



**TRABAJO DE FÍN DE GRADO**  
**PROFÁRMACOS DE NUCLEÓTIDOS:**  
**Fosforamidatos y fosfonamidatos**

**Nombre:** Nuria Barrio Ibarzo

**Tutora:** Mónica Söllhuber Kretzer

**Convocatoria:** Junio

## **RESUMEN**

Los análogos de nucleósidos se emplean en el tratamiento de enfermedades víricas y en el tratamiento del cáncer. Así pues, para abordar las limitaciones farmacológicas que estos presentan, se considera útil el empleo de sus derivados monofosfato, es decir, nucleótidos precursores de la especie activa, responsable del efecto biológico. Por otra parte, estos nucleótidos presentan muchas limitaciones farmacocinéticas por lo que es necesario el empleo de profármacos que enmascaran dicho grupo fosfato para conseguir que la penetración de los mismos en las células diana sea adecuada. Una vez dentro de la célula, se producirá la bioactivación de una forma u otra en función del tipo de profármaco utilizado. Dentro de la amplia gama de posibles profármacos de nucleótidos, los ProTide (ariloxifosforamidato) son los que mejores resultados han dado en la actividad encontrándose un importante número de profármacos ya aprobados como es el caso de sofosbuvir y tenofovir alafenamida o en diversas fases de estudio clínico como por ejemplo NUC-1031, GS-5734 y GS-9131. Más tipos de profármacos de nucleósidos monofosfato como son los fosfonamidato monoésteres, arilmetil haloalquilamidatos y bis (aminoácido) fosforamidatos se están estudiando actualmente para intentar mejorar lo actualmente vigente.

## **ABSTRACT**

Nucleoside analogs are used in the treatment of viral diseases and in the treatment of cancer. Thus, to address the pharmacological limitations it is considered useful to employ its monophosphate derivatives, that is, precursor nucleotides of the active species, responsible for the biological effect. On the other hand, these nucleotides present many pharmacokinetic limitations, which is why it is necessary to use prodrugs that mask said phosphate group in order to achieve adequate penetration of the same to the target cells. Once inside the cell, bioactivation will take place in one form or another depending on the type of prodrug used. Within the wide range of possible prodrugs of nucleotides the ProTide (aryloxyphosphoramidates) are those that have given better results in the activities found. There is a significant number of prodrugs already approved such as sofosbuvir and tenofovir alafenamide or in various phases of study such as NUC-1031, GS-5734, GS-9131. More types of prodrugs such as phosphonamidate monoesters, methylaryl haloalkylamidate and bis (amino acid) phosphoramidate are studied to try to improve what is currently in force.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los nucleósidos son compuestos que se forman por la unión de una pentosa y una base nitrogenada. Los compuestos resultantes de la unión entre un nucleósido y moléculas de ácido fosfórico dan lugar a los nucleótidos. Estos pueden tener uno, dos o tres moléculas de ácido fosfórico enlazadas al carbono 5' de la pentosa. Los nucleótidos mediante enlaces fosfodiéster forman los ácidos nucleicos de los seres vivos: ADN y ARN, es decir, son sus monómeros.

Los análogos de nucleósidos están en uso clínico desde hace casi 50 años y se han convertido en piedras angulares para el tratamiento de cáncer o infecciones virales (1). El diseño de estos análogos se centra principalmente en modificaciones en el azúcar o su base nitrogenada. Estos análogos de nucleósidos son profármacos que tendrían que ser activados in vivo, a su forma trifosfato gracias a enzimas encargadas de producir la fosforilación (nucleosido/nucleótido–kinasas), generándose así los metabolitos activos. Esta activación se realiza en tres pasos dependientes de kinasas y la primera fosforilación que convierte los nucleósidos en sus derivados monofosfato suele ser el paso limitante en la velocidad de la bioactivación. Esto hace que la eficacia de los nucleósidos tenga ciertas limitaciones por lo que se pensó en la administración de metabolitos monofosforilados. Se lograría de esta forma una mejor actividad puesto que la primera fosforilación no limitaría la activación del profármaco. Sin embargo la introducción de grupos fosfatos (mono-, di- o tri- fosfato) hace que los análogos sean más polares, por lo que el transporte a través de la membrana sería muy bajo, y por tanto la eficacia de los mismos pequeña.

Además los derivados monofosfato poseen una escasa estabilidad in vivo puesto que se hidrolizan fácilmente en el organismo por acción de fosfatasas. Para abordar esto último se optó por el uso de grupos fosfonato, que no son hidrolizables. (2) La estabilidad de estos derivados es mejor pero no se solventa el hecho de que la molécula está ionizada lo que impide su absorción por la membrana.

Así pues, para abordar estas limitaciones, se optó por la modificación de la estructura del nucleósido monofosfato, enmascarando el grupo fosfato o fosfonato, para dar un nuevo profármaco bioactivable en el organismo. (Figura 1)



haloalquilamidato y a los bis (aminoácido) fosforamidato, que a diferencia de los ProTide aún no han logrado un empleo como agente terapéuticos.

## METODOLOGÍA

Al tratarse el trabajo de una revisión bibliográfica la metodología utilizada es la realización de una revisión sistemática de documentos publicados en diferentes fuentes bibliográficas, artículos científicos y bases de datos como pueden ser PubMed y Science Direct.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los últimos 20-30 años se han propuesto estrategias muy variadas para el diseño de profármacos de nucleótidos en función de cómo esté enmascarado el grupo fosfato o fosfonato.

Básicamente estos se pueden dividir en dos grandes grupos: profármacos de tipo fosfato o fosfonato y profármacos de tipo fosforamidato o fosfonamidato. (Figura 2)

