



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
PROFÁRMACOS DE NUCLEÓTIDOS:
ESTERES CÍCLICOS Y MONO-ESTERES

Autor: FERNANDO DELGADO HERMOSO

Fecha: Junio 2019

Tutor: Prof. Mónica M^a Söllhuber Kretzer

INDICE

1	RESUMEN	3
2	ABSTRACT.....	3
3	INTRODUCCIÓN.....	4
4	OBJETIVOS	6
5	METODOS	6
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
6.1	ESTRATEGIA CICLO-SAL Y SUS DERIVADOS “LOCK-IN”.....	6
6.1.1	HIDROLISIS: MECANISMO Y ESTRUCTURA.....	7
6.1.2	ACTIVIDAD ANTIVIRAL	8
6.1.3	DERIVADOS CICLOSAL “LOCK-IN”	8
6.1.4	PRONUCLEOTIDOS CICLOSAL DE DIFERENTES ANALOGOS NUCLEOSIDICOS	9
6.2	ESTRATEGIA HEP-DIRECT.....	10
6.2.1	HIDROLISIS: MECANISMO Y ESTRUCTURA.....	10
6.2.2	PRADEFOVIR	11
6.3	PROFÁRMACOS TIPO NUCLEÓSIDO MONOFOSFATO 3',5'-CÍCLICOS.....	12
6.3.1	PSI-352938.....	12
6.4	ESTRATEGIA ALCOXIALQUIL MONOESTERES DE FOSFATO Y FOSFONATO....	13
6.4.1	<i>MECANISMO DE ACTIVACIÓN</i>	14
6.4.2	TENOFOVIR EXALIDEX (HDP-TENOFOVIR), CMX157 [HDP-(S)-HPMA]	14
6.4.3	BRINCIDOFVIR (HDP-CDV) (CMX001).....	15
6.4.4	HEXADECILOXIPROPIL-CITARABINA (HDP-P-Ara-C) y (HDP-cP-Ara-C).....	16
6.4.5	ODE-Bn-PMEG.....	17
7	CONCLUSIONES.....	17
8	BIBLIOGRAFIA.....	18

1 RESUMEN

Los análogos de nucleósidos tienen la capacidad de inhibir la acción de las polimerasas celulares e impedir la replicación y transcripción del ADN o ARN en estas células. Estos derivados nucleosídicos se diseñaron para el tratamiento de enfermedades virales y antineoplásicas. Para conseguir el correcto desarrollo de su acción inhibitoria es necesario que el nucleósido se encuentre en su forma activa trifosforilada. Generalmente, la primera fosforilación es el paso limitante de esta bioactivación. Para eludir este paso sería adecuada la utilización de nucleótidos mono-fosforilados. Sin embargo, la elevada polaridad del grupo fosfato compromete la biodisponibilidad oral. Por esta razón se motivó el diseño de profármacos de nucleósidos monofosfato que enmascaren el grupo fosfato, consiguiendo de esta forma un aumento de lipofilia, que permita la difusión a través de las membranas, y favorezca una mayor estabilidad frente a la hidrólisis en la trayectoria hacia su diana de acción.

En los últimos años se han diseñado múltiples profármacos de nucleótidos, todos ellos con el fin de mejorar la bioselectividad y su biodisponibilidad oral. Entre los profármacos de nucleósido monofosfato destacan dos grandes grupos: ésteres de fosfato o fosfonato y derivados tipo fosforamida o fosfonamida. En esta revisión se estudian algunos tipos de profármacos del grupo de los ésteres de fosfato y fosfonato, su bioactivación, sus dianas y sus aplicaciones. Destacan entre ellos los profármacos Hep-Direct y los nucleósidos monofosfato 3',5'-cíclicos que liberan el fármaco selectivamente en el hígado, los monoésteres alcoxialquilo y los profármacos cicloSal que aún están en fase de estudio y que por su lipofilia propician el paso a través de la membrana celular.

2 ABSTRACT

Nucleoside analogues are a group of molecules with the ability to inhibit the action of cell polymerases and prevent the replication and transcription of DNA and RNA in the cell. These nucleoside derivatives were designed to treat multiple viral infections and antineoplastic diseases. In order to achieve the correct development of their inhibitory action, the drug must be transformed into their tri phosphorylated active species. Generally, the first phosphorylation is the bottleneck step of this activation process. In order to avoid this first phosphorylation it would be suitable to use of nucleoside monophosphate drugs. However, the high polarity of the phosphate group forbids oral availability. For this reason, the design of new nucleoside monophosphate prodrugs is necessary. These new prodrugs will mask the phosphate group of the nucleotide, increasing lipophilicity, enhancing on this way the bypass through the lipid bilayer, and favoring a higher stability against hydrolysis on the way towards its action site.

In the past years there have been designed multiple nucleotide prodrugs, in order to enhance their bioselectivity and oral availability. The nucleoside monophosphate prodrugs highlight two main groups: esters (phosphates or phosphonates) and amides (phosphoramides or phosphonamides). This review focuses on phosphate and phosphonate ester strategies including their bioactivation, their targets and their application. Emphasis is placed on liver directed Hep-Direct and 3',5'-cyclomonophosphate nucleoside prodrugs, and on lipophilic cell membrane directed alkyloxyalkyl monoester and cycloSal prodrugs.

3 INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los análogos de nucleósidos y nucleótidos (NT) como alternativas terapéuticas frente a enfermedades infecciosas, así como tratamientos oncológicos ha supuesto un avance muy importante que ha mejorado sustancialmente el pronóstico de estas patologías. Sin embargo, estos fármacos contaron con unas limitaciones que, poco a poco, han ido solventándose gracias a nuevas estrategias de diseño de profármacos de estos análogos. Estos nucleósidos en su forma activada actúan inhibiendo competitivamente las DNA y RNA polimerasas, así como la transcriptasa inversa, induciendo el bloqueo del proceso e incluso la terminación de la cadena y de esta manera impiden los procesos de replicación o de transcripción del DNA o RNA. (1)

La bioactivación de los nucleósidos, necesaria para llevar a cabo su acción terapéutica, depende de las quinasas celulares que adicionan, uno a uno, los grupos fosfato hasta formar el nucleósido trifosfato activo (32) (1). El paso limitante del proceso de bioactivación lo encontramos generalmente en la primera fosforilación, que es el paso más lento, por lo que condiciona la cinética de activación del fármaco.

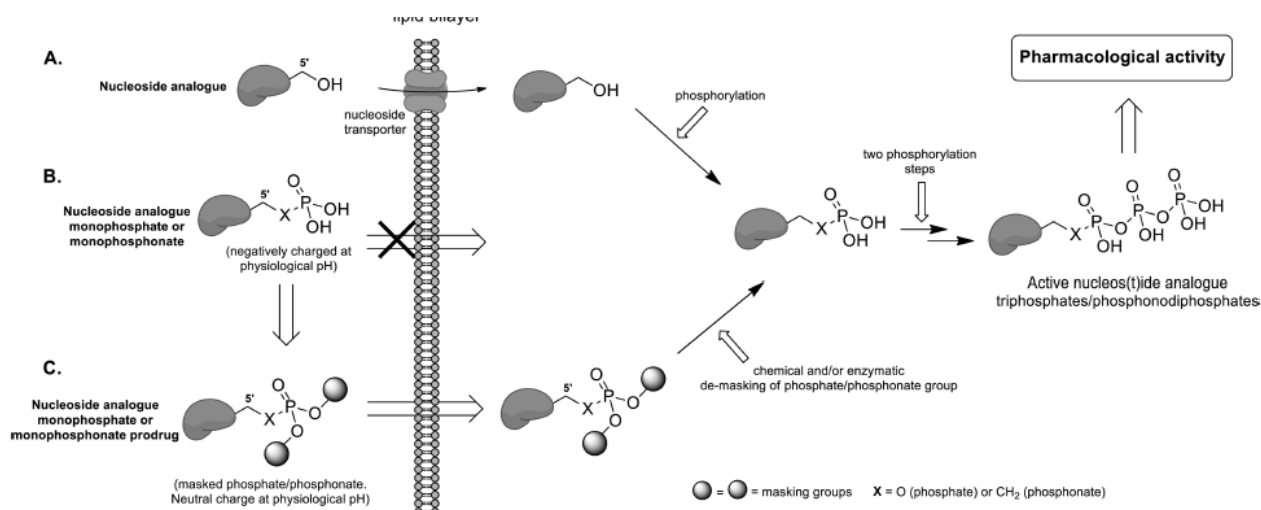


Figura 1: Esquema general de bioactivación intracelular de nucleósidos y de profármacos de nucleósidos monofosforilados para dar lugar a sus metabolitos activos (15)

Para eludir la primera fosforilación de los fármacos nucleosídicos, se diseñaron análogos monofosfato, lo cual permite una conversión al metabolito activo trifosforilado mucho más rápida. Sin embargo, la viabilidad de estos análogos se ve comprometida por la baja estabilidad química *in vivo* y la elevada polaridad de su grupo fosfato. Estos análogos monofosfato son sustrato de la fosfatasa alcalina intestinal, la cual escinde el grupo fosfato reconvirtiéndolo en su nucleósido (15). La acción de la fosfatasa alcalina se puede evitar en algunos casos mediante la sustitución del grupo fosfato por un grupo fosfonato, el cual será resistente a la acción de estas enzimas. La segunda limitación que encuentran estos análogos es el paso a través de las membranas, ya que carecen del sistema de transporte específico de los nucleósidos y su alta polaridad impide su difusión a través de la membrana. (28)

Con la finalidad de conseguir nucleósidos monofosfato más lipófilos que sean capaces de atravesar la barrera intestinal y las membranas celulares y una vez dentro de la célula ser bioactivados por acción enzimática y/o química de forma selectiva y eficiente se han diseñado

los correspondientes profármacos. Paralelamente estos profármacos aumentan la estabilidad química de la molécula, confiriéndole resistencia frente a las fosfatasa alcalinas y evitando la inactivación durante el proceso farmacocinético.

