)етил]аміно]феноксифосфініл]-
метокси]пропіл]аденін, яка також позначається тут як GS-7340



Іншим кращим варіантом втілення даного винаходу є фумаратна сіль сполуки структурної формули (5) (структурна формула (7)) - 9-[(R)-2-[[[(S)-[[[(S)-1-(ізопропоксикарбоніл)етил]аміно]феноксифосфініл]метокси]пропіл]аденін]фумарат (1:1), яка також позначається тут як GS-7340-2

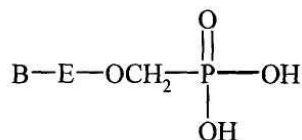


Сполуки структурних формул (1)-(7) необов'язково вводяться до складу композицій, які містять фармацевтично прийнятні ексципієнти. Такі композиції використовуються у ефективних дозах в терапії чи профілактиці вірусних інфекцій (особливо ВІЛ чи гепаднавірусних).

За іншим варіантом втілення, пропонується зручний спосіб виробництва 9-[2-(фосфонометокси)пропіл]аденіну (тут та надалі "РМРА") чи 9-[2-(фосфонометоксі)етил]аденіну (тут та надалі "РМЕА") з використанням алкоксиду магнію, який включає проведення реакції зв'язування 9-(2-гідроксипропіл)аденіну чи 9-(2-гідроксіетил)аденіну, захищеного п-толуолсульфонілоксиметилфосфонату та алкоксиду магнію, і виділення РМРА чи РМЕА, відповідно.

Детальний опис винаходу

Вихідні лікарські засоби на основі метоксифосфонатнуклеотидних аналогів, призначені для використання у цьому методі скринінгу є сполуками, що мають структуру $A-OCH_2P(O)(OH)_2$ де А означає залишок нуклеозидного аналога. Ці сполуки є відомими як такі і не входять до цього винаходу. Конкретніше, вихідні сполуки включають гетероциклічну основу В та аглікони Е, маючи загалом структурну формулу



де група В визначена нижче, а група Е визначена вище. Приклади описані у [патентах США №№ 4659825, 4808716, 4724233, 5142051, 5130427, 5650510, 5663159, 5302585, 5476938, 5696263, 5744600, 5688778, 5386030, 5733896, 5352786 та 5798340, та ЕР 821690 та 654037].

Проліки, придатні для застосування у способі скринінгу за даним винаходом, є ковалентно модифікованими аналогами вихідних метоксифосфонат-нуклеотидних аналогів, описаних у попередньому абзаці. Загалом, атом фосфору вихідного лікарського засобу є кращим місцем для модифікації проліків, але можливі інші місця, що знаходяться у гетероциклічній основі В чи агліконі Е. Багато таких проліків є вже відомими. У першу чергу, вони є складними ефірами чи амідатами атома фосфору, але включають також заміщення на основі та агліконі. Жодна з цих модифікацій як така не входить до цього винаходу і жодна з них не повинна вважатися такою, що обмежує обсяг винаходу.

Атом фосфору метоксифосфонатнуклеотидних аналогів має дві валентності, придатні для ковалентної модифікації, такої як амідування чи етерифікація (за винятком випадку, коли фосфорильний гідроксил є етерифікованим гідроксил-вмісним замісником аглікону Е, внаслідок чого лише одна валентність фосфору залишається вільною для заміщення). Складні ефіри типово є арилоксизаміщеними. Амідати є звичайно природними моноамінокислотами, що мають вільну карбоксильну групу (групи), етерифікованими алкільною чи арильною групою, звичайно фенільною, циклоалкільною або t-, n- чи s-алкільними групами. Проліки, придатні для використання у способі скринінгу за даним винаходом, розкриті, наприклад, у патенті США № 5798340. Однак будь-які проліки, що вважаються потенційно здатними до перетворення in vivo у клітинах цільової тканини на вільний вихідний лікарський засіб на основі метоксифосфонатнуклеотидного аналога, наприклад, шляхом гідролізу, оксидатії чи іншого ковалентного перетворення, спричиненого дією біологічних тканин, є придатними для використання у способі за даним винаходом. Такі проліки можуть бути невідомими зараз, але будуть ідентифіковані у майбутньому і, таким чином, стануть придатними кандидатами, доступними для тестування у способі за даним винаходом. Оскільки проліки є лише кандидатами для скринінгу у цих способах, їхні структури не пов'язані із здійсненням чи забезпеченням можливості здійснення способу скринінгу, хоч, звичайно, їхні структури у кінцевому підсумку визначають, чи буде виявлено при проведенні аналізу селективність цих проліків.

Про-фрагменти, зв'язані з лікарським засобом, можуть бути однаковими чи різними. Однак, кожен лікарський засіб, що використовується у скринінгу, має структурно відрізнятися від інших проліків, що випробовуються. Відмінні, тобто структурно різні проліки, загалом обирають на основі або їхньої стереохімії, або ковалентної структури, або ці ознаки змінюються у комбінаціях. Однак бажано, щоб кожен випробований пролік був по суті структурно та стереохімічно чистим, бо інакше результати скринінгу будуть менш корисними. Звичайно, до обсягу даного винаходу входить проведення випробувань окремих проліків в індивідуальному варіанті втілення способу за даним винаходом, хоч типово у такому випадку ці результати будуть порівнюватись з результатами попередніх досліджень з іншими проліками.

Авторами знайдено, що стереохімія проліків здатна впливати на їхнє накопичення у цільових тканинах. Хіральні центри знаходяться на атомі фосфору, а також у його замісниках. Наприклад, амінокислота, що використовується для одержання амідатів, може знаходитись у D-формі чи L-формі, а фосфонатні складні ефіри чи амінокислотні складні ефіри можуть також містити хіральні центри. Хіральні центри також знаходяться у частині нуклеозидного аналога молекул, але вони звичайно вже визначені стереохімією вихідного лікарського засобу і не змінюються як частина процесу скринінгу. Наприклад, R-ізомер РМРА є кращим, оскільки він має вищу активність, ніж відповідний S-ізомер. Типово ці діастереомери чи енантіомери хіральні збагачуються для кожного центра, якщо вони не є чистими, щоб результати скринінгу були більш значущими. Як відзначалося, відмінність стереоізомерів забезпечується збагаченням чи очищенням стереоізомера (типово для більшості метоксифосфонатнуклеотидних аналогів це буде діастереомер, а не енантіомер), щоб він не містив інших стереоізомерів для певного хірального центра, так щоб кожна тестована сполука була по суті гомогенною. Під по суті гомогенним чи хіральним збагаченням ми розуміємо, що бажаний стереоізомер складає більш ніж приблизно 60 % мас. сполуки, звичайно, більш ніж приблизно 80%, і краще, більш ніж приблизно 95%.

Новий спосіб скринінгу

Після того, як буде відібраний принаймні один кандидат проліків, решта стадій способу скринінгу за даним винаходом використовуються для ідентифікації проліків, що мають потрібну селективність до цільової тканини. Найзручніше, проліки мітять групою, придатною для детектування, наприклад, радіоактивною міткою, для полегшення наступного детектування у тканинах чи клітинах. Однак, мітка не є необхідною, оскільки можуть бути також застосовані інші придатні методи аналізу проліків чи їхніх метаболітів (включаючи вихідний лікарський засіб). Ці методи аналізу можуть включати, наприклад, мас-спектрометрію, ВЕРХ, біоаналізи чи імуноаналізи. Метод аналізу може виявляти проліки та будь-який один чи кілька його метаболітів, але краще метод аналізу спрямований лише на детектування утворення вихідного лікарського засобу. Основою цього є припущення (яке може не виконуватись в усіх випадках), що ступінь та швидкість перетворення проліків на антивірусно активний вихідний дифосфат будуть однаковими в усіх тканинах, що тестуються. Інакше, можна проводити тест на дифосфат.

При проведенні скринінгу проліків, придатних для лікування ВІЛ-інфекції, кращою цільовою тканиною буде лімфоїдна тканина. Лімфоїдна тканина відома фахівцям і включає клітини CD4, лімфоцити, лімфатичні вузли, макрофаги та макрофагоподібні клітини, включаючи моноцити, такі як моноцитні клітини периферичної крові (PBMC) та гліальні клітини. Лімфоїдна тканина також включає нелімфоїдні тканини, що мають підвищений вміст лімфоїдної тканини чи клітин, наприклад, легені, шкіру та селезінку. Іншими мішенями для інших антивірусних лікарських засобів будуть, звичайно, основні ділянки реплікації чи латентності для конкретного вірусу, наприклад, печінка для гепатиту та периферичні нерви для вірусу простого герпесу (HSV). Аналогічно, цільовими тканинами будуть по суті самі пухлини. Ці тканини є добре відомими фахівцям і для їхнього вибору не потрібне неналежне експериментування. При скринінгу антивірусних сполук цільова тканина може бути інфікована вірусом.

Складовою цього способу є скринінг нецільових тканин чи клітин. В цьому відношенні може бути використана будь-яка кількість будь-яких таких тканин чи клітин. Загалом, як нецільові тканини звичайно будуть використовуватись тканини, для яких очікується, що вихідний лікарський засіб буде токсичним. Вибір нецільової тканини цілком залежить від природи проліків та активності вихідного засобу. Наприклад, для проліків проти гепатиту мають бути обрані непечінкові тканини, а для скринінгу протипухлинно-селективних проліків будуть придатними нетрансформовані клітини такої самої тканини, як і пухлина.

Слід відзначити, що спосіб за цим винаходом відрізняється від досліджень, що звичайно проводяться для визначення біодоступності при пероральному введенні проліків. В дослідженнях біодоступності при пероральному введенні, метою є визначення проліків, що надходять до системного кровообігу по суті перетвореними на вихідний лікарський засіб. Метою даного винаходу є визначення проліків, що не метаболізуються у шлунково-кишковому тракті чи кровообігу. Таким чином, цільові сполуки, які піддають аналізу у способі за цим винаходом, звичайно не включають тонку кишку або, якщо кишечник включений до аналізу, то тканини також включають інші тканини, крім тонкої кишки.

Цільові та нецільові тканини, що використовуються у способі скринінгу за даним винаходом, типово є тканинами неураженої живої тварини. Проліки, що містять складні ефіри, краще випробовувати на собаках, мавпах чи інших тваринах, крім гризунів; плазма мишей та пацюків має високі рівні естераз у кровообігу, що може призвести до помилкового результату, якщо бажаний суб'єктом лікування є людина чи вищий ссавець.

Здійснення цього способу на цільних тваринах не є необхідним. До обсягу даного винаходу входить також використання органів з перфузійним живленням, культур органів *in vitro* (наприклад, шкірних трансплантатів) чи клітинних ліній, які утримуються у різних формах клітинної культури, наприклад, у роллер-флаконах чи системах суспензій з нульовим тяжінням. Наприклад, клітини MT-2 можуть бути використані як цільова тканина для відбору проліків для ВІЛ. Таким чином, термін "тканина" на слід тлумачити як такий, що потребує організованих клітинних структур або тканинних структур у тому вигляді, який вони мають у природі, хоч вони і є кращими. Замість цього, термін "тканина" слід тлумачити як синонім до клітин певного джерела, походження чи стадії диференціації.

Цільова та нецільова тканина може бути по суті однією й тою самою тканиною, але тканини повинні мати

різний біологічний статус. Наприклад, даний спосіб може бути використаний для відбору проліків, які виявляють активність у вірусно-інфікованій тканині (цільовій тканині), але залишаються по суті неактивними у неінфікованих вірусом клітинах (відповідно, нецільова тканина), така саме стратегія буде використовуватися для відбору профілактичних проліків, тобто, проліків, що метаболізуються до антивірусно активних форм у випадку вірусної інфекції, але залишаються по суті неметаболізованими у неінфікованих клітинах. Аналогічно, проліки можуть бути піддані скринінгу у трансформованих клітинах та нетрансформованій порівняльній тканині. Це буде особливо корисним у порівняльному тестуванні з метою відбору проліків для лікування гематологічних злоякісних новоутворень, наприклад, лейкозів.

Без обмеження будь-якою конкретною теорією механізму дії, у порівнянні з іншими тканинами чи клітинами, вважається, що тканино-селективні проліки селективно поглинаються цільовими клітинами та/або селективно метаболізуються усередині клітини. Унікальною перевагою метоксифосфонатних проліків за даним винаходом є те, що їхній метаболізм до діаніону при фізіологічних значеннях pH забезпечує їхню нездатність до зворотної дифузії з клітини. Таким чином, вони залишаються ефективними протягом тривалих періодів часу і підтримують підвищену внутрішньоклітинну концентрацію, виявляючи завдяки цьому підвищену активність. Вважається, що механізми підвищеної активності у цільовій тканині включають підвищене поглинання цільовими клітинами, підвищене внутрішньоклітинне утримання або обидва механізми працюють разом. Однак, спосіб виявлення селективності чи посилення доставки до цільової тканини не є важливим. Неважливо також, чи усе метаболічне перетворення проліків на вихідну сполуку відбувається усередині цільової тканини. У цільовій тканині має відбуватися лише кінцева стадія перетворення, що забезпечує виявлення активності; метаболізм у інших тканинах може приводити до утворення проміжних сполук, які зрештою перетворюються на антивірусні форми у цільовій тканині.