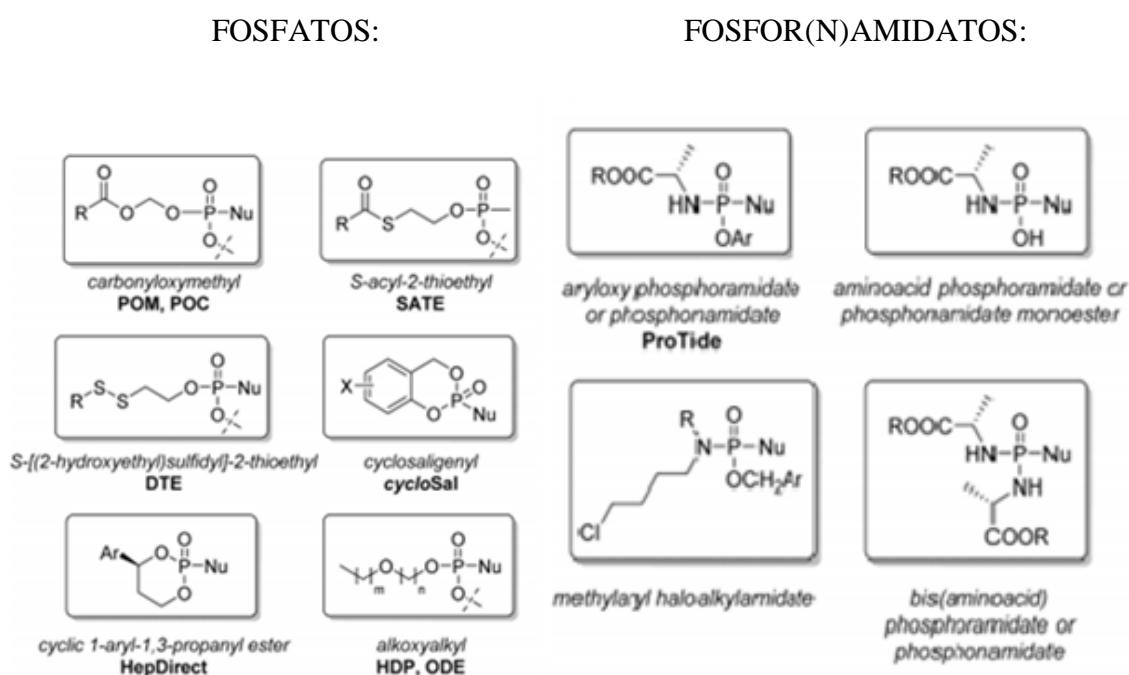


Figura 2 (3): Tipos de profármacos

El trabajo se centrará en los profármacos de tipo fosforamidatos y fosfonamidatos y revisará en qué consiste cada tipo de profármaco, su bioactivación, y los profármacos que están en el mercado o bien en ensayos clínicos de los cuatro grupos más importantes: ProTide, fosfonamidato monoesteres, arilmetil haloalquilamidatos, y bis (aminoácido) fosforamidato.

Estos grupos son los más interesantes en este campo, aunque no de todos ellos hay profármacos aprobados o en ensayos clínicos.

### Ariloxifosforamidato ó fosfonamidato. ProTide

La tecnología ProTide es un enfoque de profármaco desarrollado para lograr una concentración intracelular eficiente de monofosfatos y monofosfonatos análogos de nucleósidos.

Este enfoque de profármaco fue iniciado a principios de la década de 1990 por McGuigan y colaboradores (4), y fue el resultado de varios años de trabajo, estudios de relaciones estructura actividad (SAR) durante los cuales se evaluaron los diferentes tipos de radicales para enmascarar el grupo fosfato. (3)

De estos trabajos se concluyó que el empleo de aminoácidos, en especial L-alanina conduce a sistemas de liberación intracelular por biodegradación muy efectivos (5)

Como el empleo de dos aminoácidos como grupos enmascaradores del fosfato no dieron resultados excesivamente buenos, se llegó, después de varios intentos, a los ariloxifosforamidatos (6), que hoy en día se conocen como ProTide y que, según los conocimientos actuales, sufren la acción enzimática de primero una esterasa (por ejemplo Catepsina A) y luego la acción de una fosforamidasa (generalmente HINT-1) (7)

Así en los ProTide los hidroxilos de los grupos monofosfato o monofosfonato están enmascarados por un grupo aromático y un resto éster de aminoácido, estos grupos se escinden dentro de la célula liberando el nucleósido monofosfato o el monofosfonato.

Por tanto el profármaco, es capaz de penetrar en la célula por difusión pasiva. Una vez dentro una enzima, carboxipeptidasa o catepsina A, hidroliza el grupo éster del aminoácido. El grupo carboxilato libre, ionizado a pH fisiológico, inicia la degradación química. Se lleva a cabo un ataque nucleofílico al grupo fosfato o fosfonato. Esto provoca la salida del grupo ariloxi para formar un anillo de cinco miembros inestable. Se hidroliza el anillo heterocíclico produciendo un metabolito fosforamidato. Este último metabolito necesita de una segunda enzima fosforamidasa (HINT-1) que escinde el enlace P-N dejando libre el monofosfato análogo de nucleósido. Este nucleótido monofosfato sufrirá posteriormente dos fosforilaciones consecutivas, hasta conseguir el nucleótido trifosfato responsable de la actividad biológica.

(Figura 3)

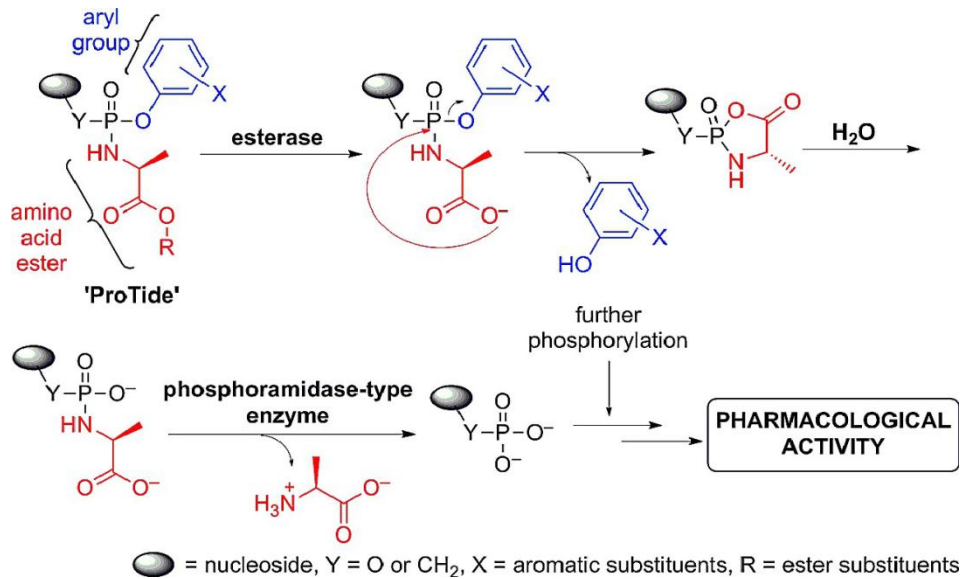


Figura 3 (8). Bioactivación de los profármacos ProTide en el interior celular

La técnica ProTide se utilizó con éxito en el descubrimiento y desarrollo de sofosbuvir (Sovaldi) y tenofovir alafenamida aprobados en Estados Unidos por la FDA. El primero se aprobó para el tratamiento de la hepatitis C en el año 2013. El profármaco del tenofovir, GS-7340, ahora conocido como tenofovir alafenamida, fue aprobado a finales de 2015, y se emplea en combinación con otros agentes anti-VIH para el tratamiento de la infección por VIH-1. (8) (Figura 5)

Desde 2001 (EEUU) y 2002 (UE) se ha venido empleando el profármaco: tenofovir disoproxil fumarato (TDF) (Figura 4). Este es un antirretroviral de gran eficacia que está presente en el tratamiento de primera línea de la infección por VIH. No obstante, a largo plazo puede producir ciertos problemas de toxicidad, entre los que destaca la pérdida de función renal.

