

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-504402

(P2004-504402A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl.⁷

C07F 9/6561
A61K 31/664
A61P 31/12
A61P 31/18
A61P 35/00

F I

C O 7 F 9/6561
 A 6 1 K 31/664
 A 6 1 P 31/12
 A 6 1 P 31/18
 A 6 1 P 35/00

テーマコード (参考)

2 G O 4 5
 4 C O 8 6
 4 H O 5 0

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 107 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-514146 (P2002-514146)
 (86) (22) 出願日 平成13年7月20日 (2001.7.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年1月15日 (2003.1.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/023104
 (87) 国際公開番号 W02002/008241
 (87) 国際公開日 平成14年1月31日 (2002.1.31)
 (31) 優先権主張番号 60/220,021
 (32) 優先日 平成12年7月21日 (2000.7.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

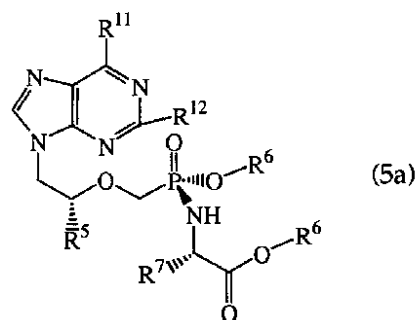
(71) 出願人 500029420
 ギリアード サイエンスーズ, インコー
 ポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
 04, フォスター シティ, レイクサイ
 ド ドライブ 333
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスホネートヌクレオチドアナログのプロドラッグならびにこれを選択および作製するための方法。

(57) 【要約】

抗ウイルス活性または抗腫瘍活性を有する所望の組織を選択的に標的化するプロドラッグを同定するために、メトキシホスホネートヌクレオチドアナログのプロドラッグをスクリーニングするための新規の方法が提供される。この方法は、レトロウイルス治療またはヘパドナウイルス治療のためのPMPAの新規の混合エステルアミデートの同定を導き、このPMPAのエステルアミデートは、本明細書中で規定されるような置換基を有する構造(5a)の化合物を含む。薬学的に受容可能な賦形剤中のこれらの新規の化合物の組成、ならびに治療および予防におけるそれらの使用が提供される。本明細書中の用途のための出発物質および化合物を調製するためにマグネシウムアルコキシドを使用するための改良された方法もまた提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的組織において増大した活性を与えるメトキシホスホネートヌクレオチドアナログプロドラッグを同定するためのスクリーニング方法であって、該方法は、以下：

(a) 少なくとも 1 つの該プロドラッグを提供する工程；

(b) 少なくとも 1 つの治療標的組織および少なくとも 1 つの非標的組織を選択する工程；

(c) 該プロドラッグを、該標的組織および該少なくとも 1 つの非標的組織に投与する工程；ならびに

(d) 工程 (c) において、該組織中の該プロドラッグによって与えられた相対活性を決定する工程、
を包含する、方法。 10

【請求項 2】

前記活性が、抗ウイルス活性または抗腫瘍活性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記活性が、抗ウイルス活性である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記活性が、抗 HIV 活性または抗 HBV 活性である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記プロドラッグが、PMPA または PMEA のプロドラッグである、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記プロドラッグが、ホスホノアミデート、ホスホノエステルまたは混合ホスホノアミデート/ホスホノエステルである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記アミデートが、アミノ酸アミデートである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記エステルが、アリアルエステルである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記標的組織において、前記非標的組織の活性の 10 倍より大きい相対活性を有するプロドラッグを選択する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 10】

請求項 1 に記載の方法であって、前記標的組織および非標的組織が動物中に存在し、前記プロドラッグが該動物に投与され、そして前記相対活性が、該プロドラッグの投与後に、該動物の組織の分析によって決定される、方法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の方法であって、前記標的組織および非標的組織における活性が、組織中の前記プロドラッグの少なくとも 1 つの代謝産物の量をアッセイすることによって決定される、方法。

【請求項 12】

前記代謝産物が、親薬物である、請求項 12 に記載の方法。 40

【請求項 13】

前記代謝産物が、前記親薬物のジホスフェートである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記標的組織がウイルス感染した組織であり、そして前記非標的組織が、ウイルス感染していない同じ組織である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記標的組織がリンパ組織であり、そして前記活性が抗 HIV 活性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記標的組織が肝臓であり、そして前記活性が抗 H B V 活性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記標的組織が血液学的であり、そして前記活性が抗腫瘍活性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

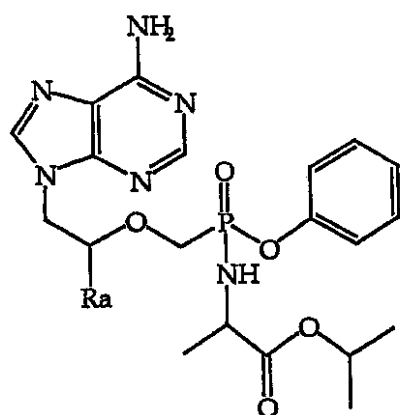
前記標的組織が悪性であり、そして前記非標的組織が、悪性ではない同じ組織である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

以下の構造 (1) を有する化合物、ならびにそのキラル富化組成物、その塩、それらの遊離塩基および溶媒和物であって：

10

【化 1】



20

(1)

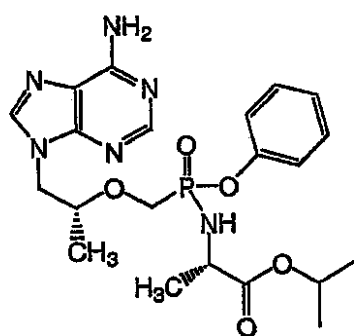
ここで、Ra は、H またはメチルである、化合物。

【請求項 20】

以下の構造 (2) を有する化合物、ならびにその富化されたジアステレオマー、塩、遊離塩基および溶媒和物：

30

【化 2】



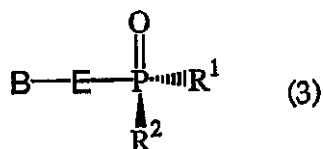
40

(2)

【請求項 21】

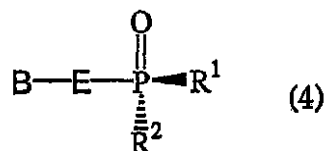
以下の構造 (3) を有するジアステレオマー富化化合物、ならびにそれらの塩、遊離塩基および溶媒和物であって：

【化 3】



該化合物は、実質的に以下のジアステレオマー（４）を含まず：

【化 4】



10

ここで、

R^1 は、インビボで加水分解可能なオキシエステル、またはヒドロキシルであり；

B は、複素環塩基であり；

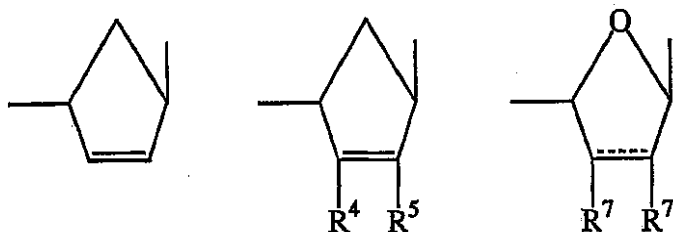
R^2 は、ヒドロキシル、またはアミノ酸の残基であり、該アミノ酸の残基は、該アミノ酸のアミノ基を介して P 原子に結合され、そしてそれぞれが、必要に応じてエステル化された該アミノ酸のカルボキシ置換基を有し、

20

ただし、 R^1 および R^2 の両方が、ヒドロキシルではなく；

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

【化 5】



30

$-\text{CH}(\text{R}^6)\text{OCH}(\text{R}^6)-$ 、 $-\text{CH}(\text{R}^9)\text{CH}_2\text{O}-$ 、または $\text{CH}(\text{R}^8)\text{O}-$ であり、ここで右側の結合は、該複素環塩基に結合され；

点線は、任意の二重結合を表し；

R^4 および R^5 は、独立して、水素、ヒドロキシ、ハロ、アミノ、またはアシルオキシ、アルキルオキシ、アルキルチオ、アルキルアミノおよびジアルキルアミノから選択される 1～5 個の炭素原子を有する置換基であり；

40

R^6 および R^6 は、独立して、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ ヒドロキシアルキル、または $\text{C}_2 \sim \text{C}_7$ アルカノイルであり；

R^7 は、独立して、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルであるか、または一緒になって $-\text{O}-$ もしくは $-\text{CH}_2-$ を形成し；

R^8 は、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ ヒドロキシアルキル、または $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ ハロアルキルであり；そして

R^9 は、H、ヒドロキシメチル、またはアシルオキシメチルである、

化合物。

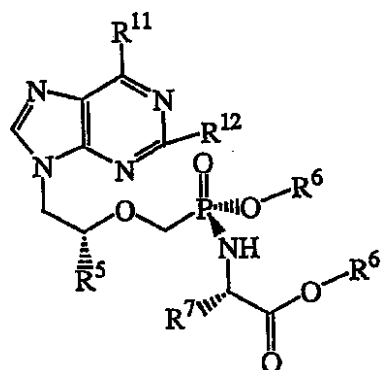
【請求項 22】

以下の構造（5a）を有するジアステレオマー富化化合物、ならびにその塩、互変異性体

50

、遊離塩基および溶媒和物であって：

【化 6】

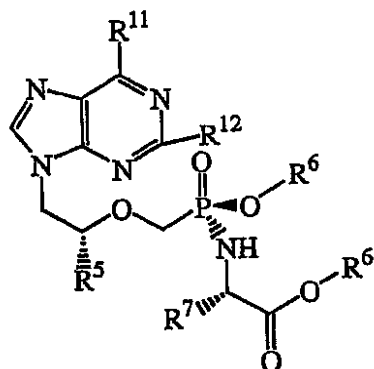


(5a)

10

該化合物は、実質的に以下のジアステレオマー（5 b）を含まず：

【化 7】



(5b)

20

30

ここで、

R^5 は、メチルまたは水素であり；

R^6 は、独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアリールアルキルであるか、 R^6 は、独立して、アルキルアミノ、アルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノ、ヒドロキシル、オキソ、ハロ、アミノ、アルキルチオ、アルコキシ、アルコキシアルキル、アリールオキシ、アリールオキシアルキル、アリールアルコキシ、アリールアルコキシアルキル、ハロアルキル、ニトロ、ニトロアルキル、アジド、アジドアルキル、アルキルアシル、アルキルアシルアルキル、カルボキシルまたはアルキルアシルアミノから選択される 1 ~ 3 個の置換基で置換された、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアリールアルキルであり；

40

R^7 は、任意の天然に存在するアミノ酸または薬学的受容可能なアミノ酸の側鎖であり、該側鎖がカルボキシルを含む場合、該カルボキシル基は、アルキル基またはアリール基で必要に応じてエステル化され；

R^{11} は、アミノ、アルキルアミノ、オキソまたはジアルキルアミノであり；そして

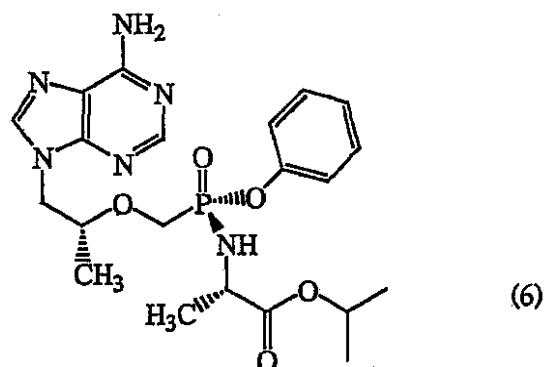
R^{12} は、アミノまたはHである、

化合物。

【請求項 23】

以下の構造（6）の化合物、ならびにその塩および溶媒和物：

【化 8】

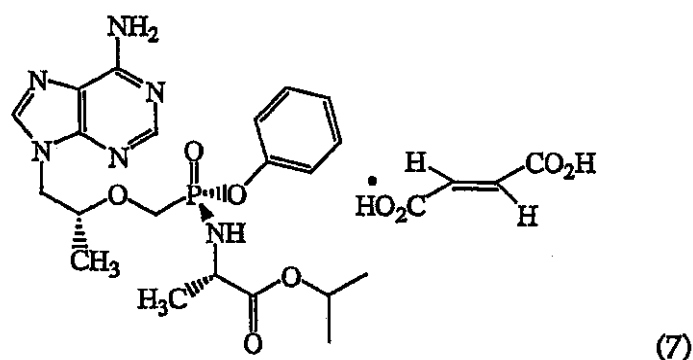


10

【請求項 2 4】

以下の構造 (7) の化合物：

【化 9】



20

【請求項 2 5】

請求項 1 9 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の化合物および薬学的に有効な賦形剤を含む、組成物。

30

【請求項 2 6】

前記賦形剤がゲルである、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

局所投与に適切である、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

抗ウイルス治療または予防のための方法であって、該方法は、請求項 1 9 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の化合物を、治療的または薬学的に有効な量で、このような治療または予防を必要とする被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 2 9】

マグネシウムアルコキシドを使用するための方法であって、該方法は、9 - (2 - ヒドロキシプロピル) アデニン (HPA) または 9 - (2 - ヒドロキシエチル) アデニン (HEA)、マグネシウムアルコキシド、および保護した p - トルエンスルホニルオキシメチルホスホネートを反応させる工程を包含する、方法。

40

【請求項 3 0】

PMPA または PME A をそれぞれ回収する工程をさらに包含する、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記 p - トルエンスルホニルオキシメチルホスホネートのホスホネートが、エチルエステルによって保護される、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

50

前記アルコキシドが、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシドである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 33】

前記アルコキシドが、*t*-ブチルオキシドまたはイソプロピルオキシドである、請求項 32 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は、メトキシホスホネートヌクレオチドアナログのプロドラッグに関する。詳細には、本願は、このようなプロドラッグを作製および同定するための改良方法に関する。

【0002】

多くのメトキシホスホネートヌクレオチドアナログは公知である。一般に、このような化合物は、構造 $A-OCH_2P(O)(OR)_2$ を有し、ここで、A は、ヌクレオチドアナログの残基であり、そして R は、独立して、水素または様々な保護基、あるいはプロドラッグ官能基である。米国特許第 5,663,159 号、同第 5,977,061 号および同第 5,798,340 号、Oliyais 「Pharmaceutical Research」16(11):1687-1693(1999)、Stella 「J. Med. Chem.」23(12):1275-1282(1980)、Aarons, L., Boddy, A. および Petrak, K. (1989) Novel Drug Delivery and Its Therapeutic Application (Prescott, L. F. および Nimmo, W. S. 編), pp. 121-126; Bundgaard, H. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H. 編) pp. 70-74 および 79-92; Banerjee, P. K. および Amidon, G. L. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H. 編) pp. 118-121; Notari, R. E. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H. 編) pp. 135-156; Stella, V. J. および Himmelstein, K. J. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H. 編) pp. 177-198; Jones, G. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H. 編) pp. 199-241; Connors, T. A. (1985) Design of Prodrugs (Bundgaard, H. 編) pp. 291-316 を参照のこと。本明細書中の全ての文献および特許引用文献は、参考として明確に援用される。

【0003】

(発明の要旨)

抗ウイルス治療または抗腫瘍治療を意図したメトキシホスホネートヌクレオチドアナログのプロドラッグは、公知であるものの、それらの全身的な効果のために従来的に選択された。例えば、このようなプロドラッグは、親薬物が全ての組織に利用可能であることを保証する増大したバイオアベイラビリティ(すなわち、胃腸管から吸収されて親化合物に迅速に変換される能力)のために選択された。しかし、出願人は、ここで、アナログが HIV 感染の局在した病巣部位で富化される本明細書中で記載される研究によって示されるように、治療的部位で富化される薬物を選択することが可能であることを見出した。本発明の目的は、他の利点の中でもとりわけ、親メトキシホスホネートヌクレオチドアナログを用いる治療の標的である組織における親薬物の、バースタンダー組織に対するより小さな毒性およびより大きな効力を生じることである。

【0004】

従って、これらの観察によって、標的組織において増大した活性を与えるメトキシホスホネートヌクレオチドアナログのプロドラッグを同定するためのスクリーニング方法が提供され、この方法は、以下の工程を包含する：

(a) 少なくとも 1 つのプロドラッグを提供する工程；

(b) 少なくとも 1 つの治療標的組織および少なくとも 1 つの非標的組織を選択する工程；

(c) このプロドラッグを、この標的組織および少なくとも 1 つの非標的組織に投与する工程；ならびに

(d) 工程(c)において、この組織中のプロドラッグによって与えられた相対的な抗ウイルス活性を決定する工程。

【0005】

好ましい実施形態において、標的組織は、HIVがアクティブに複製される部位および/またはHIVレザバとして働く部位であり、非標的組織はインタクトな動物である。予想外にも、本発明者らは、この方法をHIVについて実施するための標的組織としてリンパ組織を選択することによって、活性薬物のこのような組織への送達を促進するプロドラッグを同定した。

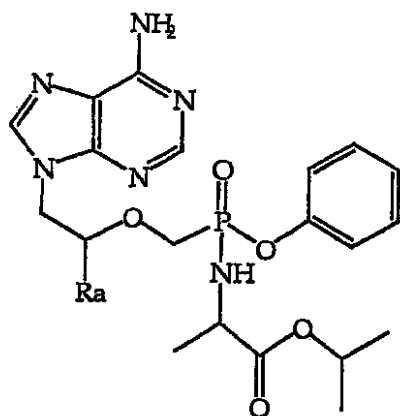
10

【0006】

この方法によって同定された、本発明の好ましい化合物、ならびにそのキラル富化組成物、その塩、その遊離塩基および溶媒和物は、以下の構造(1)を有する：

【0007】

【化10】



20

(1)

30

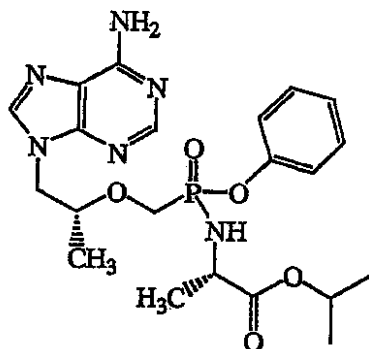
ここで、Raは、Hまたはメチルである。

【0008】

本発明の好ましい化合物、ならびにその富化ジアステレオマー、塩、遊離塩基および溶媒和物は、以下の構造(2)を有する：

【0009】

【化11】



40

(2)

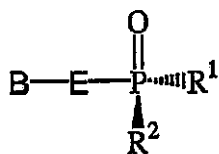
さらに、本発明者らは、予想外にも、リン原子および/またはアミデート置換基上の置換

50

基のキラリティーは、本発明の実施において観察された富化に影響を及ぼすことを見出した。従って、本発明の別の実施形態において、本発明者らは、以下の構造(3)を有する本発明のジアステレオマー富化化合物、ならびにその塩、遊離塩基および溶媒和物を提供し：

【0010】

【化12】



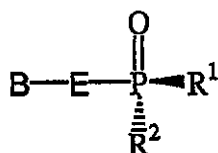
(3)

10

この富化化合物は、実質的に以下のジアステレオマー(4)を含まず：

【0011】

【化13】



(4)

20

ここで、

R^1 は、インビボで加水分解可能なオキシエステル、またはヒドロキシルであり；

B は、複素環塩基であり；

R^2 は、ヒドロキシル、またはアミノ酸の残基であり、このアミノ酸の残基は、このアミノ酸のアミノ基を介してP原子に結合され、そしてそれぞれが、必要に応じてエステル化されたこのアミノ酸のカルボキシ置換基を有し、

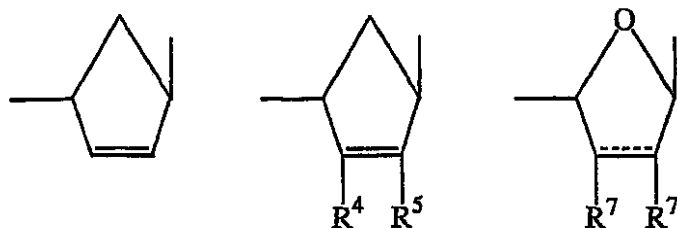
ただし、 R^1 および R^2 の両方が、ヒドロキシルではなく；

E は、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CH(CH_3)CH_2-$ 、 $-CH(CH_2F)CH_2-$ 、 $-CH(CH_2OH)CH_2-$ 、 $-CH(CH=CH_2)CH_2-$ 、 $-CH(C\equiv CH)CH_2-$ 、 $-CH(CH_2N_3)CH_2-$ 、

30

【0012】

【化14】



40

$-CH(R^6)OCH(R^{6'})-$ 、 $-CH(R^9)CH_2O-$ 、または $CH(R^8)O-$ であり、ここで右側の結合は、この複素環塩基に結合され；

点線は、任意の二重結合を表し；

R^4 および R^5 は、独立して、水素、ヒドロキシ、ハロ、アミノ、またはアシルオキシ、アルキルオキシ、アルキルチオ、アルキルアミノおよびジアルキルアミノから選択される1～5個の炭素原子を有する置換基であり；

R^6 および $R^{6'}$ は、独立して、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ ヒドロキシアルキル、または $C_2 \sim C_7$ アルカノイルであり；

50

R^7 は、独立して、 H 、 $C_1 \sim C_6$ アルキルであるか、または一緒になって $-O-$ もしくは $-CH_2-$ を形成し；

R^8 は、 H 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ ヒドロキシアルキル、または $C_1 \sim C_6$ ハロアルキルであり；そして

R^9 は、 H 、ヒドロキシメチル、またはアシルオキシメチルである。

【0013】

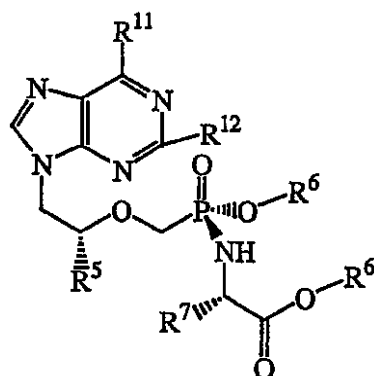
構造(3)のジアステレオマーは、リンキラル中心において、(S)異性体であるように設計される。

【0014】

本発明の好ましい実施形態は、以下の構造(5a)を有するジアステレオマー富化化合物、ならびにその塩、互変異性体、遊離塩基および溶媒和物であり；

【0015】

【化15】



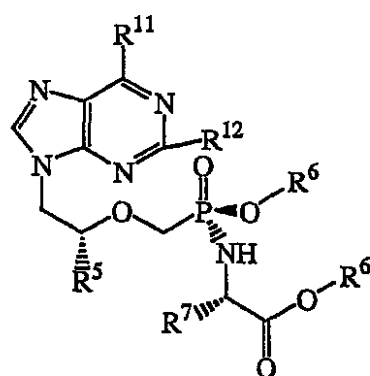
20

(5a)

この富化化合物は、以下のジアステレオマー(5b)を実質的に含まない：

【0016】

【化16】



30

(5b)

40

ここで、

R^5 は、メチルまたは水素であり；

R^6 は、独立して、 H 、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアリーラルキルであるか、 R^6 は、独立して、アルキルアミノ、アルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、オキソ、ハロ、アミノ、アルキルチオ、アルコキシ、アルコキシアルキル、アリーロキシ、アリーロキシアルキル、アリーラルコキシ、アリーラルコキシアルキル、ハロアルキル、ニトロ、ニトロアルキル、アジド、アジドアルキル、アルキルアシル、アルキルアシルアルキル、カルボキシルまたはアルキルアシルアミノから選択される1～3個の置換基で置換された、アルキル

50

、アルケニル、アルキニル、アリールまたはアリールアルキルであり；

R^7 は、任意の天然に存在するアミノ酸または薬学的受容可能なアミノ酸の側鎖であり、この側鎖がカルボキシルを含む場合、このカルボキシル基は、アルキル基またはアリール基で必要に応じてエステル化され；

R^{11} は、アミノ、アルキルアミノ、オキソまたはジアルキルアミノであり；そして

R^{12} は、アミノまたはHである。

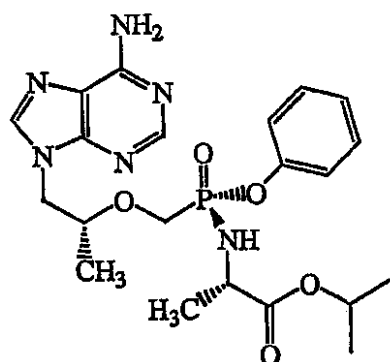
【0017】

本発明の好ましい化合物は、構造(6)の化合物、9-[(R) - 2 - [[(S) - [[(S) - 1 - (イソプロポキシカルボニル)エチル]アミノ]フェノキシホスフィニル]メトキシ]プロピル]アデニン(本明細書中でGS-7340とも呼ばれる)である：

10

【0018】

【化17】



20

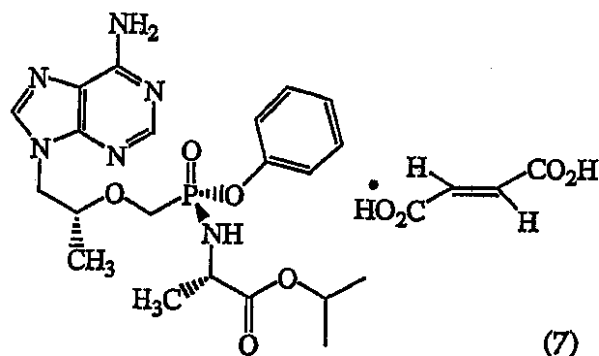
(6)

本発明の別の好ましい実施形態は、構造(5)(構造(7))のフマル酸塩、9-[(R) - 2 - [[(S) - [[(S) - 1 - (イソプロポキシカルボニル)エチル]アミノ]フェノキシホスフィニル]メトキシ]プロピル]アデニンフマル酸塩(1:1)(本明細書中で、GS-7340-2とも呼ばれる)である：

【0019】

30

【化18】



(7)

40

構造(1)~(7)の化合物は、必要に応じて、薬学的に受容可能な賦形剤を含む組成物に処方される。このような組成物は、ウイルス(特に、HIVまたはヘパドナウイルス)感染の治療または予防において、有効用量で使用される。

【0020】

さらなる実施形態において、9-[2-(ホスホノメトキシ)プロピル]アデニン(本明細書以下、「PMEA」と呼ぶ)または9-[2-(ホスホノメトキシ)エチル]アデニン(本明細書以下、「PMEA」と呼ぶ)を、マグネシウムアルコキシドを使用して容易に製造するための方法が提供され、ここでこの方法は、9-(2-ヒドロキシプロピル)

50

アデニンまたは 9 - (2 - ヒドロキシエチル) アデニン、保護した p - トルエンスルホニルオキシメチルホスホネートおよびマグネシウムアルコキシドを合わせ、それぞれ P M P A または P M E A を回収する工程を包含する。

【 0 0 2 1 】

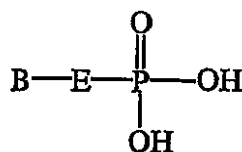
(発明の詳細な説明)

このスクリーニング方法において使用するためのメトキシホスホネートヌクレオチドアナログ親薬物は、構造 $A - O H_2 P (O) (O H)_2$ を有する化合物であり、ここで、A は、ヌクレオチドアナログの残基である。これらの化合物はそれ自体公知であり、そして本発明の部分ではない。より詳細には、親化合物は、複素環の塩基 B およびアグリコン E を含み、一般的に以下の構造を有する：

10

【 0 0 2 2 】

【 化 1 9 】



7

20

ここで、B 基は以下で定義され、そして E 基は上で定義される。例は、以下に記載される：米国特許第 4 , 6 5 9 , 8 2 5 号、同第 4 , 8 0 8 , 7 1 6 号、同第 4 , 7 2 4 , 2 3 3 号、同第 5 , 1 4 2 , 0 5 1 号、同第 5 , 1 3 0 , 4 2 7 号、同第 5 , 6 5 0 , 5 1 0 号、同第 5 , 6 6 3 , 1 5 9 号、同第 5 , 3 0 2 , 5 8 5 号、同第 5 , 4 7 6 , 9 3 8 号、同第 5 , 6 9 6 , 2 6 3 号、同第 5 , 7 4 4 , 6 0 0 号、同第 5 , 6 8 8 , 7 7 8 号、同第 5 , 3 8 6 , 0 3 0 号、同第 5 , 7 3 3 , 8 9 6 号、同第 5 , 3 5 2 , 7 8 6 号、および同第 5 , 7 9 8 , 3 4 0 号、ならびに E P 8 2 1 , 6 9 0 および E P 6 5 4 , 0 3 7。

【 0 0 2 3 】

本発明のスクリーニング方法において使用するためのプロドラッグは、前述のパラグラフに記載される親メトキシホスホネートヌクレオチドアナログの共有結合的に修飾されたアナログである。一般的に、親薬物のリン原子は、プロドラッグの修飾に好ましい部位であるが、他の部位は複素環の塩基 B またはアグリコン E 上に見出される。多くのこのようなプロドラッグは、すでに公知である。主に、これらは、リン原子のエステルまたはアミデートであるが、塩基およびアグリコン上の置換基もまた含む。これらの修飾自体のいずれも、本発明の部分でもなく、本発明の範囲を限定するともみなされない。

30

【 0 0 2 4 】

メトキシホスホネートヌクレオチドアナログのリン原子は、アミド化またはエステル化のような共有結合的修飾のための 2 の原子価を含む（ただし、ただ 1 つのリンの原子価が自由に置換されると、1 つのホスホリルのヒドロキシルがエステル化されて、アグリコン E のヒドロキシル置換基になる場合は除く）。このエステルは、代表的には、アリアルオキシシである。このアミデートは、通常、アルキル基またはアリアル基（通常は、フェニル基、シクロアルキル基、または t - アルキル基、n - アルキル基もしくは s - アルキル基）でエステル化された遊離カルボキシル基を有する天然に存在するモノアミノ酸である。本発明のスクリーニング方法において使用するために適切なプロドラッグは、米国特許第 5 , 7 9 8 , 3 4 0 号の実施例に開示される。しかし、おそらく標的組織細胞内において、例えば、加水分解、酸化または生物学的組織への暴露から生じる他の共有結合の転移によって、インビボで遊離メトキシホスホネートヌクレオチドアナログ親薬物に変換され得ると考えられる任意のプロドラッグは、本発明の方法における使用のために適切である。このようなプロドラッグは、現時点で公知ではないかもしれないが、将来的に同定され、従

40

50

って、本発明の方法における試験のために利用可能な適切な候補物となる。プロドラッグは、この方法におけるスクリーニングのための候補物にすぎないため、それらの構造は、スクリーニング方法を実施することまたは可能にすることに関係しないが、もちろん、それらの構造は結局、プロドラッグがこのアッセイにおいて選択的であると示されるか否かを決定する。

【0025】

親薬物に結合したプロ部分 (pro-moiety) は、同じであっても異なってもよい。しかし、スクリーニングアッセイに使用される各プロドラッグは、試験される他のプロドラッグとは構造的に異なる。別個の、すなわち構造的に異なるプロドラッグは、一般に、それらの立体化学または共有結合構造のいずれかに基づいて選択されるか、あるいはそれらの特徴は組み合わせで変更される。しかし、試験される各プロドラッグは、望ましくは構造的かつ立体化学的に実質的に純粋であり、そうでなければ、スクリーニングアッセイの結果はそれほど有用ではなくなる。もちろん、本発明の方法の個々の実施形態で、単一のプロドラッグのみを試験することは、本発明の範囲内であるが、代表的には、次いで、従来の研究の結果と他のプロドラッグを比較する。