Бажаний ступінь селективності чи підвищення доставки буде змінюватись у залежності від вихідної сполуки та від способу вимірювання (розподіл дози у % або концентрація вихідного лікарського засобу). Загалом, якщо вихідний лікарський засіб вже має широке терапевтичне вікно, то для бажаних проліків може виявитись достатнім низький рівень селективності. З іншого боку, токсичні сполуки можуть потребувати детальнішого скринінгу для ідентифікації селективних проліків. Відносні витрати на спосіб за даним винаходом можна зменшити завдяки проведенню скринінгу лише у цільовій тканині та тканинах, про які відомо, що по відношенню до них вихідна сполука є відносно токсичною, наприклад, для РМЕА, що є нефротоксичним у вищих дозах, увагу слід звернути у першу чергу на нирки та лімфоїдні тканини.

Стадія визначення відносної антивірусної активності проліків у обраних тканинах звичайно здійснюється шляхом проведення аналізу цільової та нецільової тканин на відносну присутність чи активність метаболіту проліків, про який відомо, що цей метаболіт виявляє антивірусну чи протипухлинну активність, або перетворюється на метаболіт, що їх має. Так, типово визначають відносну кількість вихідного лікарського засобу у тканинах протягом по суті одного й того самого періоду часу з метою ідентифікації проліків, що переважно метаболізуються у цільовій тканині на антивірусно чи протипухлинно активний метаболіт чи їхній прекурсор, який у цільовій тканині зрештою утворює активний метаболіт. У випадку антивірусних сполук активний метаболіт є дифосфатом фосфонатних вихідних сполук. Саме цей метаболіт включається до вірусної нуклеїнової кислоти, тим самим перериваючи подовження нитки нуклеїнової кислоти та припиняючи вірусну реплікацію. Метаболіти проліків можуть бути анаболічними метаболітами, катаболічними метаболітами або спільним продуктом анаболізму та катаболізму. Спосіб одержання метаболіту не є важливим у практиці способу за цим винаходом.

Спосіб за даним винаходом не обмежений аналізом метаболіту, який сам по собі виявляє антивірусну чи протипухлинну активність. Замість цього можна проводити аналіз неактивних прекурсорів активних метаболітів. Прекурсори антивірусно активного дифосфатного метаболіту включають монофосфат вихідного лікарського засобу, монофосфати інших метаболітів вихідного лікарського засобу (наприклад, проміжна модифікація замісника на гетероциклічній основі), сам вихідний лікарський засіб та метаболіти, що генеруються клітиною при перетворенні проліків на вихідну сполуку перед фосфорилуванням. Структури прекурсорів можуть значно відрізнятися, оскільки вони є результатом клітинного метаболізму. Однак, ця інформація є вже відомою або може бути легко одержана фахівцем в цій області.

Якщо проліки, що аналізуються, не виявляють протипухлинної чи антивірусної активності самі по собі, то може бути потрібна корекція первинних результатів аналізу. Наприклад, якщо внутрішньоклітинне перетворення неактивного метаболіту на активний метаболіт відбувається з різними швидкостями у різних тканинах, що тестуються, то необроблені результати тобто, проліків, що метаболізуються до антивірусно активних форм у випадку вірусної інфекції, але залишаються по суті неметаболізованими у неінфікованих клітинах. Аналогічно, проліки можуть бути піддані скринінгу у трансформованих клітинах та нетрансформованій порівняльній тканині. Це буде особливо корисним у порівняльному тестуванні з метою відбору проліків для лікування гематологічних злоякісних новоутворень, наприклад, лейкозів.

Без обмеження будь-якою конкретною теорією механізму дії, у порівнянні з іншими тканинами чи клітинами, вважається, що тканино-селективні проліки селективно поглинаються цільовими клітинами та/або селективно метаболізуються усередині клітини. Унікальною перевагою метоксифосфонатних проліків за даним винаходом є те, що їхній метаболізм до діаніону при фізіологічних значеннях pH забезпечує їхню нездатність до зворотної дифузії з клітини. Таким чином, вони залишаються ефективними протягом тривалих періодів часу і підтримують підвищену внутрішньоклітинну концентрацію, виявляючи завдяки цьому підвищену активність. Вважається, що механізми підвищеної активності у цільовій тканині включають підвищене поглинання цільовими клітинами, підвищене внутрішньоклітинне утримання або обидва механізми працюють разом. Однак, спосіб виявлення селективності чи посилення доставки до цільової тканини не є важливим. Неважливо також, чи усе метаболічне перетворення проліків на вихідну сполуку відбувається усередині цільової тканини. У цільовій тканині має відбуватися лише кінцева стадія перетворення, що забезпечує виявлення активності; метаболізм у інших тканинах може приводити до утворення проміжних сполук, які зрештою перетворюються на антивірусні форми у цільовій тканині.

Бажаний ступінь селективності чи підвищення доставки буде змінюватись у залежності від вихідної сполуки та від способу вимірювання (розподіл дози у % або концентрація вихідного лікарського засобу). Загалом, якщо вихідний лікарський засіб вже має широке терапевтичне вікно, то для бажаних проліків може виявитись достатнім низький рівень селективності. З іншого боку, токсичні сполуки можуть потребувати детальнішого скринінгу для ідентифікації селективних проліків. Відносні витрати на спосіб за даним винаходом можна зменшити завдяки проведенню скринінгу лише у цільовій тканині та тканинах, про які відомо, що по відношенню до них вихідна сполука є відносно токсичною, наприклад, для PMEA, що є нефротоксичним у вищих дозах, увагу слід звернути у першу чергу на нирки та лімфоїдні тканини.

Стадія визначення відносної антивірусної активності проліків у обраних тканинах звичайно здійснюється шляхом проведення аналізу цільової та нецільової тканин на відносну присутність чи активність метаболіту проліків, про який відомо, що цей метаболіт виявляє антивірусну чи протипухлинну активність, або перетворюється на метаболіт, що їх має. Так, типово визначають відносну кількість вихідного лікарського засобу у тканинах протягом по суті одного й того самого періоду часу з метою ідентифікації проліків, що переважно метаболізуються у цільовій тканині на антивірусно чи протипухлинно активний метаболіт чи їхній прекурсор, який у цільовій тканині зрештою утворює активний метаболіт. У випадку антивірусних сполук активний метаболіт є дифосфатом фосфонатних вихідних сполук. Саме цей метаболіт включається до вірусної нуклеїнової кислоти, тим самим перериваючи подовження нитки нуклеїнової кислоти та припиняючи вірусну реплікацію. Метаболіти проліків можуть бути анаболічними метаболітами, катаболічними метаболітами або спільним продуктом анаболізму та катаболізму. Спосіб одержання метаболіту не є важливим у практиці способу за цим винаходом.

Спосіб за даним винаходом не обмежений аналізом метаболіту, який сам по собі виявляє антивірусну чи протипухлинну активність. Замість цього можна проводити аналіз неактивних прекурсорів активних метаболітів. Прекурсори антивірусно активного дифосфатного метаболіту включають монофосфат вихідного лікарського засобу, монофосфати інших метаболітів вихідного лікарського засобу (наприклад, проміжна модифікація замісника на гетероциклічній основі), сам вихідний лікарський засіб та метаболіти, що генеруються клітиною при перетворенні проліків на вихідну сполуку перед фосфорилуванням. Структури прекурсорів можуть значно відрізнятися, оскільки вони є результатом клітинного метаболізму. Однак, ця інформація є вже відомою або може бути легко одержана фахівцем в цій області.

Якщо проліки, що аналізуються, не виявляють протипухлинної чи антивірусної активності самі по собі, то може бути потрібна корекція первинних результатів аналізу. Наприклад, якщо внутрішньоклітинне перетворення неактивного метаболіту на активний метаболіт відбувається з різними швидкостями у різних тканинах, що тестуються, то необроблені результати аналізів неактивного метаболіту мають бути відкориговані для того, щоб врахувати розбіжності між різними типами клітин, тому що релевантним параметром є генерування активності у цільовій тканині, а не накопичення неактивних метаболітів. Однак, визначення потрібної корекції є доступним пересічному фахівцю. Таким чином, якщо стадія (d) даного способу потребує визначення активності, то активність може бути або визначена безпосередньо, або екстрапольована. Це не означає, що даний спосіб обмежений лише проведенням аналізу проміжних сполук, що є активними самі по собі. Наприклад, можна також аналізувати відсутність чи зниження рівня проліків у тестованих тканинах. Стадія (d) потребує лише оцінки активності, створюваної проліками при їхній взаємодії з певною тканиною, і вона може бути основана на екстраполяції чи іншому непрямому вимірі.

Стадія (d) способу за даним винаходом потребує визначення "відносної" активності проліків. Слід розуміти, що для цього не потрібно, щоб кожен аналіз чи серія аналізів обов'язково включав дослід з обраною нецільовою тканиною. Навпаки, до обсягу даного винаходу входить використання історичного контролю нецільової тканини чи тканин, або алгоритмів, що представляють результати, очікувані для таких нецільових тканин, для визначення контрольного значення нецільової активності.

Результати, одержані на стадії (d), потім використовуються для оптимального вибору чи ідентифікації проліків, які продукують більшу антивірусну активність у цільовій тканині порівняно з нецільовою тканиною. Саме ці проліки обирають для подальшої розробки.

Слід розуміти, що певна попередня оцінка проліків-кандидатів може бути проведена до практичного здійснення способу за даним винаходом. Наприклад, проліки мають бути в значній мірі неметаболізованими для проходження крізь шлунково-кишковий тракт, вони мають бути по суті стабільними у крові, і вони до певної міри мають проникати у клітини. У більшості випадків, вони повинні також завершати перше коло печінкової циркуляції без істотного метаболізму. Такі попередні дослідження є необов'язковими і добре відомі фахівцям в цій області.

Ті ж самі висновки, що наведені вище для антивірусної активності, є також застосовними до протипухлинних проліків метоксифосфонатнуклеотидних аналогів. Вони включають, наприклад, проліки PMEG, який є гуанільним аналогом PMEA. У цьому випадку цитотоксичні фосфонати, такі як PMEG, є придатними кандидатами для проведення досліджень, оскільки їхня цитотоксичність по суті забезпечує їхню протипухлинну активність.

Сполука, ідентифікована цим новим способом скринінгу, може бути потім піддана традиційній програмі преклінічних чи клінічних випробувань з метою підтвердження того, що було досягнуто бажаної мети. Типово, проліки вважаються селективними, якщо активність чи концентрація вихідного лікарського засобу у цільовій тканині (розподіл дози у %) становить більш ніж 2х, краще більш ніж 5х, порівняно з показником для вихідної сполуки у нецільовій тканині. За іншим варіантом, кандидата у проліки можна порівнювати з еталонними проліками. У цьому випадку селективність буде відносною, а не абсолютною. Селективними проліками будуть такі, що забезпечують більш ніж приблизно 10х концентрацію чи активність у цільовій тканині порівняно з прототипом, хоч ступінь селективності є предметом обговорення.

Новий спосіб одержання вихідних матеріалів чи проміжних сполук

Ця заявка включає також удосконалений спосіб виробництва кращих вихідних матеріалів (вихідних лікарських засобів) за даним винаходом - PMEA та (R)-PMPA. Типово, цей спосіб включає проведення реакції

9-(2-гідроксипропіл)аденіну (HPA) чи 9-(2-гідроксіетил)аденіну (HEA) з алкоксидом магнію з наступним доданням до реакційної суміші захищеного агліконсинтон-п-толуолсульфонілоксиметилфосфонату (тозилату) і виділення РМРА чи РМЕА, відповідно.

Краще, якщо R-енантіомером, який збагачують чи виділяють, є HPA. Якщо використовується хіральна суміш HPA, то R-PMRA може бути ізольованим з хіральної суміші РМРА після завершення синтезу.

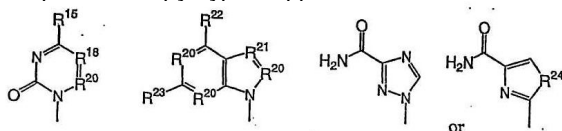
Типово тозилат є захищеним нижчими алкільними групами, але фахівцям відомі інші придатні групи. Може бути зручним використання тозилату, попередньо заміщеного замісниками фосфонатних проліків, які здатні діяти як захисні групи у реакції тозилування, тим самим дозволяючи пропустити стадію видалення захисних груп і одержувати безпосередньо проліки чи проміжні сполуки для їхнього синтезу.

Алкільна група алкоксиду магнію є некритичною і може бути будь-яким розгалуженим чи нормальним C₁-C₆-алкілом, але краще т-бутилом (для РМРА) чи ізопропілом (для РМЕА). Реакційні умови також є некритичними, але переважно включають нагрівання реакційної суміші до приблизно 70-75°C при помішуванні чи помірному збовтуванні.

