



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
PROFÁRMACOS DE NUCLEÓTIDOS:  
PROTIDES.**

Autor: María Cantón Navarro.

Convocatoria: Junio 2019.

Tutor: Prof. Mónica M<sup>a</sup> Söllhuber Kretzer.

## **1. RESUMEN**

Los análogos de nucleósidos se han convertido en una herramienta clave como agentes antivirales y antineoplásicos. Su uso clínico se ve limitado por factores farmacocinéticos que mejoren su paso a la célula diana. Una vez en el interior de la célula debe producirse una bioactivación al nucleósido trifosfato, que en muchos casos es deficiente por realizarse una bioactivación insuficiente al nucleósido monofosfato inicial. Así surgió la necesidad de diseñar profármacos cuyo objetivo era resolver estas limitaciones a través de la administración de nucleótidos precursores portadores del grupo monofosfato/fosfonato en su estructura, que puedan ser activados fácilmente al derivado trifosforilado, es decir, a la especie activa responsable de interferir en la biosíntesis del ADN o ARN.

En los últimos 25 años se han diseñado diferentes estrategias para diferentes profármacos de nucleósido monofosfato entre los que la estrategia ProTide ocupa un lugar destacado. En este trabajo nos centraremos en el avance de la estrategia ProTide (ariloxifosforamidato), su mecanismo de activación *in vivo* y su aplicación a compuestos de uso terapéutico como el sofosbuvir o el tenofovir alafenamida, y a nuevos fármacos en estudio como el acelarin, la stampidina, el remdesvir, NUC- 3373 y otros.

## **1. ABSTRACT**

Nucleoside analogs have become a key tool as antiviral and antineoplastic agents. Their clinical use is limited by pharmacokinetic factors that improve their passage to the target cell. Once inside the cell, a bioactivation to the nucleoside triphosphate must take place, which in many cases is deficient due to an insufficient bioactivation of the initial nucleoside to the monophosphate derivative. That is how the need to design prodrugs of nucleotide precursors carrying the monophosphate / phosphonate group in their structure, which can easily be activated to triphosphorylated derivatives, was necessary to solve these limitations and so get the active species responsible for interfering with the biosynthesis of DNA or RNA.

In the last 25 years different strategies have been designed for different nucleoside monophosphate prodrugs, among which the ProTide strategy occupies a prominent place. In this work we will focus on the progress of the ProTide strategy (aryloxyphosphoramidates), their activation mechanism *in vivo* and their application to drugs in medical such as sofosbuvir and tenofovir alafenamide, and the application to new drugs under study like acelarin, stampidin, remdesvir, NUC-3373 and others.

## 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los nucleósidos están formados por la unión de una pentosa (ribosa o desoxirribosa) y una base nitrogenada o nucleobase (púrica o pirimidíca). La unión entre el nucleósido y el ácido fosfórico en posición 5' da lugar al nucleósido monofosfato, que se transforma en el nucleósido trifosfato por acción de cinasas celulares. Los nucleótidos así formados se unen entre sí por enlaces fosfodiéster para formar los ácidos nucleicos ARN y ADN.

Los análogos de nucleósidos llevan en la clínica casi 50 años y se han convertido en pilares muy importantes en el tratamiento de pacientes con enfermedades víricas y cáncer.

El factor limitante en la utilización de los antivirales y antineoplásicos nucleosídicos es su pobre farmacocinética que no permite una bioactivación eficaz hacia la especie activa, el nucleósido trifosfato, como se observa en la figura 1. En gran parte de estos fármacos, la etapa limitante de esta bioactivación es el proceso de fosforilación inicial al nucleósido monofosfato (figura 1A). Esto ha impulsado la idea de administrar directamente el derivado monofosforilado, pero su poca estabilidad frente a las enzimas hidrolíticas del organismo, empezando por la fosfatasa alcalina intestinal, y la ionización del grupo fosfato a pH fisiológico hacen imposible esta tarea, especialmente si se busca su aplicación por vía oral (figura 1B).

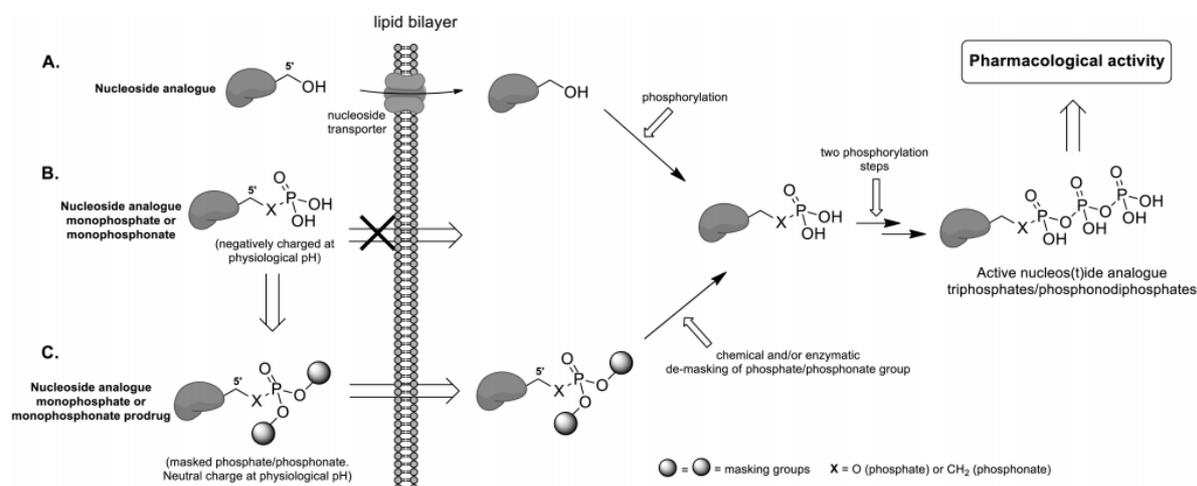


Figura 1.- Entrada de nucleósidos y sus profármacos a través de la membrana plasmática (23).

La alternativa sería enmascarar el grupo fosfato y convertirlo en el éster o la amida correspondiente para evitar por una parte su rápida hidrólisis por fosfatasas y por otra parte evitar la ionización del grupo fosfato. Al aumentar de esta forma la lipofilia de la molécula, se favorece adicionalmente la difusión pasiva por las membranas, logrando de esta forma una mayor concentración de la especie activa en el interior de la célula (figura 1C).

En este sentido se han diseñado diversas estrategias para obtener profármacos de nucleósidos monofosfato de las cuales algunas ya tienen ejemplos de uso terapéutico y otras están aún en fase de desarrollo. Entre las estrategias que de momento tienen mayor aplicación clínica están los ésteres de tipo carboniloximetilo POM (bis-pivaloiloioximetilo)(1) y POC (bis-isopropiloxicarboniloximetilo)(2) con sus representantes adefovir dipivoxilo (2002, hepatitis B (VHB)) y tenofovir disoproxilo (2001, HIV; 2008, VHB), y los profármacos que emplean la estrategia ProTide entre los que están el innovador sofosbuvir introducido en 2013 para el tratamiento de la hepatitis C (VHC) y el tenofovir alafenamida introducido en 2015 para el tratamiento del VIH.