10

【0026】

本発明者らは、プロドラッグの立体化学は、標的組織中の富化に影響を与え得ることを見出した。キラルな部位は、リン原子に存在し、そしてまた、その置換基において見出される。例えば、アミデートの調製に使用されるアミノ酸は、D型またはL型であり得、そしてリン酸エステルまたはアミノ酸エステルも同様に、キラル中心を含み得る。キラルな部位はまた、この分子のヌクレオシドアナログ部分上に見出されるが、これらは代表的には、親薬物の立体化学によってすでに規定され、そしてスクリーンの一部として変更されない。例えば、PMPAのR異性体は、これが対応するS異性体よりも活性であるために好ましい。代表的に、これらのジアステレオマーまたはエナンチオマーは、純粋ではない場合、各部位でキラル富化され、その結果、スクリーンの結果は、より意味のあるものとなる。記載されるように、立体異性体の差示性は、問題のキラル中心において他の立体異性体を含まない立体異性体 (代表的には、これは、ほとんどのメトキシホスホネートヌクレオチドアナログの場合、エナンチオマーよりむしろジアステレオマーである) を富化または精製することによって与えられ、その結果、各試験化合物は、実質的に均質である。実質的に均質またはキラル富化されたとは、所望の立体異性体が、約60重量%の化合物、通常約80重量%より多くの化合物、好ましくは約95重量%より多くの化合物を含むことを意味する。

20

30

【0027】

(新規なスクリーニング方法)

一旦、少なくとも1つの候補プロドラッグが選択されると、本発明のスクリーニング方法の残りの工程を使用して、標的組織に必要とされる選択性を有するプロドラッグを同定する。最も簡便には、プロドラッグは、組織または細胞における後の検出を容易にするために、検出可能な基で標識される (例えば、放射性標識される)。しかし、標識は、必要とされない。なぜなら、プロドラッグまたはその代謝産物 (親化合物を含む) についての他の適切なアッセイがまた、使用され得るためである。これらのアッセイとしては、例えば、質量分析法、HPLC、生物検定またはイムノアッセイが挙げられ得る。このアッセイは、プロドラッグおよびその代謝産物のいずれか1つ以上を検出し得るが、好ましくは、このアッセイは、親薬物の生成をのみを検出するために行われる。これは、プロドラッグの抗菌的に活性な親二リン酸塩への変換の程度および速度が試験される全ての組織中で同じであるという仮定 (これは、全ての場合において保証され得ない) に基づく。そうでなければ、二リン酸塩について試験し得る。

40

【0028】

標的組織は、好ましくは、HIV感染の処置において有用であるプロドラッグをスクリーニングする場合、リンパ様組織である。リンパ様組織は、当業者に周知であり、これらとしては、CD4細胞、リンパ球、リンパ節、マクロファージおよびマクロファージ様細胞

50

(末梢血液単球細胞(PBMC))のような単球を含む)ならびにグリア細胞が挙げられる。リンパ様組織はまた、リンパ様組織または細胞(例えば、肺、皮膚および脾臓)において豊富である非リンパ組織を含む。もちろん、他の抗ウイルス薬物の経路についての他の標的は、特定のウイルスが関係する複製または潜伏の最初の部位(例えば、肝炎についての肝臓およびHSVについての末梢神経)である。同様に、腫瘍についての標的組織は、実際に、腫瘍自体である。これらの組織は、当業者に周知であり、そして選択するために過度の実験を必要としない。抗ウイルス化合物についてスクリーニングする場合、標的組織は、ウイルスによって感染され得る。

【0029】

非標的組織または細胞はまた、本明細書中の方法の一部としてスクリーニングされる。任意の数または身元のこのような組織または細胞が、この点で使用され得る。一般に、親薬物が毒性であると予想される組織は、非標的組織として使用される。非標的組織の選択は、全体的に、プロドラッグの性質および親の活性に依存している。例えば、非肝炎組織は、肝炎に対するプロドラッグについて選択され、そして腫瘍と同じ組織の非形質転換細胞は、抗腫瘍選択的プロドラッグスクリーニングについて十分である。

10

【0030】

本発明の方法は、プロドラッグの経口的バイオアベイラビリティを決定するために代表的に行なわれる研究とは別であることに注意するべきである。経口的バイオアベイラビリティ研究において、目的は、親薬物に実質的に変換された、全身的循環に入るプロドラッグを同定することである。本発明において、目的は、胃腸管または循環において代謝されないプロドラッグを見出すことである。従って、本発明の方法において評価される標的組織は、一般に、小腸を含まないか、または小腸が含まれる場合、組織は、小腸以外のさらなる組織を含み得る。

20

【0031】

本発明のスクリーニング方法において使用される標的組織および非標的組織は、代表的に、インタクトな生きている動物における組織である。エステルを含むプロドラッグは、より望ましくは、イヌ、サルまたはげっ歯類以外の他の動物において試験される；マウスおよびラットの血漿は、所望な治療被験体がヒトまたは高等動物である場合、誤解されやすい結果を生じ得る高い循環レベルのエステラーゼを含む。

【0032】

インタクトな動物でこの方法を実施することが必要である。灌流された器官、インビトロ器官培養物(例えば、皮膚移植片)または細胞培養の種々の形態において維持された細胞株(例えば、回転ビンまたは無重力懸濁系)を使用することもまた、本発明の範囲内である。例えば、MT-2細胞は、HIVプロドラッグを選択するための標的組織として使用され得る。従って、用語「組織」は、組織化された細胞構造、または天然で見出され得るような組織構造を必要とするように解釈されるべきではないが、このような組織構造は好ましい。むしろ、用語「組織」は、特定の供給源、起源または分化段階の細胞と同義であると解釈されるべきである。

30

【0033】

標的組織および非標的組織は、実際、同じ細胞であり得るが、組織はまた、異なる生物学的状態で存在し得る。例えば、本明細書中の方法は、ウイルス未感染細胞(非標的組織に対応する)において実質的に不活性のままであるが、ウイルス感染した組織(標的組織)において活性を付与するプロドラッグを選択するために使用される。同じ手法が、予防的プロドラッグ(すなわち、非感染細胞において実質的に代謝されないままであるが、ウイルス感染に付随する抗ウイルス的活性形態に代謝されるプロドラッグ)を選択するために使用され得る。同様に、プロドラッグは、形質転換細胞および非形質転換の対応する組織においてスクリーニングされ得る。これは、血液学的悪性腫瘍(例えば、白血病)の治療のためのプロドラッグを選択する比較試験において特に有用である。

40

【0034】

操作のいずれの特定の理論によって限定されることなく、組織選択的プロドラッグは、他

50

の組織または細胞と比較して、標的細胞によって選択的に取り込まれ、そして／または細胞内で選択的に代謝されると考えられている。本明細書中のメトキシホスホネートプロドラッグの固有の利点は、生理学的 pH におけるジアニオンへのこれらの代謝が、これらが細胞から拡散し得ないことを保証するという点である。従って、これらは、長い期間効果的であり、そして上昇した細胞内濃度で維持され、それにより、増加した効力を示す。標的組織における増強された活性についての機構は、標的細胞による増強された取り込み、増強された細胞内保持、または両方の機構が共に作用することを含むと考えられる。しかし、選択性または増強された送達が増強された組織中で生じる様式は、重要ではない。プロドラッグの親化合物への代謝変換のすべてが、標的組織中で生じることはまた、重要ではない。最終的な薬物活性を付与する変換のみが、標的組織中で生じる必要がある；他の組織における代謝は、標的組織における抗ウイルス形態に最終的に変換される中間体を提供し得る。

10

【0035】

所望である選択性の程度または増強された送達は、親化合物およびこれが測定される様式（%用量分布または親化合物濃度）と共に変化する。一般的に、親薬物が、すでに大きな治療ウィンドウを有する場合、低い程度の選択性が、所望のプロドラッグに十分であり得る。他方、毒性化合物は、選択的プロドラッグを同定するためのより広範なスクリーニングを必要とし得る。本発明の方法の相対的な費用は、標的組織、および親化合物が相対的に毒性であることが知られている組織のみにおけるスクリーニングによって減少され得る（例えば、より高い用量で腎毒性である P M E A については、主に腎臓およびリンパ様組織に集中する）。

20

【0036】

選択された組織におけるプロドラッグの相対的な抗ウイルス活性を決定する工程は、通常、プロドラッグの代謝産物の相対的な存在または活性について標的組織および非標的組織をアッセイすることによって達成される。このプロドラッグの代謝産物は、抗ウイルス活性または抗腫瘍活性を有する代謝産物を有するかまたはこれに変換されることが知られている。従って、代表的に、標的組織において最終的に活性代謝産物を生成する抗ウイルス活性なもしくは抗腫瘍活性な代謝産物またはその前駆体に標的細胞において優先的に代謝されるプロドラッグを同定するために、実質的に同じ時間経過にわたって組織中の親薬物の相対量を決定する。抗ウイルス化合物の場合において、活性な代謝産物は、ホスホネート親化合物の二リン酸塩である。ウイルス核酸に組み込まれるのはこの代謝産物であり、それにより、伸長する核酸鎖を短縮させ、そしてウイルス複製を停止させる。プロドラッグの代謝産物は、タンパク質同化性代謝産物、異化性代謝産物、または同化作用および異化作用の両方の産物であり得る。代謝産物が生成される様式は、本発明の方法の実施において重要ではない。

30

【0037】

本発明の方法は、抗ウイルス活性または抗腫瘍活性を実質上有する代謝産物をアッセイすることに限定されない。確かに、活性な代謝産物の不活性な前駆体をアッセイし得る。抗ウイルス的に活性な二リン酸塩代謝産物の前駆体としては、親薬物の一リン酸塩、親薬物の他の代謝産物の一リン酸塩（例えば、ヘテロ環状塩基上の置換基の中間体改変）、親自体、およびリン酸化の前のプロドラッグの親への変換において細胞によって生成された代謝産物が挙げられる。前駆体構造は、これらが細胞性代謝産物の結果であるので、かなり変化し得る。しかし、この情報は、すでに公知であるか、または当業者によって容易に決定され得る。

40

【0038】

アッセイされるプロドラッグが、それ自体抗腫瘍活性または抗ウイルス活性を示さない場合、生のアッセイに対する調整が必要とされ得る。例えば、不活性な代謝産物の活性な代謝産物への細胞内プロセッシングは、試験される組織中で異なる速度で生じ、不活性な代謝産物を用いる生のアッセイは、細胞型中の差異を考慮して調整される必要がある。なぜなら、相対的なパラメータは、不活性な代謝産物の蓄積ではなく、標的組織における活性

50

の生成であるためである。しかし、適切な調整を決定することは、当業者の範囲内である。従って、本明細書中の本発明の工程(d)は、活性を決定する工程を必要とし、活性は、直接的に測定されるかまたは推定され得るかのいずれかである。これは、本明細書中の方法が、それ自体活性である中間体をアッセイすることのみに限定されることを意味するのではない。例えば、試験組織におけるプロドラッグの非存在または減少はまた、アッセイされ得る。工程(d)は、それが関係する組織と相互作用する場合、プロドラッグによって付与される活性の評価のみを必要とし、そしてこのことは、推定または他の非間接的な測定に基づき得る。

【0039】

本発明の方法の工程(d)は、プロドラッグの「相対的」活性を決定する工程を必要とする。これは、各アッセイおよび全てのアッセイまたは一連のアッセイが、必ずしも選択された非標的組織を含む必要はないと理解される。対照的に、基準となる非標的活性を提供するために、非標的組織もしくは組織の組織学的制御、またはこのような非標的組織から予想される結果を示すアルゴリズムを使用することは、本発明の範囲内である。

10

【0040】

次いで、工程(d)において得られる結果は、非標的組織よりも標的組織においてより大きい抗ウイルス活性を生成するプロドラッグを最適に選択または同定するために使用される。さらなる開発のために選択されるのはこのプロドラッグである。

【0041】

プロドラッグ候補物のいくつかの前評価は、本発明の方法の実施の前に、行なわれ得ることが理解される。例えば、プロドラッグは、大部分が代謝されないで胃腸管を通過し得る必要があり、血液中で実質的に安定である必要があり、そして少なくともある程度細胞を浸透し得なければならない。ほとんどの場合において、このプロドラッグはまた、実質的な代謝なしで肝臓循環の初回通過を完了する必要がある。このような前研究は任意であり、そして当業者に周知である。

20

【0042】

抗ウイルス活性について上記のような同じ推定は、メトキシホスホネートヌクレオチドアナログの抗腫瘍プロドラッグについても同様に適用可能である。これらとしては、例えば、PMEGのプロドラッグ、PMEAのグアニルアナログが挙げられる。この場合において、PMEGのような細胞障害性ホスホネートは、これらの細胞障害性が実際にこれらの抗腫瘍活性を付与するので、探求する価値のある化合物である。

30

【0043】

次いで、この新規なスクリーニング方法によって同定された化合物を、所望の目的が満たされていることを確認するために、伝統的な臨床前プログラムまたは臨床プログラムに入れ得る。代表的に、プロドラッグは、標的組織における親薬物の活性または濃度(%用量分布)が、非標的組織における親化合物の活性または濃度の2倍より大きく、そして好ましくは5倍より大きい場合、選択的であると考えられる。あるいは、プロドラッグ候補物は、基準プロドラッグと比較され得る。この場合、選択性は、絶対的ではなく、相対的である。選択的プロドラッグは、原型と比較して標的組織において約10倍よりも大きい濃度または活性を生じるプロドラッグであるが、選択性の程度は任意である。

40

【0044】

(開始物質または中間体の調製のための新規な方法)

本発明の好ましい出発物質(親薬物)(PMEAおよび(R)-PMPA)の製造のための改善された方法もまた、本明細書中に含まれる。代表的には、この方法は、9-(2-ヒドロキシプロピル)アデニン(HPA)または9-(2-ヒドロキシエチル)アデニン(HEA)をマグネシウムアルコキシドと反応させ、その後、保護されたアグリコンシントnp-トルエン-スルホニルオキシメチルホスホネート(トシレート)を反応混合物に添加し、そしてそれぞれPMPAまたはPMEAを回収する工程を包含する。

【0045】

好ましくは、HPAは、濃縮されたかまたは単離されたRエナンチオマーである。キラル

50

H P A 混合物が使用される場合、R - P M P A は、合成が完了した後、キラル P M P A 混合物から単離され得る。

【 0 0 4 6 】

代表的には、トシレートは、低級アルキル基によって保護されるが、他の適切な基が、当業者に明らかである。トシル化反応において保護基として作用し得るプロドラッグホスホネート置換基であらかじめ置換されたトシレートを使用することは便利であり、それにより、脱保護工程を回避しそしてそこからプロドラッグまたは中間体を直接回収し得る。

【 0 0 4 7 】

マグネシウムアルコキシドのアルキル基は重要ではなく、そして任意の $C_1 \sim C_6$ の分枝または直鎖状のアルキルであり得るが、好ましくは、*t*-ブチル (P M P A について) またはイソブチル (P M E A について) である。反応条件はまた、重要ではないが、好ましくは、撹拌しながらかまたは他に中程度に撹拌しながら、約 70 ~ 75 で反応混合物を加熱する工程を包含する。

【 0 0 4 8 】

ホスホネート置換基を保持する利益がない場合、生成物は、脱保護され (通常、トシレート保護基がアルキルであるプロモトリメチルシランを用いて)、次いで、この生成物は、結晶化または当業者に明らかな他の簡便な方法によって回収される。

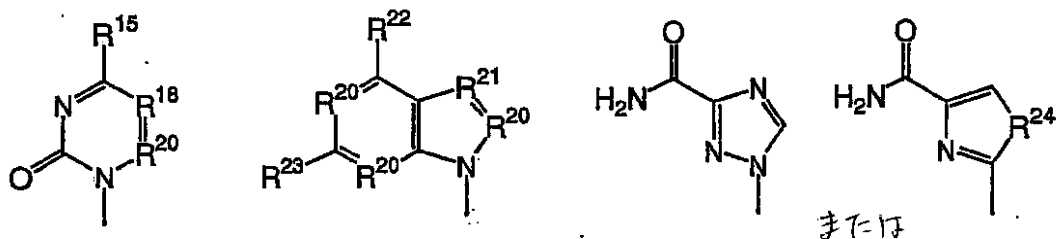
【 0 0 4 9 】

(複素環式塩基)

構造 (3) および (4) に記載される本発明の化合物において、複素環式塩基 B は、以下の構造 ;

【 0 0 5 0 】

【 化 2 0 】



から選択され、ここで、

R^{15} は、H、OH、F、Cl、Br、I、 OR^{16} 、SH、 SR^{16} 、 NH_2 、または NHR^{17} であり ;

R^{16} は、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 CH_2CCH_3 、 CH_2CHCH_2 および C_3H_7 を含む、 $C_1 \sim C_6$ アルキルまたは $C_2 \sim C_6$ アルケニルであり ;

R^{17} は、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 CH_2CCH_3 、 CH_2CHCH_2 および C_3H_7 を含む、 $C_1 \sim C_6$ アルキルまたは $C_2 \sim C_6$ アルケニルであり ;

R^{18} は、N、CF、CCl、CBr、CI、 CR^{19} 、 CSR^{19} 、または COR^{19} であり ;

R^{19} は、H、置換されていないかまたは OH、F、Cl、Br もしくは I によって置換された $C_1 \sim C_9$ アルキル、 $C_2 \sim C_9$ アルケニル、 $C_2 \sim C_9$ アルキニル、 $C_1 \sim C_9$ アルキル - $C_1 \sim C_9$ アルコキシ、または $C_7 \sim C_9$ アリール - アルキルであり、従って R^{19} は、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CHCH_2$ 、 $-CHCH_2Br$ 、 $-CH_2CH_2Cl$ 、 $-CH_2CH_2F$ 、 $-CH_2CCH_3$ 、 $-CH_2CHCH_2$ 、 $-C_3H_7$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2OCH_3$ 、 $-CH_2OC_2H_5$ 、 $-CH_2OCCH_3$ 、 $-CH_2OCH_2CHCH_2$ 、 $-CH_2C_3H_7$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2OCH_3$ 、 $-CH_2CH_2OC_2H_5$ 、 $-CH_2CH_2OCCH_3$ 、 $-CH_2CH_2OCH_2CHCH_2$ 、および $-CH_2CH_2OC_3H_7$ を含む ;

R^{20} は、N または CH であり ;

10

20

30

40

50

$R^{2\ 1}$ は、N、CH、CCN、CCF₃、CC≡CHまたはCC(O)NH₂であり；
 $R^{2\ 2}$ は、H、OH、NH₂、SH、SCH₃、SCH₂CH₃、SCH₂CCH₃、SCH₂CHCH₂、SC₃H₇、NH(CH₃)、N(CH₃)₂、NH(CH₂CH₃)、N(CH₂CH₃)₂、NH(CH₂CCH₃)、NH(CH₂CHCH₂)、NH(CH₃H₇)、ハロゲン(F、Cl、BrまたはI)、またはXであり、ここで、Xは、-(CH₂)_m(O)_n(CH₂)_mN(R^{1 0})₂であり、ここで、各mは独立して0～2であり、nは0～1であり、そしてR^{1 0}は、独立して、

H、

C₁～C₁₅アルキル、C₂～C₁₅アルケニル、C₆～C₁₅アリアルアルケニル、C₆～C₁₅アリアルアルキニル、C₂～C₁₅アルキニル、C₁～C₆アルキルアミノ-
 C₁～C₆アルキル、C₅～C₁₅アラルキル、C₆～C₁₅ヘテロアラルキル、C₅～
 C₆アリアル、C₂～C₆ヘテロシクロアルキル、

C₂～C₁₅アルキル、C₃～C₁₅アルケニル、C₆～C₁₅アリアルアルケニル、C₃～C₁₅アルキニル、C₇～C₁₅アリアルアルキニル、C₁～C₆アルキルアミノ-
 C₁～C₆アルキル、C₅～C₁₅アラルキル、C₆～C₁₅ヘテロアルキル、またはC₃～C₆ヘテロシクロアルキルであり、ここで、アルキル部分におけるメチレンは、-O-
 -によって置換されたN⁶に隣接せず、

必要に応じて、両方のR^{1 0}は一緒に、Nに結合して1個または2個のNヘテロ原子および必要に応じてさらなるOまたはSヘテロ原子を含む、飽和または不飽和のC₂～C₅複素環を形成し、

あるいは、前述のR^{1 0}基の1つは、1～3個のハロ、CNまたはN₃で置換される；しかし、必要に応じて、少なくとも1つのR^{1 0}基はHではなく；

$R^{2\ 8}$ は、H、OH、F、Cl、Br、I、SCH₃、SCH₂CH₃、SCH₂CCH₃、SCH₂CHCH₂、SC₃H₇、OR^{1 6}、NH₂、NHR^{1 7}またはR^{2 2}であり；そして

$R^{2\ 4}$ は、O、SまたはSeである。

【0051】

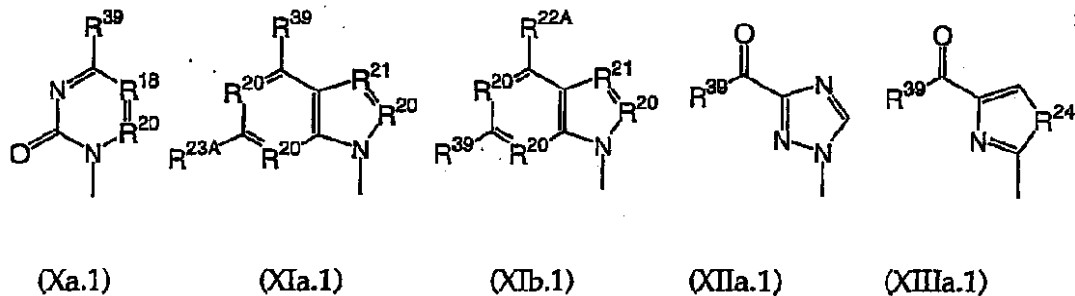
Bはまた、保護された複素環式塩基および保護されていないヘテロ環式塩基の両方（特にプリン塩基およびピリミジン塩基）を含む。環外アミンおよび他の不安定な基のための保護基が公知であり（Greeneら、「Protective Groups in Organic Synthesis」）、そしてN-ベンゾイル、イソブチリル、4,4'-ジメトキシトリチル(DMT)などが挙げられる。保護基の選択は、当業者に明らかであり、そして不安定な基の性質および保護基が遭遇すると予想される化学（例えば、酸性、塩基性、酸化的、還元的または他の条件）に依存する。例示的な保護種は、N⁴-ベンゾイルシトシン、N⁶-ベンゾイルアデニン、N²-イソブチリルグアニンなどである。

【0052】

保護塩基は、式Xa.1、XIa.1、XIb.1、XIIa.1またはXIIIa.1

【0053】

【化21】



を有し、ここで、R^{1 8}、R^{2 0}、R^{2 1}、R^{2 4}は、以前に定義された意味を有し；R

$R^{2,2,A}$ は、 $R^{2,2}$ が NH_2 ではない条件で、 $R^{3,9}$ または $R^{2,2}$ であり； $R^{2,3,A}$ は、 $R^{2,3}$ が NH_2 ではない条件で、 $R^{3,9}$ または $R^{2,3}$ であり； $R^{3,9}$ は、 $NHR^{4,0}$ 、 $NHC(O)R^{3,6}$ または $CR^{4,1}N(R^{3,8})_2$ であり、ここで、 $R^{3,6}$ は、1個もしくは2個の原子またはハロゲン、メチル、エチル、メトキシ、エトキシ、ヒドロキシおよびシアノから選択される基で置換された、 $C_1 \sim C_{1,9}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{1,9}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_{1,0}$ アリール、アダマントイル (adamantoyl)、アルキルアニル、または $C_3 \sim C_{1,0}$ アリールであり； $R^{3,8}$ は、 $C_1 \sim C_{1,0}$ アルキルであるか、または両方の $R^{3,8}$ は共に、1-モルホリノ、1-ピペリジン、または1-ピロリジンであり； $R^{4,0}$ は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ペンチル、ヘキシル、オクチルおよびデカニルを含む、 $C_1 \sim C_{1,a}$ アルキルであり；そして $R^{4,1}$ は、水素または CH_3 である。

10

【0054】

構造 XIa 、1および XIb 、1の塩基について、 $R^{3,9}$ が $R^{2,2,A}$ または $R^{2,3,A}$ に存在する場合、同じ塩基上の両方の $R^{3,9}$ 基は、一般に同じである。例示的な $R^{3,6}$ は、フェニル、前述の $R^{3,6}$ アリール置換基の1つで置換されたフェニル、 $-C_{1,0}H_{1,5}$ (ここで、 $C_{1,0}H_{1,5}$ は、2-アダマントイルである)、 $-CH_2-C_6H_5$ 、 $-C_6H_5$ 、 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2CH_3$ 、メチル、ブチル、*t*-ブチル、ヘプタニル、ノナニル、ウンデカニル、またはウンデセニルである。

【0055】

特定の塩基としては、ヒポキサンチン、グアニン、アデニン、シトシン、イノシン、チミン、ウラシル、キサンチン；2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、ヒポキサンチン、イノシンおよびキサンチンの8-アザ誘導体；アデニン、グアニン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、ヒポキサンチン、イノシンおよびキサンチンの7-デアザ-8-アザ誘導体；2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、ヒポキサンチン、イノシンおよびキサンチンの1-デアザ誘導体；2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、ヒポキサンチン、イノシンおよびキサンチンの7-デアザ誘導体；2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、ヒポキサンチン、イノシンおよびキサンチンの3-デアザ誘導体；6-アザシトシン；5-フルオロシトシン；5-クロロシトシン；5-ヨードシトシン；5-ブ

20

30

ロモシトシン；5-メチルシトシン；5-プロモビニルウラシル；5-フルオロウラシル；5-クロロウラシル；5-ヨードウラシル；5-プロモウラシル；5-トリフルオロメチルウラシル；5-メトキシメチルウラシル；5-エチニルウラシルおよび5-プロピニルウラシルが挙げられる。

【0056】

好ましくは、 B は、グアニル、3-デアザグアニル、1-デアザグアニル、8-アザグアニル、7-デアザグアニル、アデニル、3-デアザアデニル、1-デアザアデニル、8-アザアデニル、7-デアザアデニル、2,6-ジアミノプリーニル、2-アミノプリーニル、6-クロロ-2-アミノプリーニルおよび6-チオ-2-アミノプリーニルから選択される9-プリーニル残基であり、または B' は、シトシニル、5-ハロシトシニル、および5-($C_1 \sim C_3$ -アルキル)シトシニルから選択される1-ピリミジニル残基である。

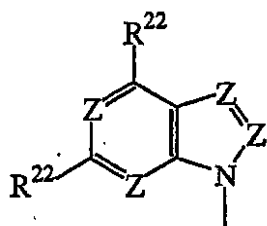
40

【0057】

このましい B 基は、式

【0058】

【化22】



を有し、ここで、

R^{22} は、独立して、ハロ、酸素、 NH_2 、 X または H であるが、必要に応じて、少なくとも1つの R^{22} は、 X であり；

X は、 $-(CH_2)_m(O)_n(CH_2)_mN(R^{10})_2$ であり、ここで、 m は、 $0 \sim 2$ であり、 n は $0 \sim 1$ であり、そして

R^{10} は、独立して、

H 、

$C_1 \sim C_{15}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{15}$ アルケニル、 $C_6 \sim C_{15}$ アリールアルケニル、 $C_6 \sim C_{15}$ アリールアルキニル、 $C_2 \sim C_{15}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ-
 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_5 \sim C_{15}$ アラルキル、 $C_6 \sim C_{15}$ ヘテロアラルキル、 $C_5 \sim C_6$ アリール、 $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクロアルキル、

$C_2 \sim C_{15}$ アルキル、 $C_3 \sim C_{15}$ アルケニル、 $C_6 \sim C_{15}$ アリールアルケニル、 $C_3 \sim C_{15}$ アルキニル、 $C_7 \sim C_{15}$ アリールアルキニル、 $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ-
 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_5 \sim C_{15}$ アラルキル、 $C_6 \sim C_{15}$ ヘテロアルキル、または
 $C_3 \sim C_6$ ヘテロシクロアルキルであり、ここで、アルキル部分におけるメチレンは、 $-O-$ によって置換された N^6 に隣接せず、

必要に応じて、両方の R^{10} は一緒に、 N に結合して1個または2個の N ヘテロ原子および必要に応じてさらなる O または S ヘテロ原子を含む、飽和または不飽和の $C_2 \sim C_5$ 複素環を形成し、

あるいは、前述の R^{10} 基の1つは、1～3個のハロ、 CN または N_3 で置換される；しかし、必要に応じて、少なくとも1つの R^{10} 基は H ではなく；そして

Z は、複素環式核がたった1個の Z だけプリンとは異なる条件で、 N または CH である。

【0059】

E 基は、メトキシホスホネートヌクレオチドアナログにおいて使用されるアグリコンを示す。好ましくは、 E 基は、 $-CH(CH_3)CH_2-$ または $-CH_2CH_2-$ である。また、アグリコンにおけるキラル中心の側鎖は、(濃縮された(S)エナンチオマーであるヒドロキシメチルを除いて)実質的に(R)構造のみであることが好ましい。

【0060】

R^1 は、構造 $-OR^{35}$ または $-OR^6$ を有するインビボ加水分解性オキシエステルであり、ここで、 R^{35} は、本明細書中に参考として援用される米国特許第5,798,340号の64段落49行目において定義され、そして R^6 は、上に定義される。好ましくは、 R^1 は、アリールオキシ、通常、非置換かまたはパラ置換の(R^6 において定義されるような)フェノキシである。

【0061】

R^2 は、必要に応じて約5未満の原子によってアミデート N に結合された任意のカルボキシ基がエステル化されている条件で、アミノ酸残基である。 R^2 は、代表的に、構造

【0062】

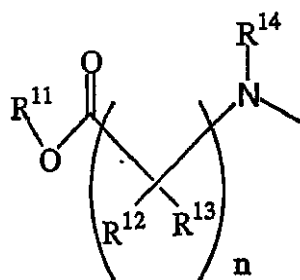
【化23】

10

20

30

40



(8)

10

を有し、ここで、

n は、1 または 2 であり；

R^{11} は、 R^6 または H であり；好ましくは、 $R^6 = C_3 \sim C_9$ アルキル；OH、ハロゲン、O または N で独立して置換された $C_3 \sim C_9$ アルキル； $C_3 \sim C_6$ アリール；OH、ハロゲン、O または N で独立して置換された $C_3 \sim C_6$ アリール；あるいは OH、ハロゲン、O または N で独立して置換された $C_3 \sim C_6$ アリールアルキルであり；

R^{12} は、独立して、H または非置換であるかもしくは OH、O、N、 $COOR^{11}$ およびハロゲンからなる群より独立して選択される置換基によって置換された $C_1 \sim C_9$ アルキル；非置換であるかもしくは OH、O、N、 $COOR^{11}$ およびハロゲンからなる群より独立して選択される置換基によって置換された $C_3 \sim C_6$ アリール；あるいは非置換であるかしくは OH、O、N、 $COOR^{11}$ およびハロゲンからなる群より独立して選択される置換基によって置換された $C_3 \sim C_9$ アリール - アルキルであり；