Якщо немає потреби у збереженні фосфонатних замісників, то з продукту видаляють захисні групи (звичайно за допомогою бромтриметилсилану, якщо захисною групою у тозилаті є алкіл), а потім продукт виділяють кристалізацією чи іншим зручним способом, відомим фахівцям.

Гетероциклічна основа

У сполуках за даним винаходом, зображених структурними формулами (3) та (4), гетероциклічну основу В обирають зі структурних фрагментів



у яких

R¹⁵ означає H, OH, F, Cl, Br, I, OR¹⁶, SH, SR¹⁶, NH₂ чи NHR¹⁷,

R¹⁶ означає C₁-C₆-алкіл чи C₂-C₆-алкеніл, включаючи CH₃, CH₂CH₃, CH₂CCH₃, CH₂CHCH₂ та C₃H₇,

R¹⁷ означає C₁-C₆-алкіл чи C₂-C₆-алкеніл, включаючи CH₃, CH₂CH₃, CH₂CCH₃, CH₂CHCH₂ та C₃H₇,

R¹⁸ означає N, CF, CCl, CBr, Cl, CR¹⁹, CSR¹⁹ чи COR¹⁹,

R¹⁹ означає H, C₁-C₉-алкіл, C₂-C₉-алкеніл, C₂-C₉-алкініл, C₁-C₉-алкіл- C₁-C₉-алкоксигрупу або C₇-C₉-арилалкіл, незаміщений чи заміщений OH, F, Cl, Br чи I, і таким чином R¹⁹ включає -CH₃, -CH₂CH₃, -CHCH₂, -CHCHBr, -CH₂CH₂Cl, -CH₂CH₂F,

-CH₂CCH₃, -CH₂CHCH₂, -C₃H₇, -CH₂OH, -CH₂OCH₃, -CH₂OC₂H₅, -CH₂OCCH₃, -

CH₂OCH₂CHCH₂, -CH₂C₃H₇, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂OCH₃, -CH₂CH₂OC₂H₅, -

CH₂CH₂OCCH₃, -CH₂CH₂OCH₂CHCH₂ та -CH₂CH₂C₃H₇,

R²⁰ означає N чи CH,

R²¹ означає N, CH, CCN, CCF₃, CC=CH чи CC(O)NH₂,

R²² означає H, OH, NH₂, SH, SCH₃, SCH₂CH₃, SCH₂CCH₃, SCH₂CHCH₂, SC₃H₇,

NH(CH₃), N(CH₃)₂, NH(CH₂CH₃), N(CH₂CH₃)₂, NH(CH₂CCH₃), NH(CH₂CHCH₂),

NH(C₃H₇), галоген (F, Cl, Br чи I) або X, де X означає -(CH₂)_m(O)_n(CH₂)_mN(R¹⁰)₂, де

кожен m дорівнює незалежно 0-2, η дорівнює 0-1, і

R¹⁰ незалежно означає

H,

C₁-C₁₅-алкіл, C₂-C₁₅-алкеніл, C₆-C₁₅-арилалкеніл, C₆-C₁₅-арилалкініл, C₂-C₁₅-алкініл, C₁-C₆-алкіламіно-C₁-C₆-алкіл, C₅-C₁₅-аралкіл, C₆-C₁₅-гетероаралкіл, C₅-C₆-арил, C₂-C₆-гетероциклоалкіл, C₂-C₁₅-алкіл, C₃-C₁₅-алкеніл, C₆-C₁₅-арилалкеніл, C₃-C₁₅-алкініл, C₇-C₁₅-арилалкініл, C₁-C₆-алкіламіно- C₁-C₆-алкіл, C₅-C₁₅-аралкіл, C₆-C₁₅-гетероалкіл чи C₃-C₆-гетероциклоалкіл, у якому метилен в алкільному фрагменті, не сусідній з N⁶, є заміщеним на -O-,

причому необов'язково обидва R¹⁰ з'єднані разом з N з утворенням насиченого чи ненасиченого C₂-C₅-гетероциклу, який містить один чи два гетероатоми N та необов'язково додатковий гетероатом O чи S,

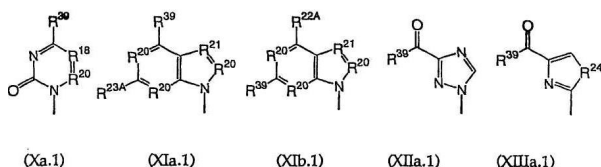
або одну з вищевказаних груп R¹⁰, заміщену 1-3 галоїдами, CN чи N₃, але необов'язково принаймні одна група R¹⁰ відрізняється від H,

R²³ означає H, OH, F, Cl, Br, I, SCH₃, SCH₂CH₃, SCH₂CCH₃, SCH₂CHCH₂, SC₃H₇, OR¹⁶, NH₂, NHR¹⁷ чи R²², і

R²⁴ означає O, S чи Se.

В також включає як захищені, так і незахищені гетероциклічні основи, зокрема, пуринові та піримідинові основи. Захисні групи для екзоциклічних амінів та інших лабільних груп відомі (Greene et al., "Protective Groups in Organic Synthesis") і включають N-бензоїл, ізобутирил, 4/4'-диметокситритил (DMT) і т.п. Вибір захисної групи є зрозумілим для пересічного фахівця і залежить від природи лабільної групи та хімічних умов, у яких ця захисна група повинна знаходитись, наприклад, кислотних, основних, окисних, відновних чи інших умов. Прикладами захищених фрагментів є N⁴-бензоїлцитозин, N⁶-бензоїладенін, N²-ізобутирилгуанін і т.п.

Захищені основи мають формули Xa.1, XIa.1, XIIa.1 чи XIIIa.1



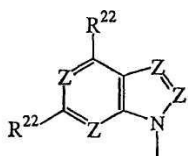
де R^{18} , R^{20} , R^{21} , R^{24} мають значення, вказані вище, R^{22A} означає R^{39} чи R^{22} , за умови, що R^{22} не є NH_2 , R^{23A} означає R^{39} чи R^{23} , за умови, що R^{23} не є NH_2 , R^{39} означає NHR^{40} , $NHC(O)R^{36}$ чи $CR^{41}N(R^{38})_2$, де R^{36} означає C_1 - C_{19} -алкіл, C_1 - C_{19} -алкеніл, C_3 - C_{10} -арил, адамантоїл, алкіланіл чи C_3 - C_{10} -арил, заміщений 1 чи 2 атомами чи групами, обраними з галогену, метилу, етилу, метоксигрупи, етоксигрупи, гідроксильної групи та ціаногрупи, R^{38} означає C_1 - C_{10} -алкіл, або обидва R^{38} разом утворюють 1-морфоліно, 1-піперидин чи 1-піролідин, R^{40} означає C_1 - C_{1a} -алкіл, включаючи метил, етил, пропіл, ізопропіл, бутіл, ізобутіл, т-бутіл, пентил, гексил, октил та деканіл, і R^{41} означає гідроген чи CH_3 .

Для основ структурних формул XIa.1 та XIb.1, якщо R є присутнім у R^{22A} чи R^{23A} , то обидві групи R^{39} у одній основі звичайно будуть однаковими. Прикладами R^{36} є феніл, феніл, заміщений одним з вищевказаних арильних замісників R^{36} , $-C_{10}H_{15}$ (де $C_{10}H_{15}$ означає 2-адамантоїл), $-CH_2-C_6H_5$, $-C_6H_5$, $-CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH_3$, метил, бутіл, т-бутіл, гептаніл, нонаніл, ундеканіл чи ундеценіл.

Конкретні основи включають гіпоксантин, гуанін, аденін, цитозин, інозин, тимін, урацил, ксантин, 8-азапохідні 2-амінопурину, 2,6-діамінопурину, 2-аміно-6-хлорпурину, гіпоксантину, інозину та ксантину, 7-деаза-8-азапохідні аденіну, гуаніну, 2-амінопурину, 2,6-діамінопурину, 2-аміно-6-хлорпурину, гіпоксантину, інозину та ксантину, 1-деазапохідні 2-амінопурину, 2,6-діамінопурину, 2-аміно-6-хлорпурину, гіпоксантину, інозину та ксантину, 7-деазапохідні 2-амінопурину, 2,6-діамінопурину, 2-аміно-6-хлорпурину, гіпоксантину, інозину та ксантину, 3-деазапохідні 2-амінопурину, 2,6-діамінопурину, 2-аміно-6-хлорпурину, гіпоксантину, інозину та ксантину, 6-азацитозин, 5-фторцитозин, 5-хлорцитозин, 5-йодцитозин, 5-бромцитозин, 5-метилцитозин, 5-бромвінілурацил, 5-фторурацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, 5-бромурацил, 5-трифторметилурацил, 5-метоксиметилурацил, 5-етинілурацил та 5-пропінілурацил.

Краще, B означає 9-пуринільний залишок, обраний з гуанілу, 3-деазагуанілу, 1-деазагуанілу, 8-азагуанілу, 7-деазагуанілу, аденілу, 3-деазааденілу, 1-деазааденілу, 8-азааденілу, 7-деазааденілу, 2,6-діамінопуринілу, 2-амінопуринілу, 6-хлор-2-амінопуринілу та 6-тіо-2-амінопуринілу, або B' означає 1-піримідинільний залишок, обраний з цитозинілу, 5-галоїдцитозинілу та 5-(C_1 - C_3 -алкіл)цитозинілу.

Кращі групи B мають формулу



у якій

R^{22} незалежно позначають галоїд, оксиген, NH_2 , X чи H , але необов'язково

принаймні один R^{22} означає X ,

X означає $-(CH_2)_m(O)_n(CH_2)_mN(R^{10})_2$, де m дорівнює 0-2, n дорівнює 0-1, і

R^{10} незалежно позначають

H ,

C_1 - C_{15} -алкіл, C_2 - C_{15} -алкеніл, C_6 - C_{15} -арилалкеніл, C_6 - C_{15} -арилалкініл, C_2 - C_{15} -алкініл, C_1 - C_6 -алкіламіно- C_1 - C_6 -алкіл, C_5 - C_{15} -аралкіл, C_6 - C_{15} -гетероаралкіл, C_5 - C_6 -арил, C_2 - C_6 -гетероциклоалкіл,

C_2 - C_{15} -алкіл, C_3 - C_{15} -алкеніл, C_6 - C_{15} -арилалкеніл, C_3 - C_{15} -алкініл, C_7 - C_{15} -арилалкініл, C_1 - C_6 -алкіламіно- C_1 - C_6 -алкіл, C_5 - C_{15} -аралкіл, C_6 - C_{15} -гетероалкіл чи C_3 - C_6 -гетероциклоалкіл, де метилен у алкільному фрагменті, не сусідній з N^6 , був заміщений на $-O-$,

причому необов'язково обидва R^{10} з'єднуються разом з N з утворенням насиченого чи ненасиченого C_2 - C_5 -гетероциклу, що містить один чи два гетероатоми N і необов'язково додатковий гетероатом O чи S ,

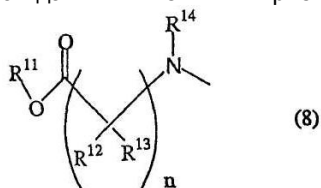
або одна з вищевказаних груп R^{10} є заміщеною 1-3 галоїдами, CN чи N_3 , але необов'язково принаймні одна група R^{10} означає не H , і

Z означає N чи CH , за умови, що гетероциклічне ядро відрізняється від пурину не більш ніж одним Z .

Групи E представляють аглікони, що використовуються у метоксифосфонатнуклеотидних аналогах. Краще, група E означає $-CH(CH_3)CH_2$ - чи $-CH_2CH_2$ -. Також краще, щоб бічні групи у хіральных центрів аглікону знаходились по суті виключно у (R)-конфігурації (за винятком гідроксиметилу, який означає збагачений (S)-енантіомер).

R^1 означає складний оксифір, що гідролізується *in vivo*, який має структурну формулу $-OR^{35}$ чи $-OR^6$, де R^{35} визначений у колонці 64, рядок 49 патента США №5798340, який включено сюди за посиланням, а R^6 визначений вище. Краще, якщо R^1 означає арилоксигрупу, звичайно, незаміщену чи пара-заміщену (як визначено у R^6) феноксигрупу.