Entre las diversas estrategias de profármacos que han alcanzado los ensayos clínicos hay varios muy prometedores. Entre ellos, son de destacar los alquiloialquil monoésteres de Hostetler y col. (3) que incluyen una serie de compuestos actualmente en estudio como son el brincidofovir para el tratamiento de infecciones víricas causadas por CMV, adenovirus, virus de la viruela y del ébola, y el hexadeciloxipropil-tenofovir para el tratamiento de VHB y VIH. Así mismo se pueden mencionar otras estrategias de diseño como son los HepDirect (4), de bioactivación selectiva en el hígado y cuyo principal representante es el pradefovir, los fosfatos 3',5'-cíclicos (5) que también se bioactivan en el hígado de forma selectiva y entre los que se ha estudiado el PSI-352938 contra la hepatitis C, y los fosfonodiamidatos (6) como es GS-9191 evaluado como antiviral y como antineoplásico.

Finalmente, entre las muchas estrategias de diseño de profármacos de nucleósidos monofosfato que aún están en desarrollo, se pueden mencionar como más relevantes los ésteres de ciclosaligenilo o cicloSal (7) y los bis-S-aciltioetil ésteres o Bis-SATE (8).

Entre todas las diversas estrategias mencionadas, los profármacos ProTide son seguramente los que presentan las mejores opciones para una aplicación generalizada, que no sólo se va a restringir a los nucleósido monofosfato sino también a otros fármacos portadores de la función fosfato, por lo que serán el objeto de estudio en este trabajo.

### **3. OBJETIVOS**

Como se ha indicado anteriormente, los análogos de nucleósidos muestran varias limitaciones en su absorción, distribución y metabolismo que restringen su utilidad en la práctica clínica. Los análogos de nucleósidos monofosfato tienen una baja estabilidad *in vivo* y no tienen buena permeabilidad a través de la membrana ya que contienen un grupo fosfato ionizable. Para mejorar sus propiedades fisico-químicas se pueden enmascarar los oxígenos

de los grupos fosfato, lo que permite incrementar su estabilidad frente a enzimas hidrolíticas como son, por ejemplo, las fosfatasas celulares. Por otra parte se favorece un aumento de lipofilia, lo que permite el paso a través de las membranas por difusión pasiva.

En el presente trabajo se realizará una revisión de una de las principales estrategias de diseño de profármacos de nucleósidos monofosfato, la estrategia ProTide. Se analizará su trayectoria desde su descubrimiento por McGuigan y colaboradores (9), hasta la aprobación de algunos de ellos como el sofosbuvir o el tenofovir alafenamida, que se han convertido en importantes fármacos para el tratamiento de infecciones virales como VHC y VIH, respectivamente.

#### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

Al ser un trabajo de revisión bibliográfica sobre algunas estrategias de diseño de profármacos de nucleósidos monofosfato se han empleado las bases de datos de diversas fuentes científicas como PubMed, Science Direct y Elsevier.

#### **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los nucleósidos antivirales y antineoplásicos inhiben directamente enzimas celulares implicadas en la biosíntesis de ADN/ARN funcionando como inhibidores competitivos de los sustratos naturales (10). Al actuar como falsos nucleótidos, su incorporación puede inducir la terminación de la elongación de la cadena en la biosíntesis de ácidos nucleicos, o a la acumulación de mutaciones en el genoma vírico o celular. Esto trae como consecuencia un efecto tóxico en las células, deteniendo el crecimiento y la proliferación viral o celular e induciendo procesos apoptóticos (11).

Un factor limitante encontrado en la aplicación de análogos de nucleósidos se encuentra en la vía de su activación hacia el derivado trifosforilado responsable de su actividad quimioterapéutica. Generalmente la primera fosforilación realizada por kinasas es el paso limitante para la formación de los nucleósidos trifosfato activos. Se pensó en la administración directa de análogos de nucleósidos monofosfato que eviten la primera fosforilación, pero esta estrategia resultó no ser práctica ya que el nucleósido monofosfato es altamente polar y por ello, impermeable a la membrana plasmática. Además, estos nucleótidos son muy susceptibles a la desfosforilación por fosfatasas, especialmente si son administradas por vía oral (12).

## LA VÍA DE DISEÑO DE PROTIDES A PARTIR DE PROFÁRMACOS SENCILLOS

En la aplicación terapéutica de los análogos de nucleósidos antivirales y antineoplásicos se encontraron una serie de limitaciones con respecto a su administración y su biodisponibilidad:

1. Los análogos de nucleósidos son estructuralmente diferentes a los nucleósidos endógenos y aunque son capaces de aprovechar los mecanismos de transporte celular de los metabolitos naturales, presentan problemas de transformación en sus metabolitos naturales trifosforilados. Como ya hemos visto, las quinasas responsables de su fosforilación son muy selectivas, lo que provoca que en la mayoría de los casos se produzca una fosforilación ineficiente y con ello se limite la formación de metabolitos trifosforilados (especie activa).
2. Por otra parte se observan en muchos casos mecanismos de resistencia:
  - a. Regulación a la baja de las quinasas responsables de la fosforilación del análogo de nucleósido.
  - b. Agotamiento de transportadores que conducen a estas moléculas a las células donde ejercen su acción antiviral.
  - c. Activación de fosfatasas (5' nucleosidasas) que desfosforilan los análogos de nucleósidos haciéndolos inactivos (13).

Para resolver estos problemas de la primera etapa limitante, se empezaron a estudiar los nucleósidos monofosfato, pero como se indicó ya anteriormente, el enlace P-O del fosfato era fácilmente escindido por las fosfatasas del organismo y además, su transporte a través de membranas sería ineficiente debido a la falta de transportador específico y a la ionización del nucleósido fosforilado a pH fisiológico (11). Por este motivo, Holy y De Clercq (14) propusieron la incorporación de un grupo monofosfonato en vez del monofosfato, ya que el enlace P-CH<sub>2</sub> no es sensible a la acción de enzimas hidrolíticas, lo que da como resultado una mejor estabilidad *in vivo* y una vida media más larga de estos derivados fosfonato. Esta variación estructural llevó al diseño de antivirales como el cidofovir para el tratamiento de HCMV, y el adefovir y tenofovir, para el tratamiento de VHB y VIH. A pesar de ello, estos compuestos aún tenían una baja absorción celular debido a la ionización de la función fosfonato. Este hecho inició la búsqueda de profármacos menos polares y más lipófilos que permitan una buena difusión pasiva.