20

R^{13} は、独立して、 $C(O) - OR^{11}$ ；アミノ；アミド；グアニジニル；イミダゾリル；インドリル；スルホキシド；ホスホリル； $C_1 \sim C_3$ アルキルアミノ； $C_1 \sim C_3$ アルキルジアミノ； $C_1 \sim C_6$ アルケニルアミノ；ヒドロキシ；チオール； $C_1 \sim C_3$ アルコキシ； $C_1 \sim C_3$ アルキルチオール (alkythiol)； $(CH_2)_n COOR^{11}$ ；非置換かまたは OH、ハロゲン、SH、 NH_2 、フェニル、ヒドロキシフェニルもしくは $C_7 \sim C_{10}$ アルコキシフェニルで置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル；非置換かまたは OH、ハロゲン、SH、 NH_2 、フェニル、ヒドロキシフェニルもしくは $C_7 \sim C_{10}$ アルコキシフェニルで置換された $C_2 \sim C_6$ アルケニル；および非置換かまたは OH、ハロゲン、SH、 NH_2 、フェニル、ヒドロキシフェニルもしくは $C_7 \sim C_{10}$ アルコキシフェニルで置換された $C_6 \sim C_{12}$ アリールであり；そして

30

R^{14} は、H あるいは $C_1 \sim C_9$ アルキル、または OH、ハロゲン、 $COOR^{11}$ 、O もしくは N で独立して置換された $C_1 \sim C_9$ アルキル； $C_3 \sim C_6$ アリール；OH、ハロゲン、 $COOR^{11}$ 、O もしくは N で独立して置換された $C_3 \sim C_6$ アリール；または OH、ハロゲン、 $COOR^{11}$ 、O もしくは N で独立して置換された $C_3 \sim C_6$ アリールアルキルである。

【0063】

好ましくは、 R^{11} は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、最も好ましくはイソプロピルであり、 R^{13} は、天然に存在するアミノ酸の側鎖であり、 $n = 1$ であり、 R^{12} は H であり、そして R^{14} は H である。構造 (2) の化合物において、本発明は、ヘノキシおよびイソプロピルエステルが -OH に加水分解された代謝産物を含む。同様に、化合物 (5a)、5 (b) および (6) の脱エステル化された濃縮ホスホノアミデート代謝産物は、本発明の範囲内に含まれる。

40

【0064】

アリールおよび「O」または「N」置換は、米国特許第 5,798,340 号の 16 列目、42 ~ 58 行に規定されている。

【0065】

代表的には、アミノ酸は、天然アミノ酸または L アミノ酸である。適切な特異的な実施例は、米国特許第 5,798,340 号において、例えばその表 4 および 8 ~ 10 列に記載

50

されている。

【 0 0 6 6 】

本明細書において用いる場合、アルキルは、反対に言及しない限り、正常な、第二級、第三級、または環状の炭化水素である。反対に言及しない限り、アルキルは、 $C_1 - C_{12}$ である。例えば、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 $-C(CH_3)_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_2CH_3)_2$ 、 $-C(CH_3)_2CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$ 、 $-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$ 、 $-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$ 、 $-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$ 、および $-CH(CH_3)C(CH_3)_3$ である。アルケニルおよびアルキニルは、同じ様式で規定されるが、それぞれ少なくとも1つの二重結合または三重結合を含む。

10

【 0 0 6 7 】

ここでエノール基またはケト基が開示されており、対応する互変異性体も同様に教示されていると解釈される。

【 0 0 6 8 】

20

本発明のプロドラッグ化合物は、米国特許第5,798,340号に列挙される遊離塩基または種々の塩の形態で提供されており、そしてまた米国特許第5,798,340号に記載されるような薬学的産物としての使用のために薬学的に受容可能な賦形剤または溶媒和希釈剤とともに処方される。これらのプロドラッグは、親薬物について既に確立された抗ウイルスおよび有用性を有する（米国特許第5,798,340号およびメトキシホスホネートヌクレオチドアナログに関する他の引用文献を参照のこと）。構造(4)のジアステレオマーは少なくとも、本明細書における研究において表されたような比較的無差別の特徴にかかわらず、インビトロにおける加水分解によって親薬物の化学的生成における中間産物として有用であることが理解される。

【 0 0 6 9 】

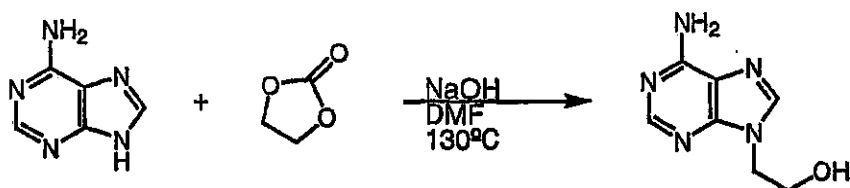
30

本発明は以下の実施例を参考としてさらに完全に理解される。

【 0 0 7 0 】

【 化 2 4 】

実施例 1 a



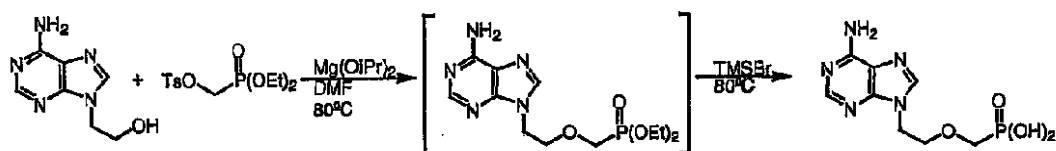
40

(マグネシウムイソプロポキシドを用いるPMEAへのアデニン) アデニン(16.8g、0.124mol)を含有するDMF(41.9ml)の懸濁液へ、エチレンカルボネート(12.1g、0.137mol)および水酸化ナトリウム(0.100g、0.0025mol)を添加した。この混合物を130℃で一晩加熱した。反応物を50℃以下に冷却し、そしてトルエン(62.1ml)を添加した。このスラリーを2時間50℃にさらに冷却し、濾過し、そしてトルエンでリンスした(2×)。湿潤固体を65℃減圧下で乾燥し20.0g(90%)の9-(2-ヒドロキシエチル)アデニンをオフホワイトの固体として得た。Mp: 238~240℃。

【 0 0 7 1 】

50

【化 2 5】

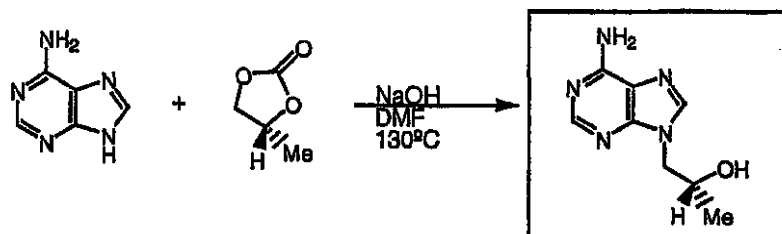


9 - (2 - ヒドロキシエチル) アデニン (H E A) (20 . 0 g 、 0 . 112 mol) を DMF (125 ml) 中に懸濁し、そして 80 に加熱した。マグネシウムイソプロポキシド (11 . 2 g 、 0 . 0784 mol)、または代わりにマグネシウム t - ブトキシドをこの混合物に添加し、続いてジエチル p - トルエンスルホニルオキシメチルホスホネート (66 . 0 g 、 0 . 162 mol) を 1 時間にわたって添加した。この混合物を 80 で 7 時間攪拌した。30 ml の揮発物を減圧蒸留によって除去し、そして反応物に 30 ml の新鮮 DMF を再チャージした。室温への冷却後、プロモトリメチルシラン (69 . 6 g 、 0 . 450 mol) を添加し、そしてこの混合物を 6 時間 80 に加熱した。反応物を濃縮し高粘度の粘性物質 (thick gum) を得た。この粘性物質を 360 ml の水に溶解し、120 ml のジクロロメタンで抽出し、水酸化ナトリウムで pH 3 . 2 に調節し、そして得られたスラリーを一晩室温で攪拌した。このスラリーを 1 時間 4 に冷却した。この固体を濾過によって分離し、水で洗浄し (2 ×)、そして 56 減圧下で乾燥して、白色固体として 20 g (65 . 4 %) の 9 - [2 - (ホスホノメトキシ) エチル] アデニン (P M E A) を得た。Mp : > 200 (分解)。 ¹ H NMR (D₂O) : 3 . 49 (t , 2 H) ; 3 . 94 (t , 2 H) ; 4 . 39 (t , 2 H) ; 8 . 13 (s , 1 H) ; 8 . 22 (s , 1 H)。

【 0 0 7 2 】

【化 2 6】

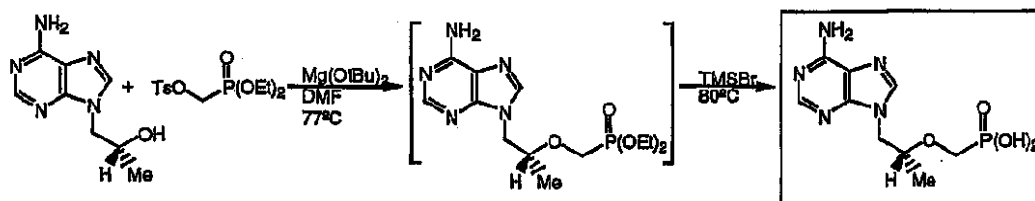
実施例 1 b



(マグネシウム t - ブトキシドを用いる P M P A への アデニン) アデニン (40 g 、 0 . 296 mol) を含有する DMF (41 . 9 ml) の懸濁液へ、(R) - プロピレンカーボネート (34 . 5 g 、 0 . 338 mol) および水酸化ナトリウム (0 . 480 g 、 0 . 012 mol) を添加した。この混合物を 130 で一晩加熱した。反応物を 100 より下に冷却し、そして反応温度を 100 ~ 110 の間に維持したまま、トルエン (138 ml) を、続いてメタンスルホン酸 (4 . 7 g 、 0 . 049 mol) 添加した。追加のトルエン (114 ml) を添加して均一な溶液を作成した。この溶液を 7 時間にわたって 3 に冷却し、次いで 1 時間 3 で保持した。得られた固体を濾過して分離し、そしてアセトンでリンスした (2 ×)。湿潤固体を 80 減圧下で乾燥し、オフホワイトの固体として、42 . 6 g (75 %) の (R) - 9 - [2 - (ヒドロキシ) プロピル] アデニン (H P A) エチル) アデニンを得た。Mp : 188 ~ 190 。

【 0 0 7 3 】

【化 2 7】



(R)-9-[2-(ヒドロキシ)プロピル]アデニン(HPA)(20.0g、0.104mol)をDMF(44.5ml)中に懸濁し、そして65℃に加熱した。マグネシウムt-ブトキシド(14.2g、0.083mol)、または代わりにマグネシウムイソプロポキシドを、温度を78℃に保持したまま、1時間にわたってこの混合物に添加し、続いてジエチルp-トルエンスルホニルオキシメチルホスホネート(66.0g、0.205mol)を2時間にわたって添加した。この混合物を75℃で4時間攪拌した。50℃より下への冷却後、プロモトリメチルシラン(73.9g、0.478mol)を添加し、そしてこの混合物を3時間77℃に加熱した。完了したとき、この反応物を80℃に加熱し、そして揮発物を常圧蒸留によって取り出した。残滓を50℃で水(120ml)に溶解し、次いで酢酸エチルで抽出した(101ml)。水酸化ナトリウムを用いて水相のpHをpH1.1に調節し、標準(R)-PMPAをシードし、そして水相のpHを水酸化ナトリウムでpH2.1に再調節した。得られたスラリーを室温で一晩攪拌した。このスラリーを3時間4℃に冷却した。この固体を濾過して分離し、水(60ml)で洗浄し、そして50℃減圧下で乾燥し、オフホワイトの固体として、18.9g(63.5%)の粗(R)-9-[2-(ホスホノメトキシ)プロピル]アデニン(PMPA)を得た。

10

20

30

【0074】

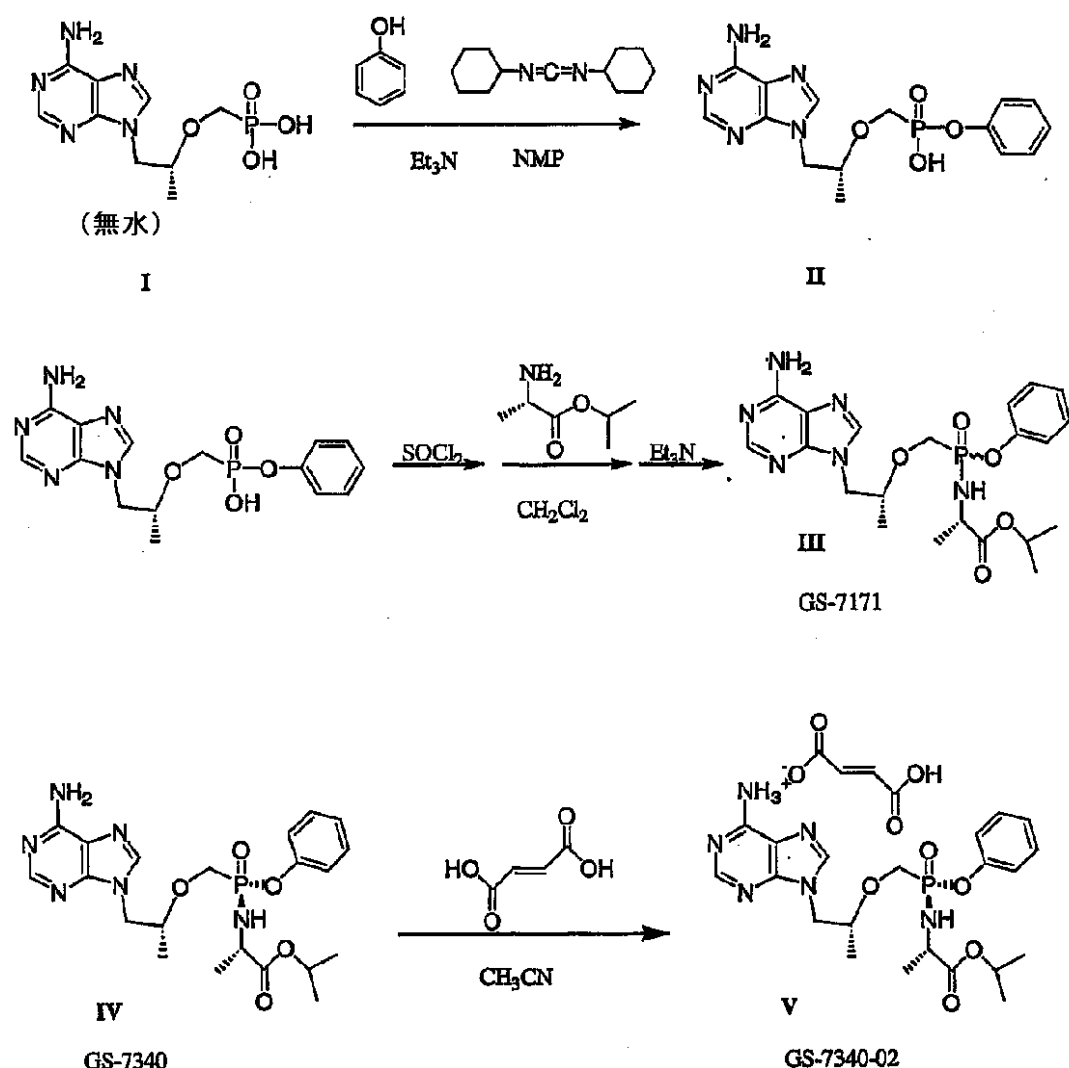
全ての固体が溶解するまで、粗(R)-9-[2-(ホスホノメトキシ)プロピル]アデニンを水(255ml)中で加熱還流した。この溶液を4時間にわたって室温まで冷却した。得られたスラリーを3時間4℃に冷却した。この固体を濾過によって分離し、水(56ml)およびアセトン(56ml)で洗浄し、そして50℃減圧下で乾燥して、白色固体として15.0g(50.4%)の(R)-9-[2-(ホスホノメトキシ)プロピル]アデニン(PMPA)を得た。Mp: 278~280℃。

【0075】

【化28】

実施例 2
GS-7171 (III) の調製

スキーム 1



10

20

30

40

50

ガラスで裏打ちした (glass-lined) リアクターに、無水 PMPA、(I) (14.6 kg、50.8 mol)、フェノール (9.6 kg、102 mol)、および 1-メチル-2-ピロリジノン (39 kg) を充填した。この混合物を 85 に加熱し、そしてトリエチルアミン (6.3 kg、62.3 mol) を添加した。次いで、1,3-ジクロヘキシルカルボジイミド (17.1 kg、82.9 mol) を含有する 1-メチル-2-ピロリジノン (1.6 kg) の溶液を、100 で 6 時間にわたって添加した。加熱を 16 時間続けた。反応物を 45 に冷却して、水 (29 kg) を添加し、そして 25 に冷却した。濾過して反応物から固体を除き、そして水 (15.3 kg) でリンスした。合わせた濾過液およびリンスを減圧下で褐色の (tan) スラリーに濃縮して、水 (24.6 kg) を添加し、そして NaOH (水に 25% 含有) で pH = 11 に調節した。珪藻土を通した濾過、続いて水 (4.4 kg) でのリンスによって細粒を取り除いた。合わせた濾過液およびリンスを酢酸エチル (28 kg) で抽出した。HCl (水に 37% 含有) (4 kg) を用いて水溶液を pH = 3.1 に調節した。粗 II を濾過で分離し、そしてメタノール (12.7 kg) で洗浄した。粗 II の湿潤ケーキをメタノール (58 kg) 中に懸濁 (スラリー) した。固体を濾過によって分離し、メタノール (8.5 kg) で洗浄し、そして減圧下で乾燥して、白色粉末として 9.33 kg の II を得た。¹H NMR (D₂O) δ 1.2 (d, 3H)、3.45 (q, 2H)、3.7 (q, 2H)、4 (m

, 2 H)、4.2 (q, 2 H)、4.35 (dd, 2 H)、6.6 (d, 2 H)、7 (t, 1 H)、7.15 (t, 2 H)、8.15 (s, 1 H)、8.2 (s, 1 H); $^3\text{ }^1\text{P}$ NMR (D_2O) δ 15.0 (デカップリング)。

【0076】

(GS-7171 (III)) (スキーム1) ガラスで裏打ちしたリアクターに、モノフェニルPMPA、(II)、(9.12 kg、25.1 mol) およびアセトニトリル (30.7 kg) を充填した。塩化チオニル (6.57 kg、56.7 mol) を50より下で添加した。固体が溶解するまで、この混合物を75で加熱した。反応温度を80に上昇させ、そして窒素下での常圧蒸留によって揮発物 (11.4 kg) を収集した。ポット残滓を25に冷却し、ジクロロメタン (41 kg) を添加し、そして-29に冷却した。 (L) - アラニンイソプロピルエステル (7.1 kg、54.4 mol) を含有するジクロロメタン (36 kg) の溶液を、-18で60分にわたって添加し、続いて-18~-11で30分にわたってトリエチルアミン (7.66 kg、75.7 mol) を添加した。この反応混合物を室温まで暖め、そして二水素リン酸ナトリウム溶液 (水中に10%含有、各洗浄に15.7 kg) を用いて5回洗浄した。有機溶液を無水硫酸ナトリウム (18.2 kg) で乾燥し、濾過し、ジクロロメタン (28 kg) でリンスし、そして減圧下で油状物に濃縮した。アセトン (20 kg) をこの油状物にチャージし、そしてこの混合物を減圧下で濃縮した。アセトン (18.8 kg) を得られた油状物にチャージした。38×38 cmベッドの22 kg シリカゲル60、230~400メッシュを通したクロマトグラフィーによって生成溶液の半分を精製した。このカラムを480 kgのアセトンで溶出した。新鮮なシリカゲルおよびアセトンを用いてこの油状物の半分で精製を繰り返した。清浄な生成物を有する画分を減圧下で油状物に濃縮した。アセトニトリル (19.6 kg) をこの油状物にチャージし、そしてこの混合物を減圧下で濃縮した。アセトニトリル (66.4 kg) をチャージし、そしてこの溶液を16時間0~-5に冷却した。固体を濾過によって取り出し、そして濾過物を減圧下で濃縮して、黒い油状物として5.6 kgのIIIを得た： ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.1 (m, 12 H)、3.7 (m, 1 H)、4.0 (m, 5 H)、5.0 (m, 1 H)、6.2 (s, 2 H)、7.05 (m, 5 H)、8.0 (s, 1 H)、8.25 (d, 1 H); $^3\text{ }^1\text{P}$ NMR (CDCl_3) δ 21.0、22.5 (デカップリング)。

【0077】

【化29】

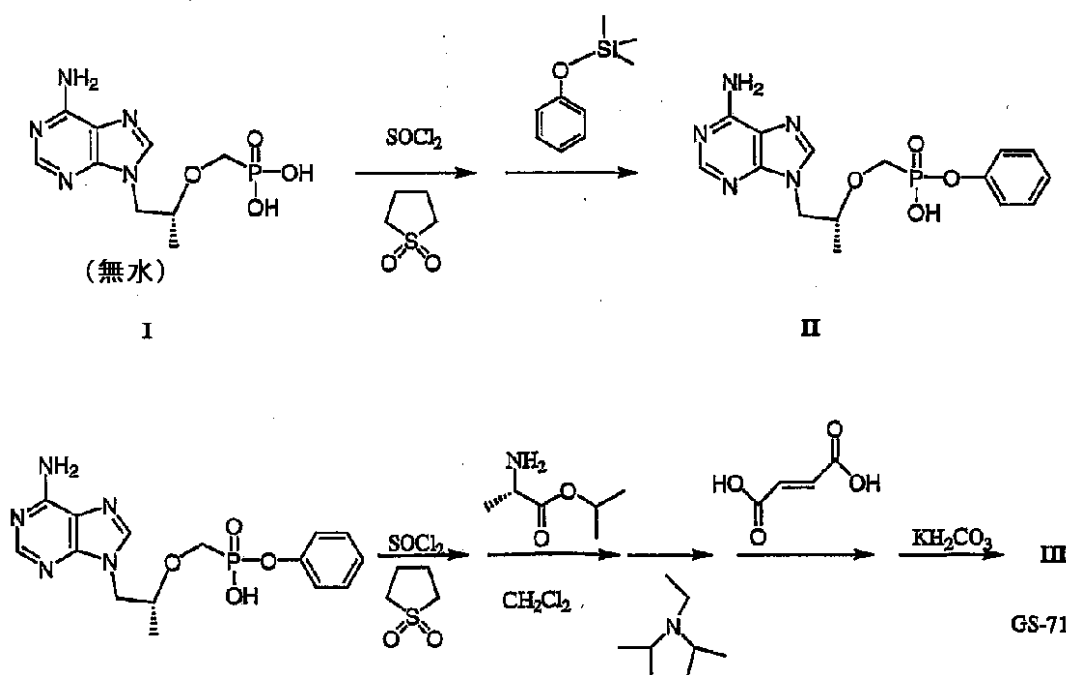
10

20

30

GS-7171(III) の代替方法

スキーム 2



10

20

（モノフェニル PMPA（II））。還流冷却器および窒素入口を備える丸底フラスコを、70 の油槽に入れた。このフラスコに無水PMPA（I）（19.2 g、67 mmol）、N,N-ジメチルホルムアミド（0.29 g、3.3 mmol）、およびテトラメチレンスルホン（40 mL）を充填した。塩化チオニル（14.2 g、119 mmol）を4時間にわたって添加した。加熱を同じ時間にわたって100 まで上昇させた。均一な溶液を得た。フェノキシトリメチルシラン（11.7 g、70 mmol）を5分間にわたってこの溶液に添加した。100 油槽中での加熱をさらに2時間続けた。反応物を0 に冷却しながら、迅速に攪拌するアセトン（400 mL）中に注いだ。固体を濾過によって分離して、減圧下で乾燥して、メタノール（75 mL）に溶解した。氷/水中で冷却しながら、水酸化カリウム溶液（45%水）を用いて、溶液のpHを3.0に調節した。得られた固体を濾過して分離し、メタノールでリンスし、そして減圧下で白色粉末として20.4 gのII（スキーム2）に乾燥した。

30

【0078】

（GS-7171（III））。モノフェニル PMPA（II）（3 g、8.3 mmol）、テトラメチレンスルホン（5 mL）、およびN,N-ジメチルホルムアミド（1 ドロップ）を、40 の油槽中の丸底フラスコに合わせた。塩化チオニル（1.96 g、16.5 mmol）を添加した。20分後、この透明な溶液を熱から取り出し、ジクロロメタン（10 mL）で希釈し、そして（L）-アラニンイソプロピルエステル（5 g、33 mmol）およびジイソプロピルエチルアミン（5.33 g、41 mmol）を含有する-10 のジクロロメタン（20 mL）の溶液に添加した。反応混合物を室温まで暖め、二水素リン酸ナトリウム（10%水、各洗浄10 mL）で3回洗浄した。有機溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、そして減圧下で油状物に濃縮した。この油状物をフマル酸（0.77 g、6.6 mmol）およびアセトニトリル（40 mL）とあわせ、そして加熱し還流して均一な溶液を得た。この溶液を氷槽中で冷却し、そして濾過によって固体を分離した。固体GS-7171フマル酸塩を減圧下で3.7 gに乾燥した。この塩（3.16 g、5.3 mmol）をジクロロメタン（30 mL）に懸濁し、そして炭酸カリウム溶液（5 mL、水中に2.5 M）とともにこの固体が溶解するまで攪拌した。有機相を分離し、次いで水（5 mL）で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、そして減圧下で乾燥して

40

50

褐色の泡状物として2.4gのIIIを得た。

【0079】

(実施例3)

(A. バッチ溶出クロマトグラフィーによるジアステレオマー分離)

Chiralpak AS, 20 μ m、21 $\times$ 50mmガードカラムを備える市販のChiralpak AS, 20 μ m、21 $\times$ 250mm半-分離用HPLCカラムを用いて、GS-7171(III)のジアステレオマーをバッチ溶出クロマトグラフィーによって分離した。Chiralpak(登録商標)ASは、Diaceilが製造し、Chiral Technologies, Inc.によって北アメリカで販売されている独自のパッキング材である(米国特許第5,202,433号、RE35,919号、5,434,298号、5,434,299号、および5,498,752号)。Chiralpak ASは、シリカゲル支持体上にコーティングされたアミロセトリス[(S)- α -メチルベンジルカルバメート]から構成される鏡像異性体(キラル)固定相(chiral stationary phase)(CSP)である。

【0080】

GS-7171ジアステレオマー混合物を、移動相中で溶解させ、そしてGS-7171の約1gのアリコートクロマトグラフィーシステムにポンピングした。望ましくないジアステレオマー(GS-7339と名付けられた)は、このカラムから溶出する最初の主要な広い(約15分、期間)のピークであった。GS-7339ピークを最終溶出した場合、この移動相は、直ちに100%メチルアルコールにスイッチし、ここで所望のジアステレオマー(GS-7340(IV)と名付けられた)が、メチルアルコール溶媒先端を用いてこのカラムから先鋭なピークで溶出するようにさせた。このメチルアルコールを用いて全体にわたるサイクル時間を短くさせた。注入の最初の組み合わせ後、精製したジアステレオマーの1つを含有する単一の大きな画分(>99.0%単一ジアステレオマー)として、両方のジアステレオマーを収集した。この移動相溶媒を減圧下で取り出して、砕けやすい泡状物として精製したジアステレオマーを得た。

【0081】

出発GS-7171量の約95%を2つのジアステレオマー画分中で回収した。このGS-7340画分は、総回収量の約50%を構成した。

【0082】

クロマトグラフィー条件は、以下の通りであった：

移動相(最初) : GS-7171-アセトニトリル：イソプロピルアルコール(90：10)

(最後) : 100%メチルアルコール

流れ : 10mL/分

実行時間 : 約45分

検出 : UV(275nm)

温度 : 環境

溶出プロファイル：GS-7339(ジアステレオマーB)

：GS-7340(ジアステレオマーA；(IV))。

【0083】

(B. SMBクロマトグラフィーによるGS-7171のジアステレオマーの分離)

擬似移動床式(SMB)クロマトグラフィーの一般的な説明については、Strubeら、「Organic Process Research and Development」2：305-319(1998)を参照のこと。

【0084】

GS-7340(IV)。GS-7171(III)(2.8kg)を、10cm $\times$ 5cmの充填床(Chiral Technologies Inc., シリカゲル上にコーティングした20ミクロンのChiralpak AS)(1.2kg)上での擬似移動床式クロマトグラフィーによって精製した。このカラムを、アセトニトリル中30%メタ

ノールで溶出した。生成物含有画分を、アセトニトリル中、I V 溶液まで濃縮した (2 . 4 8 k g) 。この溶液を放置して、アセトニトリルを用いて湿った結晶性塊まで凝固させた。この結晶性塊を、黄褐色の結晶性粉末まで減圧下で乾燥した。1 . 3 0 1 k g I V , 9 8 . 7 % のジアステレオマー純度 : m p 1 1 7 ~ 1 2 0 ; ¹ H N M R (C D C l ₃) δ 1 . 1 5 (m , 1 2 H) , 3 . 7 (t , 1 H) , 4 . 0 (m , 5 H) , 4 . 2 (d d , 1 H) , 5 . 0 (m , 1 H) , 6 . 0 5 (s , 2 H) , 7 . 1 (m , 5 H) , 8 . 0 (s , 1 H) , 8 . 2 (s , 1 H) ; ³ ¹ P N M R (C D C l ₃) δ 2 1 . 0 (デカップリングした) 。

【 0 0 8 5 】

(C . C 1 8 R P - H P L C によるジアステレオマーの分離)

10

G S - 7 1 7 1 (I I I) を、ジアステレオマーを分離するために、以下に要約するプロトコルを使用して、逆相 H P L C によるクロマトグラフィーにかけた。

【 0 0 8 6 】

クロマトグラフィーカラム : P h e n o m e n e x L u n a ^{T M} C 1 8 (2) , 5 μ m , 1 0 0 の細孔サイズ (P h e n o m e n e x , T o r r a n c e , C A) 、またはその等価物

ガードカラム : P e l l i c u l a r C 1 8 (A l l t e c h , D e e r f i e l d , I L) 、またはその等価物

移動相 : A - 水中 0 . 0 2 % (8 5 %) H ₃ P O ₄ : アセトニトリル (9 5 : 5)

20

B - 水中 0 . 0 2 % (8 5 %) H ₃ P O ₄ : アセトニトリル (5 0 : 5 0)

移動相の勾配

【 0 0 8 7 】

【 表 1 】

時間	移動相 A の %	移動相 B の %
0	100	0
5	100	0
7	70	30
32	70	30
40	0	100
50	0	100

30

実行時間 : 5 0 分

平衡化猶予 : 1 0 0 % 移動相 A で 1 0 分

流速 : 1 . 2 m L / 分

温度 : 環境

検出 : U V (2 6 0 n m)

サンプル溶液 : 2 0 m M のリン酸ナトリウム緩衝液 (p H 6)

40

保持時間 : G S - 7 3 3 9 、約 2 5 分

G S - 7 3 4 0 、約 2 7 分。

【 0 0 8 8 】

(D . 結晶化によるジアステレオマーの分離)