R^2 означає амінокислотний залишок, необов'язково, за умови, що будь-яка карбоксильна група, зв'язана з амідатним N менш ніж приблизно 5 атомами, є етерифікованою. R^2 типово має структурну формулу



у якій

n дорівнює 1 чи 2,

R^{11} означає R^6 чи H , краще $R^6 = C_3$ - C_9 -алкіл, C_3 - C_9 -алкіл, заміщений незалежно OH , галогеном, O чи N , C_3 - C_6 -арил, C_3 - C_6 -арил, незалежно заміщений OH , галогеном, O чи N , або C_3 - C_9 -арилалкіл, незалежно заміщений OH , галогеном, O

чи N,

R^{12} незалежно означає Н чи C_1 - C_9 -алкіл, який є незаміщеним чи заміщеним замісниками, незалежно обраними групи, що складається з ОН, О, N, $COOR^{11}$ та галогену, C_3 - C_6 -арил, який є незаміщеним чи заміщеним замісниками, незалежно обраними з групи, що складається з ОН, О, N, $COOR^{11}$ та галогену, або C_3 - C_9 -арилалкіл, який є незаміщеним чи заміщеним замісниками, незалежно обраними з групи, що складається з ОН, О, N, $COOR^{11}$ та галогену,

R^{13} незалежно означає $C(O)OR^{11}$, аміногрупу, амід, гуанідиніл, імідазоліл, індоліл, сульфоксид, фосфорил, C_1 - C_3 -алкіламіногрупу, C_1 - C_3 -алкілдіаміногрупу, C_1 - C_6 -алкеніламіногрупу, гідроксильну групу, тіол, C_1 - C_3 -алкоксигрупу, C_1 - C_3 -алктіол, $(CH_2)_nCOOR^{11}$, C_1 - C_6 -алкіл, який є незаміщеним чи заміщеним ОН, галогеном, SH, NH_2 , фенілом, гідроксифенілом чи C_7 - C_{10} -алкоксифенілом, C_2 - C_6 -алкеніл, який є незаміщеним чи заміщеним ОН, галогеном, SH, NH_2 , фенілом, гідроксифенілом чи C_7 - C_{10} -алкоксифенілом, та C_6 - C_{12} -арил, який є незаміщеним чи заміщеним ОН, галогеном, SH, NH_2 , фенілом, гідроксифенілом чи C_7 - C_{10} -алкоксифенілом, і

R^{14} означає Н чи C_1 - C_9 -алкіл або C_1 - C_9 -алкіл, незалежно заміщений ОН, галогеном, $COOR^{11}$, О чи N, C_3 - C_6 -арил, C_3 - C_6 -арил, який незалежно заміщеним ОН, галогеном, $COOR^{11}$, О чи N, або C_3 - C_6 -арилалкіл, який є незалежно заміщеним ОН, галогеном, $COOR^{11}$, О чи N.

Краще, R^{11} означає C_1 - C_6 -алкіл, найкраще, ізопропіл, R^{13} означає бічний ланцюг природної амінокислоти, $n=1$, R^{12} означає Н і R^{14} означає Н. У сполуці структурної формули (2), винахід включає метаболіти, у яких складні фенокси та ізопропілові ефіри були гідролізовані до -ОН. Аналогічно, до обсягу винаходу включені деетерифіковані збагачені фосфоноамідатні метаболіти сполук 5(a), 5(b) та (6).

Арил та "О" чи "N"-заміщення визначені у колонці 16, рядки 42-58, патента США №5798340.

Типово, амінокислоти є природними чи /-амінокислотами. Придатні конкретні приклади наведені у патенті США № 5798340, наприклад, у Таблиці 4 та колонках 8-Ю.

Алкіл у тому значенні, що використовується тут, якщо не вказано інше, означає нормальний, вторинний, третинний чи циклічний вуглеводень. Якщо не вказано інше, алкіл означає C_1 - C_{12} . Прикладами є $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$, $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$, $-C(CH_3)_3$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$, $-CH(CH_2CH_3)_2$, $-C(CH_3)_2CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$, $-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$, $-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$, $C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$, $-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$, $-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$, і $-CH(CH_3)C(CH_3)_3$.

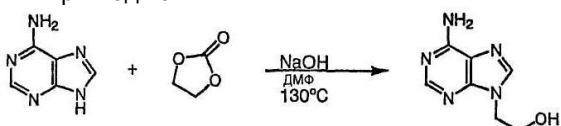
Алкеніл та алкініл визначені так само, але містять щонайменше один подвійний чи потрійний зв'язок, відповідно.

У тих випадках, коли розкриті енольні чи кетогрупи, відповідні таутомери вважаються також описаними.

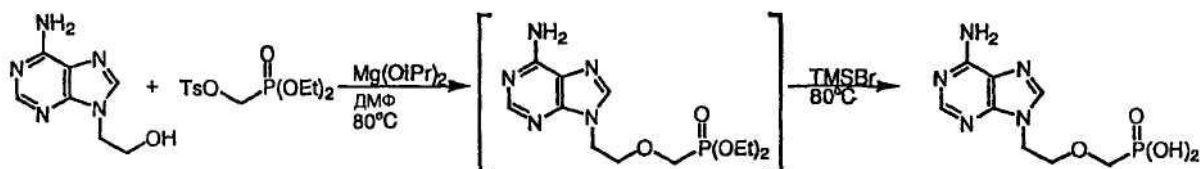
Сполуки проліків за даним винаходом пропонуються у формі вільної основи чи різних солей, перелічених у [патенті США №5798340], і змішуються з фармацевтично прийнятними ексципієнтами чи сольватуючими розріджувачами для використання як фармацевтичні продукти, також як описано у [патенті США №5798340]. Ці проліки мають антивірусні та інші властивості, вже визначені для вихідних лікарських засобів [див патент США №5798340 та інші посилання, що стосуються метоксифосфонатнуклеотидних аналогів]. Слід розуміти, що діастереомер структурної формули (4) є принаймні корисним як проміжна речовина у хімічному одержанні вихідного лікарського засобу шляхом гідролізу *in vitro*, незалежно від його відносно неселективного характеру, як це було визначено дослідженнями.

Винахід буде краще пояснений з посиланням на такі приклади:

Приклад 1а



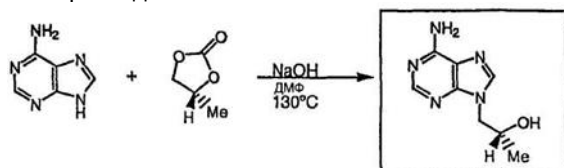
Перетворення аденіну на РМЕА з використанням ізопропоксиду магнію. До суспензії аденіну (16,8г, 0,124моль) у ДМФ (41,9мл) додають етиленкарбонат (12,1г, 0,137моль) та гідроксид натрію (0,100г, 0,0025моль). Суміш нагрівають при 130°C протягом ночі. Реакцію охолоджують до температури нижче 50°C і додають толуол (62,1мл). Суспензію далі охолоджують до 5°C на 2 години, фільтрують та промивають толуолом (2×). Вологу тверду речовину висушують під вакуумом при 65°C, одержуючи 20,0г (90%) 9-(2-гідроксіетил)аденін у вигляді білуватої твердої речовини. Т.пл. 238-240°C.



9-(2-Гідроксіетил)аденін (HEA) (20,0г, 0,112моль) суспендують у ДМФ (125мл) та нагрівають до 80 °C. До суміші додають ізопропоксид магнію (11,2г, 0,0784моль), чи за іншим варіантом т-бутоксид магнію, а потім діетил-п-толуолсульфонілоксиметилфосфонат (66,0г, 0,162моль) протягом однієї години. Суміш перемішують при 80°C протягом 7 годин. 30мл летких речовин видаляють вакуумною перегонкою і до реакції додають 30мл свіжого ДМФ. Після охолодження до кімнатної температури додають бромтриметилсилан (69,6г, 0,450моль) і суміш нагрівають до 80°C протягом 6 годин, реакцію концентрують, одержуючи в'язку смолисту речовину. Смолисту речовину розчиняють у 360мл води, екстрагують 120мл дихлорметану, доводять до pH 3,2 гідроксидом натрію і одержану суспензію перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Суспензію

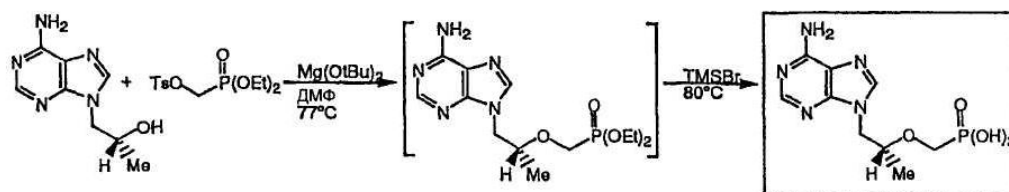
охолоджують до 4°C на одну годину. Тверді речовини видаляють фільтрацією, промивають водою (2×) та висушують у вакуумі при 56°C, одержуючи 20г (65,4%) 9-[2-(фосфонометокси)етил]аденін (PMEA) у вигляді білої твердої речовини. Т.пл. >200°C (розкл.) ¹H ЯМР (D₂O) δ 3,49 (т, 2H), 3,94 (т, 2H), 4,39 (т, 2H), 8,13 (с, 1H), 8,22 (с, 1H).

Приклад 1b



Перетворення аденіну на РМРА з використанням т-бутоксиду магнію.

До суспензії аденіну (40г, 0,296моль) у ДМФ (41,9мл) додають (R)-пропіленкарбонат (34,5г, 0,338моль) та гідроксид натрію (0,480г, 0,012моль). Суміш нагрівають при 130°C протягом ночі. Реакцію охолоджують до 100°C і додають толуол (138мл), а потім метансульфонову кислоту (4,7г, 0,049моль), підтримуючи температуру реакції у межах 100-110°C. Додають ще толуол (114мл) для одержання гомогенного розчину. Розчин охолоджують до 3°C протягом 7 годин, а потім витримують при 3°C протягом однієї години. Одержану тверду речовину відокремлюють фільтрацією та промивають ацетоном (2×). Вологу тверду речовину висушують у вакуумі при 80°C, одержуючи 42,6г (75%) (R)-9-[2-(гідрокси)пропіл]аденін (HPA) у вигляді білуватої твердої речовини. Т.пл. 188-190°C.



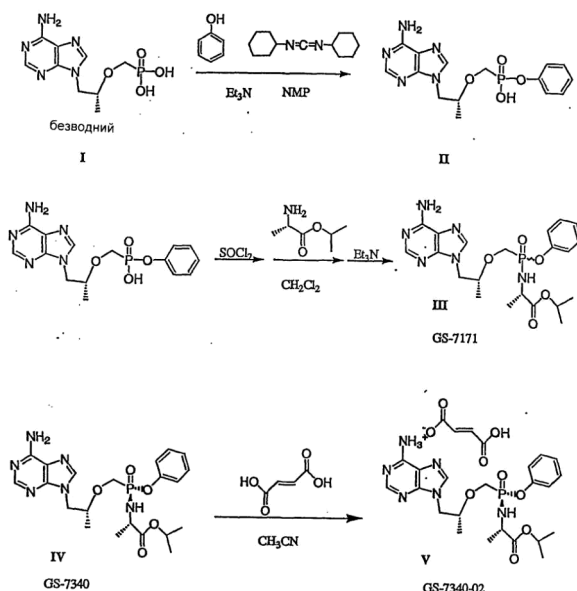
(P)-9-[2-(гідрокси)пропіл]аденін (HPA) (20,0г, 0,104моль) суспендують у ДМФ (44,5мл) та нагрівають до 65°C, додають до суміші т-бутоксид магнію (14,2г, 0,083моль), чи за іншим варіантом ізопропоксид магнію, протягом однієї години, а потім діетил-п-толуолсульфонілоксиметилфосфонат (66,0г, 0,205моль) протягом двох годин, підтримуючи температуру 78°C. Суміш перемішують при 75°C протягом 4 годин. Після охолодження до температури нижче 50°C додають бромтриметилсилан (73,9г, 0,478моль) і суміш нагрівають до 77°C протягом 3 годин. Після завершення реакцію нагрівають до 80°C і леткі речовини видаляють шляхом атмосферної дистиляції. Залишок розчиняють у воді (120мл) при 50°C, а потім екстрагують етилацетатом (101мл). рН водної фази доводять до рН 1,1 за допомогою гідроксиду натрію, вводять затравку з аутентичним (R)-PMPA, і рН водного шару знов доводять до рН 2,1 за допомогою гідроксиду натрію. Одержану суспензію перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Суспензію охолоджують до 4°C на три години. Тверду речовину відокремлюють фільтрацією, промивають водою (60мл) та висушують у вакуумі при 50°C, одержуючи 18,9г (63,5%) сирового (K)-9-[2-(фосфонометокси)пропіл]аденіну (PMPA) у вигляді білуватої твердої речовини.

Сировий (P)-9-[2-(фосфонометокси)пропіл]аденін нагрівають до кипіння зі зворотним холодильником у воді (255 мл) до повного розчинення твердих речовин. Розчин охолоджують до кімнатної температури протягом 4 годин. Одержану суспензію охолоджують при 4°C протягом трьох годин. Тверду речовину відокремлюють фільтрацією, промивають водою (56мл) та ацетоном (56мл) і висушують у вакуумі при 50°C, одержуючи 15,0г (50,4%) (R)-9-[2-(фосфонометокси)пропіл]аденіну (PMPA) у вигляді білої твердої речовини. Т.пл.: 278-280°C.