Curiosamente, estos profármacos no sólo han demostrado una mayor actividad que sus “nucleósidos progenitores”, sino que también han permitido la integración de nuevos nucleósidos, originalmente inactivos frente algunas patologías, al lograrse una mayor concentración en el sitio de acción. La estrategia de profármacos de nucleósidos monofosfato se está consolidando como un avance importante en la terapia antiviral y antineoplásica que ha aumentado la eficacia y la selectividad del fármaco por su diana disminuyendo la toxicidad y los efectos adversos asociados a estos tratamientos.

Entre los profármacos aprobados y en uso terapéutico destacan como derivados de ésteres de fosfato el adefovir pivoxilo (A) para el tratamiento de la hepatitis B (HBV) y el tenofovir disoproxilo (B) para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (32). Entre los derivados de fosforamidas y fosfonamidas son importantes el sofosbuvir (C) (Fig 2), para el tratamiento de la hepatitis C (HCV) y el tenofovir alafenamida (D) (Fig 2), para el tratamiento del VIH y VHB. El éxito de estos profármacos ha animado a los investigadores a profundizar en el diseño de nuevos profármacos monofosfato y fosfonato como una estrategia para obtener nuevas moléculas con actividad frente a enfermedades virales o proliferativas (15).

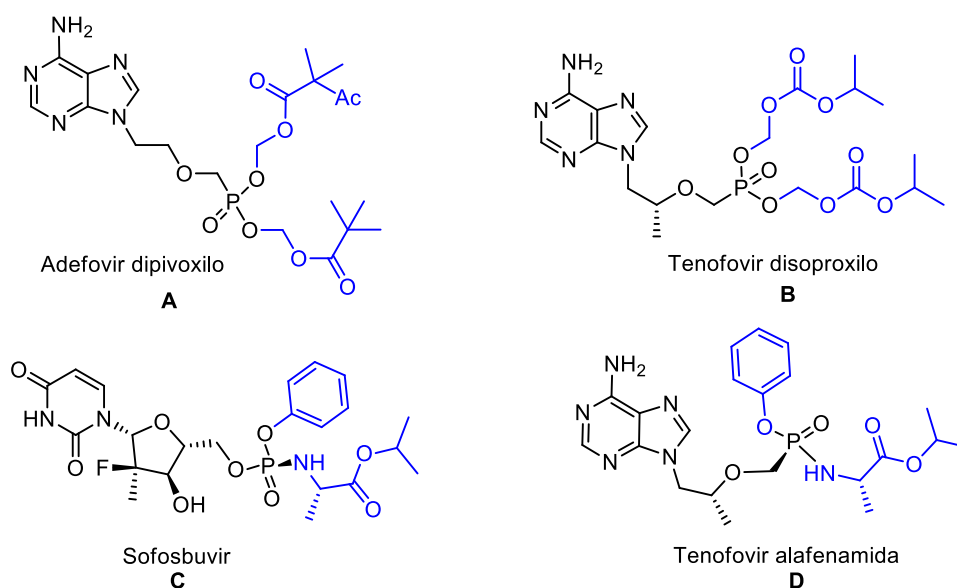


Figura 2: Estructuras adefovir pivoxilo (A), tenofovir disoproxilo (B), sofosbuvir (C) y tenofovir alafenamida (D)

Las múltiples estrategias de enmascaramiento de los análogos de nucleósidos monofosfato se pueden agrupar en dos. Diseño de ésteres de fosfato o fosfonato y diseño de amidas de fosfato o fosfonato. Ambos a su vez pueden presentar diferentes mecanismos de liberación del nucleósido monofosfato y coincidir en la posterior activación por las quinasas celulares. Este trabajo se centrará en nuevos ésteres como profármacos de los nucleósidos monofosfato y fosfonato diferentes a los ya clásicos POC [bis (isopropiloximetil carbonatos)] y POM [bis (pivaloiloximetil) derivados]. Se hará referencia a los siguientes grupos:

- Profármacos cycloSal y sus derivados “lock-in”
- Profármacos HepDirect

- Nucleósidos monofosfato 3',5'-cíclicos
- Alcoxialquil monoesteres de fosfato y fosfonato

4 OBJETIVOS

En este trabajo se analizarán algunos ésteres de nucleósidos monofosfato y fosfonato como profármacos de nucleótidos trifosfato de aplicación como antivirales y/o antineoplásicos. Se hará referencia a las estrategias cicloSal, HepDirect, nucleósidos monofosfato 3',5'-cíclicos y alcoxialquilmonoésteres.

- Se describirá el mecanismo de bioactivación correspondiente al fármaco y sus aplicaciones terapéuticas.
- Se revisarán algunos ejemplos de estos nuevos profármacos analizando su relación estructura actividad, su aplicación terapéutica.
- Se estudiará el impacto positivo que ha producido en el pronóstico de muchas enfermedades, algunas de las cuales son altamente prevalentes en el mundo actual.

5 METODOS

Este documento es una revisión bibliográfica sobre algunas de las nuevas estrategias de diseño de ésteres de fosfato como profármacos de nucleósidos monofosfato dividido en cuatro grandes bloques: Profármacos cicloSal y sus derivados "lock-in", profármacos "HepDirect", profármacos de tipo monofosfato-3',5'-cíclicos y profármacos de tipo alcoxialquil monoésteres. Se ha recopilado información acerca de su diseño, relación estructura actividad y sus aplicaciones y ventajas terapéuticas. Para ello se ha obtenido información en diferentes bases de datos informáticas como Science Direct, SciELO y Pubmed

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ESTRATEGIA CICLO-SAL Y SUS DERIVADOS "LOCK-IN"

Durante los últimos años se han desarrollados nuevas estrategias para el tratamiento del VIH. Algunos de los derivados nucleosídicos que se han utilizado son la estavudina (d4T), la zidovudina (AZT), o la zalcitabina (ddC), los cuales son potentes inhibidores de la transcriptasa inversa (3) y presentan una alta eficacia inhibiendo la replicación del virus. Una de las estrategias que se idearon para aumentar la eficacia de estos análogos fueron los profármacos cicloSal que son capaces de liberar los análogos en su forma monofosfato dentro de la célula diana.

Los cicloSal de fosfatos y fosfonatos utilizan al alcohol salicílico para formar un doble éster cíclico y fueron desarrollados por C. Meier y cols (5). Este alcohol al reaccionar con el grupo fosfato o fosfonato a través de una doble esterificación contribuye a formar una molécula más lipófila capaz de difundir a través de la membrana. Una vez en el interior de la célula, el pH levemente

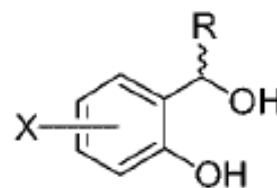


Figura 3: alcohol salicílico⁽⁵⁾

alcalino intracelular fuerza la hidrólisis del éster de cicloSal liberando el nucleósido monofosfato. Para explicar el mecanismo de hidrólisis nos vamos a ayudar de la molécula cycloSal-d4TMP (**2**) cuyo mecanismo de degradación está desarrollado en la **Fig 4** (4).