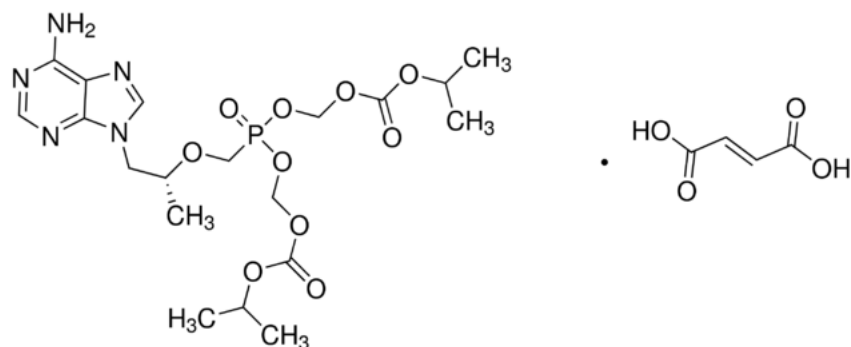


Figura 4 (9): Estructura del tenofovir disoproxil fumarato

La ventaja del tenofovir alafenamida fumarato (TAF) es que al presentar una estructura diferente al TDF, se metaboliza mayoritariamente en las células linfoides, entre las cuales se encuentran las células CD4. Esto permitiría adquirir concentraciones eficaces del fármaco a dosis mucho más reducidas que las de TDF, por lo que el riesgo de toxicidad sería bastante menor, ya que además su metabolización renal es mínima. Esto se confirmó en un estudio de fase II en el que se compararon TDF y TAF en 170 personas con VIH. Las personas que tomaban TAF presentaban concentraciones de fármaco en células mononucleares de sangre periférica cinco veces superiores a las del grupo con TDF, mientras que los niveles sanguíneos eran un 90% inferiores. (10)

Estudios más profundos de los ProTide han demostrado que los dos diferentes enantiómeros del fósforo Sp y Rp muestran diferentes perfiles biológicos, y no es raro ver una diferencia de 10 veces o más en términos de potencia in vitro entre dos diastereómeros fosforamida de L-alanina. La separación de la mezcla diastereomérica se pueden realizar, en algunos casos, por HPLC, cristalización selectiva o cromatografía flash en gel de sílice. Sin embargo, recientemente se han desarrollado síntesis diastereoselectivas en las que se utilizan reactivos enantioméricamente puros y que se basan en una reacción de mecanismo SN2 con reactivos fosfordiamidatos quirales (3) para obtener los dos enantiómeros fosforamida o fosfonamida.

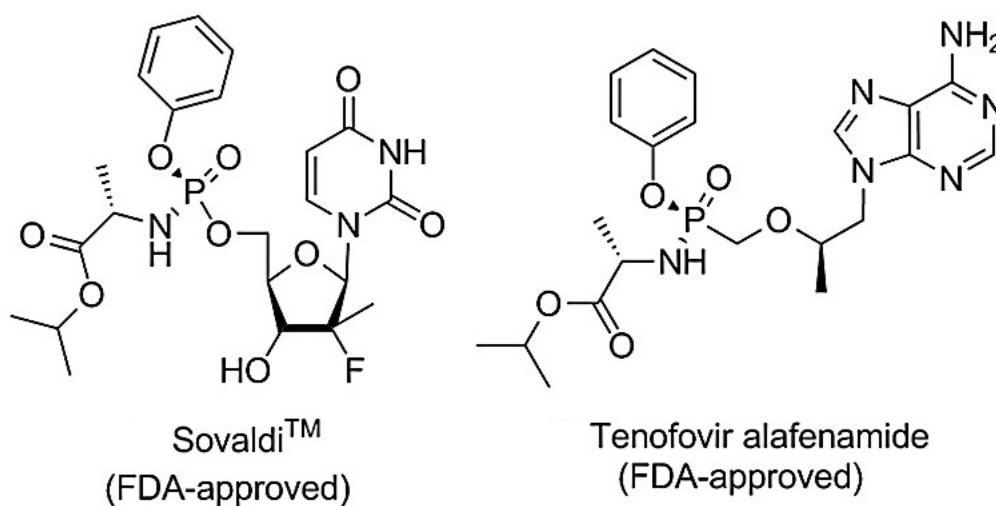


Figura 5 (8): Estructura de sofosbuvir y tenofovir alafenamida

Entre los ProTide que actualmente están en estudio, se pueden destacar los siguientes:

a) Acelarín (NUC-1031)

El ProTide de la gemcitabina conocido como acelarín (NUC-1031) representa un ejemplo de profármaco anticanceroso actualmente en ensayo clínico de Fase 2. (11)



La gemcitabina es un análogo de nucleósido comúnmente utilizado en la terapia contra diferentes tipos de cáncer que incluyen cáncer de pulmón no microcítico, cánceres de páncreas, vejiga y mama, pero con una eficacia limitada debido a una alta susceptibilidad a la resistencia de las células cancerígenas. La transformación en un nucleótido fosforamido de gemcitabina puede protegerlo contra muchos de los mecanismos clave de resistencia al cáncer. Se diseñaron varios profármacos de este grupo, demostrándose como más efectivo el NUC-1031. (12) (Figura 6)