Esta búsqueda de profármacos se inició con el diseño de ésteres de fosfato y fosfonato, utilizando como nucleósido de referencia la zidovudina (AZT) (véase figura 2):

1. **Ésteres de fosfato de dialquilo y dihaloalquilo:** el primer intento de enmascarar el grupo fosfato se realizó con los monofosfatos de 9- $\beta$ -D-arabinofuranosil adenina (AraA) y de 1- $\beta$ -D-arabinofuranosil citosina (AraC) y AZT esterificado con alquil-alcoholes y haloalquil-alcoholes. Estos profármacos, además de ser mucho más lipófilos, mostraron mejor estabilidad frente a las adenosina desaminasas pero sólo presentaban un aumento moderado de la actividad biológica. De estos ensayos se concluyó que el aumento de actividad se debía al aumento de lipofilia que permite una mayor difusión a través de la membrana, pero no se observaron mayores concentraciones intracelulares de nucleósidos fosforilados. Este hecho obligó a variar la estrategia de diseño hacia derivados de tipo fosforamidas.
2. **Alquiloxi y haloalquiloxi fosforamidas:** se llegó al estudio de fosforamidas a raíz del descubrimiento de que las proteasas del VIH son capaces de romper un oligopéptido unido al grupo fosfato. Por ello se sintetizaron una serie de alquiloxfosforamidas de AZT que están condensadas con un aminoácido en forma de éster metílico. Estos compuesto mono-fosforamida mostraron mejor actividad anti-VIH y el análisis de diferentes aminoácidos llevó a la conclusión de que la actividad depende de la cadena lateral del aminoácido, siendo la L-alanina la que mostró una mejor actividad. Posteriores estudios con  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ - aminoácidos ratificaron que los aminoácidos más eficaces eran los  $\alpha$ -aminoácidos.
3. **Fosforodiamidatos:** dado el éxito de la introducción de aminoácidos para enmascarar uno de los oxígenos del grupo fosfato, el siguiente paso fue condensar el grupo fosfato con dos aminoácidos en forma de éster alquílico. En este caso, la L-alanina no fue la que mostró mejor actividad, sino que eran los aminoácidos con cadenas aromáticas como la fenilalanina, con los que se observó una mejora en la actividad biológica. A pesar de que entonces no se realizaron más estudios con estos fosforodiamidatos, su estudio se retomó a partir del año 2011.
4. **Sistemas derivados del ácido láctico:** se sintetizaron análogos de nucleósidos de AZT con derivados del ácido láctico y ácido glicólico y pero no mostraron mejoría en la actividad anti-VIH del AZT.
5. **Diarilfosfatos:** se esterificó el grupo fosfato de AZT con fenoles provistos de sustituyentes en *para*, que mostraron tener una buena actividad anti-VIH, y especialmente si llevaban un aceptor de electrones. Esta actividad incluso era mejor que la del compuesto original (AZT), ya que eran activos también en líneas celulares

consideradas resistentes a AZT que presentan sobreexpresión de la bomba de eflujo, lo que se traducía en una deficiente fosforilación intracelular.

6. **Ariloxifosforamidatos (ProTides):** McGuigan y sus colaboradores se inspiraron en los dos ensayos anteriores y combinaron las dos últimas estrategias, condensando el nucleósido-fosfato con un fenol y con un aminoácido para dar un profármaco ariloxifosforamidato. Este concepto se aplicó al AZT que mostró mejor actividad anti-VIH que su precursor nucleosídico, y en concreto la condensación con un fenilo y un éster de L-alanina dio lugar al profármaco más activo. Además, los ariloxifosforamidatos mostraron ser superiores a sus nucleósidos originales, porque incluso presentaban actividad anti-VIH sobre líneas celulares deficientes de timidina kinasa (TK), lo que es una diferencia notable con respecto a sus nucleósidos de partida y permite intuir una alternativa a la acción de la timidina kinasa (13).

Stages of development	Phosphate masking group(s)	Stages of development	Phosphate masking group(s)
1. Alkyl and haloalkyl phosphate triesters	<p>R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> = Me, Et, Pr, -CH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub> and -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub></p>	3. Phosphorodiamidates	<p>R = H, Me, iPr, -CH<sub>2</sub>Ph or -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></p>
2. Alkyloxy phosphoramidates	<p>R = H, Me, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)Et or Bn R<sub>1</sub> = Me, Et, Pr, Bu or Hex</p>	4. Lactyl-derived systems	<p>R = Me or Et, R<sub>1</sub> = H or Me, R<sub>2</sub> = Me, nPr or nC<sub>12</sub>H<sub>25</sub></p>
	<p>n = 1-6</p>	5. Diaryl phosphates	<p>Ar = Ph or p-X-Ph (x = various)</p>
	<p>R = H, Me or iPr X = H, F or Cl</p>	6. Aryloxy phosphoramidates	<p>Ar = Ph or substituted Ph R = H, Me, -CH<sub>2</sub>iPr, -CH<sub>2</sub>Ph...etc. R<sub>1</sub> = Me, Et, iPr, tBu, Bn...etc.</p>

Figura 2.- Fases en el desarrollo de la estrategia ProTide (13).

## EL CONCEPTO DE PROTIDE Y SUS POSIBLES VARIACIONES ESTRUCTURALES

Los ProTides (= PROFármacos de nucleóTIDOS) son nucleósidos 5'-monofosfato, en los que los grupos hidroxilo se encuentran condensados: uno como éster fenólico y el otro como amida de un  $\alpha$ -aminoéster. Son capaces de penetrar en la célula por difusión pasiva y

una vez en el interior de la célula se metabolizan a su correspondiente nucleósido 5'-monofosfato (15) (figura 3).

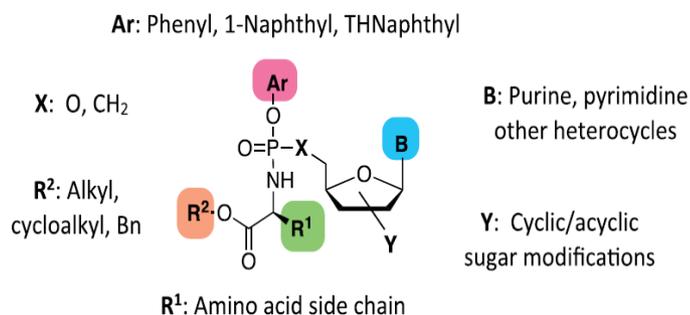


Figura 3.- Estructura general de un ProTide (11).

Un estudio amplio sobre los diversos aminoácidos ha demostrado que los L- $\alpha$ -aminoácidos parecen ser los más eficaces, y dentro de ellos, la L-alanina presenta los mejores resultados (11). Tanto es así que la L-alanina está presente en todos los profármacos ProTide que están actualmente en uso terapéutico o en ensayos clínicos (16). La variación a  $\beta$ -aminoácidos ha dado resultados muy negativos, lo que se atribuye a su dificultad de dar los intermedios cíclicos en la bioactivación del profármaco (17). La función carboxilato en los  $\alpha$ -aminoácidos está esterificada, pudiendo ser los sustituyentes cadenas lineales cortas (metilo, etilo, pentilo), cadenas ramificadas (isopentilo, neopentilo) o cadenas bencílicas. Radicales voluminosos como el tert-butilo no son adecuados por el impedimento estérico que generan (18).

Como ésteres fenólicos del grupo fosfato son adecuados los radicales fenilo, 1-naftilo y recientemente también el 5,6,7,8-tetrahidro-1-naftilo (19).

La estrategia ProTide no sólo es aplicable a nucleósidos monofosfato sino que también se estudia actualmente su aplicación a fármacos monofosforilados no nucleosídicos como son las glucosaminas para el tratamiento de la osteoartritis (20), el fingolimod, un inmunomodulador usado en el tratamiento de la esclerosis múltiple (21), o derivados de 2-desoxi-D-ribosa-1-fosfato de acción antiviral (22), entre otros.

### TRANSFORMACIÓN INTRACELULAR DEL PROTIDE EN SU FÁRMACO ACTIVO

Una vez en el interior de la célula, gracias a la difusión pasiva por la membrana, la bioactivación del ProTide se inicia por acción de una esterasa, catepsina A o carboxipeptidasa, que hidroliza el grupo éster (23). Este primer paso es el paso limitante de la bioactivación del ProTide, ya que las esterases son muy selectivas (15).