6.1.1 HIDROLISIS: MECANISMO Y ESTRUCTURA

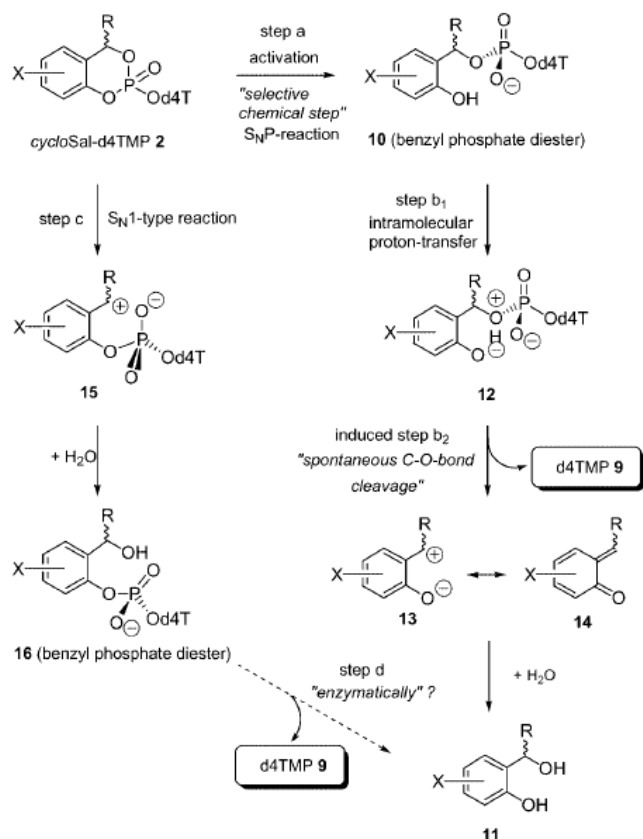


Figura 4: Esquema del mecanismo hidrólisis de cycloSal-d4TMP (4)

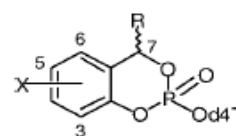
hidrolizaría espontáneamente ya que la carga negativa del átomo de fósforo le previene de un nuevo ataque nucleofílico (4) (5).

Se ha demostrado que la morfología de la molécula condiciona su estabilidad hidrolítica. Tanto la presencia de sustituyentes en el anillo aromático como la estereoquímica del grupo fosfato afectan la estabilidad de la molécula, así como a su actividad anti-VIH.

La presencia de sustituyentes aceptores (Cl, F) disminuye la estabilidad hidrolítica, mientras que los sustituyentes donadores (metilo, terc-butilo) la aumentan consiguiendo una mayor semivida. Dentro de los sustituyentes donadores no todos contribuyen igual a estabilizar la molécula. Así, el terc-butilo (**2f**, **2g**) tiene una mayor repercusión en el aumento de la semivida que la presencia del metilo (**2d**, **2e**). Sin embargo, la presencia de estos donadores favorece la hidrólisis del éster fenólico frente al éster bencilo (**step c**) por lo que compromete la liberación del d4TMP. Para solventar este problema se propusieron 2 alternativas: (i) El 7-

Meier y cols. proponen una hidrólisis química que ocurre en un medio alcalino y es independiente de cualquier reacción enzimática. Esta hidrólisis se inicia con un ataque nucleofílico S_NP de un anión hidroxilo sobre el fósforo del cicloSal triéster liberándose el anión fenolato (**step a**). El intermedio inestable de bencil-fosfato (**10**) formado sufre una ruptura espontánea (**step b1 y b2**) liberando el nucleósido monofosfato d4TMP y alcohol salicílico vía catión bencilo. El pH ligeramente básico del interior celular provocará que el nucleótido esté en su forma ionizada y no pueda difundir a través de la membrana, por lo que queda atrapado en el medio intracelular (4) (5).

Meier y cols también proponen una bioactivación hidrolítica alternativa minoritaria, (**step c**) en la que se provocaría la hidrólisis del éster bencilo. Ello llevaría a una acumulación del éster **16** que no



- 2a:** X = 5-Cl; R = H
- 2b:** X = 6-Cl; R = H
- 2c:** X = R = H
- 2d:** X = 3-Me; R = H
- 2e:** X = 3,5-Me; R = H
- 2f:** X = 3-tBu; R = H
- 2g:** X = 3,5-tBu; R = H
- 2h:** X = 3,5-tBu, 6-F; R = H
- 2i:** X = H; R = Me
- 2j:** X = 6-Cl; R = Me

Figura 5: Prototipos de cycloSal (4).

metil cicloSal-4dTMP (**2i**), que a pesar de que tiene una semivida menor que la del prototipo sin sustituir (**2c**), no favorece la formación del éster **16**. (ii) La otra estrategia para prevenir la hidrólisis del éster bencílico es la adición de un grupo aceptor (Cl, F) en la posición 6 del anillo aromático y favorecer así la hidrólisis fenólica (**2j**) que, aunque disminuiría la estabilidad del profármaco propiciaría la liberación del nucleósido monofosfato d4TMP.

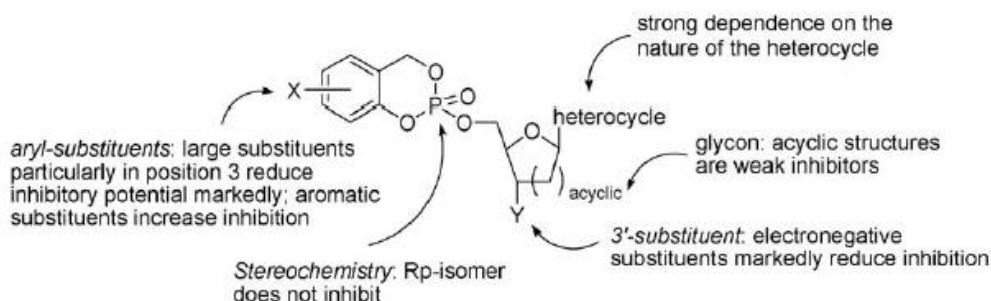


Figura 6: Esquema de la estructura del cicloSal y sus variaciones estructurales que influyen en la estabilidad y potencia ⁽⁵⁾

6.1.2 ACTIVIDAD ANTIVIRAL

En lo relativo a la actividad antiviral de los profármacos cicloSal: tras 6 horas de incubación, generan concentraciones de d4TMP 15 veces mayores a las que obtenemos cuando tratamos directamente con el nucleósido (d4T) (4). Los diastereoisómeros (S_p) muestran mayor actividad antiviral contra VIH-1 VIH-2 que los diastereoisómeros (R_p). Todos los diastereoisómeros (S_p) generan un alto grado de respuesta tanto en células CEM/0 como en células mutadas timidina-quinasa deficientes CEM/TK⁻ en las que la estavudina (d4T) era inactiva al no poder llevarse a cabo una primera fosforilación eficaz para la activación del fármaco (6). Al liberarse el nucleósido monofosfato a partir del profármaco cicloSal no están condicionadas por la primera fosforilación de la quinasa por lo que su acción no se verá mermada (7).

6.1.3 DERIVADOS CICLOSAL “LOCK-IN”

A pesar de que en principio los profármacos cicloSal descritos se bioactivan bien, la hidrólisis química tiene la desventaja de que también se produce extracelularmente durante el trayecto del profármaco hacia la célula diana. Para evitar esta pérdida de profármaco durante el proceso farmacocinético se propuso una nueva generación de profármacos cicloSal que sólo inicien su bioactivación intracelularmente por acción enzimática (cicloSal lock-in) (5) (4). Para ello se desarrollaron derivados cicloSal portadores de una cadena de propionato de alquilo.

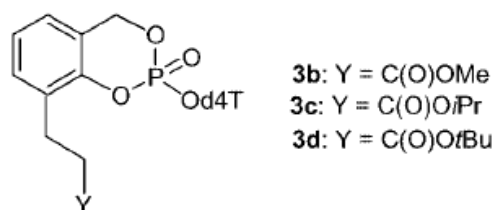


Figura 7: Ejemplos cicloSal lock-in ⁽⁵⁾

La activación en el interior del linfocito correría a cargo de una carboxiesterasa y el ácido carboxílico liberado, al estar ionizado a pH intracelular, no sería capaz de abandonar la célula (“lock-in”). Una vez hidrolizado el éster carboxílico se iniciaría la hidrólisis del fosfato triéster mediante el ataque del anión hidroxilo produciéndose la liberación del nucleósido

monofosfato d4MTP. El grupo carboxilato debe estar separado del anillo aromático por un grupo etileno (**Fig 8**) para favorecer la reacción catalítica al separarse el éster carboxílico de la nube de electrones pi del anillo aromático.