G S - 7 3 4 0 (I V) 。アセトニトリル中の G S - 7 1 7 1 (I I I) の溶液を、減圧下で、琥珀色泡状物まで濃縮した (1 4 . 9 g) 。この泡状物を、アセトニトリル (2 0 m L) 中に溶解し、そして I V の結晶で播種した。この混合物を一晩攪拌し、5 まで冷却し、そして濾過によって固体を単離した。この固体を乾燥して、2 . 3 g の I V を白色結晶として得た。9 8 % のジアステレオマー純度 (³ ¹ P N M R) : ¹ H N M R (C D C l ₃) δ 1 . 1 5 (m , 1 2 H) , 3 . 7 (t , 1 H) , 3 . 9 5 (m , 2 H) , 4 . 0 5 (m , 2 H) , 4 . 2 (m , 2 H) , 5 . 0 (m , 1 H) , 6 . 4 (s , 2 H)

50

, 7.1 (m, 5H), 8.0 (s, 1H), 8.2 (s, 1H); ^{31}P NMR (CDCl₃) δ 19.5 (デカップリングした)。この生成物から選択した単結晶のX線結晶分析により、以下のデータを得た:

結晶の色、晶相 無色、カラム
結晶寸法 0.25 × 0.12 × 0.08 mm
結晶系 斜方晶系
格子型 単純
格子パラメーター a = 8.352 (1)
b = 15.574 (2)
c = 18.253 (2)
V = 2374.2 (5)
空間群 P 2₁ 2₁ 2₁ (# 19)
Z 値 4
D_{calc} 1.333 g/cm³
F₀₀₀ 1008.00
 μ (MoK α) 1.60 cm⁻¹。

10

【0089】

(実施例4)

(GS-7340のフマル酸塩の調製)

GS-7340-02 (V)。 (スキーム1) ガラス管付き反応器に、GS-7340 (20
IV) (1.294 kg, 2.71 mol)、フマル酸 (284 g, 2.44 mol)、
およびアセトニトリル (24.6 kg) を充填した。この混合物を加熱還流して固体を溶解し、熱いまま濾過し、そして16時間かけて5℃まで冷却した。この生成物を濾過によって単離し、アセトニトリル (9.2 kg) でリンスし、そして乾燥して1329 g (V) を白色粉末として得た: mp 119.7 ~ 121.1℃; $[\alpha]_D^{20}$ -41.7° (c 1.0, 酢酸)。

20

【0090】

(実施例5)

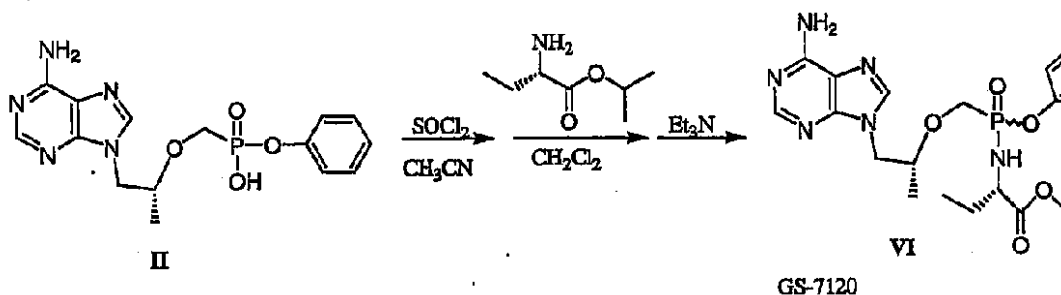
(GS-7120 (VI) の調製)

スキーム3

30

【0091】

【化30】



40

5 L の丸底フラスコに、モノフェニル PMPA、(II) (200 g, 0.55 mol) およびアセトニトリル (0.629 kg) を充填した。塩化チオニル (0.144 kg, 1.21 mol) を 27℃未満で添加した。この混合物を、固体が溶解するまで70℃で加熱した。揮発性物質 (0.45 L) を、窒素下での大気圧蒸留によって除去した。このポットの残渣を25℃に冷却し、ジクロロメタン (1.6 kg) を添加し、そしてこの混合物を -20℃に冷却した。ジクロロメタン (1.33 kg) 中の (L) - α アミノ酪酸エチルエステル (0.144 kg, 1.1 mol) の溶液を、-20 ~ -10℃で18分かけて添加し、続いてトリエチルアミン (0.17 kg, 1.65 mol) を -8 ~ -15℃で15分かけて添加した。この反応混合物を室温まで暖め、そしてリン酸二水素ナトリウム溶液 (10% aq., 各洗浄 0.3 L) で4回洗浄した。有機溶液を無水硫酸ナト

50

リウム (0 . 5 k g) で乾燥させ、そして濾過した。この固体をジクロロメタン (0 . 6 k g) でリンスし、そして合わせた濾液およびリンスを減圧下で油状物まで濃縮した。この油状物を、1 . 2 k g のシリカゲル 60 (230 ~ 400 メッシュ) の 15 × 13 c m のベッド上でのクロマトグラフィーによって精製した。このカラムを、ジクロロメタンおよびメタノールの勾配で溶出した。生成物含有画分を減圧下で濃縮して、211 g の V I (スキーム 3) を黄褐色の泡状物として得た。

【 0092 】

(実施例 5 a)

(バッチ溶出クロマトグラフィーによる G S - 7120 のジアステレオマーの分離)

ジアステレオマー混合物を、以下を除いて、実施例 3 A において G S - 7171 について記載された条件を使用して精製した： 10

移動相 (最初) : G S - 7120 - アセトニトリル : イソプロピルアルコール (98 : 2)

(最後) : 100 % メチルアルコール

溶出プロフィール : G S - 7341 (ジアステレオマー B)

: G S - 7342 (ジアステレオマー A) 。

【 0093 】

(実施例 6)

(結晶化による G S - 7120 のジアステレオマーの分離)

1 L の丸底フラスコに、モノフェニル P M P A , (I I) , (50 g , 0 . 137 m o l) およびアセトニトリル (0 . 2 L) を充填した。塩化チオニル (0 . 036 k g , 0 . 303 m o l) を添加し、10 発熱した。この混合物を、固体が溶解するまで加熱還流した。揮発性物質 (0 . 1 L) を、室素下での大気圧蒸留によって除去した。このポットの残渣を 25 に冷却し、ジクロロメタン (0 . 2 k g) を添加し、そしてこの混合物を - 20 に冷却した。ジクロロメタン (0 . 67 k g) 中の (L) - α アミノ酪酸エチルエステル (0 . 036 k g , 0 . 275 m o l) の溶液を、- 20 ~ - 8 で 30 分かけて添加し、続いてトリエチルアミン (0 . 042 k g , 0 . 41 m o l) を - 6 まで 10 分かけて添加した。この反応混合物を室温まで暖め、そしてリン酸二水素ナトリウム溶液 (10 % a q . , 各洗浄 0 . 075 L) で 4 回洗浄した。この有機溶液を無水硫酸ナトリウム (0 . 1 k g) で乾燥させ、そして濾過した。この固体を酢酸エチル (0 . 25 L) でリンスし、そして合わせた濾液およびリンスを減圧下で油状物まで濃縮した。この油状物を、酢酸エチル (0 . 25 L) で希釈し、播種し、一晚攪拌し、そして - 15 に冷却した。この固体を濾過によって単離し、そして減圧下で乾燥して、17 . 7 g の G S - 7342 (表 5) を黄褐色粉末として得た：¹ H N M R (C D C l ₃) δ 0 . 95 (t , 3 H) , 1 . 3 (m , 6 H) , 1 . 7 (m , 2 H) , 3 . 7 (m , 2 H) , 4 . 1 (m , 6 H) , 4 . 4 (d d , 1 H) , 5 . 8 (s , 2 H) , 7 . 1 (m , 5 H) , 8 . 0 (s , 1 H) , 8 . 4 (s , 1 H) ; ³¹ P N M R (C D C l ₃) δ 21 (デカップリングした) 。 20

【 0094 】

(実施例 7)

(G S - 7097 のジアステレオマーの分離)

このジアステレオマー混合物を、以下を除いて、G S - 7171 について記載された条件 (実施例 3 A) を使用して精製した： 40

移動相 (最初) : G S - 7120 - アセトニトリル : イソプロピルアルコール (95 : 5)

(最後) : 100 % メチルアルコール

溶出プロフィール : G S - 7115 (ジアステレオマー B)

: G S - 7114 (ジアステレオマー A) 。

【 0095 】

(実施例 8)

(GS-7097の調製のための代替的手順)

GS-7097: フェニルPMPA, エチルL-アラニルアミデート。フェニルPMPA (15.0 g, 41.3 mmol)、L-アラニンエチルエステル塩酸塩 (12.6 g, 83 mmol) およびトリエチルアミン (11.5 mL, 83 mmol) を、乾燥N₂下、500 mLのピリジン中で一緒にスラリーにした。この懸濁液を、トリフェニルホスフィン (37.9 g, 145 mmol)、アルドリチオール2 (Aldrichiol 2) (2, 2'-ジピリジルジスルフィド) (31.8 g, 145 mmol)、および120 mLのピリジンの溶液と合わせた。この混合物を57の内部温度で15時間加熱した。完全な反応物を、減圧下で黄色ペースト (100 g) まで濃縮した。このペーストを、1.1 kgのシリカゲル60 (230~400メッシュ) の25×11 cmのベッド上でのカラムクロマトグラフィーによって精製した。このカラムを、ジクロロメタン中2%メタノール (8リットル)、続いて最終組成13%メタノールまでの26リットルの溶出剤の過程の直線勾配で溶出した。きれいな生成物を含有する画分を濃縮して、12.4 gの粗性 (5) (理論値の65%) を得た。この物質は、¹H NMRによって、約15% (重量) のトリエチルアミン塩酸塩が混入していた。この生成物を350 mLの酢酸エチルに溶解し、20 mLの水で抽出し、有機溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、そして濃縮して11.1 gの純粋なGS-7097を白色固体として得ることによって、この混入物を除去した (収率58%)。この手順をまた、GS-7003aとGS-7003b (フェニルアラニルアミデート) とのジアステレオマー混合物、およびGS-7119とGS-7335 (グリシルアミデート) との混合物を合成するために使用した。これらのジアステレオマーを、実施例3A、6および7に示されるようなバッチ溶出手順を使用して分離した。

【0096】

(実施例9)

(プロドラッグジアステレオマーのインビトロ研究)

MT-2細胞におけるインビトロでの抗HIV-1活性および細胞傷害性、ならびにヒト血漿およびMT-2細胞抽出物 (遊離塩基) におけるGS-7340およびテノフォビルジスオプロキシルフマレート (tenofovir disoproxil fumarate) (TDF) の安定性を、表1に示す。GS-7340は、TDFと比較して10倍増加した抗ウイルス活性を示し、そして血漿安定性において200倍の増加を示す。このより大きな血漿安定性は、経口投与後の、TDFより高いGS-7340の循環レベルを生じると予想される。

【0097】

(表1. インビトロ活性および安定性)

【0098】

【表2】

	HIV-1 活性	細胞傷害性	安定性 T _{1/2} (分)		
	IC ₅₀ μM	CC ₅₀ μM	ヒト血漿	MT-2 細胞抽出物	(P/MT-2)
GS 7340	0.005	> 40	90.0	28.3	3.2
TDF	0.05	70	0.41	70.7	0.006
テノフォビル	5	6000	—	—	—

TDFの細胞内代謝から生じる、GS-7340と比較した相対的細胞内PMPAを推定するために、プロドラッグおよびPMPAの両方を放射標識し、そして等モル濃度でインタクトなヒト全血へとスパイクした。1時間後、血漿、赤血球 (RBC) および末梢血単核細胞 (PBMC) を単離し、そして放射測定検出を用いるHPLCによって分析した。

この結果を、表 2 に示す。

【 0 0 9 9 】

1 時間後、GS - 7 3 4 0 は、T D F および P M P A と比較して、それぞれ 1 0 × および 3 0 × の、P B M C における P M P A の総細胞内濃度を生じる。1 時間後の血漿において、放射能の 8 4 % が、インタクトな GS - 7 3 4 0 に起因するが、一方、1 時間では T D F は検出されない。血漿においてインタクトな T D F が検出されないので、1 時間での T D F と GS - 7 3 4 0 との間の 1 0 × の差は、インビボで予期される最小限の差異である。P B M C における 3 つ全ての化合物についての H P L C クロマトグラムを、図 1 に示す。

【 0 1 0 0 】

(表 2 . ヒト血液における P M P A プロドラッグまたは P M P A の 1 時間のインキュベーション後の、血漿、P B M C および R B C における P M P A 代謝産物)

【 0 1 0 1 】

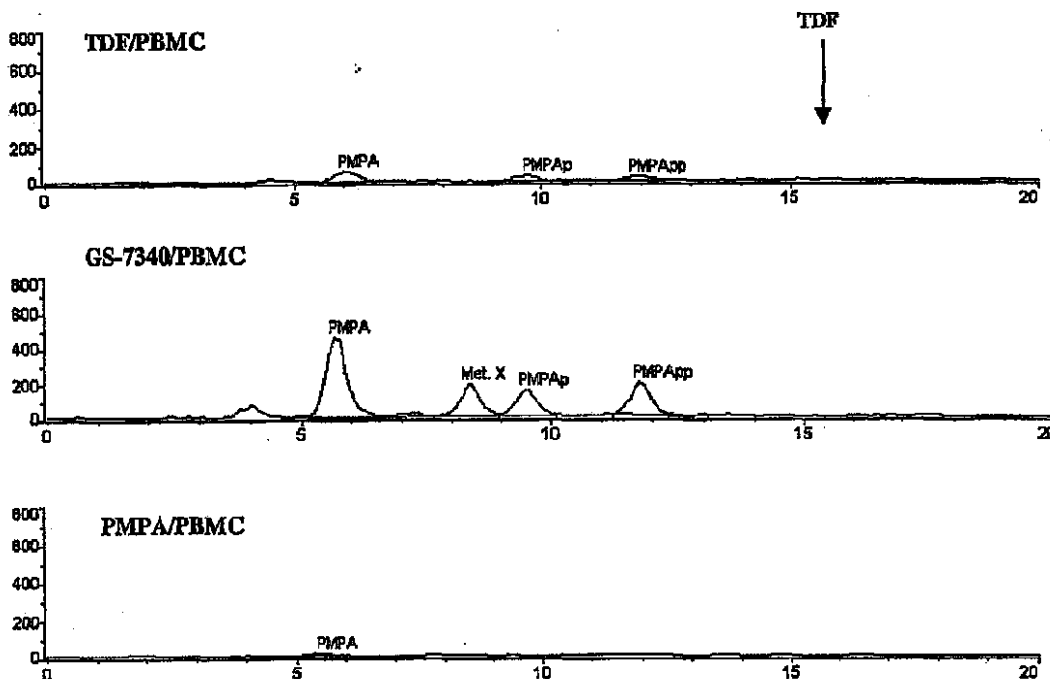
【 表 3 】

化合物	マトリックス	回収した 総C-14 μg-eq	代謝産物 (総ピーク面積の%)					GS 7340, %
			PMPA %	PMPAp, %	PMPApp, %	Met. X, %	Met. Y, %	
GS-7340 (60 μg-eq)	血漿 /FP	43.0	1	-	-	2	13	84
	PBMC	1.25	45	16	21	18	-	-
	RBC/FP	12.6	8	-	-	24	11	57
GS-4331 (TDF) (60 μg-eq)	血漿 /FP	48.1	PMPA 11	PMPAp -	PMPApp -	モノ・POC 89	GS-4331 -	
	PBMC	0.133	50	25	18	7	-	
	RBC/FP	10.5	93	7.0	-	-	-	
PMPA (60 μg-eq)	血漿 /FP	55.7	PMPA 100	PMPAp -	PMPApp -			
	PBMC	0.033	86	14	-			
	RBC/FP	3.72	74	10	16			

(図 1 . 3 7 で T D F、GS - 7 3 4 0 または P M P A と 1 時間インキュベートしたヒト血液からの P B M C 抽出物の、H P L C / C - 1 4 追跡)

【 0 1 0 2 】

【 表 4 】



Met. X および Met. Y (代謝産物 X および Y) を、表 5 に示す。小文字の「p」は、リン酸化を表す。これらの結果を、ヒト血液において 1 時間後に得た。時間の増加に伴

10

20

30

40

50

って、インビトロの差異は増加すると予想される。なぜなら、GS-7340の84%は、1時間後でも血漿中で依然としてインタクトであるためである。インタクトなGS-7340は、経口投与後の血漿中に存在するので、相対的な臨床的有効性は、インビトロで見られる IC_{50} 値に関連するはずである。

【0103】

以下の表3において、テノフォビル、TDF、GS-7340、いくつかのヌクレオシドおよびプロテアーゼインヒビターネルフィニビル(nelfinavir)の IC_{50} を列挙する。示されるように、ネルフィナビル(nelfinavir)およびGS-7340は、他の全てのヌクレオチドまたはヌクレオシドよりも2~3桁強力である。

【0104】

10

(表3. 抗レトロウイルス化合物のインビトロでの抗HIV-1活性)

【0105】

【表5】

化合物	IC_{50} (μM)
アデフォビル (PMEA)	13.4 ± 4.2^1
テノフォビル (PMPA)	6.3 ± 3.3^1
AZT	0.17 ± 0.08^1
3TC	1.8 ± 0.25^1
d4T	8 ± 2.5^1
ネルフィナビル	0.006 ± 0.002^1
TDF	0.05
GS 7340	0.005

20

30

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

【0106】

本発明の分離したジアステレオマーのインビトロでの細胞培養抗HIV-1活性および C_{50} のさらなる研究を行い、そして結果を以下の表にする。

【0107】

(表4. ジアステレオマーの効果)

【0108】

【表6】

化合物	ジアステレオマー	IC ₅₀ (μM)	変化倍率	A/B 活性	CC ₅₀ (μM)
PMPA	-	5	1x	-	6000
Ala-メチルエステル	1:1混合物	0.025	200x	20x	80
GS-6957a	A	0.0075	670x		
GS-6957b		0.15	33x		
Phe-メチルエステル	1:1混合物	0.03	170x	10x	60
GS-7003a	A	0.01	500x		
GS-7003b	B	0.1	50x		
Gly-エチルエステル	1:1混合物	0.5	10x	20x	
GS-7119	A	0.05	100x		>100
GS-7335	B	1.0	5x		
Ala-イソプロピル	1:1混合物	0.01	500x	12x	
GS-7340	A	0.005	1,000x		40
GS-7339	B	0.06	83x		>100
ABA-エチル	1:1混合物	0.008	625x	7.5x	>100
GS-7342	A	0.004	1,250x		
GS-7341	B	0.03	170x		
Ala-エチル	1:1混合物	0.02	250x	10x	60
GS-7114	A	0.005	1,000x		
GS-7115	B	0.05	100x		

10

20

アッセイ参照：Arimilli, MNら, (1997) Synthesis, in vitro biological evaluation and oral bioavailability of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) prodrugs. Antiviral Chemistry and Chemotherapy 8(6):557-564.

30

【0109】

「Phe-メチルエステル」は、メチルフェニルアラニルモノアミデート、テノフォビルのフェニルモノエステルである；「glyメチルエステル」は、メチルグリシルモノアミデート、テノフォビルのフェニルモノエステルである。

【0110】

上記の各場合において、異性体Aは、GS-7340(S)と同じ絶対立体化学を有すると考えられ、そして異性体Bは、GS-7339と同じ絶対立体化学を有すると考えられる。

【0111】

分離されたジアステレオマーのインビトロでの代謝および安定性を、PLCE、MT-2抽出物およびヒト血漿において決定した。以下に列挙した生物学的サンプル(80 μL)を、ネジ蓋付き遠心管に移し、37 で5分間インキュベートした。適切な緩衝液(20 μL)中に0.2 mg/mLの試験化合物を含む溶液を、その生物学的サンプルに添加し、そして混合した。この反応混合物(20 μL)を即座にサンプリングし、そしてHPLC分析のための内部標準として0.015 mg/mLの2-ヒドロキシメチレンナフタレンを含む、60 μLのメタノールと混合した。このサンプルを、0時間のサンプルとして用いた。次いで、特定の時点で、反応混合物(20 μL)をサンプリングし、そして内部標準を含む60 μLのメタノールと混合した。このようにして得られた混合物を、15,000 Gで5分間遠心分離し、そして上清を、以下に記載の条件下でのHPLCで分析した。

40

【0112】

50

評価した生物学的サンプルは、以下のとおりである：

(1) PLCE (PBS (リン酸緩衝化生理食塩水) に 20 倍希釈した、Sigma 製のブタ肝臓カルボキシエステラーゼ (160 u / mg タンパク質、21 mg タンパク質 / mL))。

(2) MT-2 細胞抽出物 (公開された手順 [A. Pompon, I. Lefebvre, J. - L. Imbach, S. Kahn, および D. Farquhar, 「Antiviral Chemistry & Chemotherapy」、5 : 91 - 98 (1994)] に従って (媒体として以下に記載の HEPES 緩衝液を使用することを除く) MT-2 細胞から調製した)。

(3) ヒト血清 (George King Biomedical Systems, Inc. 製のプールした正常ヒト血漿)。

10

【0113】

本研究で使用した緩衝系は、以下のとおりである：

PLCE の研究において、試験化合物を PBS 中に溶解した。PBS (リン酸緩衝化生理食塩水、Sigma) は、0.01 M リン酸、0.0027 M リン酸カリウム、および 0.137 M 塩化ナトリウムを含む。37 にて pH 7.4。

【0114】

MT-2 細胞抽出物の研究において、試験化合物を HEPES 緩衝液に溶解した。HEPES 緩衝液は、0.010 M HEPES、0.05 M 塩化カリウム、0.005 M 塩化マグネシウム、および 0.005 M dl-ジチオトレイトールを含む。37 にて

20

【0115】

ヒト血漿の研究において、試験化合物を TBS 中に溶解した。TBS (トリス緩衝化生理食塩水 (Sigma)) は、0.05 M Tris、0.0027 M 塩化カリウム、および 0.138 M 塩化ナトリウムを含む。37 にて pH 7.5。

【0116】

HPLC 分析を、以下の条件下で行った。

カラム：Zorbax $R_x - C_8$ 、4.6 × 250 mm、5 μ

(MAC-MOD Analytical, Inc. Chadds Ford, PA)

検出：260 nm の UV

30

流速：1.0 mL / 分

実行時間：30 分

注入用量：20 μ L

カラム温度：周囲温度

移動相 A：50 mM リン酸カリウム (pH 6.0) / CH_3CN = 95 / 5 (v / v)

移動相 B：50 mM リン酸カリウム (pH 6.0) / CH_3CN = 50 / 50 (v / v)

勾配泳動：0 分 100% 移動相 A

25 分 100% 移動相 B

40

30 分 100% 移動相 B

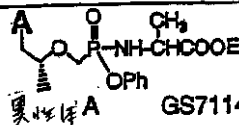
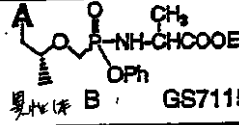
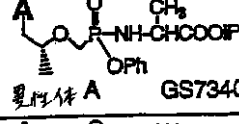
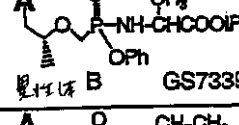
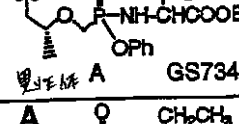
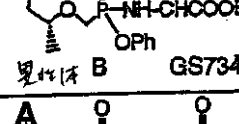
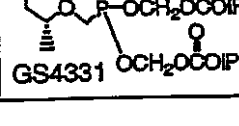
結果を以下の表 5 に示す (これはまた、表 4 からの選択された IC_{50} データを含む)。

【0117】

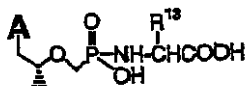
(表 5.37 での PMPA モノアミデートの異性体 A および B のインビトロ代謝)

【0118】

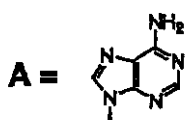
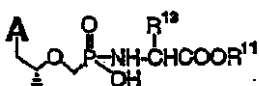
【表 7】

番号	PMMAモノアミド構造	HIV IC ₅₀ (μ M)	PLCE加水分解 速度の比較	MT-2抽出液 加水分解速度の比較	ヒト血漿 安定性 (HP)
1	 異性体 A GS7114	0.005	$t_{1/2} = 2.9$ 分 Met. X $\sim$ PMPA	$t_{1/2} = 2.9$ 分 Met. X $\sim$ PMPA	$t_{1/2} = 148$ 分 Met. Y
2	 異性体 B GS7115	0.05	$t_{1/2} = 8.0$ 分 Met. X $\sim$ PMPA	$t_{1/2} = 150.6$ 分 Met. X $\sim$ PMPA	$t_{1/2} = 495$ 分 Met. Y
3	 異性体 A GS7340	0.005	$t_{1/2} = 3.3$ 分 Met. X $\sim$ PMPA	$t_{1/2} = 28.3$ 分 Met. X $\sim$ PMPA	$t_{1/2} = 90.0$ 分 Met. Y
4	 異性体 B GS7339	0.06	$t_{1/2} = 10.1$ 分 Met. X $\sim$ PMPA	$t_{1/2} > 1000$ 分	$t_{1/2} = 231$ 分 Met. Y
5	 異性体 A GS7342	0.004	$t_{1/2} = 3.9$ 分 Met. X	$t_{1/2} = 49.2$ 分 Met. X $\sim$ PMPA	$t_{1/2} = 103$ 分 Met. Y
6	 異性体 B GS7341	0.03	$t_{1/2} = 11.3$ 分 Met. X	$t_{1/2} > 1000$ 分	$t_{1/2} = 257$ 分 Met. Y
7	 GS4331	0.05	$t_{1/2} < 0.14$ 分 元 / POC PMPA	$t_{1/2} = 70.7$ 分 元 / POC PMPA	$t_{1/2} = 0.41$ 分 元 / POC PMPA

Met. X:



Met. Y:



(実施例 10)

(ビーグル犬へのプロドラッグジアステレオマーの経口投与後の血漿曝露およびPBM C曝露)

GS7340の薬物動態学を、10mg当量/kg用量の経口投与後のイヌにおいて研究した。

【0119】

(処方物)プロドラッグを、投薬前0.5時間以内に、50mMのクエン酸中の溶液として調製した。本研究で使用した全ての化合物は、Gilead Sciencesによって合成された。以下のロットを使用した：

【0120】

【表 8】

10

20

30

40

GSI	アミノ酸	AA エキス	ジスチレオアミン	ロット番号
GS-7340-2	アミン	i-プロピル	異性体 A	1504-187-19
GS-7339	アミン	i-プロピル	異性体 B	1509-185-31
GS7114	アミン	エチル	異性体 A	1509-181-26
GS7115	アミン	エチル	異性体 B	1509-181-22
GS7119	グリシン	エチル	異性体 A	1428-163-28
GS7342	α -アミノ酸	エチル	異性体 A	1509-191-12
GS7341	α -アミノ酸	エチル	異性体 B	1509-191-7

(用量投与およびサンプル収集) 本研究の生物相 (in-life phase) は、「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」(National Institutes of Health 刊行物 86-23) の推奨に従って行い、そしてこれは、Institutional Animal Care and Use Committee によって承認された。絶食させた雄性ビーグル犬 (10 ± 2 kg) を、本研究に使用した。各薬物を、経口栄養法によって単回用量として投与した ($1.5 \sim 2$ ml/kg)。用量は、10 mg 当量 PMPA/kg であった。PBMC について、血液サンプルを、投薬後 0 時間 (投薬前)、2 時間、8 時間および 24 時間で収集した。血漿について、血液サンプルを、投薬後 0 時間 (投薬前)、5 分、15 分および 30 分、ならびに 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、6 時間、8 時間、12 時間および 24 時間で収集した。血液 (1.0 ml) を、2,000 rpm で 10 分間の遠心分離によって血漿用に即座に処理した。血漿サンプルを凍結させ、分析までに -70°C で維持した。

【0121】

(末梢血単核細胞 (PBMC) 調製) 特定の時点で採取した全血 (8 ml) を、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) と等しい割合で混合し、15 ml の Ficoll-Paque 溶液 (Pharmacia Biotech) 上に重層し、そして $400 \times g$ で 40 分間遠心分離した。PBMC 層を取り出し、そして PBS で 1 回洗浄した。形成された PBMC ペレットを、0.5 ml の PBS 中で再構成し、細胞を再懸濁し、血球計数器を使用してカウントし、分析までに -70°C で維持した。平均一細胞容積を乗算した細胞数を、細胞内濃度の計算に使用した。200 フェムトリットル/細胞の報告された値を、休止 PBMC 容積として使用した (B. L. Robins, R. V. Srinivas, C. K. Kim, N. Bischofberger, および A. Fridland, Antimicrob. Agents Chemother. 42, 612 (1998))。

【0122】

(血漿および PBMC 中の PMPA およびプロドラッグの測定) イヌ血漿サンプル中の PMPA の濃度を、PMPA をクロロアセトアルデヒドで誘導体化して高い蛍光性の N^1 , N^6 -エテノアデニン誘導体を生成することによって決定した (L. Naesens, J. Balzarini, および E. De Clercq, Clin. Chem. 38, 480 (1992))。手短には、血漿 (100 μ l) を、200 μ l のアセトニトリルと混合して、タンパク質を沈殿させた。次いで、サンプルを、室温にて減圧下で、乾燥するまでエバポレートした。乾燥されたサンプルを、200 μ l の誘導体化混液 (100 mM 酢酸ナトリウム中の 0.34% クロロアセトアルデヒド (pH 4.5)) 中で再構成し、ボルテックスし、そして遠心分離した。次いで、上清を新しいネジ蓋付きチューブに移し、95 $^\circ\text{C}$ で 40 分間インキュベートした。次いで、誘導体化されたサンプルを、乾燥するまでエバポレートし、HPLC 分析のために 100 μ l の水中で再構成した。

【0123】

細胞内 PMPA を HPLC によって測定し得る前に、PBMC 抽出物中に存在する多量のアデニン関連リボヌクレオチドを、選択的な酸化によって除去しなければならなかった。本発明者らは、Tanaka ら (K. Tanaka, A. Yoshioka, S. Tanaka, および Y. Wataya, Anal. Biochem., 139, 35 (1984)) の改変した手順を使用した。手短には、PBMC サンプルを、メタノールと 1:2

で混合し、そして減圧下で乾燥するまでエバポレートした。乾燥されたサンプルを、血漿アッセイ中に記載のように誘導体化した。誘導体化されたサンプルを、 $20\mu\text{L}$ の 1M ラムノースおよび $30\mu\text{L}$ の 0.1M 過ヨウ素酸ナトリウムと混合し、そして 37°C で5分間インキュベートした。インキュベーション後、 $40\mu\text{L}$ の 4M メチルアミンおよび $20\mu\text{L}$ の 0.5M イノシンを添加した。 37°C で30分間のインキュベーション後、サンプルを、減圧下でエバポレートして乾燥し、そしてHPLC分析のために水で再構成した。

【0124】

インタクトなプロドラッグは、いずれのPBMCサンプル中にも検出されなかった。インタクトなプロドラッグを含む可能性のある血漿サンプルについては、PMPAへのさらなる変換が誘導体化中に生じないことを確かめるために、実験を行った。プロドラッグ標準を、薬物を含まない血漿に添加し、そして記載のように誘導体化した。これらの血漿サンプルのいずれにおいても検出可能なレベルのPMPAは存在せず、変換の推定%は、1%未満であった。