La eficacia de la hidrólisis depende de la estructura del éster y es correlativa con la actividad biológica observada. Grupos éster voluminosos como el terc-butilo se hidrolizan más lentamente que ésteres metílicos, isopropílicos o bencílicos. Por contrapartida la actividad biológica también dependerá de la lipofilia de la cadena, por lo que debe haber un equilibrio entre la velocidad de hidrólisis y la lipofilia. Así por ejemplo, un éster de fenilo sería menos activo que un éster de naftilo ya que este último es más lipófilo y fácil de hidrolizar. Por otra parte, también influirá en la hidrólisis de la función éster la naturaleza del aminoácido ya que la catepsina A, por ejemplo, no tiene capacidad para hidrolizar ésteres de aminoácidos de cadena ramificada más o menos voluminosa, como son la valina o la isoleucina. De los amplios estudios realizados se ha podido concluir que los ProTides derivados de alanina se hidrolizan fácilmente por acción de esterasas y proteasas de serina, pero no por proteasas de cisteína, proteasas de aspártico o metaloproteasas (24). Los aminoácidos de cadenas más voluminosas, como fenilalanina o leucina, son hidrolizados de forma más eficiente por proteasas de serina tipo quimotripsina, como son la catepsina G y la quimasa.

Una vez hidrolizado el grupo éster se produce una degradación química. El grupo carboxilato resultante que se encuentra cargado negativamente a pH fisiológico, llevará a cabo un ataque nucleofílico al grupo fosfato/fosfonato. Este ataque provoca la salida del anión ariloxi (fenolato, por ejemplo) y la formación de un anillo de 5 átomos muy inestable (un anhídrido mixto cíclico) que rápidamente sufre un ataque nucleofílico por una molécula de agua provocando la apertura del anillo y la formación del metabolito fosforamidato (23). Es interesante destacar que en el caso de  $\beta$ -alaninas no se forma el anhídrido cíclico, por lo que la bioactivación no progresaría.

El siguiente paso lo realiza una segunda enzima, una fosforamidasa importante en la bioactivación del ProTide, la HINT-1 (histidine triad nucleotide binding protein 1), que va a escindir el enlace P-N liberando el nucleósido monofosfato/fosfonato. Una vez formado el nucleósido monofosfato éste sufrirá posteriores fosforilaciones por acción de cinasas hasta conseguir el derivado trifosforilado responsable de su actividad biológica (15) (figura 4). En determinados casos, como sucede por ejemplo con el tenofovir alafenamida, el enlace amídico P-N es resistente a la acción de la HINT-1. Para estos casos se postula que la hidrólisis se realiza gracias a la inestabilidad química que presenta el enlace P-N en el entorno ácido de los endosomas o lisosomas de la célula (25).

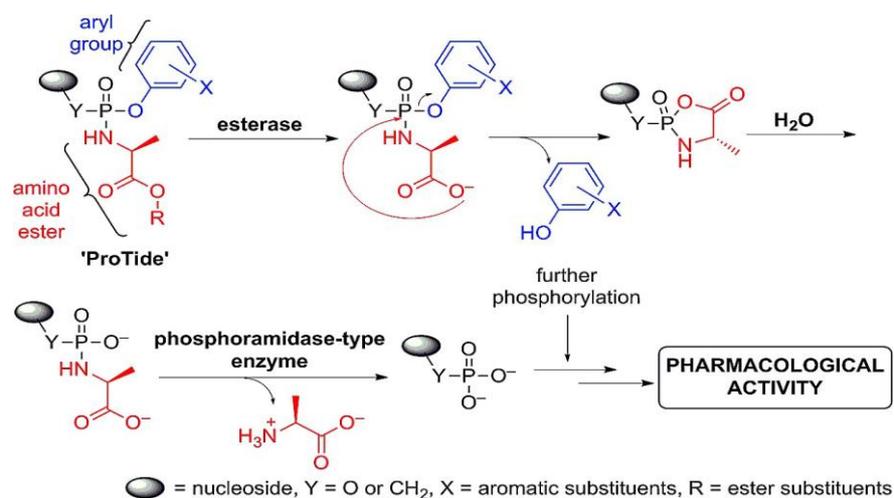


Figura 4.- Mecanismo de activación *in vivo* de ProTides (23).

Se han realizado estudios sobre la HINT-1 humana (hHINT-1) con una batería de posibles sustratos a través de cristalografía de rayos X y calorimetría de titulación isotérmica para poder obtener datos sobre la energía de la unión enzima-sustrato y establecer las bases estructurales necesarias para una buena eficiencia catalítica. La hHINT-1 se expresa en gran cantidad de tejidos, incluidos muchos tipos de tumores (26), y su función ha sido asociada con una variedad de procesos biológicos como la hidrólisis de aminoaciladenilatos, supresión del crecimiento de tumores y efectos centrales como la modulación de la analgesia opioide o el dolor crónico. A pesar de esto, la función biológica de la HINT-1 y sus sustratos endógenos dentro de las células sigue sin estar del todo claro (27).

Wagner y colaboradores (28) demostraron que hHINT-1 tiene preferencia por nucleósidos con base púrica, aunque también son activas, en menor medida, sobre bases pirimídicas. También se observó que el anillo de ribosa es muy importante para la unión de la enzima al análogo nucleosídico, por ejemplo en el caso del cidofovir que contiene un anillo abierto en su estructura, se vio que HINT-1 no era tan efectivo como con otras moléculas que contenían el anillo ribosa en su estructura. Eso mismo es aplicable al tenofovir alafenamida. El grupo fosfato aunque también aumentaba la afinidad por la enzima, no es necesario para la unión enzima-sustrato.

### SÍNTESIS DE PROTIDES

La síntesis de estos profármacos fue revisada recientemente por Pradere y colaboradores (29). Actualmente contamos con tres estrategias principales para sintetizar ProTides (véase figura 5). Estos procedimientos se diferencian en la forma de introducir el resto fosforamidato sobre el 5'-hidroxilo del nucleósido (11):

1. Acoplamiento del nucleósido con un diarilfosfito seguido de una aminación oxidativa.
2. Acoplamiento de un nucleósido con un reactivo de fosforilación tipo clorofosfato: La reacción de acoplamiento entre el clorofosfato y el nucleósido se lleva a cabo empleando N-metilimidazol (NMI) o cloruro de terc-butil magnesio (reactivo de Grignard, t-BuMgCl), que actúan como base. En los ribonucleótidos polihidroxilados (ej. Ribosa) normalmente se emplea el NMI ya que generan como productos mayoritarios los 5'-O- fosforamidatos debido al impedimento estérico. En el caso de los nucleósidos con un solo grupo hidroxilo la base de elección sería tBuMgCl ya que proporciona mayores rendimientos que el NMI. Esta ha sido la ruta sintética más empleada hasta ahora y se ha aplicado a la síntesis de varios análogos de nucleósidos antivirales y anticancerígenos (13).
3. Acoplamiento de un aminoácido a un nucleósido arilfosfato: el material de partida en este caso es un nucleósido monofosfato enmascarado con un grupo difenilo. Se somete a una saponificación parcial para producir la eliminación selectiva de uno de los grupos fenilos condensando posteriormente con un éster de aminoácido (29). (Figura 5).