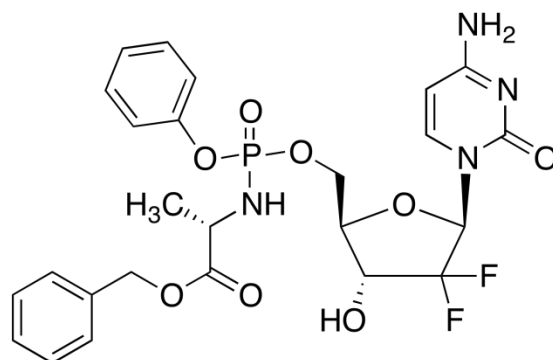


Figura 6 (13): Acelarín NUC-1031

Este fármaco experimental se está desarrollando actualmente por NuCana Biomed Ltd. En fase III para el tratamiento de cáncer de páncreas y en fase I/II para el tratamiento de cánceres de vejiga, biliar y pulmón no microcítico. Sorprendentemente, el NUC-1031 fue efectivo en el tratamiento de cánceres que son resistentes a su nucleósido, la gemcitabina. La capacidad de este ProTide para superar la resistencia a gemcitabina se puede deber a tres razones principales. En primer lugar, el compuesto es capaz de superar mecanismos activos de captación celular que limitan la eficacia de gemcitabina, ya que el profármaco es más lipofílico y entra en las células por difusión pasiva. En segundo lugar, la liberación de gemcitabina monofosfato a partir del profármaco es superior al efecto de activación de la gemcitabina por la desoxicitidina quinasa, que además se regula negativamente en algunos cánceres. (14) En tercer lugar, la administración de gemcitabina monofosfato limita la desaminación de la nucleobase citosina, que genera el metabolito uracilo inactivo, un proceso que reduce la eficacia de gemcitabina. (2)

#### b) Remdesivir (GS-5734)

El remdesivir (GS-5734) (Figura 7) es actualmente el único ProTide derivado de un C-nucleósido que está sometido a ensayos clínicos. Aunque GS-5734 está siendo desarrollado por Gilead Sciences, Inc. para el tratamiento del ébola, el compuesto mostró actividad

antiviral de amplio espectro contra una selección de virus de ARN como son arenavirus, coronavirus y filovirus. (2)

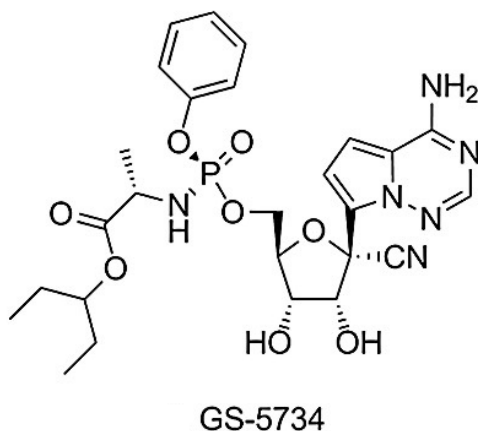


Figura 7 (8): Remdesivir

Al igual que en los casos del sofosbuvir y tenofovir alafenamida el isómero activo es el Sp.

El remdesivir exhibió potente inhibición de la replicación del virus del Ébola (EBOV) ( $EC_{50} = 0.06- 0.14 \mu M$ ), mientras que el C-nucleósido original no fue tan efectivo ( $CE_{50} = 0,77 a > 20 \mu M$ ). Esto se atribuyó a la formación de niveles más altos de trifosfato de C-nucleósido, el metabolito activo, cuando se utilizó remdesivir. Se logró una protección completa cuando se administró GS-5734 a una dosis intravenosa diaria de 10 mg / kg, comenzando 3 días después a cuando se produjo la infección. Después de las pruebas de seguridad de Fase I en voluntarios humanos sanos, GS-5734 se administró por primera vez para uso compasivo en octubre de 2015 a un paciente infectado con virus del Ébola cuando una enfermera que había sobrevivido a la enfermedad desarrolló una recurrencia en el sistema nervioso central. (2) y (15)

Así mismo el remdesivir se ha administrado en uso compasivo a dos pacientes con ébola, ambos sobrevivieron, y actualmente se encuentra en fase 2 de desarrollo clínico para el tratamiento de la enfermedad del virus del Ébola. (15)

### c) Stampidina

Los profármacos stampidina y thymectacina (Figura 8) se empezaron a desarrollar como candidatos clínicos. Sin embargo es cierto que, a pesar de los prometedores datos iniciales no ha habido recientemente una actualización sobre su desarrollo posterior, por lo tanto su actual estado de desarrollo clínico no está claro.

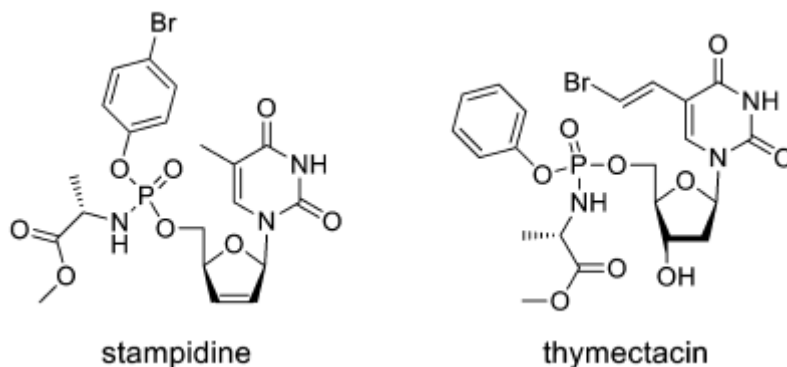


Figura 8 (2)

La stampidina fue uno de los primeros ProTides que entró en ensayos clínicos. Es el profármaco de la estavudina, inhibidor de la transcriptasa inversa del VIH. Se diseñó el profármaco porque la primera fosforilación del nucleósido de la estavudina, producida por la timidina quinasa, limitaba la formación de su forma trifosfato, la especie activa, su forma trifosfato especialmente en los casos de células deficitarias de esta enzima. La stampidina demostró una potente actividad contra las cepas silvestres de VIH-1 además de cepas resistentes a nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa. En estudios preliminares, se encontró que la stampidina es sustancialmente más potente que estavudina en la inhibición de la replicación de una cepa VIH-1 de laboratorio en células T deficientes en timidina quinasa. La presencia del grupo para-bromo en el resto fenilo de este compuesto favorece su degradación química rápida a alanil-STV-monofosfato. (2) y (17)

#### d) Thymectacina

Thymectacina (NB1011) es el ProTide de la brivudina, un potente inhibidor del virus herpes simple tipo 1 (HSV-1) y del virus varicela-zoster (VZV). (11)

Thymectacina fue preparado por New Biotics Inc. y se encuentra en ensayos clínicos de fase I/II para tratar el cáncer de colon. Otros estudios sobre NB1011 revelaron que tiene toxicidad selectiva sobre células tumorales que expresan niveles elevados de timidilato sintasa (TS), enzima clave en síntesis de ADN. (7)

#### e) GS-9131

Otro ejemplo de profármaco de este tipo que se encuentra en estudio es GS-9131 (Figura 9), ProTide de GS-9148 que muestra una potente actividad contra el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y un excelente perfil de resistencia in vitro. (19)