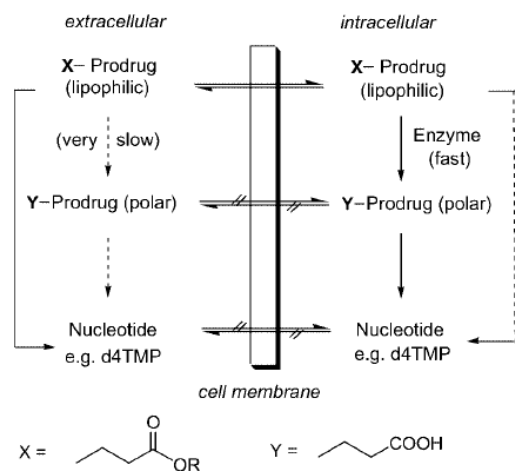


Figura 8: Hidrólisis cicloSal lock-in (4)

Los resultados obtenidos fueron bastante positivos ya que los fármacos **3b-d** demostraron una semivida 2 veces superior al 3-metil-cicloSal d4TMP. Cuando se les trataba en un medio con extracto de hígado de cerdo, el cual contenía varias esterasas, esta mayor estabilidad disminuye. En cuanto a la actividad antiviral demostró ser efectivo contra los virus VIH-1 y VIH-2 incluso en los casos con déficit de tirosina quinasas (CEM/TK⁻).

6.1.4 PRONUCLEOTIDOS CICLOSAL DE DIFERENTES ANALOGOS NUCLEOSIDICOS

El diseño de profármacos cyclosal se ha ampliado a varios nucleótidos permitiendo su aplicación frente a algunos DNA virus obteniendo resultados dispares:

- Aciclovir (ACV) y Brivudina (BVDU): Son análogos selectivos contra Herpes-virus. El diseño de cyclosal-ACV/BVDU (**Fig 9**) fue beneficioso para el tratamiento del herpes ya que, a diferencia de sus precursores, su acción es independiente de la primera fosforilación lo que les confiere actividad frente a aquellas cepas HSV-1/TK⁻ sin detectarse un aumento de la toxicidad. Además, también se obtuvieron buenos resultados frente a herpes varicela-Zoster y frente a citomegalovirus.
- También se trataron de diseñar nuevos profármacos cycloSal que aumentasen la actividad de algunos inhibidores de la DNA-polimerasa como el cidofovir (HPMPC), el adefovir (PMEA) o el tenofovir (PMPA). Estos compuestos eran muy polares por lo que su adaptación al cycloSal (**Fig 10**) mejoró su biodisponibilidad y se obtuvieron actividades frente a VIH 2-3 veces superiores a las de sus precursores PMEa y PMPA (4)

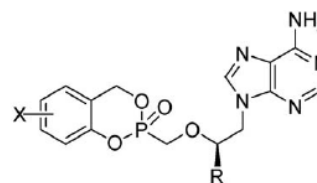
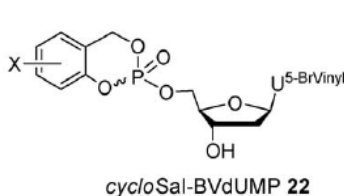
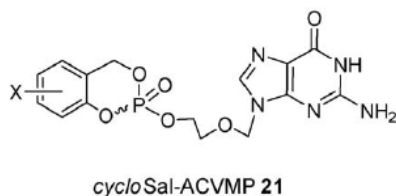


Figura 9: Estructuras cicloSal-ACVMP y cicloSal-BVdUMP

Figura 10: cicloSal-PMPA

6.2 ESTRATEGIA HEP-DIRECT

Los Hep-Direct son profármacos dirigidos al hígado que liberan el nucleósido monofosforilado selectivamente en los hepatocitos gracias a la acción de citocromo P-450 (CYP-450) y concretamente del CYP3A4 que bioactiva el profármaco por hidroxilación permitiendo la liberación del nucleósido monofosfato (NMP) (8) (11). De esta manera se consigue burlar la primera fosforilación del nucleósido por acción de las quinasas, que como sabemos es el paso limitante para la formación del nucleósido trifosfato. Adicionalmente se consigue atrapar al fármaco en su diana farmacológica, ya que el NMP se libera como anión en los hepatocitos, por lo que no puede difundir a través de la membrana (2).

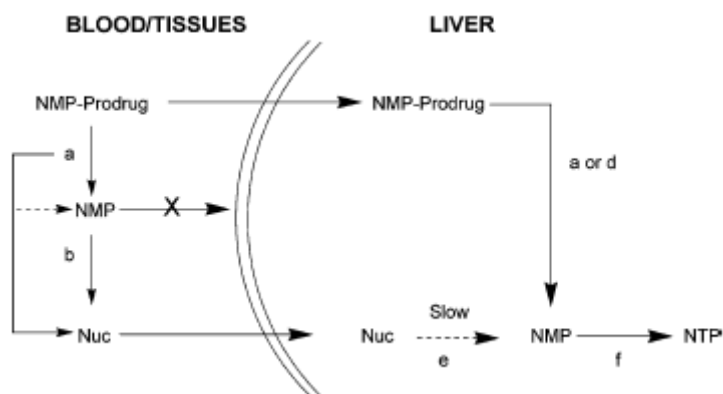


Figura 11: Ruta metabólica de los profármacos Hep-Direct (8)

Estos profármacos reúnen una serie de características que los hacen idóneos para el tratamiento de infecciones virales en el hígado o para el tratamiento de hepatocarcinoma como son la ya mencionada rápida bioactivación por el CYP3A4 expresado predominantemente en el hígado, la buena estabilidad en fase acuosa, sangre y fluidos no hepáticos, y por último la poca toxicidad asociada a estos profármacos (8).

6.2.1 HIDROLISIS: MECANISMO Y ESTRUCTURA

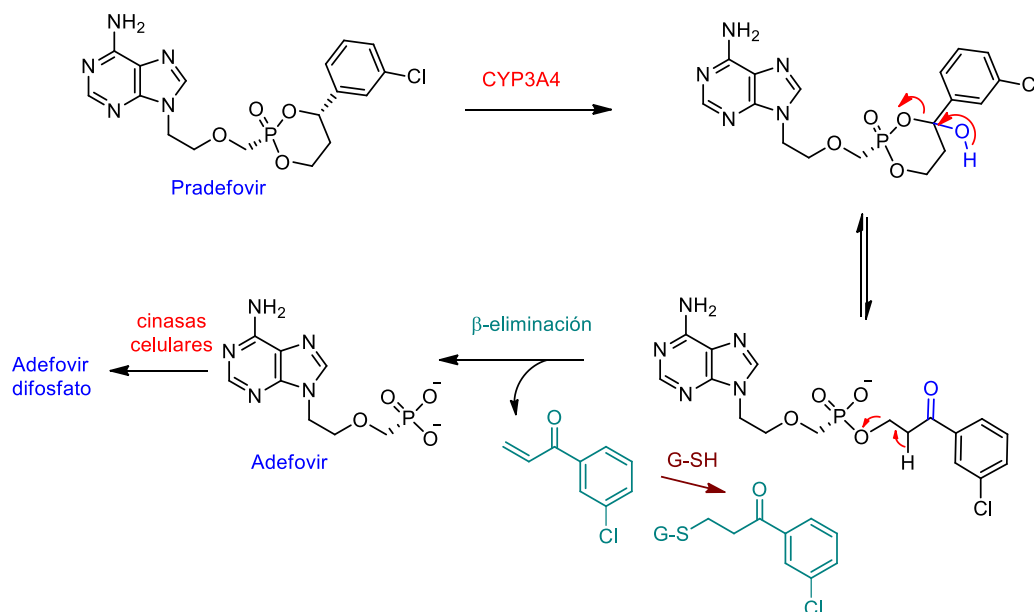


Figura 12: Mecanismo de bioactivación de los profármacos Hep-Direct (8)

La base estructural de estos profármacos es un anillo de 4-arildioxafosfinato. El citocromo CYP3A4 oxida la posición 4 del anillo (posición bencílica) favoreciendo la apertura

espontánea del anillo. La bioactivación concluye con una beta-eliminación en la que se libera el nucleósido monofosfato (**Fig 12**). No todas las isoformas del citocromo tienen la capacidad de oxidar esta posición. En un esfuerzo por analizar que subtipos inducen esta reacción se incubó el profármaco junto a varios inhibidores de varias isoformas de CYP. El único que inhibió significativamente la reacción fue el ketoconazol (8), inhibidor selectivo del CYP3A, por lo que se concluyó que los profármacos Hep-direct son activados predominantemente por el CYP3A (10).

Junto al NMP se libera una vinil cetona que generalmente se asocia a una alta citotoxicidad y genotoxicidad, ya que es un compuesto altamente electrofílico (puede provocar alquilaciones por reacción de Michael). En el hígado estos productos deben ser detoxificados por conjugación con el glutatión (**Fig 12**).

Para que un profármaco Hep-Direct tenga éxito es necesario que:

- La presencia del sustituyente en posición 4 del anillo sea aromático. Al convertirse C4 en posición bencílica, se favorece la hidroxilación por parte del CYP-450 en esta posición.
- La activación del profármaco es dependiente de la relación estereoquímica entre los dos estereocentros C4 y P, los sustituyentes de estos estereocentros han de estar en posición *cis* para que se realice la oxidación y se pueda abrir el ciclo.