10

【0125】

HPLCシステムは、AS3000自動注入器およびF2000蛍光検出器を備えるP4000溶媒送達系から構成された(Thermo Separation, San Jose, CA)。カラムは、Inertsil ODS-2カラム($4.6\times 150\text{mm}$)であった。使用した移動相は、以下であった：A、 5mM テトラブチルアンモニウムプロミド(TBABr)を含む 25mM のリン酸カリウム緩衝液中の5%アセトニトリル($\text{pH}6.0$)；B、 5mM TBABrを含む 25mM のリン酸カリウム緩衝液中の60%アセトニトリル($\text{pH}6.0$)。流速は、 $2\text{mL}/\text{分}$ であり、そしてカラム温度を、カラムオープンによって 35°C に維持した。勾配プロフィールは、PMPAについては、10分間の90% A / 10% B、そしてプロドラッグについては、10分間の65% A / 35% Bであった。検出は、 236nm での励起および 420nm での発光による、蛍光によるものであり、そして注入容量は、 $10\mu\text{L}$ であった。データを、実験データ獲得系(Peak Pro、Beckman、Allendale、NJ)によって獲得および保存した。

20

【0126】

(薬物動態学計算) PMPAおよびプロドラッグの曝露を、0時間~24時間の血漿またはPBMCにおける濃度曲線下の面積(AUC)として表した。このAUC値は、台形法則を使用して計算した。

30

【0127】

(血漿濃度およびPBMC濃度) 本研究の結果を、図2および図3に示す。図2は、PMPAプロドラッグの純粋なジアステレオアイソマーの経口投与後の、血漿曝露およびPBMC曝露のGS7340-2代謝概要の時間経過を示す。

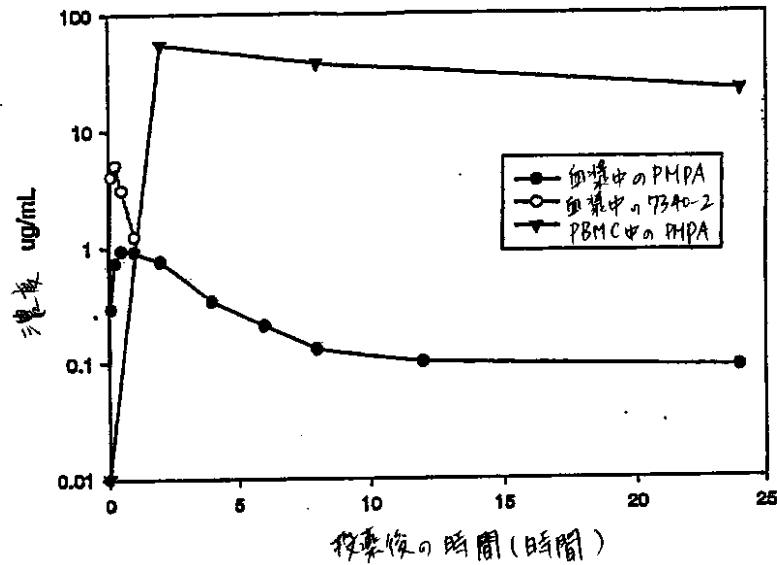
【0128】

(図2. 10mg 当量 / kg でのイヌへのGS7340-2の経口投与後の血漿およびPBMC中のPMPAおよびプロドラッグの濃度)

【0129】

40

【表9】



10

図2の棒グラフは、PMPA s.c.、TDFおよびアミデートエステルプロドラッグの投与後のイヌのPBMC中および血漿中のテノフォビル (tenofovir) についてのAUC (0~24時間)を示す。全てのアミデートプロドラッグは、PBMC曝露における増加を示した。例えば、GS7340は、PMPA s.c.およびTDFと比較して、PBMC曝露における約21倍の増加を生じ；そして血漿曝露における、それぞれ、6.25倍および1.29倍の減少を生じた。

20

【0130】

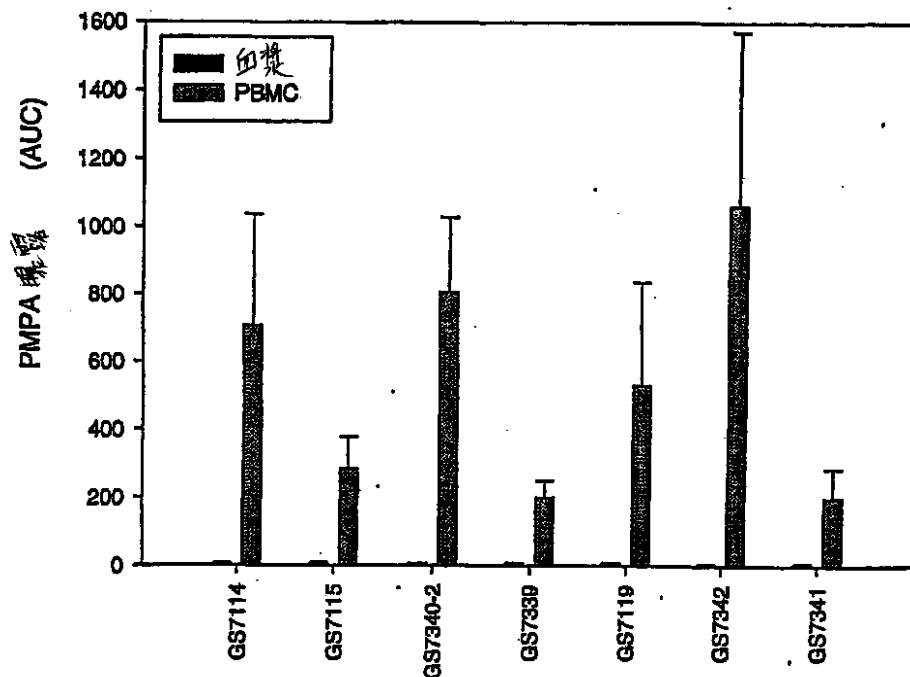
(図3. イヌにおける10mg当量/kgの投与におけるPBMC中および血漿中のテノフォビル曝露を示す)

イヌへの10mg当量/kgのPMPAプロドラッグの経口投薬後のPBMC中および血漿中のPMPAについてのAUC (0~24時間)

【0131】

30

【表10】



40

50

これらのデータは、インビボにて、GS7340が、経口的に送達され得、PMPAへの全身曝露を最小化し、そしてHIV複製を主に担う細胞中のPMPAの細胞内濃度を大いに増強することを説明する。

【0132】

(表6)

(イヌにおけるPMPAの経口プロドラッグからのPBMC中および血漿中のPMPA曝露)

【0133】

【表11】

GS#	成分	血漿におけるPMPA AUC			PBMCにおけるPMPA AUC			血漿中の プロドラッグ	PBMC / 血漿 曝露比
		平均	標準偏差	N	平均	標準偏差	N		
GS-7114	モノ-Ala-Et-A	5.8	0.9	2	708	331	5	あり	122
GS-7115	モノ-Ala-Et-B	6.6	1.5	2	284	94	5	あり	43
GS-7340-2	モノ-Ala-IPr-A	5.0	1.1	5	605	222	5	あり	161
GS-7339	モノ-Ala-IPr-A	6.4	1.3	2	200	57	5	あり	31
GS-7119	モノ-Gly-Et-A	6.11	1.88	2	530	304	5	あり	87
GS-7342	モノ-ABA-Et-A	4.6	1.2	2	1060	511	5	あり	230
GS7341	モノ-ABA-Et-B	5.8	1.4	2	199	86	5	あり	34

10

20

(実施例11)

(GS-7340の体内分布)

GS-7340の臨床前特徴付けの一部として、イヌにおけるその体内分布を測定した。GS-7340(イソプロピルアラニニル(alaniny l)モノアミデート、テノフォビルのフェニルモノエステル)の組織分布を、ビーグル犬への経口投与後に試験した。2匹の雄の動物に、水性溶液(50mMクエン酸、pH2.2)中の¹⁴C=GS-7340(8.85mg当量PMPA/kg、33.2μCi/kg;アデニンの8位の炭素が標識されている)を経口投与した。血漿および末梢血単核細胞(PBMC)を、24時間の期間にわたって得た。尿および糞便を、24時間にわたってケージ収集した。投与後24時間で、動物を屠殺し、そして組織を分析のために取り出した。組織中の総放射活性を、酸化および液体シンチレーションカウンティングによって決定した。

30

【0134】

放射標識したGS7340の単回経口投与後24時間でのPMPAの体内分布を、TDF(GS-4331)を用いた先の研究からのデータと共に、表4に示す。TDFの場合、血漿中のプロドラッグ濃度は、アッセイ検出レベル未満であり、そして血漿中に観察された主要な種は、この親薬物である。リンパ組織、骨髄および骨格筋中のPMPAのレベルは、GS-7340の投与後に10倍増加した。

【0135】

リンパ組織における蓄積は、PBMC分析から観察されたデータと一致する。なぜなら、これらの組織は、主にリンパ球から構成されるからである。同様に、骨髄における蓄積は、おそらく、この組織中のリンパ球の高い割合(70%)に起因する。

40

【0136】

(表7. 10mg当量PMPA/kgでの経口投与後のイヌ(平均、N=2)における放射標識したGS-7340の排出および組織分布)

【0137】

【表12】

組織/部位	GS-4331		GS-7340		GS 7340 対 GS-4331 の組織濃度比
	用量%	濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	用量%	濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
肝臓	12.40	38.30	16.45	52.94	1.4
腎臓	4.58	87.90	3.78	80.21	0.9
脾臓	0.03	0.53	0.34	4.33	8.2
腸管リンパ節	0.00	0.51	0.01	5.42	10.6
脾臓リンパ節	0.00	0.37	0.01	5.54	14.8
腸管リンパ節	0.00	0.28	0.00	4.12	15.0
腸間膜リンパ節	0.00	1.20	0.04	6.88	5.7
甲状腺	0.00	0.30	0.00	4.78	15.8
下垂体	0.00	0.23	0.00	1.80	7.8
唾液腺(右+左)	0.00	0.45	0.03	5.54	12.3
副腎	0.00	1.90	0.00	3.47	1.8
胸腺	0.00	0.63	0.17	8.13	12.8
脾臓	0.00	0.57	0.01	3.51	6.2
前立腺	0.00	0.23	0.00	2.14	9.1
精巣(右+左)	0.02	1.95	0.02	2.01	1.0
骨髄	0.00	0.11	0.01	1.12	10.1
心臓	0.03	0.46	0.15	1.97	4.3
大腸	0.00	0.08	0.00	0.28	3.5
盲腸	0.00	0.20	0.00	2.05	10.2
皮膚	0.00	0.13	0.00	0.95	7.2
脂肪	0.00	0.16	0.00	0.90	5.8
眼(右+左)	0.00	0.06	0.00	0.23	3.7
脳	0.00	<LOD	0.00	<LOD	n.d.
脳脊髄液	0.00	<LOD	0.00	0.00	n.d.
脊髄	0.00	<LOD	0.00	0.04	n.d.
胃	0.11	1.92	0.26	2.68	1.4
十二指腸	1.34	3.01	0.79	4.16	1.4
小腸	0.49	4.96	0.44	8.77	1.8
回腸	0.01	0.50	0.16	4.61	9.2
大腸	1.63	5.97	2.65	47.20	7.9
胆管	0.00	3.58	0.04	25.02	7.0
胆汁	0.00	9.63	0.22	40.48	4.2
糞便	40.96	n.d.	0.19	n.d.	n.a.
総胆管内容物	5.61	n.d.	21.64	n.d.	n.a.
尿	23.72	n.d.	14.73	n.d.	n.a.
血漿(24時間)	0.00	0.20	0.00	0.20	1.0
血漿(0.25時間)	n.a.	3.68	n.a.	3.48	0.9
PBMC*	0.00	n.d.	0.00	63.20	n.d.
全血	0.00	0.85	0.16	0.20	0.2
総収量	81.10		68.96		

* 1.5×10^6 個の総細胞の典型的回収率および 0.2 ピコリットル/細胞平均 PBMC 容積を使用して計算した。n.s. = サンプルなし、n.a. = 適用せず、n.d. = 決定せず。

10

20

30

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08241 A2

(51) International Patent Classification: C07H 21/00

(21) International Application Number: PCT/US01/23104

(22) International Filing Date: 20 July 2001 (20.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/220,021 21 July 2000 (21.07.2000) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application:
US 60/220,021 (CIP)
Filed on 21 July 2000 (21.07.2000)(71) Applicant (for all designated States except US): GILEAD
SCIENCES, INC. [US/US]; 333 Lakeside Drive, Foster
City, CA 94404 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BECKER, Mark,
W. [US/US]; 215 Old County Road #308, Belmont, CA
94002 (US). CHAPMAN, Harlan, H. [US/US]; 60 La-
guna Drive, La Honda, CA 94020 (US). CHILAR, Tomas
[CZ/US]; 727 Caravel Lane, Foster City, CA 94404 (US).
EISENBERG, Eugene, J. [US/US]; 236 Club Drive, San
Carlos, CA 94070 (US). HE, Gong-Xin [CN/US]; 5436
Ontario Common, Fremont, CA 94555 (US). KERNAN,
Michael, R. [US/US]; 6 Sequoia Way, Pacifica, CA 94044
(US). LEE, William, A. [US/US]; 749 Anderson Drive,Los Altos, CA 94024 (US). PRISBE, Ernest, J. [US/US];
1336 Richardson Avenue, Los Altos, CA 94024 (US).
ROHLOFF, John, C. [US/US]; 1654 Cornell Drive,
Mountain View, CA 94040 (US). SPARACINO, Mark,
L. [US/US]; 1450 Seville Drive, Morgan Hill, CA 95037
(US).(74) Agents: HENSLEY, Max, D. et al.; Gilead Sciences, Inc.,
333 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/08241 A2

(54) Title: PRODRUGS OF PHOSPHONATE NUCLEOTIDE ANALOGUES AND METHODS FOR SELECTING AND MAK-
ING SAME(57) Abstract: A novel method is provided for screening prodrugs of methoxyphosphonate nucleotide analogues to identify pro-
drugs selectively targeting desired tissues with antiviral or antitumor activity. This method has led to the identification of novel mixed
ester-amides of PMPA for retroviral or hepadnaviral therapy, including compounds of structure (5a) having substituent groups as
defined herein. Compositions of these novel compounds in pharmaceutically acceptable excipients and their use in therapy and
prophylaxis are provided. Also provided is an improved method for the use of magnesium alkoxide for the preparation of starting
materials and compounds for use herein.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5

10 **Prodrugs of Phosphonate Nucleotide Analogues and
 Methods for Selecting and Making Same**

 This application relates to prodrugs of methoxyphosphonate nucleotide
analogues. In particular it relates to improved methods for making and identifying
15 such prodrugs.

 Many methoxyphosphonate nucleotide analogues are known. In general,
such compounds have the structure $A-OCH_2P(O)(OR)_2$, where A is the residue of a
nucleoside analogue and R independently is hydrogen or various protecting or
prodrug functionalities. See U.S. Patent Nos. 5,663,159, 5,977,061 and 5,798,340,
20 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., ed.),
pp. 121-126; Bundgaard, H. (1985) *Design of Prodrugs* (Bundgaard, H., ed.) pp. 70-
74 and 79-92; Banerjee, P. K. and Amidon, G. L. (1985) *Design of Prodrugs*
25 (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. All literature and patent citations herein are
30 expressly incorporated by reference.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5

Summary of the Invention

Prodrugs of methoxyphosphonate nucleotide analogues intended for antiviral or antitumor therapy, while known, traditionally have been selected for their systemic effect. For example, such prodrugs have been selected for enhanced bioavailability, i.e., ability to be absorbed from the gastrointestinal tract and converted rapidly to parent drug to ensure that the parent drug is available to all tissues. However, applicants now have found that it is possible to select prodrugs that become enriched at therapeutic sites, as illustrated by the studies described herein where the analogues are enriched at localized focal sites of HIV infection. The objective of this invention is, among other advantages, to produce less toxicity to bystander tissues and greater potency of the parental drug in tissues which are the targets of therapy with the parent methoxyphosphonate nucleotide analogue.

Accordingly, pursuant to these observations, a screening method is provided for identifying a methoxyphosphonate nucleotide analogue prodrug conferring enhanced activity in a target tissue comprising:

- (a) providing at least one of said prodrugs;
- (b) selecting at least one therapeutic target tissue and at least one non-target tissue;
- (c) administering the prodrug to the target tissue and to said at least one non-target tissue; and
- (d) determining the relative antiviral activity conferred by the prodrug in the tissues in step (c).

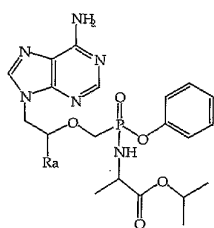
In preferred embodiments, the target tissue are sites where HIV is actively replicated and/or which serve as an HIV reservoir, and the non-target tissue is an intact animal. Unexpectedly, we found that selecting lymphoid tissue as the target tissue for the practice of this method for HIV led to identification of prodrugs that enhance the delivery of active drug to such tissues.

A preferred compound of this invention, which has been identified by this method has the structure (I),

35

WO 02/08241

PCT/US01/23104



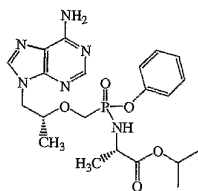
5

(1)

10 where R_a is H or methyl,
and chirally enriched compositions thereof, salts, their free base and solvates
thereof.

A preferred compound of this invention has the structure (2)

15



20

(2)

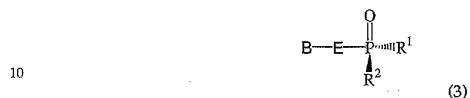
and its enriched diastereomers, salts, free base and solvates.

25 In addition, we unexpectedly found that the chirality of substituents on the
phosphorous atom and/or the amidate substituent are influential in the enrichment
observed in the practice of this invention. Thus, in another embodiment of this

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 invention, we provide diastereomerically enriched compounds of this invention having the structure (3)



15 which are substantially free of the diastereomer (4)



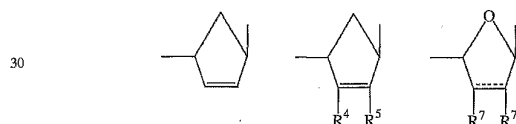
20 wherein

R^1 is an oxyester which is hydrolyzable *in vivo*, or hydroxyl;

B is a heterocyclic base;

R^2 is hydroxyl, or the residue of an amino acid bonded to the P atom through an amino group of the amino acid and having each carboxy substituent of the amino acid optionally esterified, but not both of R^1 and R^2 are hydroxyl;

25 E is $-(CH_2)_2-$, $-CH(CH_3)CH_2-$, $-CH(CH_2F)CH_2-$, $-CH(CH_2OH)CH_2-$, $-CH(CH=CH_2)CH_2-$, $-CH(C=CH)CH_2-$, $-CH(CH_2N_3)CH_2-$,



$-CH(R^6)OCH(R^6)-$, $-CH(R^8)CH_2O-$ or $-CH(R^8)O-$, wherein the right hand bond is

35 linked to the heterocyclic base;

the broken line represents an optional double bond;

R^4 and R^5 are independently hydrogen, hydroxy, halo, amino or a substituent having 1-5 carbon atoms selected from acyloxy, alkoxy, alkylthio, alkylamino and dialkylamino;

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 R^6 and $R^{6'}$ are independently H, C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 hydroxyalkyl, or C_2-C_7 alkanoyl;

R^7 is independently H, C_1-C_6 alkyl, or are taken together to form $-O-$ or $-CH_2-$;

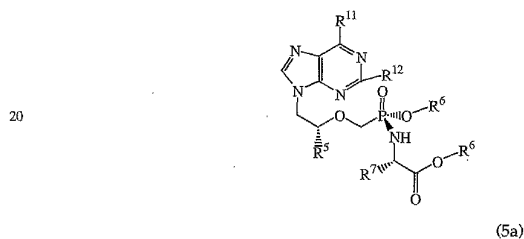
R^8 is H, C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 hydroxyalkyl or C_1-C_6 haloalkyl; and

10 R^9 is H, hydroxymethyl or acyloxymethyl;

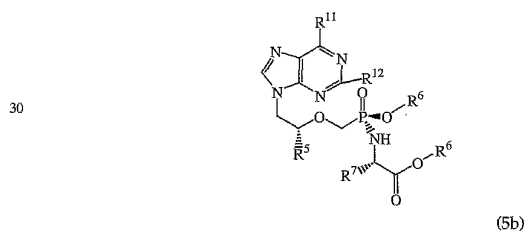
and their salts, free base, and solvates.

The diastereomers of structure (3) are designated the (S) isomers at the phosphorus chiral center.

Preferred embodiments of this invention are the diastereomerically enriched
15 compounds having the structure (5a)



25 which is substantially free of diastereomer (5b)



WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 wherein

 R^5 is methyl or hydrogen; R^6 independently is H, alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl or arylalkyl, or R^6 independently is alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl or arylalkyl which is substituted with
from 1 to 3 substituents selected from alkylamino, alkylaminoalkyl,10 dialkylaminoalkyl, dialkylamino, hydroxyl, oxo, halo, amino, alkylthio, alkoxy,
alkoxyalkyl, aryloxy, aryloxyalkyl, arylalkoxy, arylalkoxyalkyl, haloalkyl, nitro,
nitroalkyl, azido, azidoalkyl, alkylacyl, alkylacylalkyl, carboxyl, or alkylacylamino; R^7 is the side chain of any naturally-occurring or pharmaceutically

acceptable amino acid and which, if the side chain comprises carboxyl, the carboxyl

15 group is optionally esterified with an alkyl or aryl group;

 R^{11} is amino, alkylamino, oxo, or dialkylamino; and R^{12} is amino or H;

and its salts, tautomers, free base and solvates.

20 A preferred embodiment of this invention is the compound of structure (6),

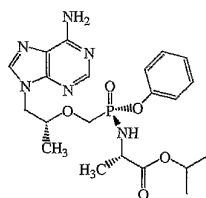
9-[(R)-2-[(S)-[(S)-1-

(isopropoxycarbonyl)ethyl]amino]phenoxyphosphinyl]methoxy]propyl]adenine,

also designated herein GS-7340

25

30



(6)

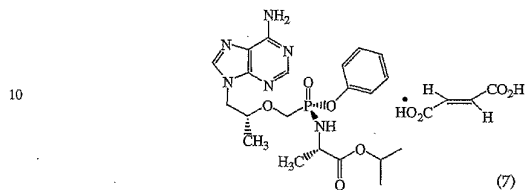
35 Another preferred embodiment of this invention is the fumarate salt of

structure (5) (structure (7)), 9-[(R)-2-[(S)-[(S)-1-

WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 (isopropoxycarbonyl)ethyl]amino]phenoxyphosphinyl]methoxy]propyl]adenine fumarate (1:1), also designated herein GS-7340-2

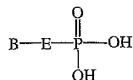


- 15 The compounds of structures (1)-(7) optionally are formulated into compositions containing pharmaceutically acceptable excipients. Such compositions are used in effective doses in the therapy or prophylaxis of viral (particularly HIV or hepadnaviral) infections.

- 20 In a further embodiment, a method is provided for the facile manufacture of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (hereinafter "PMPA" or 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine (hereinafter "PMEA") using magnesium alkoxide, which comprises combining 9-(2-hydroxypropyl)adenine or 9-(2-hydroxyethyl)adenine, protected *p*-toluenesulfonyloxymethylphosphonate and magnesium alkoxide, and recovering PMPA or PMEA, respectively.

25 Detailed Description of the Invention

- The methoxyphosphonate nucleotide analogue parent drugs for use in this screening method are compounds having the structure A-OH₂P(O)(OH)₂ wherein
- 30 A is the residue of a nucleoside analogue. These compounds are known per se and are not part of this invention. More particularly, the parent compounds comprise a heterocyclic base B and an aglycon E, in general having the structure



WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 wherein the group B is defined below and group E is defined above. Examples are described in U.S. Patent Nos. 4,659,825, 4,808,716, 4,724,233, 5,142,051, 5,130,427, 5,650,510, 5,663,159, 5,302,585, 5,476,938, 5,696,263, 5,744,600, 5,688,778, 5,386,030, 5,733,896, 5,352,786, and 5,798,340, and EP 821,690 and 654,037.

The prodrugs for use in the screening method of this invention are
10 covalently modified analogues of the parent methoxyphosphonate nucleotide analogues described in the preceding paragraph. In general, the phosphorus atom of the parent drug is the preferred site for prodrug modification, but other sites are found on the heterocyclic base B or the aglycon E. Many such prodrugs are already known. Primarily, they are esters or amidates of the phosphorus atom, but also
15 include substitutions on the base and aglycon. None of these modifications per se is part of this invention and none are to be considered limiting on the scope of the invention herein.

The phosphorus atom of the methoxyphosphonate nucleotide analogues contains two valences for covalent modification such as amidation or esterification
20 (unless one phosphoryl hydroxyl is esterified to an aglycon E hydroxyl substituent, whereupon only one phosphorus valence is free for substitution). The esters typically are aryloxy. The amidates ordinarily are naturally occurring monoamino acids having free carboxyl group(s) esterified with an alkyl or aryl group, usually phenyl, cycloalkyl, or *t*-, *n*- or *s*- alkyl groups. Suitable prodrugs for use in the
25 screening method of this invention are disclosed for example in U.S. Patent No. 5,798,340. However, any prodrug which is potentially believed to be capable of being converted *in vivo* within target tissue cells to the free methoxyphosphonate nucleotide analogue parent drug, e.g., whether by hydrolysis, oxidation, or other covalent transformation resulting from exposure to biological tissues, is suitable for
30 use in the method of this invention. Such prodrugs may not be known at this time but are identified in the future and thus become suitable candidates available for testing in the method of this invention. Since the prodrugs are simply candidates for screening in the methods their structures are not relevant to practicing or enabling the screening method, although of course their structures ultimately are
35 dispositive of whether or not a prodrug will be shown to be selective in the assay.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 The pro-moieties bound to the parent drug may be the same or different. However, each prodrug to be used in the screening assay will differ structurally from the other prodrugs to be tested. Distinct, i.e. structurally different, prodrugs generally are selected on the basis of either their stereochemistry or their covalent structure, or these features are varied in combination. Each prodrug tested, 10 however, desirably is structurally and stereochemically substantially pure, else the output of the screening assay will be less useful. It is of course within the scope of this invention to test only a single prodrug in an individual embodiment of the method of this invention, although typically then one would compare the results with prior studies with other prodrugs.

15 We have found that the stereochemistry of the prodrugs is capable of influencing the enrichment in target tissues. Chiral sites are at the phosphorus atom and are also found in its substituents. For example, amino acid used in preparing amidates may be D or L forms, and the phosphonate esters or the amino acid esters can contain chiral centers as well. Chiral sites also are found on the 20 nucleoside analogue portion of the molecules, but these typically are already dictated by the stereochemistry of the parent drug and will not be varied as part of the screen. For example the R isomer of PMPA is preferred as it is more active than the corresponding S isomer. Typically these diastereomers or enantiomers will be chirally enriched if not pure at each site so that the results of the screen will be 25 more meaningful. As noted, distinctiveness of stereoisomers is conferred by enriching or purifying the stereoisomer (typically this will be a diastereomer rather than an enantiomer in the case of most methoxyphosphonate nucleotide analogues) free of other stereoisomers at the chiral center in question, so that each test compound is substantially homogeneous. By substantially homogeneous or 30 chirally enriched, we mean that the desired stereoisomer constitutes greater than about 60% by weight of the compound, ordinarily greater than about 80% and preferably greater than about 95%.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5

Novel Screening Method

Once at least one candidate prodrug has been selected, the remaining steps of the screening method of this invention are used to identify a prodrug possessing the required selectivity for the target tissue. Most conveniently the prodrugs are labeled with a detectable group, e.g. radiolabeled, in order to facilitate detection later in tissues or cells. However, a label is not required since other suitable assays for the prodrug or its metabolites (including the parent drug) can also be employed. These assays could include mass spectrometry, HPLC, bioassays or immunoassays for instance. The assay may detect the prodrug and any one or more of its metabolites, but preferably the assay is conducted to detect only the generation of the parent drug. This is based on the assumption (which may not be warranted in all cases) that the degree and rate of conversion of prodrug to antivirally active parent diphosphate is the same across all tissues tested. Otherwise, one can test for the diphosphate.

The target tissue preferably will be lymphoid tissue when screening for prodrugs useful in the treatment of HIV infection. Lymphoid tissue will be known to the artisan and includes CD4 cells, lymphocytes, lymph nodes, macrophages and macrophage-like cells including monocytes such as peripheral blood monocyctic cells (PBMCs) and glial cells. Lymphoid tissue also includes non-lymphoid tissues that are enriched in lymphoid tissues or cells, e.g. lung, skin and spleen. Other targets for other antiviral drugs of course will be the primary sites of replication or latency for the particular virus concerned, e.g., liver for hepatitis and peripheral nerves for HSV. Similarly, target tissues for tumors will in fact be the tumors themselves. These tissues are all well-known to the artisan and would not require undue experimentation to select. When screening for antiviral compounds, target tissue can be infected by the virus.

Non-target tissues or cells also are screened as part of the method herein. Any number or identity of such tissues or cells can be employed in this regard. In general, tissues for which the parent drug is expected to be toxic will be used as non-target tissues. The selection of a non-target tissue is entirely dependent upon

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 the nature of the prodrug and the activity of the parent. For example, non-hepatic tissues would be selected for prodrugs against hepatitis, and untransformed cells of the same tissue as the tumor will suffice for the antitumor-selective prodrug screen.

It should be noted that the method of this invention is distinct from studies typically undertaken to determine oral bioavailability of prodrugs. In oral
10 bioavailability studies, the objective is to identify a prodrug which passes into the systemic circulation substantially converted to parent drug. In the present invention, the objective is to find prodrugs that are not metabolized in the gastrointestinal tract or circulation. Thus, target tissues to be evaluated in the method of this invention generally do not include the small intestines or, if the
15 intestines are included, then the tissues also include additional tissues other than the small intestines.

The target and non-target tissues used in the screening method of this invention typically will be in an intact living animal. Prodrugs containing esters are more desirably tested in dogs, monkeys or other animals than rodents; mice
20 and rat plasma contains high circulating levels of esterases that may produce a misleading result if the desired therapeutic subject is a human or higher mammal.

It is not necessary to practice this method with intact animals. It also is within the scope of this invention to employ perfused organs, *in vitro* culture of organs (e.g. skin grafts) or cell lines maintained in various forms of cell culture, e.g.
25 roller bottles or zero gravity suspension systems. For example, MT-2 cells can be used as a target tissue for selecting HIV prodrugs. Thus, the term "tissue" shall not be construed to require organized cellular structures, or the structures of tissues as they may be found in nature, although such would be preferred. Rather, the term "tissue" shall be construed to be synonymous with cells of a particular source,
30 origin or differentiation stage.

The target and non-target tissue may in fact be the same tissue, but the tissues will be in different biological status. For example, the method herein could be used to select for prodrugs that confer activity in virally-infected tissue (target tissue) but which remain substantially inactive in virally-uninfected cells
35 (corresponding non-target tissue). The same strategy would be employed to select

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 prophylactic prodrugs, i.e., prodrugs metabolized to antivirally active forms
incidental to viral infection but which remain substantially unmetabolized in
uninfected cells. Similarly, prodrugs could be screened in transformed cells and
the untransformed counterpart tissue. This would be particularly useful in
comparative testing to select prodrugs for the treatment of hematological
10 malignancies, e.g. leukemias.