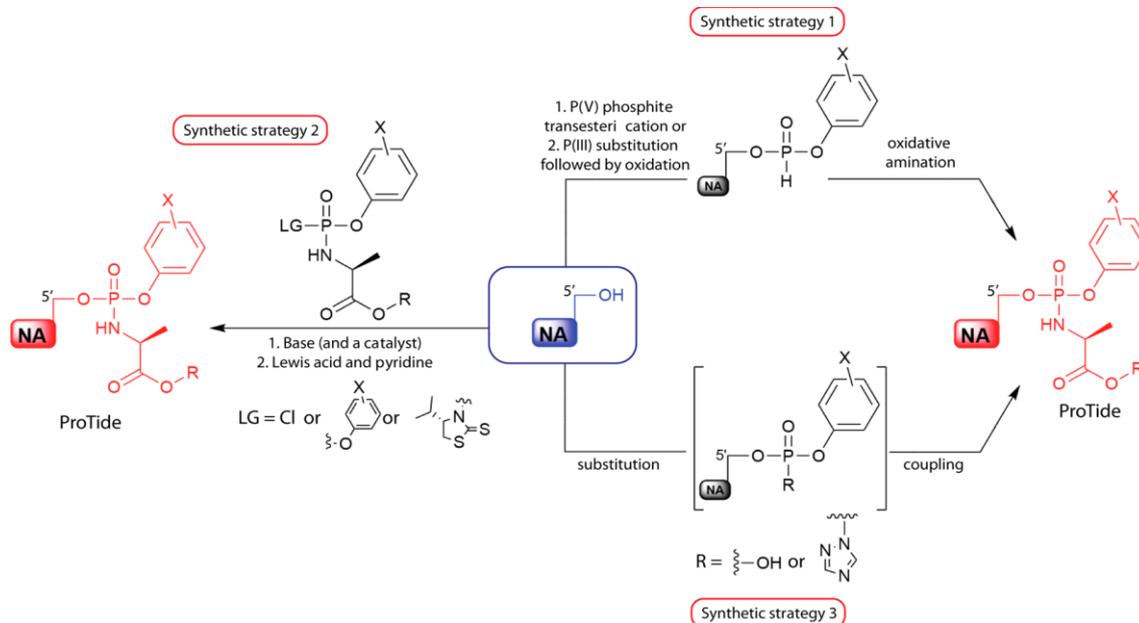


Figura 5.- Estrategias principales para la síntesis de profármacos ProTide (13).

Estas reacciones dan lugar a mezclas de diastereoisómeros que pueden presentar potencia biológica similar, pero en muchos casos muestran variaciones en el metabolismo dando lugar a grandes diferencias en la actividad biológica, como es el caso del

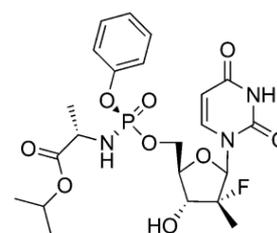
diastereoisómero Sp del sofosbuvir que exhibe hasta 10 veces más actividad que su diastereoisómero Rp. En estos casos es necesaria la separación de los diastereoisómeros. En un principio se pueden separar por cromatografía en columna, pero es un método laborioso (11). La otra opción es una síntesis estereoselectiva, Ross y colaboradores describen un método para la síntesis de los isómeros Sp, que generalmente son los más activos, utilizando clorofosfatos de pentafluorofenoles y logrando la cristalización de los estereoisómeros individuales (30).

Recientemente Merck y colaboradores han descrito varios ácidos de Lewis que permiten mejorar la estereoselectividad, regioselectividad y rendimiento de la reacción de clorofosfatos con los nucleósidos para la obtención de ProTides. El cloruro de dimetil aluminio demostró ser el catalizador óptimo para estas reacciones (31).

### PROTIDES APROBADOS PARA SU USO CLÍNICO

#### **SOFOSBUVIR (Sovaldi ®)**

Fue aprobado en diciembre de 2013 por la FDA para el tratamiento del virus de la hepatitis C (VHC), se trata de un profármaco de fosforamidato de 2'-desoxi-2'-fluoro-2'-C-metiluridina. Inhibe la NS5B polimerasa del VHC, impidiendo la replicación del genoma viral y produciendo la terminación de la cadena de ARN del virus. Durante mucho tiempo el sofosbuvir ha sido el estándar de oro para el tratamiento de VHC crónico (13).



**Sofosbuvir**

Fue desarrollado clínicamente su isómero Sp ya que se observó que tiene hasta 18 veces más actividad y produce hasta 10 veces más metabolito trifosforilado que el isómero Rp, por lo que conduce a mayores concentraciones intracelulares de metabolito activo que se resumen en una mejor actividad biológica a menores dosis administradas (11). El sofosbuvir no es metabolizado por el citocromo CYP3A4 por lo que las interacciones farmacológicas serían mínimas.

Actualmente se emplean varios medicamentos con sofosbuvir en su composición. Las terapias actualmente son pangenotípicas, es decir, eficaces frente a casi todos los tipos de genotipos de VHC, y normalmente es el equipo de hepatología el que elige el fármaco óptimo según el tipo de pacientes y las patologías asociadas (32). Se utilizan entre otros:

- Vosevi®: 400 mg sofosbuvir + 100 mg velpatasvir + 100 mg de voxilaprevir. En pacientes tratados con este fármaco se ha visto una efectividad del 95%. Indicado para el tratamiento de la infección crónica por VHC en adultos.
- Harnovi®: 400 mg sofosbuvir + 90 mg ledipasvir. Indicado para el tratamiento de hepatitis C crónica en adultos y adolescentes.
- Epclusa®: 400 mg sofosbuvir + 100 mg velpatasvir.

## TENOFOVIR ALAFENAMIDA

Tenofovir alafenamida (TAF) (Vemlidy ®) fue aprobado por la FDA en 2015 para el tratamiento del VIH y en 2016 para el tratamiento de VHB. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la transcriptasa inversa lo que da lugar a la terminación de la replicación viral (13)(figura 6).

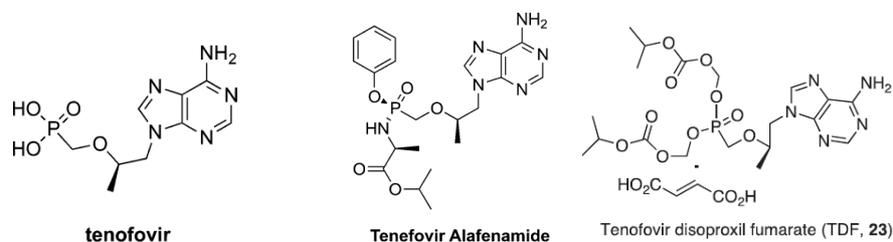


Figura 6.- Estructuras químicas del tenofovir, tenofovir alafenamida y tenofovir disoproxil fumarato (13).

Estudios sobre la actividad de los dos diastereoisómeros demostró que el diastereoisómero Sp es de 10 a 30 veces más activo que el Rp, lo que sugiere que el metabolismo intracelular es sensible a la estereoquímica del fósforo. La separación de la mezcla estereoisomérica obtenida por síntesis se realiza por HPLC, cristalización selectiva o cromatografía en gel de sílice. Recientemente, se ha desarrollado una síntesis diastereoselectiva que emplea reactivos enantioméricamente puros y está basada en una reacción SN2 con reactivos fosforoamidatos quirales (33).