6.2.2 PRADEFOVIR

El pradefovir es un profármaco Hep-Direct del adefovir. El adefovir ha demostrado una alta efectividad *in vitro* frente a la hepatitis B (VHB) (13). La baja selectividad del adefovir por el hígado hace que la actividad terapéutica del fármaco se vea comprometida cuando lo administramos vía oral y además, también puede originar problemas de toxicidad renal. La aplicación de la tecnología Hep-Direct soluciona estos problemas farmacocinéticos. La escisión del profármaco se inicia en los hepatocitos con la oxidación catalizada por la isoenzima CYP3A4 lo que deriva en una menor toxicidad del fármaco ya que disminuye los niveles basales del mismo. (12)

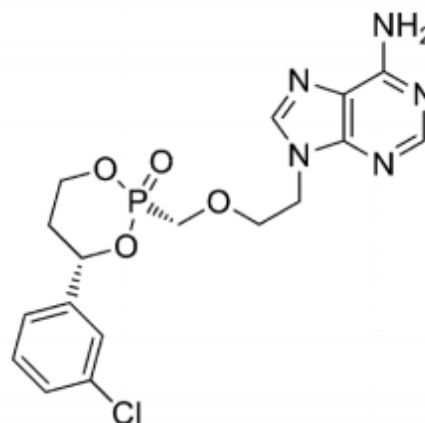


Figura 13: Pradefovir ¹⁹

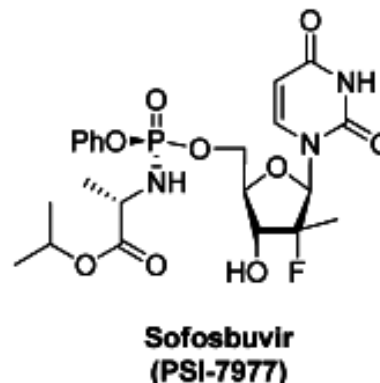
Inicialmente, pradefovir y adefovir se sometieron a ensayos clínicos en ratas y monos (11). Los resultados mostraron mayores concentraciones de adefovir en el tracto gastrointestinal y en riñón, mientras que para el pradefovir se obtuvieron niveles 15 veces superiores en hígado y 3 veces menores en el riñón. En estos ensayos también se quiso evaluar el papel que desempeña el intestino en la liberación de adefovir, ya que el intestino también presenta isoenzimas CYP3A4. Los niveles de adefovir en el plasma portal eran mucho menores que los del plasma sistémico por lo que se concluyó que la baja actividad de CYP3A4 en el intestino, junto con el tránsito rápido del pradefovir por el intestino hacen que el metabolismo intestinal del fármaco no sea significativo.

Estudios recientes realizados en pacientes humanos evaluaron aspectos como: seguridad, farmacocinética o la farmacogenética del pradefovir (13) (14). Estos fármacos demostraron un buen perfil de tolerabilidad para dosis diarias hasta 120mg. Por último, también se

demonstró que la biodisponibilidad del profármaco aumentaba al administrarlo en forma de sal de mesilato (15).

6.3 PROFÁRMACOS TIPO NUCLEÓSIDO MONOFOSFATO 3',5'-CÍCLICOS.

Los profármacos tipo nucleósido monofosfato 3',5'-cíclicos son profármacos de nucleósidos monofosfato que liberan de forma selectiva el fármaco a nivel hepático gracias a la acción de enzimas oxidativas (CYP3A4). Esta nueva línea de profármacos surgió como alternativa a los ariloxifosforamidatos (Protide) diseñados por McGuigan, 1990 (**Fig 14**), los cuales supusieron un avance importante para el tratamiento de la hepatitis C con el sofosbuvir y tienen asimismo aplicación en el tratamiento de hepatitis B crónica e infecciones de HIV con el tenofovir alafenamida.



En la actualidad hay una serie de profármacos Protide en ensayos clínicos como antineoplásicos y antivirales.

Figura 14: Sofosbuvir, ejemplo de profármaco "Protide" [\[1\]](#)

La finalidad de los profármacos tipo nucleósido monofosfato 3',5'-cíclicos es diseñar una nueva línea de profármacos que igualaran la eficacia antiviral de los Protide, eliminando la toxicidad asociada al grupo fenol que se libera en la activación. Estos nuevos profármacos presentan un mecanismo de activación diferente, más seguro, pero que siguen teniendo el hígado como diana (18).

6.3.1 PSI-352938

PSI-352938 es el primer profármaco tipo nucleósido monofosfato 3',5'-cíclico estudiado para el tratamiento del virus de la Hepatitis C (HCV). La estructura del profármaco (**Fig 15**) surge como resultado de varios estudios SAR (estudios de relación estructura-actividad), en los que se analizaron varios profármacos fosfato 3',5'-cíclicos con diferentes sustituyentes, con la finalidad de encontrar el fármaco óptimo para el tratamiento de la hepatitis C (20). El isopropil-derivado que surgió de este estudio confiere a la molécula estabilidad hidrolítica y liposolubilidad, lo que ayudará a la molécula a alcanzar la diana, donde se activa selectivamente por CYP3A4, liberará el nucleótido, y ejercerá, por tanto, su acción inhibidora de la NS5B RNA-polimerasa del virus de la hepatitis C (19).

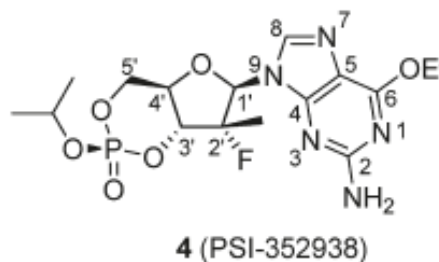


Figura 15: β -D-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-metilguanosa-5'-monofosfato [\[20\]](#)

6.3.1.1 MECANISMO DE HIDROLISIS. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD

El mecanismo de activación está basado en la acción oxidativa del CYP3A4, que se realizará selectivamente en los hepatocitos y se representa en el siguiente esquema. (Fig. 16) (19).

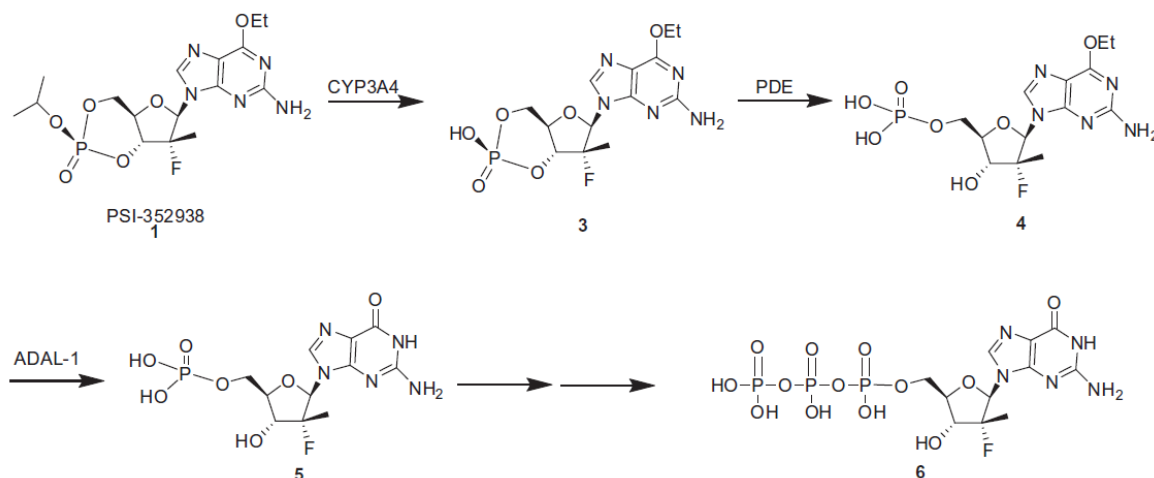


Figura 16: Metabolismo de hidrolisis y activación del profármaco PSI-352938 (19)

- La bioactivación del sistema de ciclo 3',5'-fosfato comienza por la oxidación del C-2 del isopropilo por parte de CYP3A4. Los estudios metabólicos han demostrado que es la única isoenzima que media en este paso, ya que el ketoconazol, ritonavir, y otros inhibidores del CYP3A4 disminuían el metabolismo de PSI-352938. La oxidación del carbono secundario del isopropilo forma un intermedio hemiacetal que seguido de una hidrolisis espontanea libera el nucleósido monofosfato aún en forma cíclica y acetona.
- El segundo paso consiste en la rotura del sistema de fosfato 3,5-cíclico por acción de las fosfodiesterasas presentes en el hígado (PDE2A, PDE9A, PDE5A1, PDE11A4). El metabolito pierde liposolubilidad y quedará atrapado en el hepatocito por lo que no podrá atravesar la membrana.
- En el caso del PSI-352938 se requiere una bioactivación adicional consistente en la eliminación del grupo etilo en O^{C6} que es catalizado por la enzima adenosindeaminasa (ADAL1). Una vez liberado el nucleósido monofosfato éste debe transformarse en su derivado activo trifosfato por acción de quinasas.