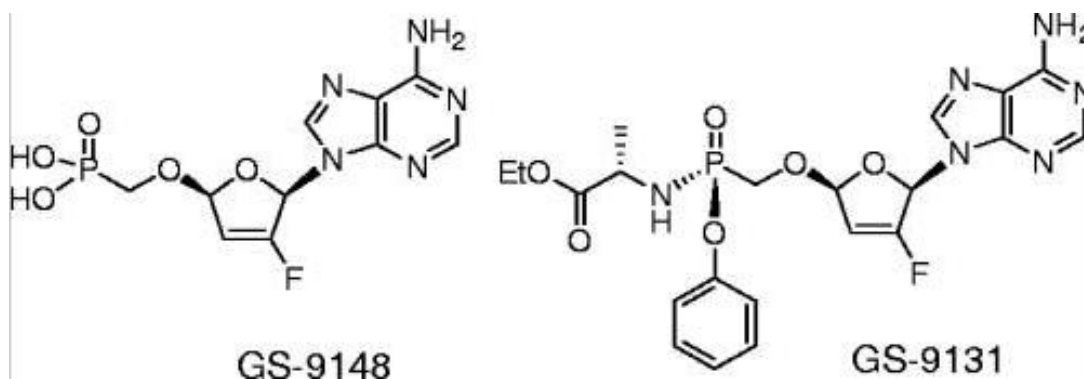


Figura 9 (20): GS-9148 es un análogo de nucleósido cuyo grupo fosfato se encuentra libre mientras que GS-9131 el grupo fosfato está enmascarado con un grupo arilo y un aminoácido

Para comprender la farmacocinética de GS-9131, se realizaron incubaciones comparativas entre GS-9148 y GS-9131, con varios tipos de células linfoides in vitro. La acumulación intracelular y los niveles de actividad antiviral de GS-9148 se vieron limitados por su falta de permeación celular, mientras que GS-9131 aumentó la concentración del metabolito activo GS-9148-DP entre 76 y 290 veces en relación con la administración de GS-9148. (19)

Actualmente hay un estudio de fase 2 para evaluar la eficacia de la monoterapia funcional de GS-9131 en adultos infectados por VIH resistente a inhibidores de la transcriptasa inversa, seguido de tratamiento continuo con GS-9131 + bicitgravir + Darunavir + Ritonavir (21)

Adicionalmente a los ejemplos mencionados, en la actualidad se encuentra una gran cantidad de ProTides en evaluación preclínica, lo que permite predecir un futuro alentador para este tipo de profármacos en el campo del cáncer y las infecciones virales (2)

### Fosforamidato de aminoésteres

Estos tipos de profármacos se diseñaron como una modificación de los ariloxifosforamidato (ProTide). Su intención era explorar si la presencia del grupo arilo lipofílico era o no indispensable para la bioactivación de estos profármacos. Por otra parte aumenta la solubilidad en agua del profármaco y se pierde la quiralidad de su estereocentro de fósforo lo que facilita su síntesis. Fue diseñado de forma que el fosforamidato de aminoéster se bioactiva directamente por ruptura del aminoácido por la acción de una fosforamidasa endógena (Figura 10) (3).

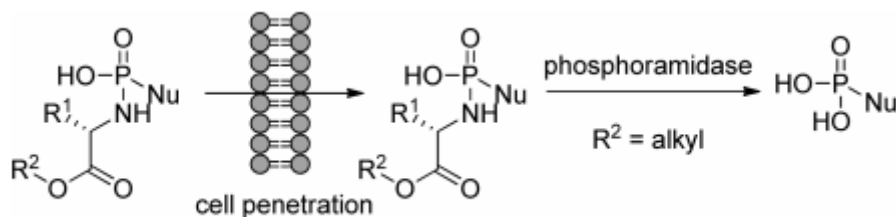


Figura 10 (3): Los fosforamidatos de aminoésteres penetran en la célula y el desenmascaramiento del grupo fosfato se da por la acción de la enzima fosforamidasa.

Este enfoque se ha aplicado a AZT y ddA, así como a fármacos anticancerosos. (22)

Se demostró que una serie de fosforamidatos de aminoésteres hidrófobos, solubles en agua y no tóxicos de didesoxiadenosina (ddA) y 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT) inhiben la replicación de VIH-1 en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de dos donantes. Los triptófano metil éster fosforamidatos de AZT y ddA tuvieron la misma potencia (EC50S = 0.3-0.4 microM), mientras que el fenilalanina metil éster de AZT fue de 40 a 100 veces más potente que los derivados de AZT. Se encontró que el alanil metil éster de AZT era 70 veces más potente que el derivado de ddA. Se descubrió que los derivados de metil amida eran 5-20 veces menos activos que los ésteres metílicos para la serie ddA, mientras que para el AZT se descubrió que los derivados tipo amida eran de potencia similar o de 60 a 166 veces más potentes que los ésteres metílicos. (23)

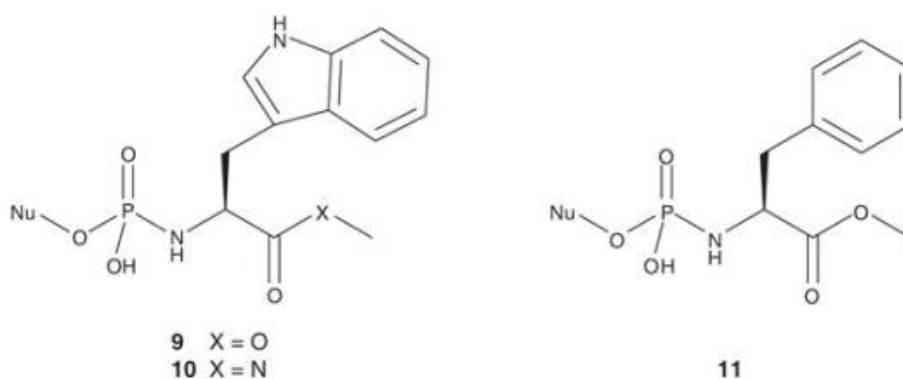


Figura 11(24): (9=Triptófano metil éster, 10= L-triptófano metil amida, 11= Fenilalanina metil éster)

En los últimos años se recuperó el interés de estos profármacos porque se descubrió su capacidad para imitar a los nucleótidos trifosfato como sustratos de la transcriptasa inversa (incluyendo HIV-1). Si el aminoácido en cuestión es el L-aspartico o mejor aún la L-Histidina está cumpliendo los requisitos de propiedades estructurales y electrónicas que permiten una

alineación adecuada del átomo de fósforo  $\alpha$  en el sitio activo de la polimerasa, imitando un nucleósido trifosfato. (3) (Figura 12)