Anteriormente, en 2002, otro profármaco del tenofovir, el tenofovir disoproxil fumarato (TDF) (Viread ®) fue aprobado en la Unión Europea por la FDA para el tratamiento del VIH, ya que mostró mejor actividad y estabilidad *in vitro* que el tenofovir. TDF se asoció a efectos tóxicos óseos y sobre la función renal como la disminución de la tasa de filtración glomerular y aumento de la creatinina sérica, ya que su eliminación es mayoritariamente por vía renal.

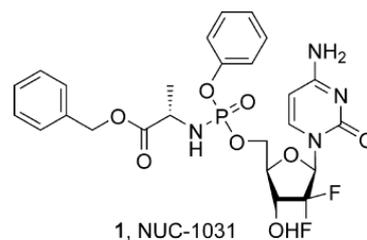
El ProTide TAF demostró mejor actividad anti-VIH, mayor estabilidad y menos efectos adversos que el tenofovir y que el TDF. Los niveles de metabolitos activos del TAF

fueron de 10 a 30 veces mayores que los obtenidos del TDF o tenofovir. Por ello, el TAF tiene la ventaja de que ejerce su acción a menores dosis por lo que se reduce la incidencia de efectos adversos. Se ha visto que el TAF se acumula en hígado, ya que es sustrato para los transportadores hepáticos OATP1B1 y OATP1B3, y en tejido linfático por lo que es útil para el tratamiento de infecciones por VHB (13).

## PROTIDES EN DESARROLLO CLÍNICO

### **ACELARÍN (NUC-1031)**

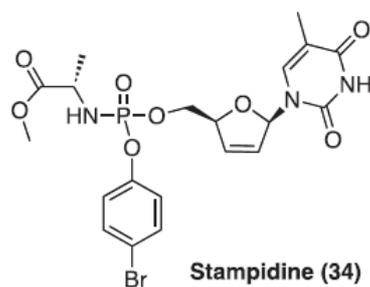
Es un ProTide de la gemcitabina. Está en desarrollo por NuCana Biomed para el tratamiento del cáncer de pulmón, ovario, mama, colon (fase I/II) y páncreas (fase III) (23).



Ha demostrado ser muy efectivo en pacientes resistentes a gemcitabina debido a que NUC-1031 logra concentraciones intracelulares mucho mayores (15). Influye en esta mayor biodisponibilidad el hecho de que la citidina desaminasa cataboliza rápidamente la gemcitabina y esta enzima necesita los grupos 3' y 5' hidroxilos libres para realizar la desaminación oxidativa dando su derivado uridina, el cual es inactivo. NUC-1031 es resistente a esta desaminación por la citidina desaminasa al tener el hidroxilo 5' sustituido. Esto le confiere un mayor perfil de seguridad y una mayor concentración intracelular del nucleósido trifosfato activo. A estas ventajas, se suma la buena farmacocinética del ProTide. Por ello, estos profármacos generalmente son bien tolerados por pacientes con efectos adversos comunes como: anemia, fatiga, transaminasas altas y trombocitopenia (23).

### **STAMPIDINA**

Es el profármaco de la estavudina, un inhibidor de la transcriptasa inversa del VIH, y fue uno de los primeros ProTides en entrar en ensayos clínicos. La estavudina presenta una fosforilación inicial lenta por parte de la timidina quinasa, lo que produce una formación deficiente del trifosfato (23).

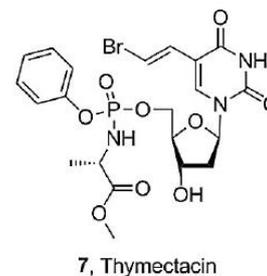


La stampidina mostró una gran eficacia frente al virus silvestre de VIH, el cual tiene mutaciones que lo hacen resistente a los inhibidores de nucleósidos que actúan inhibiendo la transcriptasa inversa. La stampidina es sustancialmente más potente que la estavudina en la inhibición de la replicación del VIH en las células T deficientes de timidina quinasa.

El bromofenol favorece una bioactivación más rápida hacia la forma alanil-STV-monofosfato, precursora de la forma activa trifosforilada. Estudios *in vivo* mostraron que tiene buena tolerancia por vía oral o intraperitoneal a dosis de 500 mg/kg en ratones o ratas. También se observó que puede ser útil en la profilaxis al contagio por VIH para mujeres heterosexuales que mantengan relaciones con personas seropositivas (23).

### **TIMECTACINA (NB1001)**

Se trata de un profármaco de la brivudina, potente inhibidor del virus herpes simple tipo 1 (HSV-1) y del virus de la varicela zoster (VZV). Fue sintetizado por New Biotics Inc y actualmente se encuentra en ensayos clínicos en fase I y II para cáncer de colon (23).



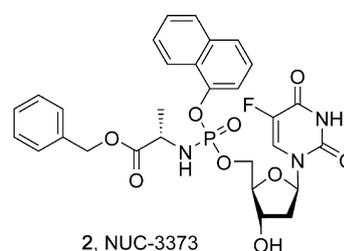
Mostró ser selectiva en células tumorales colorrectales con timidilato sintasa (TS) sobreexpresada. Un estudio con timentacina radiomarcada demostró que la formación del metabolito BVdU monofosfato (Brivudina) se realiza de forma independiente a la TS. Estudios sobre el mecanismo de acción de la timentacina sugieren su implicación en la supresión de p53 en los tumores y la activación de las fases G2/M provocando el arresto del ciclo celular.

En ensayos clínicos en fase I realizados en pacientes con cáncer colorrectal que no responden al tratamiento con 5-FU, se les administró una dosis intravenosa de 200 mg/kg a 1250 mg/kg, los pacientes mostraron buena tolerancia al tratamiento y se logró estabilizar la enfermedad. Algunos de los efectos secundarios graves mostrados fueron: dificultad respiratoria, vómitos, hiperglucemia y ascitis (15).

A pesar de los prometedores datos clínicos de stampidina y timentacina, no hay recientes actualizaciones sobre su desarrollo posterior.

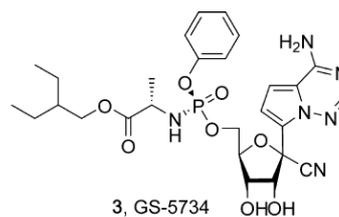
### **NUC-3373**

Este ProTide del 5-FU porta radicales 1-naftilo y bencilo. Se ha observado que tiene propiedades citotóxicas en líneas celulares deficientes de timidina kinasa (TK), al contrario que su precursor 5-FU. Además es resistente a la inactivación por enzimas catabólicas como la timidina uridina fosforilasa. Todo esto hace que NUC-3373 no sea degradado antes de llegar a la diana y logre concentraciones eficaces que permitan una actividad biológica muy superior al 5-FU (23).



## REMDESIVIR (GS-5734)

Actualmente se encuentra en fase II de ensayos clínicos para el tratamiento del virus de ébola (EBOV), desarrollado por Gilead Sciences Inc muestra una potente inhibición específica de la replicación del EBOV (15). Es un ProTide con base C-nucleosídica y al igual como ocurre con el tenofovir, el diastereoisómero activo es el Sp (23) (figura 12).