Se han realizado numerosos estudios SAR sobre estructuras análogas al PSI-352938. Estos ensayos han demostrado que la O-alkilación en la posición 6 de la base púrica mejoraba la biodisponibilidad del fármaco en la diana cuando se administraban por vía oral, demostrándose que el O⁶-etilo era el sustituyente que mostraba una mayor proporción de formación del trifosfato en el hígado. Los profármacos de 3',5'-ciclofosfato han mostrado una alta eficacia anti-VHC en ensayos in vitro y en ensayos clínicos en humanos, además de no mostrar signos de citotoxicidad (20).

6.4 ESTRATEGIA ALCOXIALQUIL MONOESTERES DE FOSFATO Y FOSFONATO

Son una nueva generación de profármacos de nucleótidos en los que el grupo fosfato está enmascarado como monoéster alcoxilquilo de una cadena alifática larga. Estos nuevos profármacos muestran un aumento de la potencia del fármaco, ligada a un aumento de la biodisponibilidad oral, y una disminución de la nefrotoxicidad. Esta nueva estrategia de enmascaramiento se está aplicado a diversos fármacos con el fin de diseñar nuevas moléculas más efectivas para el tratamiento de numerosas enfermedades virales (VHB, VIH, CMV, Poxvirus, HSV, virus del papiloma humano, etc...). La esterificación con hexadeciloxipropilo ha demostrado ser una de las más eficaces.

6.4.1 MECANISMO DE ACTIVACIÓN

El diseño de estos profármacos se inspira en la estructura de la lisofosfatidilcolina (22), un fosfolípido parcialmente degradado a partir de la fosfatidilcolina por la acción de la fosfolipasa A₂ y que atraviesa fácilmente la membrana celular. De esta manera el profármaco surge de sustituir la colina por el nucleósido monofosfato o fosfonato. Además, son necesarios otros cambios adicionales que dan estabilidad a la molécula:

- Se reemplaza la función éster el C-3 de la glicerina por un enlace éter, lo cual aumenta la estabilidad frente a la fosfolipasa pancreática e impide la escisión en el tracto GI.
- Se sustituye el grupo hidroxilo del C-2 de la glicerina por un H para evitar la re-acilación de la función -OH libre por lisofosfatidilcolina aciltransferasas y evitar así la formación de diacilfosfatidil nucleósidos, de absorción baja.

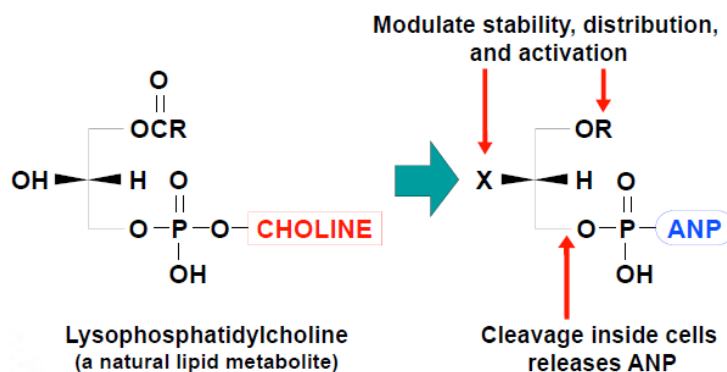


Figura 17: Comparación lisolecitina, con alcoxilquilo monoesteres

Se cree que el profármaco pasa a la célula por difusión espontánea, pero este paso también puede estar catalizado por las flipasas (22). Una vez dentro de la célula libera el nucleósido monofosfato por acción enzimática, por ejemplo, por acción de fosfolipasa C, y por acción de las quinasas formará un nucleótido trifosfato que ejercerá su acción inhibitoria de las polimerasas.

Los profármacos lipídicos presentaron un perfil de seguridad mucho mayor que los fármacos originales. Un ejemplo es el cidofovir: Este fármaco, cuando se administraba por vía intraperitoneal, aparecía en altas concentraciones en riñón. Esta acumulación del fármaco o de sus metabolitos en el túbulo renal es responsable de la nefrotoxicidad que induce el fármaco por esta vía. Los profármacos alcoxi-alquil monoésteres eliminan estos problemas de toxicidad renal ya que llegan inalterados a la célula diana donde se bioactivarán.

6.4.2 TENOFOVIR EXALIDEX (HDP-TENOFOVIR), CMX157 [HDP-(S)-HPMA]

Tenofovir exalidex (CMX157) es el profármaco lipídico (1-O-hexadeciloxipropilo) del tenofovir (TFV), activo contra VIH-1 y Hepatitis B. Se ha estudiado la potencia del CMX157 frente a VIH y el VHB, así como su toxicidad obteniéndose los siguientes resultados:

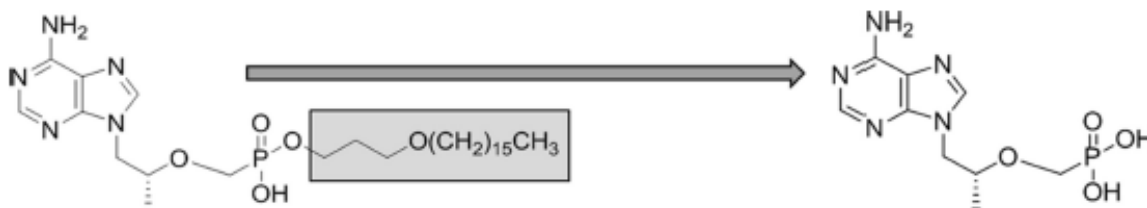


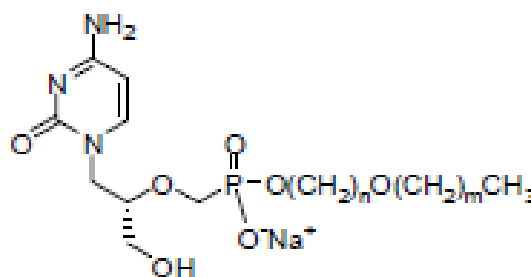
Figura 18: Estructuras CM157 (1) y TFV (2). El hexadeciloxipropilo se escinde dentro de la célula liberando TFV (24)

- Con respecto a la actividad inhibitoria de la replicación del VHB los resultados de dos ensayos (25) demostraron una actividad 4.5-4.6 veces superior que la de su precursor tenofovir (TFV).
- La actividad antiviral del CMX157 contra VIH-1 virus se evaluó en dos ensayos (MT-2, PBMC) que han demostrado una actividad antiviral 260 veces mayor. Pero también han mostrado una mayor citotoxicidad, debido a la mayor conversión celular a TFV-PP.
- Para testar la seguridad del profármaco, se realizaron estudios de toxicidad oral ratas tratadas con dosis de 10, 30 y 100 mg/Kg/día durante 7 días en los que no se detectó ningún atisbo de daño renal, ni tampoco alguna variación en el peso, en la ingesta de alimento o alguna variación en los parámetros bioquímicos o hematológicos de la sangre, así como en los análisis de orina y los análisis microbiológicos.

Estos resultados muestran el avance que supone CMX157 para el tratamiento de las infecciones por VIH y por el HBV, ya que al administrarlo por vía oral la liberación del fármaco en su diana es mayor, lo que se traduce en una mayor actividad y una mejora sustancial de la seguridad del tratamiento, lo que le hace idóneo para el tratamiento de estas infecciones (24) (25).

6.4.3 BRINCIDOFOVIR (HDP-CDV) (CMX001)

Es un nuevo profármaco éter-lípido conjugado de cidofovir (CDV) que está en estudio de fase II contra adenovirus, citomegalovirus, virus del ébola y virus de la viruela (30) (31) [(S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxypropil)-citosina] que ha demostrado una alta actividad frente a la viruela (orto-poxvirus) en comparación con el CDV. La porción lipídica de HDP-CDV se



escinde dentro de la célula liberando CDV que se convierte en su metabolito difosfato ejerciendo acción inhibitoria sobre la replicación del virus.

Figura 19: Estructura brincidofovir (HDP-CDV) (15)

La biodisponibilidad oral del brincidofovir es superior a la del CDV gracias a que su estructura lipídica le permite usar la vía de absorción de las lecitinas. Es por ello, que las concentraciones celulares del fármaco aumentan con respecto a CDV, lo que conlleva paralelamente una disminución de la nefrotoxicidad (27).