Приклад 2

Одержання GS-7171 (III)

Схема 1



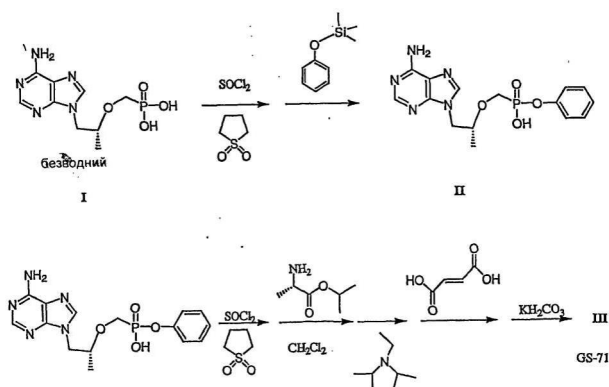
Емальований реактор завантажують безводним РМРА, (I) (14,6кг, 50,8моль), фенолом (9,6кг, 102моль) та 1-метил-2-піролідіноном (39кг). Суміш нагрівають до 85°C та додають триетиламін (6,3 кг, 62,3 моль). Потім додають розчин 1,3-дициклогексилкарбодііміду (17,1кг, 82,9моль) у 1-метил-2-піролідіноні (1,6кг) протягом 6 годин при 100°C. Продовжують нагрівати протягом 16 годин. Реакцію охолоджують до 45°C, додають воду (29кг) та охолоджують до 25°C. Тверді речовини видаляють з реакції фільтрацією та промивають водою (15,3кг). Об'єднані фільтрат та промивну рідину концентрують до жовто-коричневої суспензії при зниженому тиску, додають воду (24,6кг) та доводять до pH=11 за допомогою NaOH (25% у воді). Високодисперсні тверді речовини видаляють фільтрацією крізь діатомову землю видаляють (2кг) за наступною промивкою водою (4,4кг). Об'єднані фільтрат та промивну рідину екстрагують етилацетатом (28кг). Водний розчин доводять до pH=3,1 за допомогою HCl (37% у воді) (4кг). Сирову речовину II виділяють фільтрацією та промивають метанолом (12,7кг). Вологий осад сирової речовини II суспендують у метанолі (58кг). Тверді речовини відокремлюють фільтрацією, промивають метанолом (8,5кг) та висушують при зниженому тиску, одержуючи 9,33кг II у вигляді білого порошку: ^1H ЯМР (D_2O) δ 1,2 (д, 3H), 3,45 (кв, 2H), 3,7 (кв, 2H), 4 (м, 2H), 4,2 (кв, 2H), 4,35 (дц, 2H), 6,6 (д, 2H), 7 (т, 1H), 7,15 (т, 2H), 8,15 (с, 1H), 8,2 (с, 1H), ^{31}P ЯМР (D_2O) δ 15,0 (розщеплений).

GS-7171 (III). (Схема 1) Емальований реактор завантажують монофеніл-РМРА, (II), (9,12кг, 25,1моль) та ацетонітрилом (30,7кг). Додають тіонілхлорид (6,57кг, 56,7моль) при температурі нижче 50°C. Суміш нагрівають при 75°C до розчинення твердих речовин. Температуру реакції підвищують до 80°C і збирають леткі речовини (11,4кг) атмосферною перегонкою під азотом. Залишок від перегонки охолоджують до 25°C, додають дихлорметан (41кг) та охолоджують до -29°C. Додають протягом 60 хвилин при температурі -18°C розчин (L)-аланінізопропілового складного ефіру (7,1кг, 54,4моль) у дихлорметані (36кг), а потім триетиламін (7,66кг, 75,7моль) протягом 30 хвилин при температурі від -18°C. Реакційну суміш підігрівають до кімнатної температури та промивають п'ять разів розчином дигідрофосфату натрію (10% у воді, кожна промивка 15,7кг). Органічний розчин висушують безводним сульфатом натрію (182кг), фільтрують, промивають дихлорметаном (28кг) та концентрують до маслянистої рідини при зниженому тиску. До маслянистої рідини додають ацетон (20кг) та суміш концентрують при зниженому тиску. До одержаної маслянистої рідини додають ацетон (18,8кг). Половину розчину продукту очищають хроматографією на шарі 38×38см з 22кг силікагелю 60, 37-74 мкм (230-400меш). Колонку елюють 480кг ацетону. Процедуру очистки повторюють для другої половини маслянистої рідини, використовуючи свіжі силікагель та ацетон. Фракції, що містять чистий продукт, концентрують при зниженому тиску до маслянистої рідини. До маслянистої рідини додають ацетонітрил (19,6кг) і суміш концентрують при зниженому тиску. Додають ацетонітрил (66,4кг) і розчин охолоджують до температури у межах від 0 до -5°C протягом 16 годин. Тверді речовини видаляють фільтрацією і фільтрат концентрують при зниженому тиску до 5,6кг III у вигляді маслянистої рідини темного кольору:

^1H ЯМР (CDCl_3) δ 1,1 (м, 12H), 3,7 (м, 1H), 4,0 (м, 5H), 4,2 (м, 1H), 5,0 (м, 1H), 6,2 (с, 2H), 7,05 (м, 5H), 8,0 (с, 1H), 8,25 (д, 1H), ^{31}P ЯМР (CDCl_3) δ 21,0, 22,5 (розщеплений).

Альтернативний спосіб одержання GS-7171 (III)

Схема 2



Монофеніл-РМРА (II). Круглодонну колбу зі зворотним холодильником та вхідним отвором для азоту поміщують на масляну баню при 70°C. Колбу завантажують безводним РМРА (I) (19,2г, 67ммоль), N,N-диметилформамідом (0,29г, 3,3ммоль) та тетраметиленсульфоном (40мл). Тіонілхлорид (14,2г, 119ммоль) додають протягом 4 годин. Температуру нагрівання підвищують до 100°C протягом такого ж часу. Одержують гомогенний розчин. До розчину протягом 5 хвилин додають фенокситриметилсилан (11,7г, 7 ммоль). Продовжують нагрівання на масляній бані при 100°C протягом ще двох годин. Реакцію виливають у ацетон (400мл) при швидкому перемішуванні та охолодженні до 0°C. Тверді речовини відокремлюють фільтрацією, висушують при зниженому тиску та розчиняють у метанолі (75мл). pH розчину доводять до 3,0 за допомогою розчину гідроксиду калію (45% водн.) при охолодженні на суміші льод/вода. Тверді речовини, що утворюються, відокремлюють фільтрацією, промивають метанолом та висушують при зниженому тиску, одержуючи 20,4г II (Схема 2) у вигляді білого порошку.

GS-7171 (III). Монофеніл-РМРА (II) (3г, 8,3ммоль), тетраметиленсульфон (5мл) та N,N-диметилформамід (1 краплина) змішують у круглодонній колбі на масляній бані при 40°C. Додають тіонілхлорид (1,96г, 16,5ммоль). Через 20 хвилин прозорий розчин забирають з бані, розводять дихлорметаном (10мл) і додають до розчину (L)-аланінізопропілового складного ефіру (5г, 33ммоль) та діізопропілетиламіну (5,33г, 41ммоль) у дихлорметані (20мл) при -10°C. Реакційну суміш підігрівують до кімнатної температури та промивають три рази розчином дигідрофосфату натрію (10% водн., кожна промивка 10мл). Органічний розчин висушують над безводним сульфатом натрію та концентрують при зниженому тиску до маслянистої рідини. Маслянисту рідину змішують з фумаровою кислотою (0,77г, 6,6ммоль) та ацетонітрилом (40мл) і нагрівають до кипіння зі зворотним холодильником, одержуючи гомогенний розчин. Розчин охолоджують на льодяній бані і тверді речовини відокремлюють фільтрацією. Тверду фумаратну сіль GS-7171 висушують при зниженому тиску, одержуючи 3,7 г речовини. Сіль (3,16г, 5,3ммоль) суспендують у дихлорметані (30мл) та перемішують з розчином карбонату калію (5мл, 2,5М у воді) до розчинення твердої речовини. Органічний шар відокремлюють, а потім промивають водою (5мл), висушують над безводним сульфатом натрію та концентрують при зниженому тиску, одержуючи 2,4г III у вигляді жовтувато-коричневої піни.

Приклад 3

А. Розділення діастереомерів методом періодичної елюентної хроматографії

Діастереомери GS-7171 (III) розділяють методом періодичної елюентної хроматографії з використанням комерційно доступної колонки Chiralpak AS, 20мкм, 21×250мм для напівпрепаративної ВЕРХ із запобіжною колонкою Chiralpak AS, 20мкм, 21×50мм. Chiralpak® AS є фірмовим матеріалом наповнювача, що виробляється фірмою Diacel та продається у Північній Америці фірмою Chiral Technologies, Inc. [патенти США №№5202433, RE 35919, 5434298, 5434299 та 5498752]. Chiralpak AS є хіральною нерухомою фазою (CSP), яка складається з амілозатрис[(5)-а-метилбензилкарбамату], нанесеного на основу з силікагелю.

Діастереомерну суміш GS-7171 розчиняють у рухомій фазі і подають помпою у хроматографічну систему аліквоти приблизно 1г GS-7171. Небажаний діастереомер, позначений як GS-7339, утворював перший великий широкий (тривалістю близько 15 хв.) пік при елююванні з колонки. Після закінчення елюювання піка GS-7339 рухому фазу негайно заміняли на 100% метиловий спирт, який спричинював елюювання бажаного діастереомеру, позначеного як GS-7340 (IV), з колонки у вигляді вузького піка з фронтом розчинника метилового спирту. Метиловий спирт використовують для зменшення загальної тривалості циклу. Після перших двох впорскувань обидва діастереомери збирають у вигляді окремих великих фракцій, які містять один з очищених діастереомерів (>99,0% окремого діастереомеру). Розчинники рухомої фази видаляють у вакуумі, одержуючи очищений діастереомер у вигляді рихлої піни.

Близько 95% вихідної маси GS-7171 виділяють у двох діастереомерних фракціях. Фракція GS-7340 включає близько 50% від загальної маси виділеної речовини.

Хроматографічні умови були такими:

Рухома фаза	GS-7171	-
(початкова)	ацетонітрил:ізопропіловий спирт (90:10)	
(кінцева)	100% метиловий спирт	
Витрата	10мл/хвилину	
Час прогону	близько 45 хвилин	
Детектування	УФ на 275нм	
Температура	Навколишнього середовища	
Профіль	GS-7339 (діастереомер В)	
елюювання	GS-7340 (діастереомер А,	

(IV))

В. Виділення діастереомеру GS-7171 методом SMB-хроматографії Загальний опис методу хроматографії з імітованим рухомим шаром (SMB), [див. у Strube et al., "Organic Process Research and Development" 2:305-319 (1998)].

GS-7340 (IV). GS-7171 (III), 2,8кг, очищують методом хроматографії з імітованим рухомим шаром на шарах наповнювача розміром 10см на 5 см (Chiral Technologies Inc., 20 мікрон Chiralpak AS покриття на силікагелі) (1,2кг). Колонки елюють 30% метанолу у ацетонітрилі. Фракції, що містять продукт, концентрують до розчину IV у ацетонітрилі (2,48кг). Розчин з часом перетворюється на кристалічну масу, просочену ацетонітрилом. Кристалічну масу висушують при зниженому тиску, одержуючи кристалічний порошок жовтувато-коричневого кольору, 1,301кг IV, діастереомерна чистота 98,7%, т.пл. 117-120 °С, ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 1,15 (м, 12H), 3,7 (т, 1H), 4,0 (м, 5H), 4,2 (дд, 1H), 5,0 (м, 1H), 6,05 (с, 2H), 7,1 (м, 5H), 8,0 (с, 1H), 8,2 (с, 1H), ³¹P ЯМР (CDCl₃) δ 21,0 (розщеплений).

С. Розділення діастереомерів методом C18 ОФ-ВЕРХ

GS-7171 (III) піддають хроматографії методом обернено-фазової ВЕРХ для розділення діастереомерів за таким спрощеним протоколом

Хроматографічна колонка	Phenomenex Luna™ C18(2), 5мкм, розмір пір 100 (Phenomenex, Torrance, CA), чи еквівалентна
Запобіжна колонка	Pellicular C18 (Alltech, Deerfield, IL), чи еквівалентна
Рухома фаза	А - 0,02% (85%) H ₃ PO ₄ у суміші вода : ацетонітрил (95:5) В - 0,02% (85%) H ₃ PO ₄ у суміші вода : ацетонітрил (50:50)

Гradient рухомої фази:

Час	% Рухома фаза А	% Рухома фаза В
0	100	0
5	100	0
7	70	30
32	70	300
40	0	100
50	0	100

Час прогону	50 хвилин
Затримка для врівноважування	10хв. при 100% рухомої фази А
Швидкість подачі	1,2мл/хв
Температура	Навколишнього середовища
Детектування	УФ на 260нм
Розчин зразка	20мМ натрій-фосфатний буфер, рН 6
Час утримання	GS-7339, близько 25 хвилин GS-7340, близько 27 хвилин

Д. Розділення діастереомерів кристалізацією

GS-7340 (IV). Розчин GS-7171 (III) у ацетонітрилі концентрують до піни бурштинового кольору (14,9г) при зниженому тиску. Піну розчиняють у ацетонітрилі (20 мл) та вносять затравку кристалу IV. Суміш перемішують протягом ночі, охолоджують до 5 °С і тверді речовини відокремлюють фільтрацією. Тверді речовини висушують до 2,3 г IV у вигляді білих кристалів, діастереомерна чистота 98% (³¹P ЯМР):

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 1,15 (м, 12H), 3,7 (т, 1H), 3,95 (м, 2H), 4,05 (м, 2H), 4,2 (м, 2H), 5,0 (м, 1H), 6,4 (с, 2H), 7,1 (м, 5H), 8,0 (с, 1H), 8,2 (с, 1H), ³¹P ЯМР (CDCl₃) δ 19,5 (розщеплений).