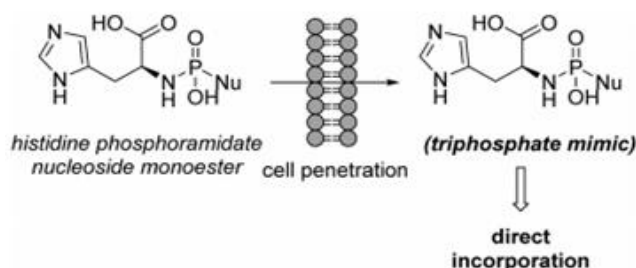


Figura 12 (3): L-Histidina imita un nucleósido trifosfato (metabolito activo)

La actividad biológica general de un profármaco se dicta no solo por el acceso exitoso al metabolito activo correspondiente, sino que también por su inherente capacidad para resistir a reacciones metabólicas no deseadas. Por ejemplo, los fosforamidatos de aminoácidos deberían ser suficientemente robustos para someterse a escisión selectiva del enlace P-N mientras que debe resistir la liberación innecesaria del nucleósido por medio de escisión del enlace P-O. Para que un profármaco fosforamidatos de aminoácidos que actúe como inhibidor / sustrato directo de una polimerasa viral tenga éxito, debe tener enlaces fosfatos (P-O) y fosforamidatos (P-N) lo suficientemente estables para que la molécula llegue inalterada al bolsillo de la enzima diana. Además, el carboxilato libre, del aminoácido, será crítico para el reconocimiento y la unión a la polimerasa. (25)

### Arilmetil haloalquilamidatos

El equipo de Borch ha desarrollado un profármaco de tipo arilmetil haloalquil fosforamidato capaz de atravesar la membrana celular.

Estos profármacos están diseñados para sufrir una activación intracelular y generar un anión fosforamidato inestable (intermedio B), que a su vez sufre ciclación espontánea mediante un ataque nucleofílico del nitrógeno. Posteriormente la hidrólisis del enlace P-N libera el nucleósido monofosfato (figura 12). Sin embargo, se observó que el ataque de la molécula de agua era poco selectiva, y que, además del nucleótido deseado, se formaba la hidroxialquilfosforamida como producto secundario. (Figura 13) (3)

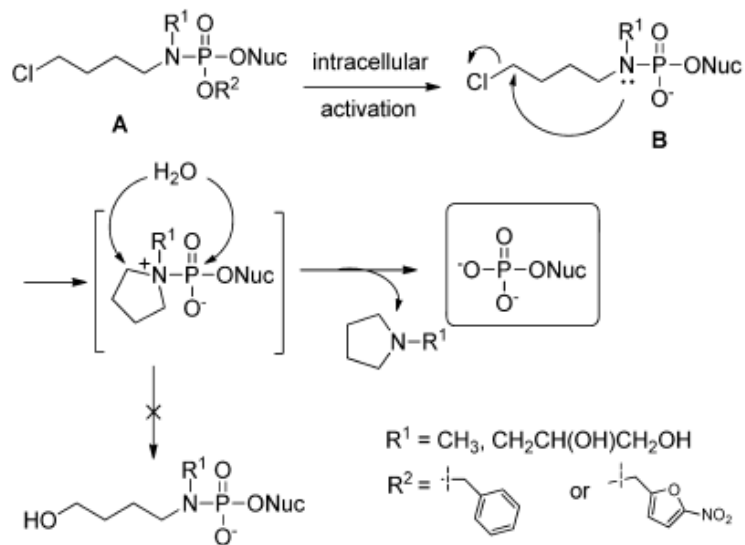


Figura 13 (3): Mecanismo de activación de los arilmetil haloalquilamidados

Este diseño de profármaco se ha aplicado con éxito para lograr la liberación intracelular del nucleótido anticancerígeno 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP). (26) (Figura 14)

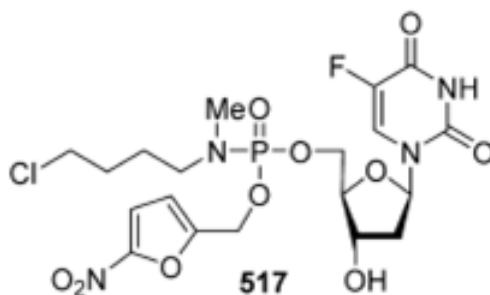


Figura 14 (3)

### Bis (amino ácido) fosforodiamidatos y fosfonodiamidatos

Los profármacos de bis (amino ácido) fosforodiamidato han estado eclipsados por el éxito de los ariloxosforamidatos (ProTide) (3).

Recientemente se han reinvestigado porque son profármacos sintéticos simétricos aquirales en los que no se producen mezclas diastereoisoméricas que dificultan la síntesis, como sucede en los ProTide. De hecho, se sabe que dos diastereoisómeros pueden interactuar de manera diferente con las enzimas implicadas en la vía de bioactivación, lo que conduce a diferentes

perfiles biológicos. Adicionalmente, los fosfordiamidatos dan productos naturales no tóxicos por metabolización, evitando la liberación de fenoles. (27)

La ruta de bioactivación propuesta por Mc Guigan es similar a lo propuesto anteriormente para los ProTide (Figura 15)

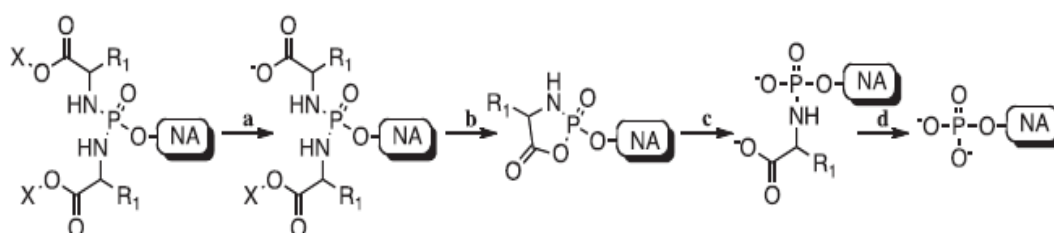


Figura 15 (27): Bioactivación de los fosfordiamidatos

Una vez que el profármaco haya penetrado en la célula el paso **a** está mediado por una esterasa o carboxipeptidasa, esta hidrolizará uno de los dos ésteres. En el paso **b** se produce un ataque intramolecular espontáneo del anión carboxilato al fósforo eliminándose el otro aminoácido. Se forma así un intermediario cíclico inestable de 5 miembros. El paso **c** implica la hidrólisis espontánea para dar lugar a un metabolito monofosforamidado. Por último el paso **d** se produce gracias a la enzima fosforamidasa que escinde el enlace P – N dando lugar al nucleósido monofosfato.