6.4.4 HEXADECILOXIPROPIL-CITARABINA (HDP-P-Ara-C) y (HDP-cP-Ara-C)

Estos nuevos profármacos lipídicos de citarabina se han diseñado para la administración intraocular de pacientes con vitreoretinopatía proliferativa, que es una enfermedad que cursa con proliferación de células retinianas, sobre todo del epitelio pigmentario de la retina y de células gliales, dentro del humor vítreo. Esta patología tiene una prevalencia alta en personas intervenidas por un desprendimiento de retina reparable. Normalmente esta patología se trata con agentes anti-proliferativos como daunorubicina o el 5-fluorouracilo (5-FU). Estos nuevos profármacos surgen de la necesidad de diseñar tratamientos que pudieran ser administrados vía intravítrea y que gozasen de una semivida larga. La citarabina inhibe la proliferación celular en la retina impidiendo la replicación del DNA mediante la inhibición de las polimerasas. Además, la citarabina también ha mostrado mejor actividad anti-proliferativa in vitro en el pigmento retiniano y en células epiteliales y fibroblásticas que el 5-fluorouracilo (23).

Por todo ello se estudió la aplicación de profármacos de citarabina para el diseño de nuevos tratamientos más efectivos contra esta patología. En este caso estudiamos (HDP-P-Ara-C) y su derivado 3',5'cíclico (HDP-cP-Ara-C). Los resultados de los estudios publicados (23) revelaron una actividad antiproliferativa mayor que la citarabina (Ara-C) sin modificar. Además, los profármacos alcoxi-alquil éter aumentan la permeabilidad a través de la membrana de la molécula obteniéndose concentraciones intracelulares más altas del fármaco y sus metabolitos que la citarabina, lo que se traduce en una mayor potencia antiviral. Sin embargo, ambos fármacos no eran igual de efectivos ya que la semivida del profármaco acíclico (HDP-P-Ara-C) es menor que la de su análogo cíclico (HDP-cP-Ara-C). Esta diferencia en la semivida se debe a la capacidad de micelación que tiene HDP-P-Ara-C. Si observamos su estructura, vemos como tiene cierta analogía con los fosfolípidos, este carácter anfipático favorece la formación de micelas que difunden rápidamente por las membranas provocando un aclaramiento más rápido. Por ello, para aumentar la semivida de estos profármacos, se diseñó el HDP-cP-Ara-C que se transforma más lentamente en HDP-P-Ara-C derivando en una semivida del fármaco mayor.

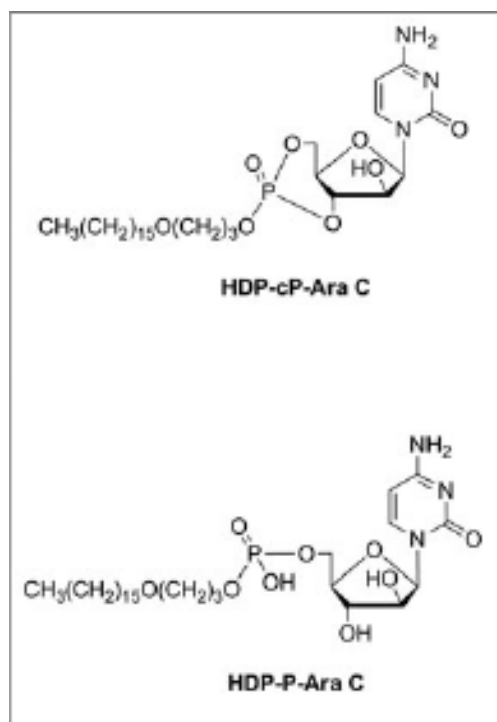


Figura 20: Estructuras (HDP-P-Ara-C) y (HDP-cP-Ara-C) ^[23]

En relación a la toxicidad se ha detectado que el uso de la citarabina puede derivar en la formación de cataratas. Por ello en futuros estudios es necesaria una estrecha monitorización para asegurar que la citarabina esté dentro de los niveles seguros.

6.4.5 ODE-Bn-PMEG

ODE-Bn-PMEG (octadeciloxietil bencil 9-[(2-fosfonometoxi) etil]guanina) es un profármaco lipídico de la 9-[2-(fosfonometoxi)etil]guanina (PMEG) diseñado para el tratamiento de los genotipos más peligrosos del virus del papiloma humano (HPV-16, HPV-18) que causan

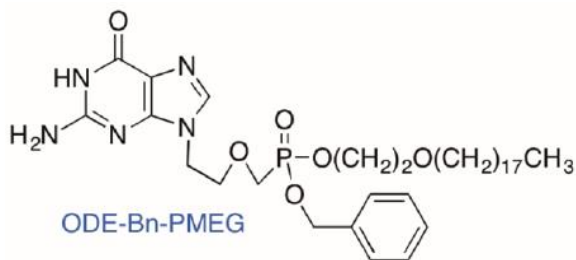


Figura 21: Estructura ODE-Bn-PMEG ^[28]

carcinomas anogenitales (29). Además es activo contra melanoma, leucemia y herpes virus. El fármaco se libera en las células infectadas en estado pre-neoplásico, aboliendo la replicación de DNA del virus, de manera que impedimos la síntesis de nuevos virus. Por último, induce a la apoptosis a las células infectadas impidiendo el desarrollo del tumor. Todas estas características hacen al profármaco un gran candidato para estudio en futuros ensayos clínicos (28).

7 CONCLUSIONES

El desarrollo de profármacos de nucleósidos monofosfato supone un avance importante en la terapia antiviral y antineoplásica, ya que permite una bioactivación más rápida y eficaz hacia el fármaco que es el nucleósido trifosfato. Las estrategias diseñadas para liberar con éxito el fármaco en su diana se pueden resumir en dos: el diseño de profármacos que son ésteres de nucleósidos monofosfato y profármacos que son amidas de nucleósidos monofosfato. En este trabajo hemos centrado el foco en los profármacos de tipo éster que al día de hoy aún están en fase de desarrollo, entre los que destacan cuatro tipos: los profármacos cicloSal y sus derivados “lock-in”, los profármacos HepDirect, los nucleósidos monofosfato 3',5'- cíclicos y los profármacos de tipo alcoxialquil monoéster.

Los resultados obtenidos para estos diferentes profármacos tienen en común una mejora de la biodisponibilidad oral, mayores perfiles de seguridad y mayor eficacia a menores dosis efectivas del fármaco. A ello contribuyen una mayor liposolubilidad, una bioactivación en algunos casos muy selectiva en el sitio de acción y una mayor estabilidad hidrolítica que se consiguen por el enmascaramiento del grupo fosfato polar de estos nucleósidos monofosfato.

Los profármacos cicloSal liberan el fármaco por hidrólisis química en un medio levemente alcalino intracelular lo cual deriva en una mayor actividad antiviral en el sitio de acción. Se ha observado que los diastereoisómeros (S_P) muestran la mayor actividad antiviral. Al tratarse de una hidrólisis química espontánea, parte del profármaco se destruye en la trayectoria hacia el órgano diana por lo que se han diseñado los derivados “lock-in”

Los profármacos Hep-Direct tienen la ventaja de ser liberados en el hígado, donde se consiguen elevadas concentraciones de fármaco, gracias a la presencia abundante y bastante selectiva del CYP3A4 en los hepatocitos. En este proceso de bioactivación se pueden liberar adicionalmente arilvinilcetonas capaces de producir alquilaciones en proteínas y DNA. Estos metabolitos tóxicos serían detoxificados por el organismo gracias a la enzima GST (glutathion-S-transferasa).

Los profármacos de nucleósido monofosfato 3',5'-cíclico también liberan el fármaco selectivamente en el hígado aprovechando la presencia del citocromo CYP3A4 y a diferencia de los HepDirect eluden la toxicidad asociada al metabolito arilvinilcetona.

Finalmente, los profármacos de nucleósido monofosfato de tipo alcoxilquilmonoéster presentan cierta analogía con la molécula de lecitina, lo cual les permite difundir a través de las membranas celulares y les confiere una mayor estabilidad química dentro del organismo. Estos profármacos muestran actividad muy prometedora frente a numerosas enfermedades antivirales. Destacan especialmente los hexadeciloxipropil derivados como el tenofovir exalidex (VIH, VHB), el brincidofovir (poxvirus, adenovirus, herpesvirus) y el HPD-cP-AraC (vitreo-retinopatía) y los octadeciloxietil derivados como el ODE-Bn-PMEG (HPV).