Рентгеноструктурний аналіз окремого кристалу, обраного з цього продукту, дав такі результати:

Колір кристалу, габітус	безбарвний, колончастий
Розмір кристалу	0,25×0,12×0,08мм
Кристаліграфічна сингонія	орторомбічна
Тип решітки	примітивний
Параметри решітки	a=8,352(1) b=15,574(2) c=18,253(2) V=2374,2(5) ³
Просторова група	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (№19)

Значення Z	4
D _{розр}	1,333г/см ³
F ₀₀₀	1008,00
μ(MoKα)	1,60 см ⁻¹

Приклад 4

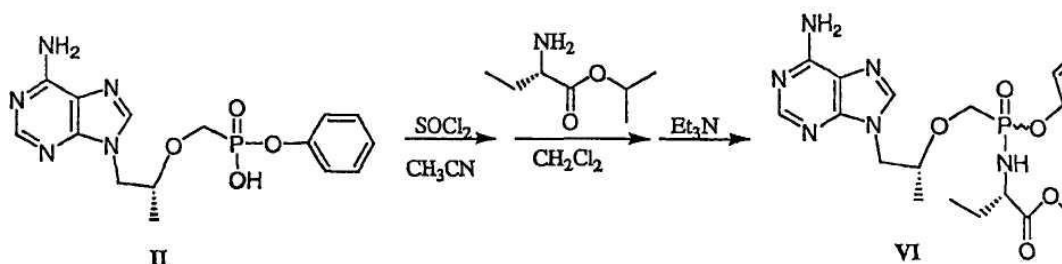
Одержання фумаратної солі GS-7340

GS-7340-02 (V). (Схема 1) Емальований реактор завантажують GS-7340 (IV), (1,294кг, 2,71моль), фумаровою кислотою (284г, 2,44моль) та ацетонітрилом (24,6кг). Суміш нагрівають до кипіння зі зворотним холодильником для розчинення твердих речовин, фільтрують у гарячому стані та охолоджують до 5°C на 16 годин. Продукт відокремлюють фільтрацією, промивають ацетонітрилом (9,2кг) та висушують, одержуючи 1329г (V) у вигляді білого порошку: т.пл. 119,7-121,1°C, [α]_D²⁰-41,7° (с 1,0, оцтова кислота).

Приклад 5

Одержання GS-7120 (VI)

Схема 3



GS-7120

Круглодонну колбу на 5л завантажують монофеніл-ПМРА, (II), (200г, 0,55моль) та ацетонітрилом (0,629кг). Додають тіонілхлорид (0,144 кг, 1,21моль) при температурі нижче 27°C. Суміш нагрівають при 70°C до розчинення твердих речовин. Леткі речовини (0,45л) видаляють атмосферною дистиляцією під азотом. Залишок від перегонки охолоджують до 25°C, додають дихлорметан (1,6кг) і суміш охолоджують до -20°C. Додають розчин етилового складного ефіру (L)-α-аміномасляної кислоти (0,144кг, 1,1моль) у дихлорметані (1,33 кг) протягом 18 хвилин при температурі від -20 до -10°C, а потім триетиламін (0,17кг, 1,65моль) протягом 15 хвилин при температурі від -8 до -15°C. Реакційну суміш підігрівують до кімнатної температури та промивають чотири рази розчином дигідрофосфату натрію (10% водн., 0,3 л кожна промивка). Органічний розчин висушують безводним сульфатом натрію (0,5кг) та фільтрують. Тверді речовини промивають дихлорметаном (0,6кг) і об'єднані фільтрат та промивні рідини концентрують до маслянистої рідини при зниженому тиску. Маслянисту рідину очищують хроматографією на шарі 15×13см з 1,2кг силікагелю 60, 74-37мкм (230-400меш). Колонку елюють градієнтом дихлорметану та метанолу. Фракції, що містять продукт, концентрують при зниженому тиску, одержуючи 211г VI (Схема 3) у вигляді піни жовтувато-коричневого кольору.

Приклад 5а

Розділення діастереомерів GS-7120 методом періодичної елюєнтної хроматографії

Діастереомерну суміш очищують з використанням умов, описаних для GS-7171 у Прикладі 3А, за винятком таких:

Рухома фаза	GS-7120 - ацетонітрил
(Початкова)	ізопропіловий спирт (98:2)
(Кінцева)	100% метиловий спирт
Профіль елювання	GS-7341 (діастереомер В)
	GS-7342 (діастереомер А)

Приклад 6

Розділення діастереомерів GS-7120 кристалізацією

Круглодонну колбу на 1л завантажують монофеніл-ПМРА, (II), (50г, 0,137моль) та ацетонітрилом (0,2л). Додають тіонілхлорид (0,036кг, 0,303моль) з екзотермічним ефектом в 10°C. Суміш нагрівають до кипіння зі зворотним холодильником до розчинення твердих речовин. Леткі речовини (0,1л) видаляють атмосферною дистиляцією під азотом. Залишок від перегонки охолоджують до 25°C, додають дихлорметан (0,2кг) і суміш охолоджують до -20°C. Додають розчин етилового складного ефіру (L)-α-аміномасляної кислоти (0,036кг, 0,275моль) у дихлорметані (0,67кг) протягом 30 хвилин при температурі від -20 до -8°C, а потім триетиламін (0,042кг, 0,41моль) протягом 10 хвилин при температурі до -6°C. Реакційну суміш підігрівують до кімнатної температури та промивають чотири рази розчином дигідрофосфату натрію (10% водн., 0,075л кожна промивка). Органічний розчин висушують безводним сульфатом натрію (0,1кг) та фільтрують. Тверді речовини промивають етилацетатом (0,25) і об'єднані фільтрат та промивну рідину концентрують до маслянистої рідини при зниженому тиску. Маслянисту рідину розводять етилацетатом (0,25л), вносять затравку кристалізації, перемішують протягом ночі та охолоджують до -15°C. Тверді речовини відокремлюють фільтрацією та висушують при зниженому тиску, одержуючи 17,7г GS-7342 (Таблиця 5) у вигляді порошку жовтувато-коричневого кольору:

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 0,95 (т, 3H), 1,3 (м, 6H), 1,7, (м, 2H), 3,7 (м, 2H), 4,1 (м, 6H), 4,4 (дд, 1H), 5,8 (с, 2H), 7,1 (м, 5H), 8,0 (с, 1H), 8,4 (с, 1H), ³¹P ЯМР (CDCl₃) δ 21 (розщеплений).

Приклад 7

Розділення діастереомерів GS-7097

Діастереомерну суміш очищують з використанням умов, описаних для GS-7171 (Приклад 3А), за винятком

таких:

Рухома фаза GS-7120 -
(початкова) ацетонітрил:ізопропіловий
спирт (95:5)
(кінцева) 100% метиловий спирт
Профіль елюювання GS-7115 (діастереомер В)
GS-7114 (діастереомер А)

Приклад 8

Альтернативна методика одержання GS-7097

GS-7097: Феніл-РМПА, етил-Баланіламідат. Феніл-РМПА (15,0г, 41,3ммоль), хлористоводневу сіль етилового складного ефіру L-аланіну (12,6г, 83ммоль) та триетиламін (11,5мл, 83ммоль) перемішують у 500мл піридину під сухим N₂. Цю суспензію змішують з розчином трифенілфосфіну (37,9г, 145ммоль), Aldrithiol 2 (2,2-дипіридилдисульфід) (31,8г, 145ммоль) та 120мл піридину. Суміш нагрівають при внутрішній температурі 57°C протягом 15 годин. Після завершення реакцію концентрують під вакуумом до жовтої пастоподібної речовини, 100г. Пастоподібну речовину очищують хроматографією на колонці на шарі 25×11см з 1,1кг силікагелю 60, 74-37мкм (230-400меш). Колонку елюють 8 літрами 2% метанолу у дихлорметані, а потім лінійним градієнтом на протязі 26 літрів елюента до кінцевої концентрації 13% метанолу. Фракції, що містять чистий продукт, концентрують, одержуючи 12,4г сирової речовини (5), 65% від теоретичного виходу. Цей матеріал був забруднений приблизно 15% (вагових) триетиламіну гідрохлориду за даними ¹H ЯМР. Забруднення видаляють шляхом розчинення продукту у 350 мл етилацетату, екстрагування 20мл води, висушування органічного розчину над безводним сульфатом натрію та концентрування з одержанням 11,1г чистого GS-7097 у вигляді білої твердої речовини, вихід 58%. Цей процес був також використаний для синтезу діастереомерної суміші GS-7003a та GS-7003b (фенілаланіламідат) та суміші GS-7119 та GS-7335 (гліциламідат). Ці діастереомери розділяють з використанням процедури періодичного елюювання, такої як описана у Прикладах 3А, 6 та 7.

Приклад 9

In vitro дослідження діастереомерних проліків

Анти-ВІЛ-1 активність та цитотоксичність у клітинах MT-2 in vitro і стабільність у плазмі людини та екстрактах клітин MT-2 для GS-7340 (вільна основа) та тенофовірдиозпроксилфумарату (TDF) наведені у Таблиці 1. GS-7340 виявляє 10-кратне збільшення антивірусної активності порівняно з TDF та 200-кратне збільшення стабільності у плазмі. Очікується, що така підвищена стабільність у плазмі приведе до вищих рівнів GS-7340 у циркуляції, ніж у TDF, після перорального введення.

Таблиця 1

Активність та стабільність in vitro

	ВІЛ-1 активність	Цитотоксичність	Стабільність T _{1/2} (хв.)		
	IC ₅₀ мкМ	CC ₅₀ мкМ	Плазма людини	Екстракт клітин MT-2	(P/MT-2)
GS 7340	0,005	>40	90,0	28,3	L 3,2
TDF	0,05	70	0,41	70,7	0,006
Тенофовір	5	6000	-	-	-

Для оцінки відносного рівня внутрішньоклітинного РМПА, що утворюється внаслідок внутрішньоклітинного метаболізму TDF у порівнянні з показниками для GS-7340, обидва проліки та РМПА мітили радіоактивними ізотопами та вводили до цільної крові людини у еквімолярних концентраціях. Через 1 годину ізолювали плазму, червоні кров'яні клітини (RBCs) та мононуклеарні клітини

периферичної крові (PBMCs) і піддавали аналізу методом ВЕРХ з радіометричним детектуванням. Результати наведені у Таблиці 2.

Через 1 годину GS-7340 спричинював 10× та 30× зростання загальної внутрішньоклітинної концентрації РМПА-споріднених сполук у PBMC порівняно з TDF та РМПА, відповідно. У плазмі через 1 годину 84% радіоактивності пов'язано з незмінним GS-7340, у той час як TDF через 1 годину не визначається. Оскільки у плазмі не було виявлено незмінного TDF, 10х-кратна різниця між TDF та GS-7340 через 1 годину означає мінімальну різницю, очікувану in vivo. Хроматограма ВЕРХ для усіх трьох сполук наведена на Фігурі 1.

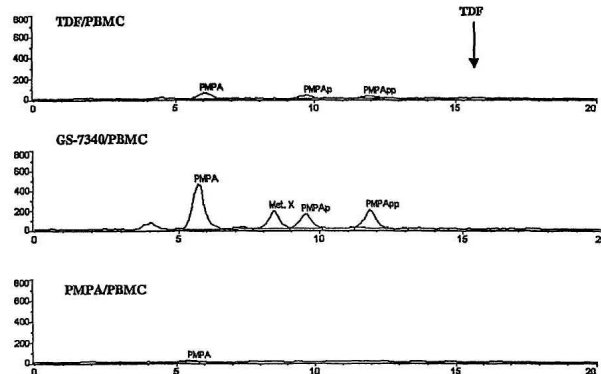
Таблиця 2

Метаболіти РМПА у плазмі, PBMC та RBC
після 1год. інкубування РМПА-проліків чи РМПА у крові людини

Сполука	Матриця	Загальний виділений C-14,мкг-екв	Метаболіти (% від загальної площі піка)					
			РМПА, %	РМПАр, %	РМПАpp, %	Met.X, %	Met.Y, %	GS 7340, %
GS-7340 (60мкг-екв)	Плазма/FP	43,0	1	-	-	2	13	84
	PBMC	1,25	45	16	21	18	-	-
	RBC/FP	12,6	8	-	-	24	11	57
			РМПА	РМПАр	РМПАpp	Моно-РОС	GS-4331	
GS-4331	Плазма/F P	48,1	11	-	-	89	-	

(TDF) (60мкг-екв)	PBMC RBC/FP	0,133	50	25	18	7	-
		10,5	93	7,0	-	-	-
			PMPA	PMPAp	PMPApp		
PMPA (60мкг-екв)	Плазма/F P	55,7	100	-	-		
	PBMC	0,033	86	14	-		
	RBC/FP	3,72	74	10	16		

Фіг.1. ВЕРХ/С-14 - слідові кількості екстрактів PBMC з крові людини, що інкубувалася протягом 1 год. при 37°C з TDF, GS-7340 чи PMPA.