En la búsqueda de un profármaco óptimo para el nucleósido antiviral GS-9148 se compararon los profármacos ProTide y los fosfordiamidato.

Se prepararon y caracterizaron por una parte una serie de profármacos de fosfonoamidato de GS-9148 con diversos restos de aminoácidos y restos éster para analizar su actividad antivírica, citotoxicidad y administración in vivo. Tanto los fenoxi-fosfonoamidatos como los fosfonodiamidatos mejoraron sustancialmente la potencia antirretroviral de GS-9148 mientras mantenían la selectividad favorable en células MT-2. Los profármacos con la más alta lipofilia, tales como (isobutil-fenilalanina) fenoxifosforoamidato (compuesto 12) y bis (*n*-butil-alanina) fosfordiamidato (compuesto 13) fueron más de 1,000 y 250 veces más activos, respectivamente, que el GS-9148 por sí mismo, lo que está en consonancia con el aumento de la permeabilidad celular. El (etil-alanina) fenoxifosforamidado (compuesto 8) mejoró la actividad de GS-9148 en aproximadamente 50 veces, mientras que su isopropilamidato (compuesto 11) sólo fue un poco más activo comparado con otros profármacos de GS-9148.



A pesar de su potente actividad *in vitro*, el bis-amidato (compuesto 13) no mostró un buen nivel de metabolitos GS-9148 en PBMCs después de la administración *iv* a perros, observándose una concentración intracelular sólo tres veces superior de GS-9148 a la inherente a la misma dosis de GS-9148. Esto probablemente es una consecuencia de una extensa eliminación metabólica de este compuesto. (28)

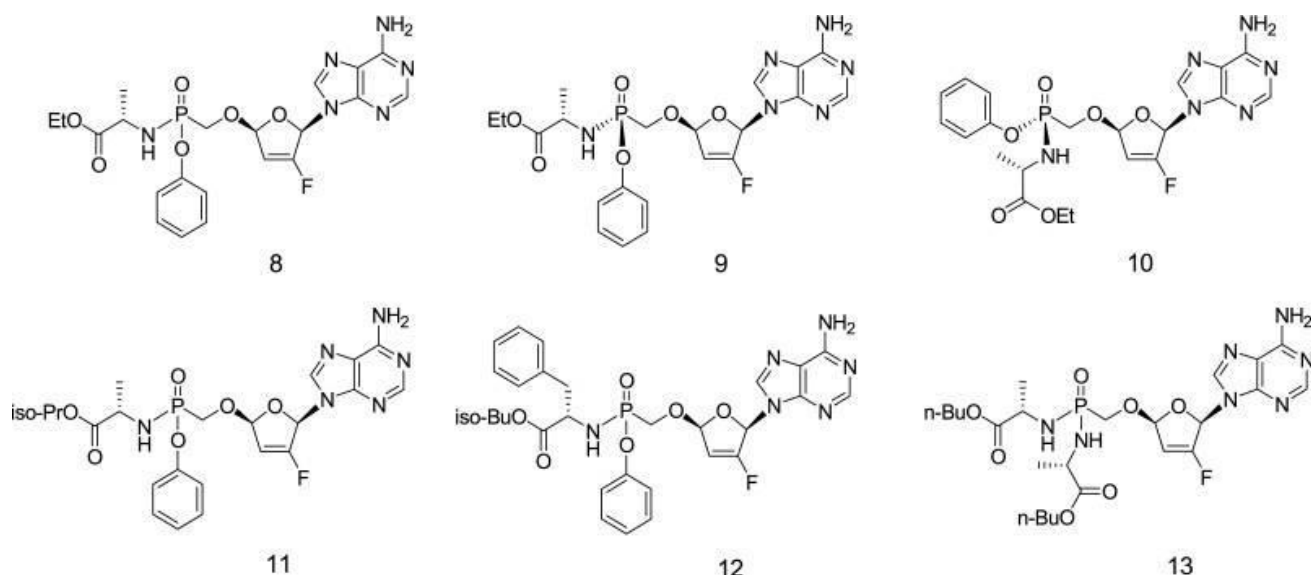


Figura 15 (25)

## **CONCLUSIÓN**

El empleo de profármacos de nucleótidos (nucleósido monofosfo) hace posible que los fármacos nucleosídicos, tanto los empleados hasta ahora en terapéutica, así como otros nucleósidos no utilizables porque no se bioactivan suficientemente, puedan ejercer una acción potenciada dentro de la célula. Esto es que la transformación de nucleósido a nucleótido (nucleósido monofosfato) que realiza la timidina quinasa y que es limitante en la bioactivación hacia el metabolito activo, se hace innecesaria ya que es sustituida por el nucleótido preformado.