Without being limited by any particular theory of operation, tissue selective
prodrugs are thought to be selectively taken up by target cells and/or selectively
metabolized within the cell, as compared to other tissues or cells. The unique
advantage of the methoxyphosphonate prodrugs herein is that their metabolism to
15 the dianion at physiological pH ensures that they will be unable to diffuse back out
of the cell. They therefore remain effective for lengthy periods of time and are
maintained at elevated intracellular concentrations, thereby exhibiting increased
potency. The mechanisms for enhanced activity in the target tissue are believed to
include enhanced uptake by the target cells, enhanced intracellular retention, or
20 both mechanisms working together. However, the manner in which selectivity or
enhanced delivery occurs in the target tissue is not important. It also is not
important that all of the metabolic conversion of the prodrug to the parent
compound occurs within the target tissue. Only the final drug activity-conferring
conversion need occur in the target tissue; metabolism in other tissues may provide
25 intermediates finally converted to antiviral forms in the target tissue.

The degree of selectivity or enhanced delivery that is desired will vary with
the parent compound and the manner in which it is measured (% dose distribution
or parent drug concentration). In general, if the parent drug already possess a
generous therapeutic window, a low degree of selectivity may be sufficient for the
30 desired prodrug. On the other hand, toxic compounds may require more extensive
screening to identify selective prodrugs. The relative expense of the method of this
invention can be reduced by screening only in the target tissue and tissues against
which the parent compound is known to be relatively toxic, e.g. for PMEA, which
is nephrotoxic at higher doses, the primary focus will be on kidney and lymphoid
35 tissues.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 The step of determining the relative antiviral activity of a prodrug in the selected tissues ordinarily is accomplished by assaying target and non-target tissues for the relative presence or activity of a metabolite of the prodrug, which metabolite is known to have, or is converted to, a metabolite having antiviral or antitumor activity. Thus, typically one would determine the relative amount of the
10 parent drug in the tissues over substantially the same time course in order to identify prodrugs that are preferentially metabolized in the target tissue to an antivirally or antitumor active metabolite or precursor thereof which in the target tissue ultimately produces the active metabolite. In the case of antiviral compounds, the active metabolite is the diphosphate of the phosphonate parent
15 compounds. It is this metabolite that is incorporated into the viral nucleic acid, thereby truncating the elongating nucleic acid strand and halting viral replication. Metabolites of the prodrug can be anabolic metabolites, catabolic metabolites, or the product of anabolism and catabolism together. The manner in which the metabolite is produced is not important in the practice of the method of this
20 invention.

The method of this invention is not limited to assaying a metabolite which per se possesses antiviral or antitumor activity. Instead, one can assay inactive precursors of the active metabolites. Precursors of the antivirally active diphosphate metabolite include the monophosphate of the parent drug,
25 monophosphates of other metabolites of the parent drug (e.g., an intermediate modification of a substituent on the heterocyclic base), the parent itself and metabolites generated by the cell in converting the prodrug to the parent prior to phosphorylation. The precursor structures may vary considerably as they are the result of cellular metabolism. However, this information is already known or could
30 be readily determined by one skilled in the art.

If the prodrug being assayed does not exhibit antitumor or antiviral activity per se then adjustments to the raw assay results may be required. For example, if the intracellular processing of the inactive metabolite to an active metabolite occurs at different rates among the tissues being tested, the raw assay results with the
35 inactive metabolite would need to be adjusted to take account of the differences

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 among the cell types because the relevant parameter is the generation of activity in the target tissue, not accumulation of inactive metabolites. However, determining the proper adjustments would be within the ordinary skill. Thus, when step (d) of the method herein calls for determining the activity, activity can be either measured directly or extrapolated. It does not mean that the method herein is
10 limited to only assaying intermediates that are active per se. For instance, the absence or decline of the prodrug in the test tissues also could be assayed. Step (d) only requires assessment of the activity conferred by the prodrug as it interacts with the tissue concerned, and this may be based on extrapolation or other indirect measurement.

15 Step (d) of the method of this invention calls for determining the "relative" activity of the prodrug. It will be understood that this does not require that each and every assay or series of assays necessarily must also contain runs with the selected non-target tissue. On the contrary, it is within the scope of this invention to employ historical controls of the non-target tissue or tissues, or algorithms
20 representing results to be expected from such non-target tissues, in order to provide the benchmark non-target activity.

The results obtained in step (d) are then used optimally to select or identify a prodrug which produces greater antiviral activity in the target tissue than in the non-target tissue. It is this prodrug that is selected for further development.

25 It will be appreciated that some preassessment of prodrug candidates can be undertaken before the practice of the method of this invention. For example, the prodrug will need to be capable of passing largely unmetabolized through the gastrointestinal tract, it will need to be substantially stable in blood, and it should be able to permeate cells at least to some degree. In most cases it also will need to
30 complete a first pass of the hepatic circulation without substantial metabolism. Such prestudies are optional, and are well-known to those skilled in the art.

The same reasoning as is described above for antiviral activity is applicable to antitumor prodrugs of methoxyphosphonate nucleotide analogues as well. These include, for example, prodrugs of PMEG, the guanyl analogue of PMEA. In

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 this case, cytotoxic phosphonates such as PMEG are worthwhile candidates to pursue as their cytotoxicity in fact confers their antitumor activity.

A compound identified by this novel screening method then can be entered into a traditional preclinical or clinical program to confirm that the desired objectives have been met. Typically, a prodrug is considered to be selective if the
10 activity or concentration of parent drug in the target tissue (% dose distribution) is greater than 2x, and preferably 5x, that of the parent compound in non-target tissue. Alternatively, a prodrug candidate can be compared against a benchmark prodrug. In this case, selectivity is relative rather than absolute. Selective prodrugs will be those resulting in greater than about 10x concentration or activity in the
15 target tissue as compared with the prototype, although the degree of selectivity is a matter of discretion.

Novel Method for Preparation of Starting Materials or Intermediates

Also included herein is an improved method for manufacture of preferred
20 starting materials (parent drugs) of this invention, PMEA and (R)-PMPA. Typically, this method comprises reacting 9-(2-hydroxypropyl)adenine (HPA) or 9-(2-hydroxyethyl)adenine (HEA) with a magnesium alkoxide, thereafter adding the protected aglycon synthon *p*-toluene-sulfonyloxymethylphosphonate (tosylate) to the reaction mixture, and recovering PMPA or PMEA, respectively.

25 Preferably, HPA is the enriched or isolated R enantiomer. If a chiral HPA mixture is used, R-PMPA can be isolated from the chiral PMPA mixture after the synthesis is completed.

Typically the tosylate is protected by lower alkyl groups, but other suitable groups will be apparent to the artisan. It may be convenient to employ the tosylate
30 presubstituted with the prodrug phosphonate substituents which are capable of acting as protecting groups in the tosylation reaction, thereby allowing one to bypass the deprotection step and directly recover prodrug or an intermediate therefore.

The alkyl group of the magnesium alkoxide is not critical and can be any C₁-
35 C₆ branched or normal alkyl, but is preferably *t*-butyl (for PMPA) or isopropyl (for

WO 02/08241

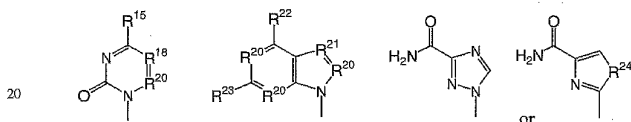
PCT/US01/23104

- 5 PMEA). The reaction conditions also are not critical, but preferably comprise heating the reaction mixture at about 70-75°C with stirring or other moderate agitation.

- If there is no interest in retaining the phosphonate substituents, the product is deprotected (usually with bromotrimethylsilane where the tosylate protecting group is alkyl), and the product then recovered by crystallization or other
 10 conventional method as will be apparent to the artisan.

Heterocyclic Base

- In the compounds of this invention depicted in structures (3) and (4), the
 15 heterocyclic base B is selected from the structures



wherein

- R^{15} is H, OH, F, Cl, Br, I, OR^{16} , SH, SR^{16} , NH_2 , or NHR^{17} ;
 25 R^{16} is C₁-C₆ alkyl or C₂-C₆ alkenyl including CH₃, CH₂CH₃, CH₂CCH₃, CH₂CHCH₂ and C₃H₇;
 R^{17} is C₁-C₆ alkyl or C₂-C₆ alkenyl including CH₃, CH₂CH₃, CH₂CCH₃, CH₂CHCH₂, and C₃H₇;
 R^{18} is N, CF, CCl, CBr, Cl, CR^{19} , CSR^{19} , or COR^{19} ;
 30 R^{19} is H, C₁-C₉ alkyl, C₂-C₉ alkenyl, C₂-C₉ alkynyl, C₁-C₉ alkyl-C₁-C₉ alkoxy, or C₇-C₉ aryl-alkyl unsubstituted or substituted by OH, F, Cl, Br or I, R^{19} therefore including -CH₃, -CH₂CH₃, -CHCH₂, -CHCHBr, -CH₂CH₂Cl, -CH₂CH₂F, -CH₂CCH₃, -CH₂CHCH₂, -C₃H₇, -CH₂OH, -CH₂OCH₃, -CH₂OC₂H₅, -CH₂OCCH₃, -CH₂OCH₂CHCH₂, -CH₂C₃H₇, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂OCH₃,

WO 02/08241

PCT/US01/23104

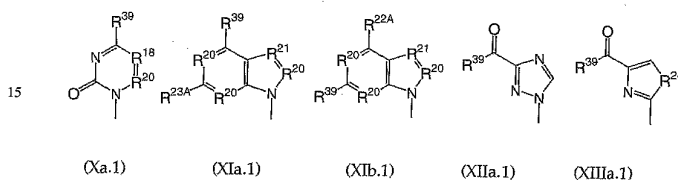
- 5 -CH₂CH₂OC₂H₅, -CH₂CH₂OCCH₃, -CH₂CH₂OCH₂CHCH₂, and
 -CH₂CH₂OC₃H₇;
 R²⁰ is N or CH;
 R²¹ is N, CH, CCN, CCF₃, CC≡CH or CC(O)NH₂;
 R²² is H, OH, NH₂, SH, SCH₃, SCH₂CH₃, SCH₂CCH₃, SCH₂CHCH₂, SC₃H₇,
 10 NH(CH₃), N(CH₃)₂, NH(CH₂CH₃), N(CH₂CH₃)₂, NH(CH₂CCH₃),
 NH(CH₂CHCH₂), NH(C₃H₇), halogen (F, Cl, Br or I) or X wherein X is
 -(CH₂)_m(O)_n(CH₂)_mN(R²⁰)₂ wherein each m is independently 0-2, n is 0-1, and
 R²⁰ independently is
 H,
 15 C₁-C₁₅ alkyl, C₂-C₁₅ alkenyl, C₆-C₁₅ arylalkenyl, C₆-C₁₅
 arylalkynyl, C₂-C₁₅ alkynyl, C₁-C₆-alkylamino-C₁-C₆ alkyl, C₅-C₁₅ aralkyl, C₆-
 C₁₅ heteroaralkyl, C₅-C₆ aryl, C₂-C₆ heterocycloalkyl,
 C₂-C₁₅ alkyl, C₃-C₁₅ alkenyl, C₆-C₁₅ arylalkenyl, C₃-C₁₅ alkynyl,
 C₇-C₁₅ arylalkynyl, C₁-C₆-alkylamino-C₁-C₆ alkyl, C₅-C₁₅ aralkyl, C₆-C₁₅
 20 heteroalkyl or C₃-C₆ heterocycloalkyl wherein methylene in the alkyl moiety not
 adjacent to N⁶ has been replaced by -O-,
 optionally both R²⁰ are joined together with N to form a saturated or
 unsaturated C₂-C₅ heterocycle containing one or two N heteroatoms and
 optionally an additional O or S heteroatom,
 25 or one of the foregoing R²⁰ groups which is substituted with 1 to 3
 halo, CN or N₃; but optionally at least one R²⁰ group is not H;
 R²³ is H, OH, F, Cl, Br, I, SCH₃, SCH₂CH₃, SCH₂CCH₃, SCH₂CHCH₂,
 SC₃H₇, OR¹⁶, NH₂, NHR¹⁷ or R²²; and
 R²⁴ is O, S or Se.
 30 B also includes both protected and unprotected heterocyclic bases,
 particularly purine and pyrimidine bases. Protecting groups for exocyclic amines
 and other labile groups are known (Greene et al. "Protective Groups in Organic
 Synthesis") and include N-benzoyl, isobutyryl, 4,4'-dimethoxytrityl (DMT) and the

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 like. The selection of protecting group will be apparent to the ordinary artisan and will depend upon the nature of the labile group and the chemistry which the protecting group is expected to encounter, e.g. acidic, basic, oxidative, reductive or other conditions. Exemplary protected species are N⁴-benzoylcytosine, N⁶-benzoyladenine, N²-isobutyrylguanine and the like.

10 Protected bases have the formulas Xa.1, XIa.1, XIb.1, XIIa.1 or XIIIa.1



20 wherein R¹⁸, R²⁰, R²¹, R²⁴ have the meanings previously defined; R^{22A} is R³⁹ or R²² provided that R²² is not NH₂; R^{23A} is R³⁹ or R²³ provided that R²³ is not NH₂; R³⁹ is NHR⁴⁰, NHC(O)R³⁶ or CR⁴¹N(R³⁸)₂ wherein R³⁵ is C₁-C₁₉ alkyl, C₁-C₁₉ alkenyl, C₃-C₁₀ aryl, adamantoyl, alkylanyl, or C₃-C₁₀ aryl substituted with 1 or 2 atoms or groups selected from halogen, methyl, ethyl, methoxy, ethoxy, hydroxy and cyano;

25 R³⁸ is C₁-C₁₀ alkyl, or both R³⁸ together are 1-morpholino, 1-piperidine or 1-pyrrolidine; R⁴⁰ is C₁-C₁₈ alkyl, including methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, t-butyl, pentyl, hexyl, octyl and decanyl; and R⁴¹ is hydrogen or CH₃.

For bases of structures XIa.1 and XIb.1, if R³⁹ is present at R^{22A} or R^{23A}, both R³⁹ groups on the same base will generally be the same. Exemplary R³⁶ are phenyl, phenyl substituted with one of the foregoing R³⁶ aryl substituents, -C₁₀H₁₅ (where C₁₀H₁₅ is 2-adamantoyl), -CH₂-C₆H₅, -C₆H₅, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH₃, methyl, butyl, t-butyl, heptanyl, nonanyl, undecanyl, or undecenyl.

Specific bases include hypoxanthine, guanine, adenine, cytosine, inosine, thymine, uracil, xanthine, 8-aza derivatives of 2-aminopurine, 2,6-diaminopurine, 2-amino-6-chloropurine, hypoxanthine, inosine and xanthine; 7-deaza-8-aza

35

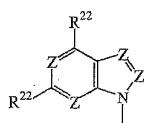
WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 derivatives of adenine, guanine, 2-aminopurine, 2,6-diaminopurine, 2-amino-6-chloropurine, hypoxanthine, inosine and xanthine; 1-deaza derivatives of 2-aminopurine, 2,6-diaminopurine, 2-amino-6-chloropurine, hypoxanthine, inosine and xanthine; 7-deaza derivatives of 2-aminopurine, 2,6-diaminopurine, 2-amino-6-chloropurine, hypoxanthine, inosine and xanthine; 3-deaza derivatives of 2-aminopurine, 2,6-diaminopurine, 2-amino-6-chloropurine, hypoxanthine, inosine and xanthine; 5-fluorocytosine; 5-chlorocytosine; 5-iodocytosine; 5-bromocytosine; 5-methylcytosine; 5-bromovinyluracil; 5-fluorouracil; 5-chlorouracil; 5-iodouracil; 5-bromouracil; 5-trifluoromethyluracil; 5-methoxymethyluracil; 5-ethynyluracil and 5-propynyluracil.

15 Preferably, B is a 9-purinyl residue selected from guanyl, 3-deazaguanyl, 1-deazaguanyl, 8-azaguanyl, 7-deazaguanyl, adenyl, 3-deazaadenyl, 1-deazaadenyl, 8-azaadenyl, 7-deazaadenyl, 2,6-diaminopurinyl, 2-aminopurinyl, 6-chloro-2-aminopurinyl and 6-thio-2-aminopurinyl, or a B' is a 1-pyrimidinyl residue selected from cytosinyl, 5-halocytosinyl, and 5-(C₁-C₃-alkyl)cytosinyl.

20 Preferred B groups have the formula



25 wherein

R²² independently is halo, oxygen, NH₂, X or H, but optionally at least one

R²² is X;

X is $-(CH_2)_m(O)_n(CH_2)_mN(R^{10})_2$ wherein m is 0-2, n is 0-1, and

30 R¹⁰ independently is

H,

C₁-C₁₅ alkyl, C₂-C₁₅ alkenyl, C₆-C₁₅ arylalkenyl, C₆-C₁₅

arylalkynyl, C₂-C₁₅ alkynyl, C₁-C₆-alkylamino-C₁-C₆ alkyl, C₅-C₁₅ aralkyl, C₆-

C₁₅ heteroaralkyl, C₅-C₆ aryl, C₂-C₆ heterocycloalkyl,

WO 02/08241

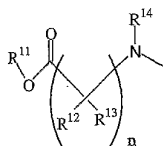
PCT/US01/23104

- 5 C₂-C₁₅ alkyl, C₃-C₁₅ alkenyl, C₆-C₁₅ arylalkenyl, C₃-C₁₅ alkynyl, C₇-C₁₅ arylalkynyl, C₁-C₆-alkylamino-C₁-C₆ alkyl, C₅-C₁₅ aralkyl, C₆-C₁₅ heteroalkyl or C₃-C₆ heterocycloalkyl wherein methylene in the alkyl moiety not adjacent to N⁶ has been replaced by -O-,
- optionally both R¹⁰ are joined together with N to form a saturated or
- 10 unsaturated C₂-C₅ heterocycle containing one or two N heteroatoms and optionally an additional O or S heteroatom,
- or one of the foregoing R¹⁰ groups is substituted with 1 to 3 halo, CN or N₃; but optionally at least one R¹⁰ group is not H; and
- Z is N or CH, provided that the heterocyclic nucleus varies from purine by
- 15 no more than one Z.

E groups represent the aglycons employed in the methoxyphosphonate nucleotide analogues. Preferably, the E group is -CH(CH₃)CH₂- or -CH₂CH₂-. Also, it is preferred that the side groups at chiral centers in the aglycon be substantially solely in the (R) configuration (except for hydroxymethyl, which is the enriched (S) enantiomer).

R¹ is an *in vivo* hydrolyzable oxyester having the structure -OR³⁶ or -OR⁶ wherein R³⁶ is defined in column 64, line 49 of U.S. Patent No. 5,798,340, herein incorporated by reference, and R⁶ is defined above. Preferably R¹ is aryloxy, ordinarily unsubstituted or para-substituted (as defined in R⁶) phenoxy.

25 R² is an amino acid residue, optionally provided that any carboxy group linked by less than about 5 atoms to the amidate N is esterified. R² typically has the structure



(8)

35 wherein

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 n is 1 or 2;

R¹¹ is R⁶ or H; preferably R⁶ = C₃-C₉ alkyl; C₃-C₉ alkyl substituted independently with OH, halogen, O or N; C₃-C₆ aryl; C₃-C₆ aryl which is independently substituted with OH, halogen, O or N; or C₃-C₆ arylalkyl which is independently substituted with OH, halogen, O or N;

10 R¹² independently is H or C₁-C₃ alkyl which is unsubstituted or substituted by substituents independently selected from the group consisting of OH, O, N, COOR¹¹ and halogen; C₃-C₆ aryl which is unsubstituted or substituted by substituents independently selected from the group consisting of OH, O, N, COOR¹¹ and halogen; or C₃-C₆ aryl-alkyl which is unsubstituted or substituted by
15 substituents independently selected from the group consisting of OH, O, N, COOR¹¹ and halogen;

R¹³ independently is C(O)-OR¹¹; amino; amide; guanidiny; imidazolyl; indolyl; sulfoxide; phosphoryl; C₁-C₃ alkylamino; C₁-C₃ alkylidiamino; C₁-C₆ alkenylamino; hydroxy; thiol; C₁-C₃ alkoxy; C₁-C₃ alkthiol; (CH₂)_nCOOR¹¹; C₁-C₆
20 alkyl which is unsubstituted or substituted with OH, halogen, SH, NH₂, phenyl, hydroxyphenyl or C₇-C₁₀ alkoxyphenyl; C₂-C₆ alkenyl which is unsubstituted or substituted with OH, halogen, SH, NH₂, phenyl, hydroxyphenyl or C₇-C₁₀ alkoxyphenyl; and C₆-C₁₂ aryl which is unsubstituted or substituted with OH, halogen, SH, NH₂, phenyl, hydroxyphenyl or C₇-C₁₀ alkoxyphenyl; and

25 R¹⁴ is H or C₁-C₃ alkyl or C₁-C₃ alkyl independently substituted with OH, halogen, COOR¹¹, O or N; C₃-C₆ aryl; C₃-C₆ aryl which is independently substituted with OH, halogen, COOR¹¹, O or N; or C₃-C₆ arylalkyl which is independently substituted with OH, halogen, COOR¹¹, O or N.

Preferably, R¹¹ is C₁-C₆ alkyl, most preferably isopropyl, R¹³ is the side chain
30 of a naturally occurring amino acid, n = 1, R¹² is H and R¹⁴ is H. In the compound of structure (2), the invention includes metabolites in which the phenoxy and isopropyl esters have been hydrolyzed to -OH. Similarly, the de-esterified enriched phosphonoamidate metabolites of compounds (5a), 5(b) and (6) are included within the scope of this invention.

35 Aryl and "O" or "N" substitution are defined in column 16, lines 42-58, of

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 United States Patent No. 5,798,340.

Typically, the amino acids are in the natural or L amino acids. Suitable specific examples are set forth in U. S. Patent No. 5,798,340, for instance Table 4 and col. 8-10 therein.

Alkyl as used herein, unless stated to the contrary, is a normal, secondary,
 10 tertiary or cyclic hydrocarbon. Unless stated to the contrary alkyl is C₁-C₁₂.
 Examples are -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH₂CH₂CH₃,
 -CH₂CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)CH₂CH₃, -C(CH₃)₃, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃,
 -CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₂CH₃)₂, -C(CH₃)₂CH₂CH₃,
 -CH(CH₃)CH(CH₃)₂, -CH₂CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃,
 15 -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃,
 -CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃), -C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃,
 -CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂,
 -C(CH₃)(CH₂CH₃)₂, -CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₂CH(CH₃)₂, and
 -CH(CH₃)C(CH₃)₃. Alkenyl and alkynyl are defined in the same fashion, but
 20 contain at least one double or triple bond, respectively.

Where enol or keto groups are disclosed, the corresponding tautomers are to be construed as taught as well.

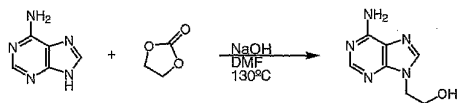
The prodrug compounds of this invention are provided in the form of free base or the various salts enumerated in U. S. Patent No. 5,798,340, and are
 25 formulated with pharmaceutically acceptable excipients or solvating diluents for use as pharmaceutical products also as set forth in U. S. Patent No. 5,798,340. These prodrugs have the antiviral and utilities already established for the parent drugs (see U. S. Patent 5,798,340 and other citations relating to the methoxyphosphonate nucleotide analogues). It will be understood that the diastereomer of structure (4)
 30 at least is useful as an intermediate in the chemical production of the parent drug by hydrolysis *in vitro*, regardless of its relatively unselective character as revealed in the studies herein.

The invention will be more fully understood by reference to the following examples:

WO 02/08241

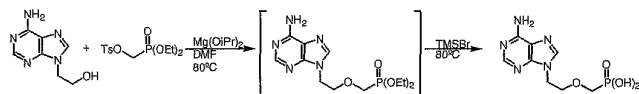
PCT/US01/23104

5

Example 1a

Adenine to PMEA using Magnesium Isopropoxide. To a suspension of adenine (16.8g, 0.124 mol) in DMF (41.9 ml) was added ethylene carbonate (12.1g, 0.137 mol) and sodium hydroxide (.100g, 0.0025 mol). The mixture was heated at 130°C overnight. The reaction was cooled to below 50°C and toluene (62.1 ml) was added. The slurry was further cooled to 5°C for 2 hours, filtered, and rinsed with toluene (2x). The wet solid was dried *in vacuo* at 65°C to yield 20.0g (90%) of 9-(2-hydroxyethyl)adenine as an off-white solid. Mp: 238-240°C.

15

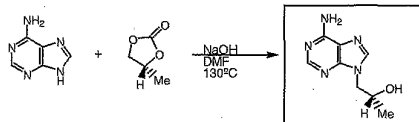


9-(2-Hydroxyethyl)adenine (HEA) (20.0g, 0.112 mol) was suspended in DMF (125 ml) and heated to 80°C. Magnesium isopropoxide (11.2g, 0.0784 mol), or alternatively magnesium t-butoxide, was added to the mixture followed by diethyl *p*-toluenesulfonyloxymethylphosphonate (66.0g, 0.162 mol) over one hour. The mixture was stirred at 80°C for 7 hours. 30 ml of volatiles were removed via vacuum distillation and the reaction was recharged with 30 ml of fresh DMF. After cooling to room temperature, bromotrimethylsilane (69.6g, 0.450 mol) was added and the mixture heated to 80°C for 6 hours. The reaction was concentrated to yield a thick gum. The gum was dissolved into 360 ml water, extracted with 120 ml dichloromethane, adjusted to pH 3.2 with sodium hydroxide, and the resulting slurry stirred at room temperature overnight. The slurry was cooled to 4°C for one hour. The solids were isolated by filtration, washed with water (2x), and dried *in*

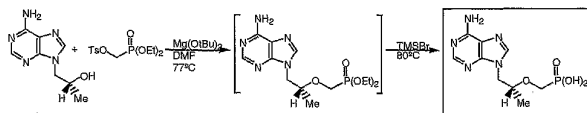
WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 *vacuo* at 56°C to yield 20g (65.4%) of 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine (PMEA) as a white solid. Mp: > 200°C dec. ¹H NMR (D₂O) • 3.49 (t, 2H); 3.94 (t, 2H); 4.39 (t, 2H); 8.13 (s, 1H); 8.22 (s, 1H).

Example 1b

- 10 **Adenine to PMPA using Magnesium t-Butoxide.** To a suspension of adenine (40g, 0.296 mol) in DMF (41.9 ml) was added (R)-propylene carbonate (34.5g, 0.338 mol) and sodium hydroxide (480g, 0.012 mol). The mixture was heated at 130°C overnight. The reaction was cooled to 100°C and toluene (138 ml) was added
- 15 followed by methanesulfonic acid (4.7g, 0.049 mol) while maintaining the reaction temperature between 100-110°C. Additional toluene (114 ml) was added to create a homogeneous solution. The solution was cooled to 3°C over 7 hours and then held at 3°C for one hour. The resulting solid was isolated by filtration and rinsed with acetone (2x). The wet solid was dried *in vacuo* at 80°C to yield 42.6g (75%) of (R)-9-
- 20 [2-(hydroxy)propyl]adenine (HPA) as an off-white solid. Mp: 188-190°C.



- (R)-9-[2-(hydroxy)propyl]adenine (HPA) (20.0g, 0.104 mol) was suspended in DMF (44.5 ml) and heated to 65°C. Magnesium t-butoxide (14.2g, 0.083 mol), or
- 25 alternatively magnesium isopropoxide, was added to the mixture over one hour followed by diethyl *p*-toluenesulfonyloxymethylphosphonate (66.0g, 0.205 mol)

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 over two hours while the temperature was kept at 78°C. The mixture was stirred at 75°C for 4 hours. After cooling to below 50°C, bromotrimethylsilane (73.9g, 0.478 mol) was added and the mixture heated to 77°C for 3 hours. When complete, the reaction was heated to 80°C and volatiles were removed via atmospheric distillation. The residue was dissolved into water (120 ml) at 50°C and then
10 extracted with ethyl acetate (101 ml). The pH of the aqueous phase was adjusted to pH 1.1 with sodium hydroxide, seeded with authentic (*R*)-PMPA, and the pH of the aqueous layer was readjusted to pH 2.1 with sodium hydroxide. The resulting slurry was stirred at room temperature overnight. The slurry was cooled to 4°C for three hours. The solid was isolated by filtration, washed with water (60 ml), and
15 dried *in vacuo* at 50°C to yield 18.9g (63.5%) of crude(*R*)-9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) as an off-white solid.

The crude(*R*)-9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine was heated at reflux in water (255 ml) until all solids dissolved. The solution was cooled to room
20 temperature over 4 hours. The resulting slurry was cooled at 4°C for three hours. The solid was isolated by filtration, washed with water (56 ml) and acetone (56 ml), and dried *in vacuo* at 50°C to yield 15.0g (50.4%) of (*R*)-9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) as a white solid. Mp: 278-280°C.

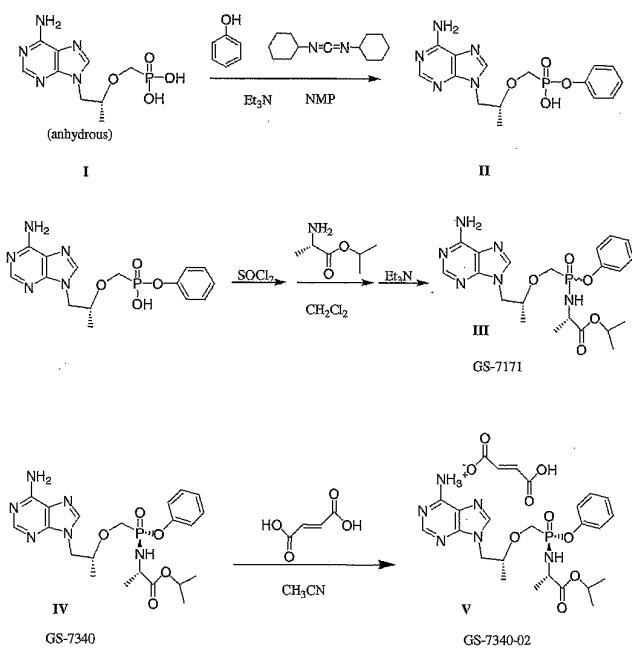
25

WO 02/08241

PCT/US01/23104

Example 2
Preparation of GS-7171 (III)

Scheme 1



WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 A glass-lined reactor was charged with anhydrous PMPA, (I) (14.6 kg, 50.8 mol), phenol (9.6 kg, 102 mol), and 1-methyl-2-pyrrolidinone (39 kg). The mixture was heated to 85°C and triethylamine (6.3 kg, 62.3 mol) added. A solution of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (17.1 kg, 82.9 mol) in 1-methyl-2-pyrrolidinone (1.6 kg) was then added over 6 hours at 100°C. Heating was continued for 16 hours. The
- 10 reaction was cooled to 45°C, water (29 kg) added, and cooled to 25°C. Solids were removed from the reaction by filtration and rinsed with water (15.3 kg). The combined filtrate and rinse was concentrated to a tan slurry under reduced pressure, water (24.6 kg) added, and adjusted to pH = 11 with NaOH (25% in water). Fines were removed by filtration through diatomaceous earth (2 kg)
- 15 followed by a water (4.4 kg) rinse. The combined filtrate and rinse was extracted with ethyl acetate (28 kg). The aqueous solution was adjusted to pH = 3.1 with HCl (37% in water) (4 kg). Crude II was isolated by filtration and washed with methanol (12.7 kg). The crude II wet cake was slurried in methanol (58 kg). Solids were isolated by filtration, washed with methanol (8.5 kg), and dried under
- 20 reduced pressure to yield 9.33 kg II as a white powder: ¹H NMR (D₂O) δ 1.2 (d, 3H), 3.45 (q, 2H), 3.7 (q, 2H), 4 (m, 2H), 4.2 (q, 2H), 4.35 (dd, 2H), 6.6 (d, 2H), 7 (t, 1H), 7.15 (t, 2H), 8.15 (s, 1H), 8.2 (s, 1H); ³¹P NMR (D₂O) δ 15.0 (decoupled).