8 BIBLIOGRAFIA

- [1] Pradere U, Garnier-Amblard EC, Coats SJ, Amblard F, Schinazi RF. Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chem Rev.* 24 de septiembre de 2014;114(18):9154-218.
- [2] Mehellou Y. The ProTides Boom. *ChemMedChem.* 6 de junio de 2016;11(11):1114-6.
- [3] Rios Morales EH, Balzarini J, Meier C. Stereoselective synthesis and antiviral activity of methyl-substituted cycloSal-pronucleotides. *J Med Chem.* 23 de agosto de 2012;55(16):7245-52.
- [4] Meier C. cycloSal-pronucleotides design of chemical trojan horses. *Mini Rev Med Chem.* junio de 2002;2(3):219-34.
- [5] Meier C, Balzarini J. Application of the cycloSal-prodrug approach for improving the biological potential of phosphorylated biomolecules. *Antiviral Research.* 1 de septiembre de 2006;71(2):282-92.
- [6] Gisch N, Pertenbreiter F, Balzarini J, Meier C. 5-(1-Acetoxyvinyl)-cycloSaligenyl-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine monophosphates, a second type of new, enzymatically activated cycloSaligenyl pronucleotides. *J Med Chem.* 25 de diciembre de 2008;51(24):8115-23.
- [7] Gisch N, Balzarini J, Meier C. Studies on enzyme-cleavable dialkoxymethyl-cycloSaligenyl-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine monophosphates. *J Med Chem.* 13 de noviembre de 2008;51(21):6752-60.
- [8] Erion MD, Reddy KR, Boyer SH, Matelich MC, Gomez-Galeno J, Lemus RH, et al. Design, synthesis, and characterization of a series of cytochrome P(450) 3A-activated prodrugs (HepDirect prodrugs) useful for targeting phosph(on)ate-based drugs to the liver. *J Am Chem Soc.* 28 de abril de 2004;126(16):5154-63.
- [9] Huttunen KM, Tani N, Juvonen RO, Raunio H, Rautio J. Design, synthesis, and evaluation of novel cyclic phosphates of 5-aminosalicylic acid as cytochrome p450-activated prodrugs. *Mol Pharm.* 4 de febrero de 2013;10(2):532-7.

- [10] Reddy PG, Chun B-K, Zhang H-R, Rachakonda S, Ross BS, Sofia MJ. Stereoselective synthesis of PSI-352938: a β -D-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyl-3',5'-cyclic phosphate nucleotide prodrug for the treatment of HCV. *J Org Chem*. 20 de mayo de 2011;76(10):3782-90.
- [11] Lin C-C, Yeh L-T, Vitarella D, Hong Z, Erion MD. Remofovir mesylate: a prodrug of PMEA with improved liver-targeting and safety in rats and monkeys. *Antivir Chem Chemother*. noviembre de 2004;15(6):307-17.
- [12] Reddy KR, Matelich MC, Ugarkar BG, Gómez-Galeno JE, DaRe J, Ollis K, et al. Pradefovir: a prodrug that targets adefovir to the liver for the treatment of hepatitis B. *J Med Chem*. 14 de febrero de 2008;51(3):666-76.
- [13] Ding Y, Zhang H, Li X, Li C, Chen G, Chen H, et al. Safety, pharmacokinetics and pharmacogenetics of a single ascending dose of pradefovir, a novel liver-targeting, anti-hepatitis B virus drug, in healthy Chinese subjects. *Hepatol Int*. 2017;11(4):390-400.
- [14] Xiao Q, Wang D, Yang W, Chen L, Ding Y, Yang J. Simultaneous determination of pradefovir, PMEA and tenofovir in HBV patient serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application to phase 2 clinical trial. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1 de junio de 2016; 1022:133-40.
- [15] Thornton PJ, Kadri H, Miccoli A, Mehellou Y. Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrug Clinical Candidates. *J Med Chem*. 08 de 2016;59(23):10400-10.
- [16] Lam AM, Espiritu C, Bansal S, Micolochick Steuer HM, Zennou V, Otto MJ, et al. Hepatitis C virus nucleotide inhibitors PSI-352938 and PSI-353661 exhibit a novel mechanism of resistance requiring multiple mutations within replicon RNA. *J Virol*. diciembre de 2011;85(23):12334-42.
- [17] Pradere U, Garnier-Amblard EC, Coats SJ, Amblard F, Schinazi RF. Synthesis of nucleoside phosphate and phosphonate prodrugs. *Chem Rev*. 24 de septiembre de 2014;114(18):9154-218.
- [18] Chang W, Bao D, Chun B-K, Naduthambi D, Nagarathnam D, Rachakonda S, et al. Discovery of PSI-353661, a Novel Purine Nucleotide Prodrug for the Treatment of HCV Infection. *ACS Med Chem Lett*. 17 de diciembre de 2010;2(2):130-5.
- [19] Du J, Bao D, Chun B-K, Jiang Y, Reddy PG, Zhang H-R, et al. β -D-2'- α -F-2'- β -C-Methyl-6-O-substituted 3',5'-cyclic phosphate nucleotide prodrugs as inhibitors of hepatitis C virus replication: a structure-activity relationship study. *Bioorg Med Chem Lett*. 15 de septiembre de 2012;22(18):5924-9.
- [20] Reddy PG, Bao D, Chang W, Chun B-K, Du J, Nagarathnam D, et al. 2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyl 3',5'-cyclic phosphate nucleotide prodrug analogs as inhibitors of HCV NS5B polymerase: discovery of PSI-352938. *Bioorg Med Chem Lett*. 15 de diciembre de 2010;20(24):7376-80.
- [21] Niu C, Tolstykh T, Bao H, Park Y, Babusis D, Lam AM, et al. Metabolic activation of the anti-hepatitis C virus nucleotide prodrug PSI-352938. *Antimicrob Agents Chemother*. julio de 2012;56(7):3767-75.

- [22] Hostetler KY. Synthesis and early development of hexadecyloxypropylcidofovir: an oral antipoxvirus nucleoside phosphonate. *Viruses*. octubre de 2010;2(10):2213-25.
- [23] Kim JS, Beadle JR, Freeman WR, Hostetler KY, Hartmann K, Valiaeva N, et al. A novel cytarabine crystalline lipid prodrug: hexadecyloxypropyl cytarabine 3',5'-cyclic monophosphate for proliferative vitreoretinopathy. *Mol Vis*. 2012; 18:1907-17.
- [24] Lanier ER, Ptak RG, Lampert BM, Keilholz L, Hartman T, Buckheit RW, et al. Development of hexadecyloxypropyl tenofovir (CMX157) for treatment of infection caused by wild-type and nucleoside/nucleotide-resistant HIV. *Antimicrob Agents Chemother*. julio de 2010;54(7):2901-9.
- [25] Painter GR, Almond MR, Trost LC, Lampert BM, Neyts J, De Clercq E, et al. Evaluation of hexadecyloxypropyl-9-R-[2-(Phosphonomethoxy)propyl]- adenine, CMX157, as a potential treatment for human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis B virus infections. *Antimicrob Agents Chemother*. octubre de 2007;51(10):3505-9.
- [26] Hartline CB, Gustin KM, Wan WB, Ciesla SL, Beadle JR, Hostetler KY, et al. Ether lipid-ester prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates: activity against adenovirus replication in vitro. *J Infect Dis*. 1 de febrero de 2005;191(3):396-9.
- [27] Painter GR, Hostetler KY. Design and development of oral drugs for the prophylaxis and treatment of smallpox infection. *Trends Biotechnol*. agosto de 2004;22(8):423-7.
- [28] Banerjee NS, Wang H-K, Beadle JR, Hostetler KY, Chow LT. Evaluation of ODE-Bn-PMEG, an acyclic nucleoside phosphonate prodrug, as an antiviral against productive HPV infection in 3D organotypic epithelial cultures. *Antiviral Res*. 2018; 150:164-73.
- [29] Beadle JR, Valiaeva N, Yang G, Yu J-H, Broker TR, Aldern KA, et al. Synthesis and Antiviral Evaluation of Octadecyloxyethyl Benzyl 9-[(2-Phosphonomethoxy) ethyl]guanine (ODE-Bn-PMEG), a Potent Inhibitor of Transient HPV DNA Amplification. *J Med Chem*. 08 de 2016;59(23):10470-8.
- [30] Hostetler KY. Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: current state of the art. *Antiviral Res*. mayo de 2009;82(2): A84-98.
- [31] Chen M, Hou J, Tan G, Xie P, Freeman WR, Beadle JR, et al. A novel lipid prodrug strategy for sustained delivery of hexadecyloxypropyl 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl] guanine (HDP-PMEG) on unwanted ocular proliferation. *Drug Deliv*. noviembre de 2017;24(1):1703-12.
- [32] Rautio J, Kärkkäinen J, Sloan KB. Prodrugs - Recent approvals and a glimpse of the pipeline. *Eur J Pharm Sci*. 15 de noviembre de 2017; 109:146-61.