Se han realizado ensayos en monos rhesus infectados con EBOV administrando una dosis intravenosa diaria de 10 mg/kg de remdesivir, lo que condujo a una inhibición potente de la replicación de EBOV, impidiendo el contagio a otros animales. Los resultados de supervivencia fueron de un 50% a los 3 días para animales tratados con 3 mg/kg (ningún superviviente en los monos tratados con placebo), y del 100% en animales tratados con 10 mg/kg observándose adicionalmente una disminución de los signos de infección por ébola como pueden ser la trombocitopenia o coagulopatía (13).

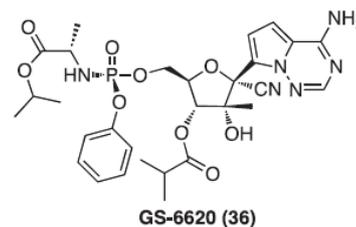
GS-5734 se metaboliza rápidamente en los macrófagos primarios. Después de 4 horas de incubación, con una vida media de 16 horas, se encontró un valor de CE50 de 20  $\mu$ m en macrófagos primarios y células endoteliales y 1,5  $\mu$ m en células hepáticas (13).

Las pruebas de seguridad de fase I en humanos sanos no mostraron efectos adversos serios asociados. Sólo se ha empleado en 2015 en dos pacientes con ébola como tratamiento compasivo y ambos pacientes sobrevivieron. Estos resultados positivos han llevado a extender el estudio de este fármaco a otros ARN virus como adenovirus, filovirus o coronavirus (11).

Actualmente, se está realizando un ensayo de fase II en Liberia por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas, con un grupo de 60 a 120 personas que serán tratadas con una dosis diaria de GS-5734 durante un ciclo de 5 días continuando el seguimiento durante 6 meses para determinar la depuración del virus en el reservorio (34).

## GS-6620

El GS-6620 es otro ProTide C-nucleosídico cuyo diastereoisómero activo es el Sp. De actividad antiviral contra el VHC, tiene actividad inhibitoria de la polimerasa NS5B, por lo que inhibe la elongación y replicación del RNA viral (11).

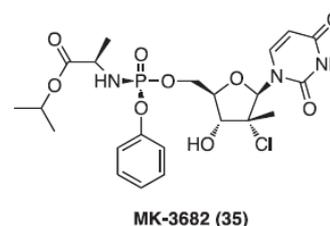


Se sintetizó inicialmente a través del modo convencional obteniendo una mezcla diastereoisómerica que después fue separada por cromatografía en columna. Resultados *in vitro* revelaron que el diastereoisómero S<sub>P</sub> es 6 veces más potente y 2 veces más efectivo que su diastereoisómero R<sub>P</sub>.

Ensayos clínicos de fase I en pacientes infectados por el genotipo VHC 1, con dosis de hasta 900 mg dos veces al día durante 5 días fue bien toleradas y mostraron importantes reducciones en la carga viral. A pesar de ello su eficacia clínica y su utilidad están limitadas debido a las altas variaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas intra e interindividuales (35).

### UPRIFOSBUVIR (MK-3682) (IDX- 21437)

Es el isómero R<sub>P</sub> del D-alanina fosforamidato de 2'-metil-2'-cloro uridina, que se estudió para el tratamiento del VHC y actúa inhibiendo la NS5B RNA polimerasa dependiente de RNA (11). Se realizaron ensayos clínicos en fase I y II en combinación con rivabirina o con fármacos no nucleosídicos como grazoprevir, elbasvir o ruzasvir pero fue suspendido para posteriores ensayos.



## 6. CONCLUSIONES

Gracias al desarrollo de la tecnología ProTide se han conseguido tratar enfermedades como la hepatitis B y C o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con fármacos de administración oral como el sofosbuvir (Sovaldi®) o el tenofovir alafenamida (Vemlidy®), dos de los grandes éxitos de este grupo de profármacos.

La estrategia ProTide no sólo es interesante a la hora de mejorar la farmacocinética de nucleósidos existentes en el arsenal terapéutico, sino que gracias a su gran capacidad de lograr concentraciones elevadas de nucleósido trifosfato en la célula diana, es útil para rescatar compuestos activos interesantes, de deficiente farmacocinética, y aplicarlas en terapias antivirales y anticancerígenas.

A raíz de estos avances y de las nuevas aprobaciones por la FDA, el interés hacia este tipo de profármacos ha crecido y se han desarrollado técnicas más sofisticadas para conseguir síntesis regio- y estereoselectivas, lo que supone un avance muy importantes en aquellos profármacos cuyos diastereoisómeros tienen diferente actividad biológica.

Además, es de destacar que la tecnología ProTide se está aplicando a otros fármacos diferentes estructuralmente de los nucleósidos portadores de un grupo fosfato como son algunos agentes antiparkinsonianos, los derivados monofosforilados de la glucosamina para el tratamiento de osteoartritis, o la esfingosina-1- fosfato de acción inmunomoduladora. Dado su rápido desarrollo se espera que en los próximos años esta tecnología de lugar a la aprobación de nuevos ProTides, tanto nucleosídicos como no nucleosídicos, para el tratamiento de enfermedades mas allá de las enfermedades víricas y el cáncer.

## 7. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) L. Naesens, J. Neyts, J. Balzarini, N. Bischofberger & E. De Clercq In vivo Antiretroviral Efficacy of Oral bis(POM)-PMEA, the bis(Pivaloyloxymethyl)prodrug of 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl) adenine (PMEA), *Nucleosides and Nucleotides*, 1995, 14:3-5, 767-770, DOI: 10.1080/15257779508012468

(2) Naesens, L.; Bischofberger, N.; Augustijns, P.; Annaert, P.; Van den Mooter, G.; Arimilli, M. N.; Kim, C. U.; De Clercq, E. Antiretroviral efficacy and pharmacokinetics of oral bis (isopropylloxycarbonyloxymethyl)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 1568.

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660984>

(3) Hostetler KY. Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: Current state of the art. *Antiviral Res* 2009; 82: A84–A98. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19425198>.

(4) Reddy KR, Matelich MC, Ugarkar BG, et al. Pradefovir: a prodrug that targets adefovir to the liver for the treatment of hepatitis B. *J Med Chem* 2008; 51: 666–676.

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18173234>.

(5) Du, J.; Bao, D.; Chun, B.-K.; Jiang, Y.; Reddy, P. G.; Zhang, H.- R.; Ross, B. S.; Bansal, S.; Bao, H.; Espiritu, C. L.; Lam, A. M.; Murakami, E.; Niu, C.; Micholochick Steuer, H.; Furman, P. A.; Otto, M. J.; Sofia, M. J.  $\beta$ -d-2' - $\alpha$ -F-2' - $\beta$ -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.* 2012, 22, 5924-5929.

(6) Wolfgang GHI, Shibata R, Wang J, et al. GS-9191 is a novel topical prodrug of the nucleotide analog 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)guanine with antiproliferative activity and possible utility in the treatment of human papillomavirus lesions. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2777–2784.

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704673/>

(7) Meier C. CycloSal phosphates as chemical Trojan horses for intracellular nucleotide and glycosylmonophosphate delivery-chemistry meets biology. *Eur J Org Chem* 2006; 2006: 1081–1102.