- GS-7171 (III). (Scheme 1) A glass-lined reactor was charged with monophenyl
- 25 PMPA, (II), (9.12 kg, 25.1 mol) and acetonitrile (30.7 kg). Thionyl chloride (6.57 kg, 56.7 mol) was added below 50°C. The mixture was heated at 75°C until solids dissolved. Reaction temperature was increased to 80°C and volatiles (11.4 kg) collected by atmospheric distillation under nitrogen. The pot residue was cooled to 25°C, dichloromethane (41 kg) added, and cooled to -29°C. A solution of (L)-
- 30 alanine isopropyl ester (7.1 kg, 54.4 mol) in dichloromethane (36 kg) was added over 60 minutes at -18°C followed by triethylamine (7.66 kg, 75.7 mol) over 30 minutes at -18 to -11°C. The reaction mixture was warmed to room temperature and washed five times with sodium dihydrogenphosphate solution (10% in water, 15.7 kg each wash). The organic solution was dried with anhydrous sodium sulfate
- 35 (18.2 kg), filtered, rinsed with dichloromethane (28 kg), and concentrated to an oil

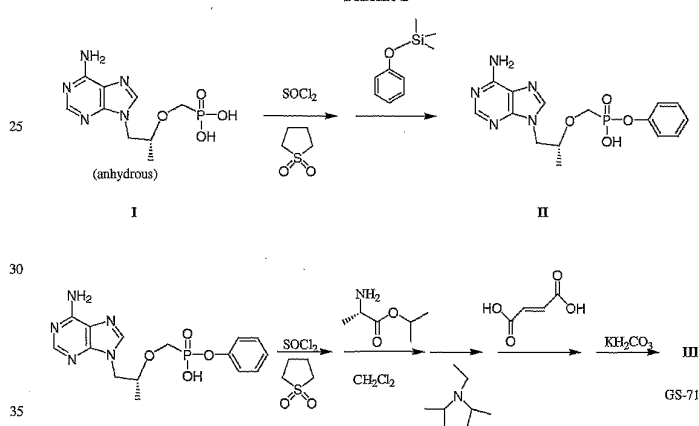
WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 under reduced pressure. Acetone (20 kg) was charged to the oil and the mixture concentrated under reduced pressure. Acetone (18.8 kg) was charged to the resulting oil. Half the product solution was purified by chromatography over a 38 x 38 cm bed of 22 kg silica gel 60, 230 to 400 mesh. The column was eluted with 480 kg acetone. The purification was repeated on the second half of the oil using fresh
 10 silica gel and acetone. Clean product bearing fractions were concentrated under reduced pressure to an oil. Acetonitrile (19.6 kg) was charged to the oil and the mixture concentrated under reduced pressure. Acetonitrile (66.4 kg) was charged and the solution chilled to 0 to -5°C for 16 hours. Solids were removed by filtration and the filtrate concentrated under reduced pressure to 5.6 kg III as a dark oil: ¹H
 15 NMR (CDCl₃) δ 1.1 (m, 12H), 3.7 (m, 1H), 4.0 (m, 5H), 4.2 (m, 1H), 5.0 (m, 1H), 6.2 (s, 2H), 7.05 (m, 5H), 8.0 (s, 1H), 8.25 (d, 1H); ³¹P NMR (CDCl₃) δ 21.0, 22.5 (decoupled).

Alternate Method for GS-7171(III)

Scheme 2



WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 **Monophenyl PMPA (II).** A round-bottom flask with reflux condenser and nitrogen inlet was placed in a 70°C oil bath. The flask was charged with anhydrous PMPA (I) (19.2 g, 67 mmol), *N,N*-dimethylformamide (0.29 g, 3.3 mmol), and tetramethylene sulfone (40 mL). Thionyl chloride (14.2 g, 119 mmol) was added over 4 hours. Heating was increased to 100°C over the same time. A homogeneous
10 solution resulted. Phenoxytrimethylsilane (11.7 g, 70 mmol) was added to the solution over 5 minutes. Heating in the 100°C oil bath continued for two hours more. The reaction was poured into rapidly stirring acetone (400 mL) with cooling at 0°C. Solids were isolated by filtration, dried under reduced pressure, and dissolved in methanol (75 mL). The solution pH was adjusted to 3.0 with
15 potassium hydroxide solution (45% aq.) with cooling in ice/water. The resulting solids were isolated by filtration, rinsed with methanol, and dried under reduced pressure to 20.4 g II (Scheme 2) as a white powder.

GS-7171 (III). Monophenyl PMPA (II) (3 g, 8.3 mmol), tetramethylene sulfone (5 mL), and *N,N*-dimethylformamide (1 drop) were combined in a round bottom flask
20 in a 40°C oil bath. Thionyl chloride (1.96 g, 16.5 mmol) was added. After 20 minutes the clear solution was removed from heat, diluted with dichloromethane (10 mL), and added to a solution of (L)-alanine isopropyl ester (5g, 33 mmol) and diisopropylethylamine (5.33 g, 41 mmol) in dichloromethane (20 mL) at -10°C. The
25 reaction mixture was warmed to room temperature and washed three times with sodium dihydrogenphosphate solution (10% aq., 10 mL each wash). The organic solution was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure to a oil. The oil was combined with fumaric acid (0.77g, 6.6 mmol) and acetonitrile (40 mL) and heated to reflux to give a homogeneous
30 solution. The solution was cooled in an ice bath and solids isolated by filtration. The solid GS-7171 fumarate salt was dried under reduced pressure to 3.7 g. The salt (3.16 g, 5.3 mmol) was suspended in dichloromethane (30 mL) and stirred with potassium carbonate solution (5 mL, 2.5 M in water) until the solid dissolved. The organic layer was isolated, then washed with water (5 mL), dried over anhydrous

WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 sodium sulfate, and concentrated under reduced pressure to afford 2.4 g III as a tan foam.

Example 3

A. Diastereomer Separation by Batch Elution Chromatography

10

The diastereomers of GS-7171 (III) were resolved by batch elution chromatography using a commercially available Chiralpak AS, 20 μ m, 21 x 250 mm semi-preparative HPLC column with a Chiralpak AS, 20 μ m, 21 x 50 mm guard column. Chiralpak® AS is a proprietary packing material manufactured by Diacel and sold in North America by Chiral Technologies, Inc. (U. S. Patent Nos. 5,202,433, 15 RE 35,919, 5,434,298, 5,434,299 and 5,498,752). Chiralpak AS is a chiral stationary phase (CSP) comprised of amylosetris[(S)- α -methylbenzyl carbamate] coated onto a silica gel support.

The GS-7171 diastereomeric mixture was dissolved in mobile phase, and 20 approximately 1 g aliquots of GS-7171 were pumped onto the chromatographic system. The undesired diastereomer, designated GS-7339, was the first major broad (approx. 15 min. duration) peak to elute from the column. When the GS-7339 peak had finished eluting, the mobile phase was immediately switched to 100% methyl alcohol, which caused the desired diastereomer, designated GS-7340 (IV), 25 to elute as a sharp peak from the column with the methyl alcohol solvent front. The methyl alcohol was used to reduce the over-all cycle time. After the first couple of injections, both diastereomers were collected as a single large fractions containing one of the purified diastereomers (>99.0% single diastereomer). The mobile phase solvents were removed *in vacuo* to yield the purified diastereomer as a friable foam.

30 About 95% of the starting GS-7171 mass was recovered in the two diastereomer fractions. The GS-7340 fraction comprised about 50% of the total recovered mass.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 The chromatographic conditions were as follows:

Mobile Phase(Initial) : GS-7171 – Acetonitrile : Isopropyl Alcohol (90:10)
(Final) : 100% Methyl Alcohol
10 Flow : 10 mL/minute
Run Time : About 45 minute
Detection : UV at 275 nm
Temperature : Ambient
Elution Profile : GS-7339 (diastereomer B)
15 : GS-7340 (diastereomer A; (IV))

15 B. Diastereomer Separation of GS-7171 by SMB Chromatography

For a general description of simulated moving bed (SMB) chromatography, see Strube et al., "Organic Process Research and Development" 2:305-319 (1998).

20 GS-7340 (IV). GS-7171 (III), 2.8 kg, was purified by simulated moving bed chromatography over 10 cm by 5 cm beds of packing (Chiral Technologies Inc., 20 micron Chiralpak AS coated on silica gel) (1.2 kg). The columns were eluted with 30% methanol in acetonitrile. Product bearing fractions were concentrated to a
25 solution of IV in acetonitrile (2.48 kg). The solution solidified to a crystalline mass wet with acetonitrile on standing. The crystalline mass was dried under reduced pressure to a tan crystalline powder, 1.301 kg IV, 98.7% diastereomeric purity: mp 117 – 120°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.15 (m, 12H), 3.7 (t, 1H), 4.0 (m, 5H), 4.2 (dd, 1H), 5.0 (m, 1H), 6.05 (s, 2H), 7.1 (m, 5H), 8.0 (s, 1H), 8.2 (s, 1H); ³¹P NMR (CDCl₃) δ 21.0
30 (decoupled).

C. Diastereomer Separation by C18 RP-HPLC

GS-7171 (III) was chromatographed by reverse phase HPLC to separate the diastereomers using the following summary protocol.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 Chromatographic column: Phenomenex Luna™ C18(2), 5 μ m, 100 Å pore size, (Phenomenex, Torrance, CA), or equivalent
 Guard column: Pellicular C18 (Alltech, Deerfield, IL), or equivalent
 10 Mobile Phase: A — 0.02% (85%) H₃PO₄ in water : acetonitrile (95:5)
 B — 0.02% (85%) H₃PO₄ in water : acetonitrile (50:50)

- 15 Mobile Phase Gradient:

Time	% Mobile Phase A	% Mobile Phase B
0	100	0
5	100	0
7	70	30
32	70	30
40	0	100
50	0	100

- Run Time: 50 minutes
 Equilibration Delay: 10 min at 100% mobile phase A
 20 Flow Rate: 1.2 mL/min
 Temperature: Ambient
 Detection: UV at 260 nm
 Sample Solution: 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6
 25 Retention Times: GS-7339, about 25 minutes
 GS-7340, about 27 minutes

D. Diastereomer Separation by Crystallization

- 30 GS-7340 (IV). A solution of GS-7171 (III) in acetonitrile was concentrated to an amber foam (14.9g) under reduced pressure. The foam was dissolved in acetonitrile (20 mL) and seeded with a crystal of IV. The mixture was stirred overnight, cooled to 5°C, and solids isolated by filtration. The solids were dried to 2.3 g IV as white crystals, 98% diastereomeric purity (³¹P NMR): ¹H NMR (CDCl₃) δ
 35 1.15 (m, 12H), 3.7 (t, 1H), 3.95 (m, 2H), 4.05 (m, 2H), 4.2 (m, 2H), 5.0 (m, 1H), 6.4 (s, 2H), 7.1 (m, 5H), 8.0 (s, 1H), 8.2 (s, 1H); ³¹P NMR (CDCl₃) δ 19.5 (decoupled). X-ray crystal analysis of a single crystal selected from this product yielded the following data:

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5	Crystal Color, Habit	colorless, column
	Crystal Dimensions	0.25 X 0.12 X 0.08 mm
	Crystal System	orthorhombic
	Lattice Type	Primitive
10	Lattice Parameters	a = 8.352(1) Å b = 15.574(2) Å c = 18.253(2) Å V = 2374.2(5) Å ³
15	Space Group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (#19)
	Z value	4
	D _{calc}	1.333 g/cm ³
	F ₀₀₀	1008.00
	μ(MoKα)	1.60 cm ⁻¹

20

Example 4

Preparation of Fumarate Salt of GS-7340

GS-7340-02 (V). (Scheme 1) A glass-lined reactor was charged with GS-7340 (IV),
 25 (1.294 kg, 2.71 mol), fumaric acid (284 g, 2.44 mol), and acetonitrile (24.6 kg). The
 mixture was heated to reflux to dissolve the solids, filtered while hot and cooled to
 5°C for 16 hours. The product was isolated by filtration, rinsed with acetonitrile
 (9.2 kg), and dried to 1329 g (V) as a white powder: mp 119.7 - 121.1°C; [α]_D²⁰ -41.7°
 (c 1.0, acetic acid).

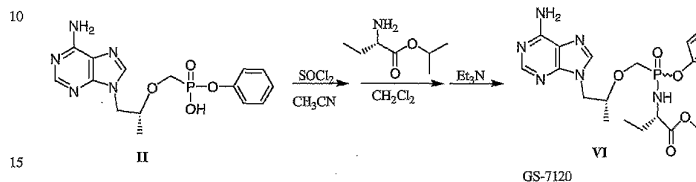
WO 02/08241

PCT/US01/23104

5

Example 5
Preparation of GS-7120 (VI)

Scheme 3



A 5 L round bottom flask was charged with monophenyl PMPA, (II), (200 g, 0.55 mol) and acetonitrile (0.629 kg). Thionyl chloride (0.144 kg, 1.21 mol) was added below 27°C. The mixture was heated at 70°C until solids dissolved. Volatiles (0.45 L) were removed by atmospheric distillation under nitrogen. The pot residue was cooled to 25°C, dichloromethane (1.6 kg) was added and the mixture was cooled to -20°C. A solution of (L)-α-aminobutyric acid ethyl ester (0.144 kg, 1.1 mol) in dichloromethane (1.33 kg) was added over 18 minutes at -20 to -10°C followed by triethylamine (0.17 kg, 1.65 mol) over 15 minutes at -8 to -15°C. The reaction mixture was warmed to room temperature and washed four times with sodium dihydrogenphosphate solution (10% aq., 0.3 L each wash). The organic solution was dried with anhydrous sodium sulfate (0.5 kg) and filtered. The solids were rinsed with dichloromethane (0.6 kg) and the combined filtrate and rinse was concentrated to an oil under reduced pressure. The oil was purified by chromatography over a 15 x 13 cm bed of 1.2 kg silica gel 60, 230 to 400 mesh. The column was eluted with a gradient of dichloromethane and methanol. Product bearing fractions were concentrated under reduced pressure to afford 211 g VI (Scheme 3) as a tan foam.

20

25

30

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5

Example 5a

Diastereomer Separation of GS-7120 by Batch Elution Chromatography

The diastereomeric mixture was purified using the conditions described for GS-7171 in Example 3A except for the following:

10

Mobile Phase (Initial) : GS-7120 – Acetonitrile : Isopropyl Alcohol (98:2)
(Final) : 100% Methyl Alcohol
Elution Profile : GS-7341 (diastereomer B)
: GS-7342 (diastereomer A)

15

Example 6

Diastereomer Separation of GS-7120 by Crystallization

20

A 1 L round bottom flask was charged with monophenyl PMPA, (II), (50 g, 0.137 mol) and acetonitrile (0.2 L). Thionyl chloride (0.036 kg, 0.303 mol) was added with a 10°C exotherm. The mixture was heated to reflux until solids dissolved. Volatiles (0.1 L) were removed by atmospheric distillation under nitrogen. The pot residue was cooled to 25°C, dichloromethane (0.2 kg) was added, and the mixture was cooled to -20°C. A solution of (L)- α aminobutyric acid ethyl ester (0.036 kg, 0.275 mol) in dichloromethane (0.67 kg) was added over 30 minutes at -20 to -8°C followed by triethylamine (0.042 kg, 0.41 mol) over 10 minutes at up to -6°C. The reaction mixture was warmed to room temperature and washed four times with sodium dihydrogenphosphate solution (10% aq., 0.075 L each wash). The organic solution was dried with anhydrous sodium sulfate (0.1 kg) and filtered. The solids were rinsed with ethyl acetate (0.25 L, and the combined filtrate and rinse was concentrated to an oil under reduced pressure. The oil was diluted with ethyl acetate (0.25 L), seeded, stirred overnight, and chilled to -15°C. The solids were isolated by filtration and dried under reduced pressure to afford 17.7 g of GS-7342 (Table 5) as a tan powder: ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.95 (t, 3H), 1.3 (m, 6H), 1.7, (m, 2H),

35

WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 3.7 (m, 2H), 4.1(m, 6H), 4.4 (dd, 1H), 5.8 (s, 2H), 7.1 (m, 5H), 8.0 (s, 1H), 8.4 (s, 1H);
³¹P NMR (CDCl₃) δ 21 (decoupled).

Example 7

Diastereomer Separation of GS-7097

10

The diastereomeric mixture was purified using the conditions described for GS-7171 (Example 3A) except for the following:

- 15 Mobile Phase (Initial) : GS-7120 – Acetonitrile : Isopropyl Alcohol (95:5)
 (Final) : 100% Methyl Alcohol
 Elution Profile : GS-7115 (diastereomer B)
 : GS-7114 (diastereomer A)

20

Example 8

Alternative Procedure for Preparation of GS-7097

- GS-7097: Phenyl PMPA, Ethyl L-Alanyl Amidate. Phenyl PMPA (15.0 g, 41.3 mmol), L-alanine ethyl ester hydrochloride (12.6 g, 83 mmol) and triethylamine
 25 (11.5 mL, 83 mmol) were slurried together in 500 mL pyridine under dry N₂. This suspension was combined with a solution of triphenylphosphine (37.9 g, 145 mmol), Aldrithiol 2 (2,2'-dipyridyl disulfide) (31.8 g, 145 mmol), and 120 mL pyridine. The mixture was heated at an internal temperature of 57°C for 15 hours. The complete reaction was concentrated under vacuum to a yellow paste, 100 g.
 30 The paste was purified by column chromatography over a 25 x 11 cm bed of 1.1 kg silica gel 60, 230 to 400 mesh. The column was eluted with 8 liters of 2% methanol in dichloromethane followed by a linear gradient over a course of 26 liters eluent up to a final composition of 13% methanol. Clean product bearing fractions were concentrated to yield 12.4 g crude (5), 65% theory. This material was contaminated
 35 with about 15% (weight) triethylamine hydrochloride by ¹H NMR. The contamination was removed by dissolving the product in 350 mL ethyl acetate, extracting with 20 mL water, drying the organic solution over anhydrous sodium

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 sulfate, and concentrating to yield 11.1 g pure GS-7097 as a white solid, 58% yield. The process also is employed to synthesize the diastereomeric mixture of GS-7003a and GS-7003b (the phenylalanyl amidate) and the mixture GS-7119 and GS-7335 (the glycyl amidate). These diastereomers are separated using a batch elution procedure such as shown in Example 3A, 6 and 7.

10

Example 9*In Vitro* Studies of Prodrug Diastereomers

The *in vitro* anti-HIV-1 activity and cytotoxicity in MT-2 cells and stability in 15 human plasma and MT-2 cell extracts of GS-7340 (freebase) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF), are shown in Table 1. GS-7340 shows a 10-fold increase in antiviral activity relative to TDF and a 200-fold increase in plasma stability. This greater plasma stability is expected to result in higher circulating levels of GS-7340 than TDF after oral administration.

20

Table 1. *In Vitro* Activity and Stability

	HIV-1 Activity IC ₅₀ μ M	Cytotoxicity CC ₅₀ μ M	Stability T 1/2 (min)		
			Human Plasma	MT-2 Cell Extract	(P/MT-2)
GS 7340	0.005	> 40	90.0	28.3	3.2
TDF	0.05	70	0.41	70.7	0.006
Tenofovir	5	6000	--	--	--

25 In order to estimate the relative intracellular PMPA resulting from the intracellular metabolism of TDF as compared to that from GS-7340, both prodrugs and PMPA were radiolabeled and spiked into intact human whole blood at equimolar concentrations. After 1 hour, plasma, red blood cells (RBCs) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated and analyzed by HPLC 30 with radiometric detection. The results are shown in Table 2.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 After 1 hour, GS-7340 results in 10x and 30x the total intracellular concentration of PMPA species in PBMCs as compared to TDF and PMPA, respectively. In plasma after 1 hour, 84% of the radioactivity is due to intact GS-7340, whereas no TDF is detected at 1 hour. Since no intact TDF is detected in plasma, the 10x difference at 1 hour between TDF and GS-7340 is the minimum difference expected *in vivo*. The HPLC chromatogram for all three compounds in PBMCs is shown in Figure 1.

Table 2. PMPA Metabolites in Plasma, PBMCs and RBCs After 1 h Incubation of PMPA Prodrugs or PMPA in Human Blood.

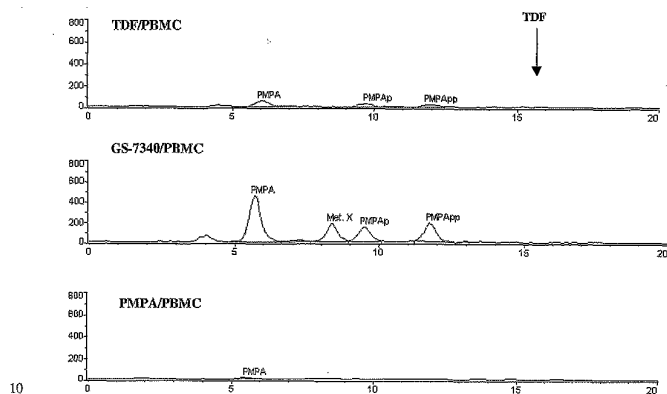
Compound	Matrix	Total C-14 Recovered, $\mu\text{g-eq}$	Metabolites (% of Total Peak Area)					GS 7340, %
			PMPA %	PMPAp, %	PMPApp, %	Met. X, %	Met. Y, %	
GS-7340 (60 $\mu\text{g-eq}$)	Plasma/FP	43.0	1	-	-	2	13	84
	PBMC	1.25	45	16	21	18	-	-
	RBC/FP	12.6	8	-	-	24	11	57
GS-4331 (TDF) (60 $\mu\text{g-eq}$)	Plasma/FP	48.1	11	-	-	89	-	-
	PBMC	0.133	50	25	18	7	-	-
	RBC/FP	10.5	93	7.0	-	-	-	-
PMPA (60 $\mu\text{g-eq}$)	Plasma/FP	55.7	100	-	-	-	-	-
	PBMC	0.033	86	14	-	-	-	-
	RBC/FP	3.72	74	10	16	-	-	-

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5

Figure 1. HPLC/C-14 Traces of PBMC Extracts from Human Blood Incubated for 1 h at 37°C with TDF, GS-7340 or PMPA.



10

Met. X and Met Y (metabolites X and Y) are shown in Table 5. Lower case "p" designates phosphorylation. These results were obtained after 1 hour in human blood. With increasing time, the *in vitro* differences are expected to increase, since 84% of GS-7340 is still intact in plasma after one hour. Because intact GS-7340 is present in plasma after oral administration, the relative clinical efficacy should be related to the IC_{50} values seen *in vitro*.

In Table 3 below, IC_{50} values of tenofovir, TDF, GS-7340, several nucleosides and the protease inhibitor nelfinavir are listed. As shown, nelfinavir and GS-7340 are 2-3 orders of magnitude more potent than all other nucleotides or nucleosides.

20

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5

Table 3. *In Vitro* Anti-HIV-1 Activities of Antiretroviral Compounds

Compound	IC ₅₀ (μM)
Adefovir (PMEA)	13.4 ± 4.2 ¹
Tenofovir (PMPA)	6.3 ± 3.3 ¹
AZT	0.17 ± 0.08 ¹
3TC	1.8 ± 0.25 ¹
d4T	8 ± 2.5 ¹
Nelfinavir	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)

10 Additional studies of the *in vitro* cell culture anti-HIV-1 activity and CC₅₀ of separated diastereomers of this invention were conducted and the results tabulated below.

15

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5

Table 4. Effect of Diastereomer

Compound	Diastereomer	IC ₅₀ (μM)	Fold change	A/B activity	CC ₅₀ (μM)
PMPA	-	5	1x	-	6000
Ala-methylester	Mixture 1:1	0.025	200x	20x	80
GS-6957a	A	0.0075	670x		
GS-6957b		0.15	33x		
Phe-methylester	Mixture 1:1	0.03	170x	10x	60
GS-7003a	A	0.01	500x		
GS-7003b	B	0.1	50x		
Gly-ethylester	Mixture 1:1	0.5	10x	20x	
GS-7119	A	0.05	100x		>100
GS-7335	B	1.0	5x		
Ala-isopropyl	Mixture 1:1	0.01	500x	12x	
GS-7340	A	0.005	1,000x		40
GS-7339	B	0.06	83x		>100
ABA-ethyl	Mixture 1:1	0.008	625x	7.5x	>100
GS-7342	A	0.004	1,250x		
GS-7341	B	0.03	170x		
Ala-ethyl	Mixture 1:1	0.02	250x	10x	60
GS-7114	A	0.005	1,000x		
GS-7115	B	0.05	100x		

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

"Phe-methylester" is the methylphenylalaninyl monoamidate, phenyl monoester of tenofovir; "gly-methylester" is the methylglycyl monoamidate, phenyl monoester of tenofovir.

In each instance above, isomer A is believed to have the same absolute stereochemistry as GS-7340 (S), and isomer B is believed to have the same absolute stereochemistry that of GS-7339.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 The *in vitro* metabolism and stability of separated diastereomers were determined in PLCE, MT-2 extract and human plasma. A biological sample listed below, 80 μ L, was transferred into a screw-capped centrifuge tube and incubated at 37°C for 5 min. A solution containing 0.2 mg/mL of the test compound in a suitable buffer, 20 μ L, was added to the biological sample and mixed. The reaction
10 mixture, 20 μ L, was immediately sampled and mixed with 60 μ L of methanol containing 0.015 mg/mL of 2-hydroxymethylnaphthalene as an internal standard for HPLC analysis. The sample was taken as the time-zero sample. Then, at specific time points, the reaction mixture, 20 μ L, was sampled and mixed with 60 μ L of methanol containing the internal standard. The mixture thus obtained was
15 centrifuged at 15,000 G for 5 min and the supernatant was analyzed with HPLC under the conditions described below.

The biological samples evaluated are as follows.

- (1) PLCE (porcine liver carboxylesterase from Sigma, 160 u/mg protein, 21 mg
20 protein/mL) diluted 20 fold with PBS (phosphated-buffered saline).
- (2) MT-2 cell extract was prepared from MT-2 cells according to the published procedure [A. Pompon, I. Lefebvre, J.-L. Imbach, S. Kahn, and D. Farquhar, "Antiviral Chemistry & Chemotherapy", 5:91-98 (1994)] except for using HEPES buffer described below as the medium.
- 25 (3) Human plasma (pooled normal human plasma from George King Biomedical Systems, Inc.)

The buffer systems used in the studies are as follows.

In the study for PLCE, the test compound was dissolved in PBS. PBS (phosphate-buffered saline, Sigma) contains 0.01 M phosphate, 0.0027 M potassium chloride,
30 and 0.137 M sodium chloride. pH 7.4 at 37°C.

In the study for MT-2 cell extracts, the test compound was dissolved in HEPES buffer. HEPES buffer contains 0.010 M HEPES, 0.05 M potassium chloride, 0.005 M magnesium chloride, and 0.005 M *dl*-dithiothreitol. pH 7.4 at 37°C.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 In the study for human plasma, the test compound was dissolved in TBS. TBS (tris-buffered saline, Sigma) contains 0.05 M Tris, 0.0027 M potassium chloride, and 0.138 M sodium chloride. pH 7.5 at 37°C.

The HPLC analysis was carried out under the following conditions.

- 10 Column: Zorbax RX-C8, 4.6 x 250 mm, 5 μ
(MAC-MOD Analytical, Inc. Chadds Ford, PA)
Detection: UV at 260 nm
Flow Rate: 1.0 mL/min
15 Run Time: 30 min
Injection Volume: 20 μ L
Column Temperature: Ambient temperature
- Mobile Phase A: 50 mM potassium phosphate (pH 6.0)/CH₃CN = 95/5 (v/v)
20 Mobile Phase B: 50 mM Potassium phosphate (pH 6.0)/CH₃CN = 50/50 (v/v)
- Gradient Run: 0 min 100% Mobile Phase A
25 25 min 100% Mobile Phase B
30 min 100% Mobile Phase B

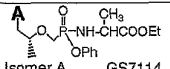
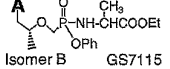
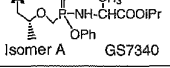
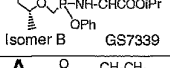
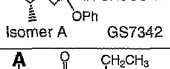
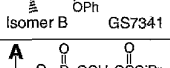
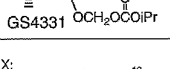
The results are shown below in Table 5 (also including selected IC₅₀ data from Table 4).

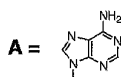
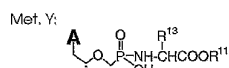
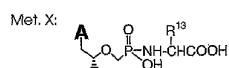
30

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 Table 5. In Vitro Metabolism of Isomers A and B of PMPA monoamidate at 37°C

No	PMPA monoamidate structure	HIV IC ₅₀ (μM)	PLCE hydrolysis rate and product	MT-2 extract hydrolysis rate and product	Human Plasma Stability (HP)
1	 Isomer A GS7114	0.005	$t_{1/2}$ = 2.9 min Met. X & PMPA	$t_{1/2}$ = 2.9 min Met. X & PMPA	$t_{1/2}$ = 148 min Met. Y
2	 Isomer B GS7115	0.05	$t_{1/2}$ = 8.0 min Met. X & PMPA	$t_{1/2}$ = 150.6 min Met. X & PMPA	$t_{1/2}$ = 495 min Met. Y
3	 Isomer A GS7340	0.005	$t_{1/2}$ = 3.3 min Met. X & PMPA	$t_{1/2}$ = 28.3 min Met. X & PMPA	$t_{1/2}$ = 90.0 min Met. Y
4	 Isomer B GS7339	0.06	$t_{1/2}$ = 10.1 min Met. X & PMPA	$t_{1/2}$ > 1000 min	$t_{1/2}$ = 231 min Met. Y
5	 Isomer A GS7342	0.004	$t_{1/2}$ = 3.9 min Met. X	$t_{1/2}$ = 49.2 min Met. X & PMPA	$t_{1/2}$ = 103 min Met. Y
6	 Isomer B GS7341	0.03	$t_{1/2}$ = 11.3 min Met. X	$t_{1/2}$ > 1000 min	$t_{1/2}$ = 257 min Met. Y
7	 GS4331	0.05	$t_{1/2}$ < 0.14 min MonoPOC PMPA	$t_{1/2}$ = 70.7 min monoPOC PMPA	$t_{1/2}$ = 0.41 min monoPOC PMPA



15

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5

Example 10Plasma and PBMC Exposures Following Oral Administration
Of Prodrug Diastereomers to Beagle Dogs

The pharmacokinetics of GS 7340 were studied in dogs after oral
10 administration of a 10 mg-eq/kg dose.