Por ello el éxito de las tecnologías de profármacos de nucleótidos ha reavivado el interés por el desarrollo de nucleósidos, con actividad antiviral y anticancerosa, que hace poco tiempo se veían como una clase de fármacos poco actualizados. Gracias a estas técnicas de diseño de profármacos se logran concentraciones intracelulares muy interesantes desde el punto de vista farmacéutico que permiten incluso aprovechar fármacos desechados por necesitar dosis excesivamente altas o dosis tóxicas. Dentro de los profármacos de nucleótidos estudiados en este trabajo, los ProTide son por el momento los profármacos más interesantes que están consiguiendo una máxima eficacia en el tratamiento de enfermedades víricas y cáncer.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Jordheim LP , Durantel D , Zoulim F , Dumontet C . Avances en el desarrollo de nucleósidos y análogos de nucleótidos para cáncer y enfermedades virales. Nat Rev Drug Discov. [internet] 2013 jun [citado may 2018]; 12 (6): 447-64. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23722347>
- (2) Peter J. Thornton, Hachemi Kadri, Ageo Miccoli, and Youcef Mehellou. Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrug Clinical Candidates. J. Med. Chem. 2016; 59: 10400–10410
- (3) Ugo Pradere, Ethel C. Garnier-Amblard, Steven J. Coats, Franck Amblard, and Raymond F. Schinazi. Synthesis of nucleoside phosphate and phosphonate prodrugs. Chem. Rev. 2014, 114, 9154–9218
- (4) (a) Humton, R. N.; Jones, A. S.; McGuigan, C.; Walker, R. T.; Balzarini, J.; De Clercq, E. J. Med. Chem. 1984, 27, 440. (b) Jones, B. C. N. M.; McGuigan, C.; Riley, P. A. Nucleic Acids Res. 1989, 17, 7195. (c) McGuigan, C.; Tollerfield, S. M.; Riley, P. A. Nucleic Acids Res. 1989, 17, 6065. (d) McGuigan, C.; Nicholls, S. R.; O'Connor, T. J.; Kinchington, D. Antiviral Chem. Chemother. 1990, 1, 25. (e) McGuigan, C.; O'Connor, T. J.; Nicholls, S. R.; Nickson, C.; Kinchington, D. Antiviral Chem. Chemother. 1990, 1, 355. (f) Devine, K. G.; McGuigan, C.; O'Connor, T. J.; Nicholls, S. R.; Kinchington, D. AIDS 1990, 4, 371. (g) McGuigan, C.; Nickson, C.; Petrik, J.; Karpas, A. FEBS Lett. 1992, 310, 171. (h) McGuigan, C.; Kinchington, D.; Wang, M. F.; Nicholls, S. R.; Nickson, C.; Galpin, S.; Jeffries, D. J.; O'Connor, T. J. FEBS Lett. 1993, 322, 249.
- (5) C. McGuigan, K. G. Devine, T. J. O'Connor, S. A. Gaplin, D. J. Jeffries, D. Kinchington, Antiviral Chem. Chemother. 1990, 1, 107–113.
- (6) C. McGuigan, R. N. Pathirana, N. Mahmood, K. G. Devine, A. J. Hay, Antiviral Res. 1992, 17, 311–321.
- (7) Y. Mehellou, J. Balzarini, C. McGuigan, ChemMedChem 2009, 4, 1779 –1791.
- (8) Mehellou Y. The ProTides Boom. ChemMedChem. 2016;11(11):1114-1116.
- (9) Imagen disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml1794?lang=es&region=ES>
- (10) A Zolopa, R Ortiz, P Sax,, et al. Comparative Study of Tenofovir Alafenamide vs Tenofovir Disoproxil Fumarate, Each with Elvitegravir, Cobicistat, and Emtricitabine, for HIV Treatment. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Atlanta, GA, March 3-6, 2013. Abstract 99LB.

- (11) Kandil S, Balzarini J, Rat S, Brancale A, Westwell A, McGuigan C. ProTides of BVdU as potential anticancer agents upon efficient intracellular delivery of their activated metabolites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2016;26(23):5618-5623.
- (12) Slusarczyk M e. Application of ProTide technology to gemcitabine: a successful approach to overcome the key cancer resistance mechanisms leads to a new agent (NUC-... - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 1 May 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=NUC-1031>
- (13) Imagen disponible en: <http://www.syninnova.com/catalog/product/SL-1095>
- (14) Slusarczyk, M.; Lopez, M. H.; Balzarini, J.; Mason, M.; Jiang, W. G.; Blagden, S.; Thompson, E.; Ghazaly, E.; McGuigan, C. Application of Protide Technology to Gemcitabine: A Successful Approach to Overcome the Key Cancer Resistance Mechanisms Leads to a New Agent (NUC-1031) in Clinical Development. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 1531–1542.
- (15) Fearn R, Deval J. New antiviral approaches for respiratory syncytial virus and other mononegaviruses: Inhibiting the RNA polymerase. *Antiviral Research*. 2016; 134:63-76. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354216303527#bib129>
- (16) Lo M, Jordan R, Arvey A, Sudhamsu J, Shrivastava-Ranjan P, Hotard A et al. GS-5734 and its parent nucleoside analog inhibit Filo-, Pneumo-, and Paramyxoviruses. *Scientific Reports*. 2017;7:43395. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28262699>
- (17) Uckun, F. M.; Pendergrass, S.; Venkatachalam, T. K.; Qazi, S.; Richman, D. Stampidine Is a Potent Inhibitor of Zidovudine- and Nucleoside Analog Reverse Transcriptase Inhibitor-Resistant Primary Clinical Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates with Thymidine Analog Mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46, 3613–3616.
- (18) M. Pegram, N. Ku, M. Shepard, L. Speid, H.L. Lenz, *Eur. J. Cancer* 38 (Suppl. 7) (2002) S34.
- (19): Ray A, Vela J, Booramra C, Zhang L, Hui H, Callebaut C et al. Intracellular Metabolism of the Nucleotide Prodrug GS-9131, a Potent Anti-Human Immunodeficiency Virus Agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;52(2):648-654. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2224749/>
- (20) Imagen disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop\\_pmc/tileshop\\_pmc\\_inline.html?title=Clic%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=2224772\\_zac0020870930001.jpg](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Clic%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=2224772_zac0020870930001.jpg)
- (21) Efficacy of GS-9131 Functional Monotherapy in HIV-1-Infected Adults Failing a Nucleos(t)ide Reverse Transcriptase Inhibitor-Containing Regimen - Full Text View -

ClinicalTrials.gov [Internet]. Clinicaltrials.gov. 2018 [cited 1 May 2018]. Disponible en:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03472326>

(22) Peterson L, McKenna C. Prodrug approaches to improving the oral absorption of antiviral nucleotide analogues. Expert Opinion on Drug Delivery. 2009;6(4):405-420. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5117106/#R42>

(23) Chang SL, Griesgraber G, Wagner CR. Comparación de la actividad antivírica de fosforamido de aminoácidos hidrófobos monoésteres de 2', 3'-didesoxiadenosina (DDA) y 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT) nucleósidos, nucleótidos, ácidos nucleicos. 2001; 20 (8): 1571-82.)  
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11554546>

(24): Imagen disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5117106/figure/F2/>

(25) Groaz E, Herdewijn P. Nucleoside Phosphate-Conjugates Come of Age: Catalytic Transformation, Polymerase Recognition and Antiviral Properties. Current Medicinal Chemistry. 2015;22(34):3980-3990.

(26): Tobias, S. C.; Borch, R. F. J. Med. Chem. 2001, 44, 4475.

(27) McGuigan C, Bourdin C, Derudas M, Hamon N, Hinsinger K, Kandil S et al. Design, synthesis and biological evaluation of phosphorodiamidate prodrugs of antiviral and anticancer nucleosides. European Journal of Medicinal Chemistry. 2013;70:326-340.

(28) Cihlar T, Ray A, Booramra C, Zhang L, Hui H, Laflamme G et al. Design and Profiling of GS-9148, a Novel Nucleotide Analog Active against Nucleoside-Resistant Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1, and Its Orally Bioavailable Phosphonoamidate Prodrug, GS-9131. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007;52(2):655-665. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2224772/>