Met.X та Met.Y (метаболіти X та Y) наведені у Таблиці 5. Маленькі літери "p" позначають фосфорилювання. Ці результати були одержані через 1 годину у крові людини. Очікується, що із зростанням часу розбіжності *in vitro* зростатимуть, тому що 84% GS-7340 залишається у плазмі незмінним після однієї години. Оскільки незмінний GS-7340 присутній у плазмі після перорального введення, відносна клінічна ефективність повинна співвідноситися із значеннями IC_{50} , що спостерігаються *in vitro*.

У Таблиці 3 нижче, наведені значення IC_{50} для тенофовіру, TDF, GS-7340, кількох нуклеозидів та інгібітора протеази нелфінавіру (nelfinavir). Як видно, активність нелфінавіру (nelfinavir) та GS-7340 є на 2-3 порядки величини вище, ніж усіх інших нуклеотидів чи нуклеозидів.

Таблиця

Анти-ВІЛ-1 активність
in vitro антиретровірусних сполук

Сполука	IC_{50} (мкМ)
Адефовір (PMEA)	13,4±4,2 ¹
Тенофовір (PMPA)	6,3±3,3 ¹
AZT	0,17±0,08 ¹
3TC	1,8±0,25 ¹
d4T	8±2,5 ¹
Нелфінавір	0,006±0,002 ¹
TDF	0,05
GS 7340	0,005

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

Були проведені додаткові дослідження *in vitro* анти-ВІЛ-1 активності клітинних культур та CC_{50} розділених діастереомерів за даним винаходом, і результати наведені у таблиці нижче.

Таблиця 4

Ефект діастереомеру

Сполука	Діастереомер	IC_{50} (мкМ)	Кратність зміни	A/B активність	CC_{50} (мкМ)
PMPA	-	5	1×	-	6000
Ala-метиловий складний ефір	Суміш 1:1	0,025	200×	20×	80
GS-6957a	A	0,0075	670×		
GS-6957b		0,15	33×		
Phe-метиловий складний ефір	Суміш 1:1	0,03	170×	10×	60

GS-7003a	A	0,01	500×		
GS-7003b	B	0,1	50×		
Gly-етилловий складний ефір	Суміш 1:1	0,5	10×	20×	
GS-7119	A	0,05	100×		>100
GS-7335	B	1,0	5×		
Ala-ізопропіл	Суміш 1:1	0,01	500×	12×	
GS-7340	A	0,005	1000×		40
GS-7339	B	0,06	83×		>100
ABA-етил	Суміш 1:1	0,008	625×	7,5×	>100
GS-7342	A	0,004	1250×		
GS-7341	B	0,03	170×		
Ala-етил	Суміш 1:1	0,02	250×	10×	60
GS-7114	A	0,005	1000×		
GS-7115	B	0,05	100×		

Посилання на джерело з описом аналізу: Arimilli, M.N., et al., (1997) Synthesis, in vitro biological evaluation та oral bioavailability of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) prodrugs. Antiviral Chemistry and Chemotherapy 8(6):557-564.

"Phe-метилловий складний ефір" означає метилфенілаланініл моноамідат, складний феніловий моноефір тенофовіру, "gly-метилловий складний ефір" означає метилгліцилмоноамідат, складний феніловий моноефір тенофовіру.

У кожному з описаних вище випадків вважається, що ізомер А має таку саме абсолютну стереохімію, як GS-7340 (S), а ізомер В - таку саме абсолютну стереохімію, як GS-7339.

Метаболізм in vitro та стабільність розділених діастереомерів визначали на PLCE, екстракті МТ-2 та плазмі людини. Вказаний нижче біологічний зразок, 80мкл, поміщали до центрифугальної пробірки із закручуваною пробкою та інкубують при 37°C протягом 5хв. До біологічного зразка додають розчин, що містить 0,2мг/мл тестової сполуки у придатному буфері, 20мкл, та перемішують. З реакційної суміші, 20мкл, негайно відбирають пробу та змішують з 60мкл метанолу, що містить 0,015мг/мл 2-гідроксиметилнафталіну як внутрішній стандарт для аналізу методом ВЕРХ. Цей зразок використовують як зразок у нульовий момент часу. Потім у визначені моменти часу з реакційної суміші об'ємом 20мкл відбирають зразки і змішують з 60мкл метанолу, що відповідає технічним вимогам. Одержану таким чином суміш центрифугують на 15000×g протягом 5хв. і надосадну рідину аналізують методом ВЕРХ за описаних нижче умов.

Для аналізів використовували такі біологічні зразки.

(1) PLCE (карбоксіестераза свинячої печінки від фірми Sigma, 160од./мг протеїну, 21мг протеїну/мл) з 20-кратним розведенням PBS (фосфатно-сольовим буфером).

(2) Клітинний екстракт МТ-2 був виготовлений з клітин МТ-2 у відповідності до опублікованої методики [A. Pompon, I. Lefebvre, J.-L. Imbach, S. Kahn, and D. Farquhar, "Antiviral Chemistry & Chemotherapy", 5:91-98 (1994)], за винятком використання як середовища буфера HEPES.

(3) Плазма людини (об'єднана нормальна плазма людини від фірми George King Biomedical Systems, Inc.)

Для досліджень були використані такі буферні системи.

Для досліджень на PLCE тестову сполуку розчиняють у PBS. PBS (фосфатно-сольовий буфер, Sigma) містить 0,01М фосфату, 0,0027М хлориду калію та 0,137М хлориду натрію. pH 7,4 при 37°C.

У дослідженнях на клітинних екстрактах МТ-2 тестову сполуку розчиняють у буфері HEPES. Буфер HEPES містить 0,01 OM HEPES, 0,05М хлориду калію, 0,005М хлориду магнію та 0,005М d/-дитіотреїту. pH 7,4 при 37°C.

Для досліджень на плазмі людини тестову сполуку розчиняють у TBS. TBS (трис-сольовий буфер, Sigma) містить 0,05М трис, 0,0027М хлориду калію та 0,138М хлориду натрію. pH 7,5 при 37°C.



Аналіз методом ВЕРХ проводять за таких умов. Колонка: Zorbax R_x-C₈, 4,6×250мм, 5мкм

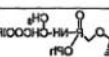
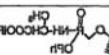
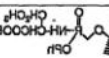
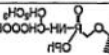
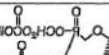
Колонка	Zorbax R _x -C ₈ , 4,6×250мм, 5мкм (MAC-MOD Analytical, Inc. Chadds Ford, PA)
Детектування	УФ на 260нм
Швидкість подачі	1,0мл/хв.
Час прогону	30хв.
Об'єм вприскування	20мкл
Температура колонки	Температура навколишнього середовища
Рухома фаза А	50мМ фосфат калію (pH 6,0)/CH ₃ CN=95/5(об./об.)
Рухома фаза В	50 мМ фосфат калію (pH 6,0)/CH ₃ CN = 50/50 (об./об.)
Градiєнт прогону:	0хв. 100% Рухома фаза А 25хв. 100% Рухома фаза В 30хв. 100% Рухома фаза В

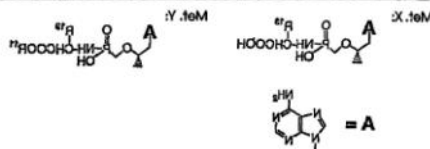
Результати наведені нижче у Таблиці 5 (включено також обрані дані IC₅₀ з Таблиці 4).

Таблиця 5

Метаболізм in vitro ізомерів
а та б РМРА-моноамідату при 37°C

№	Структура РМРА-моноамідау	Вілі ІС ₅₀ (мкМ)	Швидкість гідролізу у PLCE та продукт	Швидкість гідролізу у екстракті МТ-2 та продукт	Стабільність у плазмі людини (HP)
1	 <p>Ізомер А GS 7114</p>	0,005	$t_{1/2} = 2,9$ хв. Met.X та PMPA	$t_{1/2} = 2,9$ хв. Met.X та PMPA	$t_{1/2} = 148$ хв. Met.Y
2	 <p>Ізомер GS 7115</p>	0,05	$t_{1/2} = 8,0$ хв. Met.X та PMPA	$t_{1/2} = 150,6$ хв. Met.X та PMPA	$t_{1/2} = 495$ хв. Met.Y

3	 Isomeric A GS 1340	$t_{10} = 3,3$ xB $t_{15} = 5,8$ xB $t_{20} = 9,0$ xB MeFX ts PMPA MeFX ts PMPA MeFX
4	 Isomeric B GS 1339	$t_{10} = 10,1$ xB $t_{15} > 1000$ xB $t_{20} = 531$ xB MeFX ts PMPA MeFX
5	 Isomeric A GS 1345	$t_{10} = 3,9$ xB $t_{15} = 4,9$ xB $t_{20} = 103$ xB MeFX MeFX ts PMPA MeFX
6	 Isomeric B GS 1341	$t_{10} = 11,3$ xB $t_{15} < 1000$ xB $t_{20} = 521$ xB MeFX MeFX
7	 Isomeric A GS 1343	$t_{10} < 0,14$ xB $t_{15} = 7,7$ xB $t_{20} = 0,41$ xB PMPA Mono-POC PMPA



Приклад 10

Рівні у плазмі та PBMC після перорального введення діастереомерних проліків гончим собакам

Композиції. Композиції проліків виготовляли у формі розчинів у 50 мМ лимонній кислоті за 0,5 години до введення дози. Усі використані у дослідженнях сполуки були синтезовані фірмою Gilead Sciences. Були використані такі партії:

GSi	Амідат амінокислоти	Складний ефір амінокислоти	Діастереомер	№ партії
GS-7340-2	Аланін	i-Пропіловий	Ізомер А	1504-187-19
GS-7339	Аланін	i-Пропіловий	Ізомер В	1509-185-31
GS7114	Аланін	Етиловий	Ізомер А	1509-181-26
GS7115	Аланін	Етиловий	Ізомер В	1509-181-22
GS7119	Гліцин	Етиловий	Ізомер А	1428-163-28
GS7342	α -Аміномасляна кислота	Етиловий	Ізомер А	1509-191-12
GS7341	α -Аміномасляна кислота	Етиловий	Ізомер В	1509-191-7

Введення дози та відбирання зразків. Стадія досліджень на живих організмах проводилась відповідно до рекомендацій "Порадника з питань догляду та використання лабораторних тварин" ("Guide for the Care та Use of Laboratory Animals", National Institutes of Health, publication 86-23) і була затверджена Комітетом інституту з питань догляду за тваринами та їхнім використанням. Для досліджень використовували негодованих самців гончих собак (10±2кг). Кожен лікарський засіб вводили у вигляді разової дози орально за допомогою шлунокового зонда (1,5-2мл/кг). Доза складала 10мг-еквівалентів РМРА/кг. Для аналізів РВМС зразки крові відбирали у моменти часу 0 (перед введенням дози), 2, 8 та 24год. після введення дози. Для аналізів плазми, зразки крові відбирали в моменти часу 0 (перед введенням дози), 5, 15 та 30хв. і 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 та 24год. після введення дози. Кров (1,0мл) негайно переробляли на плазму шляхом центрифугування при 2000 об/хв. протягом 10хв. Зразки плазми заморожували та зберігали при -70°C до проведення аналізів.

Підготовку мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC). Цільну кров (8мл), узятую у визначені моменти часу, змішують з однаковою кількістю фосфатно-сольового буфера (PBS), наносять окремим шаром на 15мл розчину Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech.) та центрифугують при 400×g протягом 40хв. Шар PBMC видаляють і промивають один раз PBS. Осад PMBC, що утворився, розводять у 0,5мл PBS, клітини

ресуспендують, підраховують за допомогою гемоцитометра та зберігають при -70°C до проведення аналізу. Кількість клітин, помножену на середній об'єм окремої клітини, використовують для обчислення внутрішньоклітинної концентрації. Як об'єм покою PBMC використовують наведене у літературі значення, що дорівнює 200 фемтолітрів/клітину (B.L. Robins, R.V. Srinivas, C. Kim, N. Bischofberger and A. Fridland, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, 612(1998)).