Formulations. The prodrugs were formulated as solutions in 50 mM citric acid
within 0.5 hour prior to dose. All compounds used in the studies were synthesized
by Gilead Sciences. The following lots were used:

15

GSI	Amide Amino acid	AA Ester	Diastereoisomer	Lot Number
GS-7340-2	Alanine	i-Propyl	Isomer A	1504-187-19
GS-7339	Alanine	i-Propyl	Isomer B	1509-185-31
GS7114	Alanine	Ethyl	Isomer A	1509-181-26
GS7115	Alanine	Ethyl	Isomer B	1509-181-22
GS7119	Glycine	Ethyl	Isomer A	1428-163-28
GS7342	α -Aminobutyric Acid	Ethyl	Isomer A	1509-191-12
GS7341	α -Aminobutyric Acid	Ethyl	Isomer B	1509-191-7

Dose Administration and Sample Collection. The in-life phase of this study was
conducted in accordance with the recommendations of the "Guide for the Care and
Use of Laboratory Animals" (National Institutes of Health publication 86-23) and
20 was approved by an Institutional Animal Care and Use Committee. Fasted male
beagle dogs (10 ± 2 kg) were used for the studies. Each drug was administered as a
single dose by oral gavage (1.5–2 ml/kg). The dose was 10 mg-equivalent of
PMPA/kg. For PBMCs, blood samples were collected at 0 (pre-dose), 2, 8, and 24 h
post-dose. For plasma, blood samples were collected at 0 (pre-dose), 5, 15, and 30
25 min, and 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 and 24 h post-dose. Blood (1.0 ml) was processed
immediately for plasma by centrifugation at 2,000 rpm for 10 min. Plasma samples
were frozen and maintained at 70°C until analyzed.

Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) preparation. Whole blood (8 ml)
30 drawn at specified time points was mixed in equal proportion with phosphate
buffered saline (PBS), layered onto 15 ml of Ficoll-Paque solution (Pharmacia
Biotech,) and centrifuged at 400 x g for 40 min. PBMC layer was removed and

WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 washed once with PBS. Formed PMBC pellet was reconstituted in 0.5 ml of PBS, cells were resuspended, counted using hemocytometer and maintained at 70°C until analyzed. The number of cells multiplied by the mean single-cell volume was used in calculation of intracellular concentrations. A reported value of 200 femtoliters/cell was used as the resting PBMC volume (B. L. Robins, R.V. Srinivas, 10 C. Kim, N. Bischofberger, and A. Fridland, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 612 (1998).

Determination of PMPA and Prodrugs in plasma and PBMCs. The concentration of PMPA in dog plasma samples was determined by derivatizing PMPA with 15 chloroacetaldehyde to yield a highly fluorescent N¹, N⁶-ethenoadenine derivative (L. Naesens, J. Balzarini, and E. De Clercq, *Clin. Chem.* 38, 480 (1992). Briefly, plasma (100 µl) was mixed with 200 µl acetonitrile to precipitate protein. Samples were then evaporated to dryness under reduced pressure at room temperature. Dried samples were reconstituted in 200 µl derivatization cocktail (0.34% chloroacetaldehyde in 100 20 mM sodium acetate, pH 4.5), vortexed, and centrifuged. Supernatant was then transferred to a clean screw-cap tube and incubated at 95°C for 40 min. Derivatized samples were then evaporated to dryness and reconstituted in 100 µl of water for HPLC analysis.

- 25 Before intracellular PMPA could be determined by HPLC, the large amounts of adenine related ribonucleotides present in the PBMC extracts had to be removed by selective oxidation. We used a modified procedure of Tanaka et al (K. Tanaka, A. Yoshioka, S. Tanaka, and Y. Wataya, *Anal. Biochem.*, 139, 35 (1984). Briefly, PBMC samples were mixed 1:2 with methanol and evaporated to dryness under reduced 30 pressure. The dried samples were derivatized as described in the plasma assay. The derivatized samples were mixed with 20 µL of 1M rhamnose and 30 µL of 0.1M sodium periodate and incubated at 37°C for 5 min. Following incubation, 40 µL of 4M methylamine and 20 µL of 0.5M inosine were added. After incubation at 37°C for 30 min, samples were evaporated to dryness under reduced pressure and 35 reconstituted in water for HPLC analysis.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 No intact prodrug was detected in any PBMC samples. For plasma samples potentially containing intact prodrugs, experiments were performed to verify that no further conversion to PMPA occurred during derivatization. Prodrug standards were added to drug-free plasma and derivatized as described. There were no detectable levels of PMPA present in any of the plasma samples, and the projected
10 % of conversion was less than 1%.

The HPLC system was comprised of a P4000 solvent delivery system with AS3000 autoinjector and F2000 fluorescence detector (Thermo Separation, San Jose, CA). The column was an Inertsil ODS-2 column (4.6 × 150 mm). The mobile phases used
15 were: A, 5% acetonitrile in 25 mM potassium phosphate buffer with 5 mM tetrabutyl ammonium bromide (TBABr), pH 6.0; B, 60% acetonitrile in 25 mM potassium phosphate buffer with 5 mM TBABr, pH 6.0. The flow rate was 2 ml/min and the column temperature was maintained at 35°C by a column oven. The gradient profile was 90% A/10% B for 10 min for PMPA and 65%A/35%B for 10 min for the
20 prodrug. Detection was by fluorescence with excitation at 236 nm and emission at 420 nm, and the injection volume was 10 µl. Data was acquired and stored by a laboratory data acquisition system (PeakPro, Beckman, Allendale, NJ).

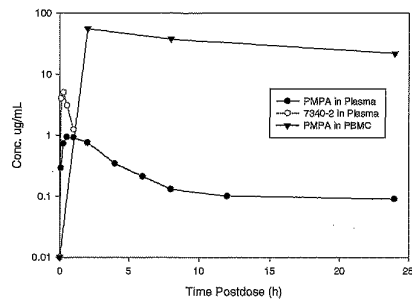
Pharmacokinetic Calculations. PMPA and prodrug exposures were expressed as
25 areas under concentration curves in plasma or PBMC from zero to 24 hours (AUC). The AUC values were calculated using the trapezoidal rule.

Plasma and PBMC Concentrations. The results of this study is shown in Figures 2 and 3. Figure 2 shows the time course of GS 7340-2 metabolism summary of plasma
30 and PBMC exposures following oral administration of pure diastereoisomers of the PMPA prodrugs.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 **Figure 2. PMPA and Prodrug Concentration in Plasma and PBMCs Following Oral Administration of GS 7340-2 to Dogs at 10 mg-eq/kg.**



10

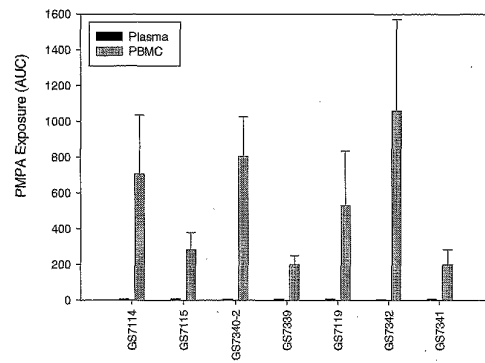
- The bar graph in Figure 2 shows the AUC (0-24h) for tenofovir in dog PBMCs and plasma after administration of PMPA s.c., TDF and amide ester prodrugs. All of the amide prodrugs exhibited increases in PBMC exposure. For example, GS 7340 results in a ~21-fold increase in PBMC exposure as compared to PMPA s.c. and TDF; and a 6.25-fold and 1.29-fold decrease in plasma exposure, respectively.
- 15

WO 02/08241

PCT/US01/23104

Figure 3. Depicts Tenofovir Exposure in PBMCs and Plasma Upon Administration of 10 mg-eq/kg in dogs

AUC(0-24h) for PMPA in PBMC and Plasma
Following an Oral Dose of 10 mg-eq/kg
PMPA Prodrugs to Dogs.



These data establish *in vivo* that GS 7340 can be delivered orally, minimizes systemic exposure to PMPA and greatly enhances the intracellular concentration of PMPA in the cells primarily responsible for HIV replication.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5

Table 6

PMPA Exposure in PBMC and Plasma from Oral Prodrugs of PMPA in Dogs

GS#	Molety	PMPA AUC in Plasma			PMPA AUC in PBMC			Prodrug in Plasma	PBMC/Plasma Exposure Ratio
		Mean	StDev	N	Mean	StDev	N		
GS-7114	Mono-Ala-Et-A	5.8	0.9	2	706	331	5	YES	122
GS-7115	Mono-Ala-Et-B	6.6	1.5	2	284	94	5	YES	43
GS-7340-2	Mono-Ala-IPr-A	5.0	1.1	5	805	222	5	YES	161
GS-7339	Mono-Ala-IPr-A	6.4	1.3	2	200	57	5	YES	31
GS-7119	Mono-Gly-Et-A	6.11	1.86	2	530	304	5	YES	87
GS-7342	Mono-ABA-Et-A	4.6	1.2	2	1060	511	5	YES	230
GS7341	Mono-ABA-Et-B	5.8	1.4	2	199	86	5	YES	34

Example 11

20

Biodistribution of GS-7340

As part of the preclinical characterization of GS-7340, its biodistribution in dogs was determined. The tissue distribution of GS-7340 (isopropyl alaninyl monoamidate, phenyl monoester of tenofovir) was examined following oral administration to beagle dogs. Two male animals were dosed orally with ¹⁴C=GS-7340 (8.85 mg-equiv. of PMPA/kg, 33.2 μ Ci/kg; the 8-carbon of adenine is labeled) in an aqueous solution (50 mM citric acid, pH 2.2). Plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained over the 24-hr period. Urine and feces were cage collected over 24 hr. At 24 h after the dose, the animals were sacrificed and tissues removed for analysis. Total radioactivity in tissues was determined by oxidation and liquid scintillation counting.

The biodistribution of PMPA after 24 hours after a single oral dose of radiolabelled GS 7340 is shown in Table 4 along with the data from a previous study with TDF (GS-4331). In the case of TDF, the prodrug concentration in the plasma is below the level of assay detection, and the main species observed in plasma is the parent drug. Levels of PMPA in the lymphatic tissues, bone marrow, and skeletal muscle are increased 10-fold after administration of GS-7340.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 Accumulation in lymphatic tissues is consistent with the data observed from the PBMC analyses, since these tissues are composed primarily of lymphocytes. Likewise, accumulation in bone marrow is probably due to the high percentage of lymphocytes (70%) in this tissue.

10 Table 7. Excretion and Tissue Distribution of Radiolabelled GS-7340 in Dogs (Mean, N=2) Following an Oral Dose at 10 mg-eq. PMPA/kg.

Tissue/Fluid	GS-4331		GS-7340		Tissue Conc. Ratio of GS 7340 to GS-4331
	% Dose	Conc. (ug-eq/g)	% Dose	Conc. (ug-eq/g)	
Liver	12.40	38.30	16.45	52.94	1.4
Kidney	4.58	87.90	3.78	80.21	0.9
Lungs	0.03	0.53	0.34	4.33	8.2
Iliac Lymph Nodes	0.00	0.51	0.01	5.42	10.6
Axillary Lymph Nodes	0.00	0.37	0.01	5.54	14.8
Inguinal Lymph Nodes	0.00	0.28	0.00	4.12	15.0
Mesenteric Lymph Nodes	0.00	1.20	0.04	6.88	5.7
Thyroid Gland	0.00	0.30	0.00	4.78	15.8
Pituitary Gland	0.00	0.23	0.00	1.80	7.8
Salivary Gland (L+R)	0.00	0.45	0.03	5.54	12.3
Adrenal Gland	0.00	1.90	0.00	3.47	1.8
Spleen	0.00	0.63	0.17	8.13	12.8
Pancreas	0.00	0.57	0.01	3.51	6.2
Prostate	0.00	0.23	0.00	2.14	9.1
Testes (L+R)	0.02	1.95	0.02	2.01	1.0
Skeletal Muscle	0.00	0.11	0.01	1.12	10.1
Heart	0.03	0.46	0.15	1.97	4.3
Femoral Bone	0.00	0.08	0.00	0.28	3.5
Bone Marrow	0.00	0.20	0.00	2.05	10.2
Skin	0.00	0.13	0.00	0.95	7.2
Abdominal fat	0.00	0.16	0.00	0.90	5.8
Eye (L+R)	0.00	0.06	0.00	0.23	3.7
Brain	0.00	<LOD	0.00	<LOD	n.d.
Cerebrospinal Fluid	0.00	<LOD	0.00	0.00	n.d.
Spinal Cord	0.00	<LOD	0.00	0.04	n.d.
Stomach	0.11	1.92	0.26	2.68	1.4
Jejunum	1.34	3.01	0.79	4.16	1.4
Duodenum	0.49	4.96	0.44	3.77	1.8
Ileum	0.01	0.50	0.16	4.61	9.2
Large Intestine	1.63	5.97	2.65	47.20	7.9
Gall bladder	0.00	3.58	0.04	25.02	7.0
Bile	0.00	9.63	0.22	40.48	4.2
Feces	40.96	n.d.	0.19	n.d.	n.a.
Total GI Tract Contents	5.61	n.d.	21.64	n.d.	n.a.
Urine	23.72	n.d.	14.73	n.d.	n.a.
Plasma at 24 h	0.00	0.20	0.00	0.20	1.0
Plasma at 0.25 h	n.a.	3.68	n.a.	3.48	0.9
PBMC*	0.00	n.d.	0.00	63.20	n.d.
Whole Blood	0.00	0.85	0.16	0.20	0.2
Total Recovery	81.10		68.96		

* Calculated using typical recovery of 15×10^6 cells total, and mean PBMC volume of 0.2 picoliters/cell

n.s. = no sample, n.a. = not applicable, n.d. = not determined.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 CLAIMS:

1. A screening method for identifying a methoxyphosphonate nucleotide
analogue prodrug conferring enhanced activity in a target tissue comprising:
- (a) providing at least one of said prodrugs;
- 10 (b) selecting at least one therapeutic target tissue and at least one non-
target tissue;
- (c) administering the prodrug to the target tissue and to said at least one
non-target tissue; and
- (d) determining the relative activity conferred by the prodrug in the
- 15 tissues in step (c).
2. The method of claim 1 wherein the activity is antiviral activity or antitumor
activity.
- 20 3. The method of claim 2 wherein the activity is antiviral activity.
4. The method of claim 3 wherein the activity is anti-HIV or anti-HBV activity.
5. The method of claim 1 wherein the prodrug is a prodrug of PMPA or PMEA.
- 25 6. The method of claim 5 wherein the prodrug is a phosphonoamidate,
phosphonoester or mixed phosphonoamidate/phosphonoester.
7. The method of claim 6 wherein the amidate is an amino acid amidate.
- 30 8. The method of claim 6 wherein the ester is an aryl ester.
9. The method of claim 1 further comprising selecting a prodrug having a
relative activity in the target tissue that is greater than 10 times that of the non-
- 35 target tissue.

WO 02/08241

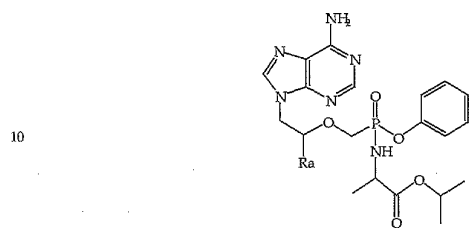
PCT/US01/23104

- 5 10. The method of claim 1 wherein the target and non-target tissue are in an animal, the prodrug is administered to the animal and the relative activity is determined by analysis of the animal tissues after administration of the prodrug.
11. The method of claim 1 wherein activity in the target and non-target tissues is
10 determined by assaying the amount of at least one metabolite of the prodrug in the tissues.
12. The method of claim 12 wherein the metabolite is the parental drug.
- 15 13. The method of claim 12 wherein the metabolite is the diphosphate of the parental drug.
14. The method of claim 1 wherein the target tissue is virally infected tissue and the non-target tissue is the same tissue which is not virally infected.
- 20 15. The method of claim 1 wherein the target tissue is lymphoid tissue and the activity is anti-HIV activity.
16. The method of claim 1 wherein the target tissue is liver and the activity is
25 anti-HBV activity.
17. The method of claim 1 wherein the target tissue is hematological and the activity is antitumor activity.
- 30 18. The method of claim 1 wherein the target tissue is malignant and the non-target tissue is the same tissue but non-malignant.

WO 02/08241

PCT/US01/23104

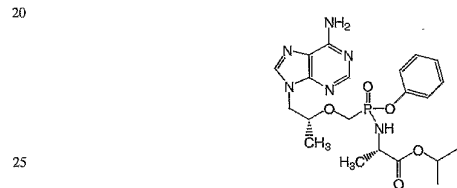
- 5 19. A compound having the structure (1)



(1)

- 15 where Ra is H or methyl,
and chirally enriched compositions thereof, salts, their free base and solvates thereof.

- 20 20. A compound having the structure (2)



(2)

- and its enriched diastereomers, salts, free base and solvates.

- 30 21. A diastereomerically enriched compound having the structure (3)



(3)

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 which is substantially free of the diastereomer (4)



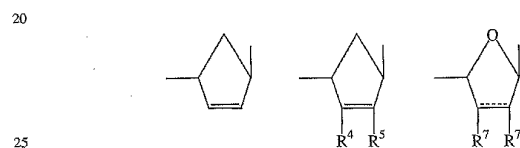
wherein

R^1 is an oxyester which is hydrolyzable *in vivo*, or hydroxyl;

B is a heterocyclic base;

15 R^2 is hydroxyl, or the residue of an amino acid bonded to the P atom through an amino group of the amino acid and having each carboxy substituent of the amino acid optionally esterified, but not both of R^1 and R^2 are hydroxyl;

E is $-(CH_2)_2-$, $-(CH(CH_3)CH_2)-$, $-(CH(CH_2F)CH_2)-$, $-(CH(CH_2OH)CH_2)-$,
 $-(CH(CH=CH_2)CH_2)-$, $-(CH(C=CH)CH_2)-$, $-(CH(CH_2N_3)CH_2)-$,



$-(CH(R^6)OCH(R^6)-)$, $-(CH(R^9)CH_2O-)$ or $-(CH(R^8)O-)$, wherein the right hand bond is

linked to the heterocyclic base;

the broken line represents an optional double bond;

30 R^4 and R^5 are independently hydrogen, hydroxy, halo, amino or a substituent having 1-5 carbon atoms selected from acyloxy, alkoxy, alkylthio, alkylamino and dialkylamino;

R^6 and R^6 are independently H, C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 hydroxyalkyl, or C_2-C_7 alkanoyl;

35 R^7 is independently H, C_1-C_6 alkyl, or are taken together to form $-O-$ or $-CH_2-$;

WO 02/08241

PCT/US01/23104

5 R^8 is H, C_1 - C_6 alkyl, C_1 - C_6 hydroxyalkyl or C_1 - C_6 haloalkyl; and

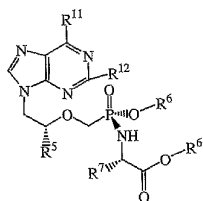
R^9 is H, hydroxymethyl or acyloxymethyl;

and their salts, free base, and solvates.

22. A diastereomerically enriched compound having the structure (5a)

10

15

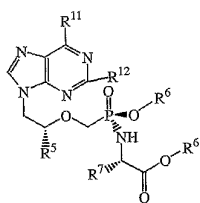


(5a)

which is substantially free of diastereomer (5b)

20

25



(5b)

wherein

30 R^5 is methyl or hydrogen;

R^6 independently is H, alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl or arylalkyl, or R^6 independently is alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl or arylalkyl which is substituted with from 1 to 3 substituents selected from alkylamino, alkylaminoalkyl, dialkylaminoalkyl, dialkylamino, hydroxyl, oxo, halo, amino, alkylthio, alkoxy,

WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 alkoxyalkyl, aryloxy, aryloxyalkyl, arylalkoxy, arylalkoxyalkyl, haloalkyl, nitro, nitroalkyl, azido, azidoalkyl, alkylacyl, alkylacylalkyl, carboxyl, or alkylacylamino;

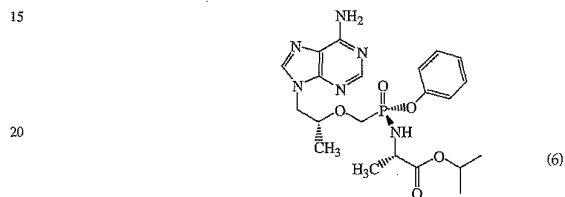
R^7 is the side chain of any naturally-occurring or pharmaceutically acceptable amino acid and which, if the side chain comprises carboxyl, the carboxyl group is optionally esterified with an alkyl or aryl group;

- 10 R^{11} is amino, alkylamino, oxo, or dialkylamino; and

R^{12} is amino or H ;

and its salts, tautomers, free base and solvates.

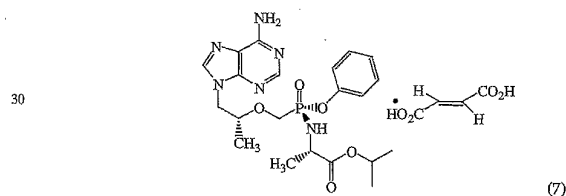
23. A compound of structure (6)



and its salts and solvates.

25

24. A compound of structure (7)



WO 02/08241

PCT/US01/23104

- 5 25. A composition comprising a compound of any of claims 19-24 and a pharmaceutically effective excipient.
26. The composition of claim 25 wherein the excipient is a gel.
- 10 27. The composition of claim 25 which is suitable for topical administration.
28. A method for antiviral therapy or prophylaxis comprising administering a compound of any of claims 19-24 in a therapeutically or prophylactically effective amount to a subject in need of such therapy or prophylaxis.
- 15 29. A method for use of magnesium alkoxide comprising reacting 9-(2-hydroxypropyl)adenine (HPA) or 9-(2-hydroxyethyl)adenine (HEA), magnesium alkoxide, and protected *p*-toluenesulfonyloxymethylphosphonate.
- 20 30. The method of claim 29 further comprising recovering PMPA or PMEA, respectively.
31. The method of claim 29 wherein the phosphonate of the *p*-toluenesulfonyloxymethylphosphonate is protected by ethyl ester.
- 25 32. The method of claim 29 wherein the alkoxide is a C₁-C₆ alkoxide.
33. The method of claim 32 wherein the alkoxide is *t*-butyl or isopropyl oxide.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/008241 A3(51) International Patent Classification: C07F 9/6561,
C07H 19/20, G01N 33/53, A61K 31/675, A61P 31/12,
35/00ROHLOFF, John, C. [US/US]; 1654 Cornell Drive,
Mountain View, CA 94040 (US). SPARACINO, Mark,
L. [US/US]; 1450 Seville Drive, Morgan Hill, CA 95037
(US).

(21) International Application Number: PCT/US01/23104

(22) International Filing Date: 20 July 2001 (20.07.2001)

(74) Agents: HENSLEY, Max, D. et al.; Gilead Sciences, Inc.,
333 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/220,021 21 July 2000 (21.07.2000) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application:
US 60/220,021 (CIP)
Filed on 21 July 2000 (21.07.2000)(71) Applicant (for all designated States except US): GILEAD
SCIENCES, INC. [US/US]; 333 Lakeside Drive, Foster
City, CA 94404 (US).

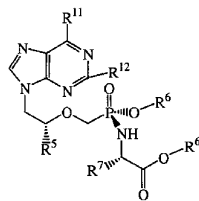
(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BECKER, Mark,
W. [US/US]; 215 Old County Road #308, Belmont, CA
94002 (US). CHAPMAN, Hartan, H. [US/US]; 60 La-
guna Drive, La Honda, CA 94020 (US). CHILAR, Tomas
[CZ/US]; 727 Caravel Lane, Foster City, CA 94404 (US).
EISENBERG, Eugene, J. [US/US]; 236 Club Drive, San
Carlos, CA 94070 (US). HE, Gong-Xin [CN/US]; 5436
Ontario Common, Fremont, CA 94555 (US). KERNAN,
Michael, R. [US/US]; 6 Sequoia Way, Pacifica, CA 94044
(US). LEE, William, A. [US/US]; 749 Anderson Drive,
Los Altos, CA 94024 (US). PRISBE, Ernest, J. [US/US];
1336 Richardson Avenue, Los Altos, CA 94024 (US).

Published:

— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
29 August 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(54) Title: PRODRUGS OF PHOSPHONATE NUCLEOTIDE ANALOGUES AND METHODS FOR SELECTING AND MAK-
ING SAME

WO 02/008241 A3



(5a)

(57) Abstract: A novel method is provided for screening prodrugs of
methoxyphosphonate nucleotide analogues to identify prodrugs selectively
targeting desired tissues with antiviral or antitumor activity. This method
has led to the identification of novel mixed ester-amidates of PMPA
for retroviral or hepadnaviral therapy, including compounds of structure
(5a) having substituent groups as defined herein. Compositions of these
novel compounds in pharmaceutically acceptable excipients and their use
in therapy and prophylaxis are provided. Also provided is an improved
method for the use of magnesium alkoxide for the preparation of starting
materials and compounds for use herein.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/23104
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07F9/6561 C07H19/20 G01N33/53 A61K31/675 A61P31/12 A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07F C07H G01N A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 977 089 A (OLIYAI REZA ET AL) 2 November 1999 (1999-11-02) examples	1, 18
A	EP 0 481 214 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 22 April 1992 (1992-04-22) the whole document --- -/-	1, 18
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 June 2002		Date of mailing of the international search report 27/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer de Nooy, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/23104
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SIDDIQUI A Q ET AL: "DESIGN AND SYNTHESIS OF LIPOPHILIC PHOSPHORAMIDATE DAT-MP PRODRUGS EXPRESSING HIGH POTENCY AGAINST HIV IN CELL CULTURE: STRUCTURAL DETERMINANTS FOR IN VITRO ACTIVITY AND QSAR" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 42, no. 20, 1999, pages 4122-4128, XP000999173 ISSN: 0022-2623 page 4122	1,18
A	WO 96 37503 A (GENTA INC) 28 November 1996 (1996-11-28) figure 9	21
P,X	H. CHAPMAN ET AL.: "Practical synthesis, separation, and stereochemical assignment of the PMPA pro-drug GS-7340" NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS, vol. 20, 2001, pages 621-628, XP002202043 the whole document	1-33

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/23104
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1. ☒	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claim 28 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.	
2. ☐	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. ☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1. ☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
 Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/23104

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5977089	A	02-11-1999	US 5922695 A	13-07-1999
			US 6069249 A	30-05-2000
			US 6043230 A	28-03-2000
			AU 3897097 A	20-02-1998
			JP 2000515866 T	28-11-2000
			TH 444020 B	01-07-2001
			WO 9804569 A1	05-02-1998
EP 0481214	A	22-04-1992	AT 167679 T	15-07-1998
			BR 1100467 A3	06-06-2000
			CA 2051239 A1	15-03-1992
			DE 69129650 D1	30-07-1998
			DE 69129650 T2	25-03-1999
			DK 481214 T3	22-02-1999
			EP 0481214 A1	22-04-1992
			ES 2118069 T3	16-09-1998
			HK 1010053 A1	11-06-1999
			JP 3164385 B2	08-05-2001
			JP 4230694 A	19-08-1992
			US 5663159 A	02-09-1997
			US 5792756 A	11-08-1998
			WO 9637503	A
PL 310248 A1	03-03-1997			
PL 312934 A1	01-09-1997			
AU 707369 B2	08-07-1999			
AU 6024096 A	11-12-1996			
CA 2222048 A1	28-11-1996			
EP 0828749 A1	18-03-1998			
JP 2002500617 T	08-01-2002			
WO 9637503 A1	28-11-1996			
AU 707093 B2	01-07-1999			
AU 6707996 A	27-03-1997			
CA 2233460 A1	13-03-1997			
EP 0850248 A1	01-07-1998			
WO 9709340 A1	13-03-1997			
NZ 315384 A	29-04-1999			

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
// C 0 7 M 7:00	C 0 7 M 7:00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ベッカー, マーク ダブリュー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 2, ベルモント, オールド カウンティー ロード 2 1 5 ナンバー 3 0 8

(72)発明者 チャプマン, ハーラン エイチ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 0, ラ ホンダ, ラグナ ドライブ 6 0

(72)発明者 チアラー, トーマス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, カラベル レーン 7 2 7

(72)発明者 アイゼンバーグ, ユージーン ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0, サン カルロス, クラブ ドライブ 2 3 6

(72)発明者 ハ, ゴン - シン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 5, フレモント, オンタリオ コモン 5 4 3 6

(72)発明者 カーナン, マイケル アール.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 4 4, パシフィカ, セクオイア ウェイ 6

(72)発明者 リー, ウィリアム エイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 4, ロス アルトス, アンダーソン ドライブ 7 4 9

(72)発明者 プリスビー, アーネスト ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 4, ロス アルトス, リチャードソン アベニュー 1 3 3 6

(72)発明者 ローロフ, ジョン シー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 4 0, マウンテン ビュー, コーネル ドライブ 1 6 5 4

(72)発明者 スパラシーノ, マーク エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 3 7, モーガン ヒル, セビル ドライブ 1 4 5 0

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA40 BB10 BB50 BB51 CA25 CB01 FB06 FB08
4C086 AA02 AA03 DA38 MA02 MA05 NA14 ZB26 ZB33 ZC55
4H050 AA01 AA03 AB28

专利名称(译)	磷酸酯核苷酸类似物的前药和选择和制备它们的方法。		
公开(公告)号	JP2004504402A	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2002514146	申请日	2001-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	吉利德科学公司		
申请(专利权)人(译)	吉利德科学公司		
[标]发明人	ベッカーマークダブリュー チャプマンハーランエイチ チアラートーマス アイゼンバーグユージーンジェイ ハゴンシン カーナンマイケルアール リーウィリアムエイ プリスビーアーネストジェイ ローロフジョンシー スパラシーノマークエル		
发明人	ベッカー, マーク ダブリュー. チャプマン, ハーラン エイチ. チアラ, トーマス アイゼンバーグ, ユージーン ジェイ. ハ, ゴン-シン カーナン, マイケル アール. リー, ウィリアム エイ. プリスビー, アーネスト ジェイ. ローロフ, ジョン シー. スパラシーノ, マーク エル.		
IPC分类号	A61K31/664 A61K31/675 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 C07F9/6561 C07H19/10 C07H19/20 C07H21/00 C12Q1/18 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C07M7/00		
CPC分类号	A61P1/16 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/20 A61P35/00 A61P43/00 C07F9/65616 C07H19/10 C07H19/20 C07H21/00 C12Q1/18 G01N33/5011		
FI分类号	C07F9/6561.Z A61K31/664 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z C07M7/00		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BB10 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/FB06 2G045/FB08 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/DA38 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C086/ZC55 4H050/AA01 4H050/AA03 4H050/AB28		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/220021 2000-07-21 US		
其他公开文献	JP4651264B2 JP2004504402A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种新方法已经导致鉴定用于逆转录病毒或嗜肝DNA病毒疗法的PMPA的新型混合酯 - 酰胺化物，包括具有如本文所定义的取代基的结构 (5a) 的化合物。提供了这些新化合物在药学上可接受的赋形剂中的组合物及其在治疗和预防中的用途。