Визначення РМРА та проліків у плазмі та PBMC. Концентрацію РМРА у зразках плазми собаки визначали шляхом дериватизації РМРА хлорацетальдегідом з одержанням сильно флуоресцентного N^1, N^6 -етеноаденинового похідного (L. Naesens, J. Balzarini and E. De Clercq, *Clin. Chem.*, 38, 480 (1992)). Сислю, плазму (100мкл) змішують з 200мкл ацетонітрилу для осадження протеїну. Зразки потім упарюють до сухого стану при зниженому тиску при кімнатній температурі. Висушені зразки відновлюють у 200мкл коктейлю для дериватизації (0,34% хлорацетальдегіду у 100мМ ацетаті натрію, рН 4,5), перемішують вихровою мішалкою та центрифугують. Після цього надосадну рідину переносять до чистої пробірки із закручуваною пробкою та інкубують при 95°C протягом 40хв. Дериватизовані зразки потім упарюють до сухого залишку та відновлюють у 100мкл води для проведення аналізу методом ВЕРХ.

Перед проведенням визначення внутрішньоклітинного РМРА методом ВЕРХ треба видалити велику кількість аденін-споріднених рибонуклеотидів, присутніх у екстрактах PBMC, шляхом селективного окислення. Ми використовували модифіковану методику Tanaka et al. [K. Tanaka, A. Yoshioka, S. Tanaka and Y. Wataya, *Anal. Biochem.*, 139, 35 (1984)]. Сислю, зразки PBMC змішують у співвідношенні 1:2 з метанолом та упарюють до сухого залишку при зниженому тиску. Висушені зразки дериватизують, як описано для аналізу плазми. Дериватизовані зразки змішують з 20мкл 1М рамнози і 30мкл 0,1М періодату натрію та інкубують при 37°C протягом 5хв. Після інкубування додають 40мкл 4М метиламіну та 20мкл 0,5М інозину. Після інкубування при 37°C протягом 30хв. зразки упарюють до сухого залишку при зниженому тиску та відновлюють у воді для проведення аналізу методом ВЕРХ.

У жодному із зразків не було виявлено проліків у незмінному стані. Для зразків плазми, що потенційно містять незмінні проліки, були проведені експерименти для того, щоб впевнитися, що під час дериватизації не відбувалося додаткового перетворення на РМРА. Для цього стандарти проліків додають до плазми, що не містить лікарських засобів та дериватизують, як описано вище. У жодному із зразків плазми не було виявлено визначуваних рівнів РМРА, і прогнозований % перетворення становить менш ніж 1%.

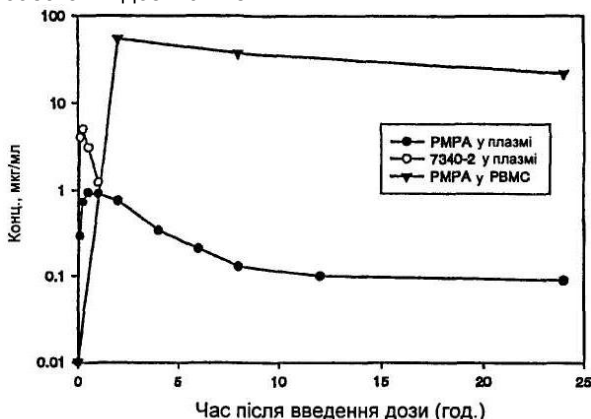
Система ВЕРХ складалася з системи подачі розчинника Р4000 з автоінжектором AS3000 та детектором флуоресценції F2000 (Thermo Separation,

San Jose, CA). Використовували колонку Inertsil ODS-2 (4,6×150мм). Використовували такі рухомі фази: А - 5% ацетонітрилу у 25мМ фосфатнокалієвому буфері з 5мМ тетрабутиламонійбромідом (ТВАВr), рН 6,0, В - 60% ацетонітрилу у 25мМ фосфатнокалієвому буфері з 5мМ ТВАВr, рН 6,0. Швидкість подачі становила 2мл/хв., а температуру колонки підтримували при 35°C за допомогою печі для колонки. Профіль градієнта становив 90% А/10% В протягом 10хв. для РМРА та 65% А/35% В протягом 10хв. для проліків. Детектування здійснювали флуоресцентним методом зі збудженням на 236нм та емісією на 420нм, а об'єм вприскування складав 10мкл. Дані реєстрували та зберігали за допомогою лабораторної системи збирання даних (PeakPro, Beckman, Allendale, NJ).

Фармакокінетичні розрахунки. Концентрацію РМРА та проліків розраховували як площу під кривими концентрації у плазмі чи PBMC на протязі періоду від нуля до 24 годин (AUC). Значення AUC обчислювали з використанням формули трапецій.

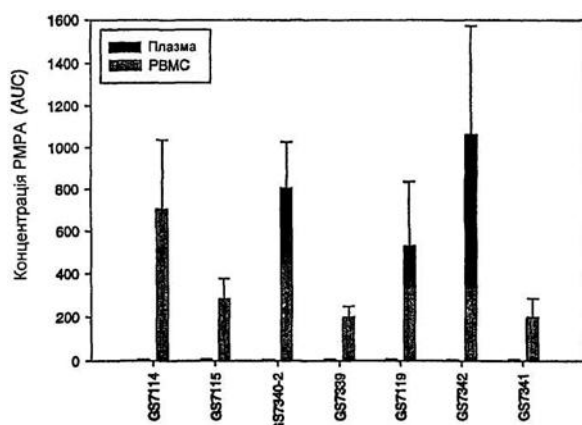
Концентрації у плазмі та PBMC. Результати цих досліджень наведені на Фігурах 2 та 3. Фігура 2 зображує зведені дані з перебігу у часі метаболізму GS-7340-2 у плазмі та PBMC після перорального введення чистих діастереомерів проліків РМРА.

Фігура 2. Концентрації РМРА та проліків у плазмі та PBMC після перорального введення GS 7340-2 собакам в дозі 10мг-екв/кг.



Стовпчаста діаграма на Фігурі 3 показує AUC (0-24год.) для тенофовіру у PBMC та плазмі собак після введення РМРА підшкірно, TDF та амідатного складного ефіру проліків. Усі амідатні проліки спричинювали збільшення концентрації у PBMC. Наприклад, GS-7340 призводив до 21-кратного підвищення концентрації у PBMC порівняно з РМРА підшкірно та TDF, та до 6,25-кратного 1,29-кратного зниження концентрації у плазмі, відповідно.

Фігура 3. Концентрації тенофовіру у PBMC та плазмі після введення собакам у дозі 10мг-екв/кг AUC (0-24год.) для РМРА у PBMC та плазмі після оральної дози 10мг-екв/кг проліків РМРА у собак.



Ці дані дозволяють встановити *in vivo*, що GS 7340 може доставлятися перорально, зводить до мінімуму системну дію РМПА та значно підвищує внутрішньоклітинну концентрацію РМПА у клітинах, які переважно відповідають за реплікацію ВІЛ.

Таблиця 6

Концентрації РМПА у PBMC та плазмі
у собак після перорального введення проліків РМПА

GS#	Фрагмент	AUC для РМПА у плазмі			AUC для РМПА у PBMC			Проліки у плазмі	Співвідношення концентрацій у PBMC/плазмі
		Середнє	Ст.відх.	N	Середнє	Ст.відх.	N		
GS-7114	Моно-Ala-Et-A	5,8	0,9	2	706	331	5	ТАК	122
GS-7115	Моно-Ala-Et-B	6,6	1,5	2	284	94	5	ТАК	43
GS-7340-2	Моно-Ala-iPr-A	5,0	1,1	5	805	222	5	ТАК	161
GS-7339	Моно-Ala-iPr-A	6,4	1,3	2	200	57	5	ТАК	31
GS-7119	Моно-Gly-Et-A	6,11	1,86	2	530	304	5	ТАК	87
GS-7342	Моно-ABA-Et-A	4,6	1,2	2	1060	511	5	ТАК	230
GS-7341	Моно-ABA-Et-B	5,8	1,4	2	199	86	5	ТАК	34

Приклад 11

Біорозподіл GS-7340

Шляхом часткового передклінічного аналізу GS-7340 було визначено його біорозподіл у собак. Розподіл у тканинах GS-7340 (ізопропілаланілілмоноамідат, складний феноловий моноефір тенофовіру) аналізували після перорального введення гончим собакам. Двом тваринам-самцям вводили перорально дозу ^{14}C -GS-7340 (8,85мг-екв. РМПА/кг, 33,2мкКі/кг; мітили карбон-8 аденіну) у водному розчині (50мМ лимонна кислота, рН 2,2). Зразки плазми та мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC) відбирали протягом 24 год. Сечу та фекалії збирали у клітках протягом 24год. Через 24год. після введення дози тварин умертвляли і тканини видаляли для аналізу. Загальну радіоактивність тканин визначали шляхом окислення та підрахунку за допомогою рідинного сцинтиляційного лічильника.

Біорозподіл РМПА через 24 години після разової оральної дози радіоміченого GS-7340 наведений у Таблиці 4 разом з даними попередніх досліджень для TDF (GS-7341). У випадку TDF, концентрація проліків у плазмі нижче рівня детектування методу, і основною формою сполуки, що спостерігається у плазмі, є вихідний лікарський засіб. Рівні РМПА у лімфатичних тканинах, кістковому мозку та скелетних м'язах підвищуються 10-кратно після введення GS-7340.

Накопичення у лімфатичних тканинах узгоджується з даними, одержаними для аналізів PBMC, оскільки ці тканини складаються переважно з лімфоцитів. Аналогічно, накопичення у кістковому мозку є, можливо, спричиненим високою відносною часткою лімфоцитів (70%) у цій тканині.

Таблиця 7

Виведення та розподіл у тканинах радіоміченого GS-7340
у собак (середнє, N=2) після орального введення дози 10мг-екв. РМПА/кг.

Тканина/Рідина	GS-4331		GS-7340		Співвідношення конц. у тканині для GS-7340 та GS-4331
	% дози	Конц. (мкг-екв/г)	% дози	Конц. (мкг-екв/г)	
Печінка	12,40	38,30	16,45	52,94	1,4
Нирка	4,58	87,90	3,78	80,21	0,9
Легені	0,03	0,53	0,34	4,33	8,2
Клубові лімфатичні вузли	0,00	0,51	0,01	5,42	10,6
Пахові лімфатичні вузли	0,00	0,37	0,01	5,54	14,8
Пахові лімфатичні вузли	0,00	0,28	0,00	4,12	15,0
Брижові лімфатичні вузли	0,00	1,20	0,04	6,88	5,7

Щитовидна залоза	0,00	0,30	0,00	4,78	15,8
Гіпофіз	0,00	0,23	0,00	1,80	7,8
Слинна залоза(Л+П)	0,00	0,45	0,03	5,54	12,3
Надниркова залоза	0,00	1,90	0,00	3,47	1,8
Селезінка	0,00	0,63	0,17	8,13	12,8
Підшлункова залоза	0,00	0,57	0,01	3,51	6,2
Простата	0,00	0,23	0,00	2,14	9,1
Яєчка (Л+П)	0,02	1,95	0,02	2,01	1,0
Скелетні м'язи	0,00	0,11	0,01	1,12	10,1
Серце	0,03	0,46	0,15	1,97	4,3
Стегнова кістка	0,00	0,08	0,00	0,28	3,5
Кістковий мозок	0,00	0,20	0,00	2,05	10,2
Шкіра	0,00	0,13	0,00	0,95	7,2
Брюшний жир	0,00	0,16	0,00	0,90	5,8
Око (Л+П)	0,00	0,06	0,00	0,23	3,7
Мозок	0,00	<LOD	0,00	<LOD	н.в.
Спинномозкова рідина	0,00	<LOD	0,00	0,00	н.в.
Спинний мозок	0,00	<LOD	0,00	0,04	н.в.
Шлунок	0,11	1,92	0,26	2,68	1,4
Порожня кишка	1,34	3,01	0,79	4,16	1,4
Дванадцятипала кишка	0,49	4,96	0,44	8,77	1,8
Клубова кишка	0,01	0,50	0,16	4,61	9,2
Товста кишка	1,63	5,97	2,65	47,20	7,9
Жовчний міхур	0,00	3,58	0,04	25,02	7,0
Жовч	0,00	9,63	0,22	40,48	4,2
Фекалії	40,96	н.в.	0,19	н.в.	н.з.
Загалом вміст шлунково-кишкового тракту	5,61	н.в.	21,64	н.в.	н.з.
Сеча	23,72	н.в.	14,73	н.в.	н.з.
Плазма через 24 год.	0,00	0,20	0,00	0,20	1,0
Плазма через 0,25 год.	н.з.	3,68	н.з.	3,48	0,9
РВМС*	0,00	н.в.	0,00	63,20	н.в.
Цільна кров	0,00	0,85	0,16	0,20	0,2
Загалом виявлено	81,10		68,96		

* Розраховано з використанням величини типового виділення загалом 15×10^6 клітин та середнього об'єму РВМС 0,2 піколітрів/клітину
п.с. = немає зразка, н.з. = не застосовно,
н.в. = не виявлено. LOD = рівень детектування