(8) Peyrottes, S.; Egron, D.; Lefebvre, I.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L.; Perigaud, C. Mini-Rev. *Med. Chem.* 2004, 4, 395. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19760699>

(9) Mehellou, Y.; Balzarini, J.; McGuigan, C. Aryloxy phosphoramidate triesters: a technology for delivering monophosphorylated nucleosides and sugars into cells. *ChemMedChem* 2009, 4, 1779–17791. Disponible en:

(10) Aniekan Okon.; Marcos Romário Matos de Souza.; Rachit Shah.; Raquel Amorim.; Luciana Jesus da Costa and Carston R. Wanger. Anchimerically activable antiviral ProTides.

*ACS Med. Chem. Lett.* 2017, 8, 958-962. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmchemlett.7b00277>

- (11) Magdalena Slusarczyk.; Michaela Serpi y Fabrizio Pertusati. Phosphoramidates and phosphoramidates (ProTide) with antiviral activity. Antiviral Chemistry and Chemotherapy. 2018. Vol 26: 1-31. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29792071>
- (12) Aniekon Okon.; JingJing Han.; Surendra Dawadi.; Christos Demosthenous.; Courtney C. Aldrich.; Mamta Gupta y Carston R. Wagner. Anchimerically activated ProTides as inhibitors of Cap- dependent translation and inducers of chemosensitization in mantle cell lymphoma. J. Med. Chem. 2017, 60, 8131-8144. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28858511>
- (13) Youcef Mehellou.; Hardeep S. Rattan y Jan Balzarini. The ProTide prodrug technology: From the concept to the clinic. J. Med. Chem. 2018, 61, 2211-2226. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28792763>.
- (14) De Clercq, E.; Holy, A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. Nat. Rev. Drug Discovery 2005, 4, 928-940. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16264436>
- (15) Youcef Mehellou. The ProTide boom. ChemMedChem. 2016, 11, 1114-1116. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27159529>.
- (16) McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Mahmood, N.; Hay, A. J. Aryl phosphate derivatives of AZT inhibit HIV replication in cells where the nucleoside is poorly active. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1992, 2, 701-704. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1642482>
- (17) McGuigan C, Tsang HW, Sutton PW, et al. Synthesis and anti-HIV activity of some novel chain-extended phosphoramidate derivatives of d4T (stavudine): esterase hydrolysis as a rapid predictive test for antiviral potency. Antiviral Chem Chemother 1998; 9: 109-115.
- (18) McGuigan C, Sutton PW, Cahard D, et al. Synthesis, anti-human immunodeficiency virus activity and esterase lability of some novel carboxylic ester-modified phosphoramidate derivatives of stavudine (d4T). Antiviral Chem Chemother 1998; 9: 473-479. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9865385>.
- (19) Pertusati F, Hinsinger K, Flynn AS, et al. PMPA and PMEA prodrugs for the treatment of HIV infections and human papillomavirus (HPV) associated neoplasia and cancer. Eur J Med Chem 2014; 78: 259-268. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24686012>
- (20) Serpi, M.; Bibbo, R.; Rat, S.; Roberts, H.; Hughes, C.; Caterson, B.; Alcaraz, M. J.; Gibert, A. T.; Verson, C. R.; McGuigan, C. Novel phosphoramidate prodrugs of N-acetyl-(D)-glucosamine with antidegenerative activity on bovine and human cartilage explants. J. Med. Chem. 2012, 55, 4629-4639. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22501024>
- (21) James, E.; Pertusati, F.; Brancale, A.; McGuigan, C. Kinase independent phosphoramidate S1P1 receptor agonist benzyl ether derivatives. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017, 27, 1371-1378. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28236593>.
- (22) Hamon N, Slusarczyk M, Serpi M, et al. Synthesis and biological evaluation of phosphoramidate prodrugs of two analogues of 2-deoxy-D-ribose-1-phosphate directed to the discovery of two carbasugars as new potential anti-HIV leads. Bioorg Med Chem 2015; 23: 829-838. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25616343>.
- (23) Peter J. Thornton.; Hachemi Kadri.; Ageo Miccoli and Youcef Mehellou. Nucleoside phosphate and phosphonate prodrug clinical candidates. J. Med. Chemistry. 2016, 59, 10400-10410. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.6b00523>

- (24) Birkus, G.; Kutty, N.; He, G. X.; Mulato, A.; Lee, W.; McDermott, M.; Cihlar, T. Activation of 9-[(R)-2-[[[(S)-[(S)-1-(Isopropoxycarbonyl)ethyl]amino] phenoxyphosphin yl]-methoxy]-propyl]adenine (GS-7340) and other tenofovir phosphonoamidate prodrugs by human proteases. *Mol. Pharmacol.* 2008, 74, 92–100.
- (25) Birkus, G.; Kutty, N.; Frey, C. R.; Shribata, R.; Chou, T.; Wagner, C.; McDermott, M.; Cihlar, T. Role of cathepsin A and lysosomes in the intracellular activation of novel antipapillomavirus agent GS-9191. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55, 2166–2173. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383096>.
- (26) Kimberly M. Maize.; Rachit Shah.; Alex Strom.; Sidath Kumarapperuma.; Andrew Zhou.; Carston R. Wagner y Barry C. Finzel. A crystal structure based guide to the design of human histidine triad nucleotide binding protein 1 (hHINT1) activated ProTides. *Mol. Pharmaceutics.* 2017, 14, 3987-3997. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28968488>
- (27) Rachit Shah.; Kimberly M. Maize.; Xin Xhou.; Barry C. Finzel y Carston R. Wanger. Caught before released: Structurl mapping of the reaction trajectory for the sofosfuvir activating enzyme, human histidine triad nucleotide binding protein 1 (hHINT1). *Biochemistry.* 2017, 56, 3559-3570. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28691797>.
- (28) Chou, T-F.; Baraniak, J.; Kaczmarek, R.; Zhou, X.; Cheng, J.; Ghosh, B.; Wagner, C. R. Phosphoramidate substrate specificity of human and Escherichia Coli Histidine Triad Nucleoside Binding Proteins. *Mol. Pharmaceutics* 2007, 4 (2), 208-217. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17217311>.
- (29) Pradere, U.; Garnier-Amblard E. C.; Coats, S.J.; Amblard F.; Schinazi R. F. Synthesis of nucleoside phosphate and phosphonate prodrugs. *Chem. Rev.* 2014, 114, 9154-9218. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr5002035>
- (30) Ross Bs, Ganapati Reddy P.; Zhang H-R, et al. Synthesis of diastereomerically pure nucleotidephosphoramidates. *J Org Chem* 2011; 76: 8311-8319. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21916475>.
- (31) DiRocco DA.; Ji Y.; Sherer EC et al. A multifunctional catalyst that stereoselectively assembles prodrugs. *Science* 2017; 356: 426-430. Disponible en: <https://science.sciencemag.org/content/356/6336/426>.
- (32) Manns M.; Samuel D.; Gane E.; Mutimer D.; McCaughan G.; Buti M.; Prieto M.; Calleja JL.; Peck- Radosavljevic M et al. Ledipasvir and sofosfuvir plus ribavirin in patients with genotype 1 or 4 hepatitis C virus infection and advanced liver disease: a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *The Lancet Infectious Diseases.* 2016. 16 (6): 685-697. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907736>
- (33) Chapman H.; Kernan M.; Prisbe E, et al. Practical synthesis separation and stereochemical assignment of the PMPA prodrug GS- 7340. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2001, 20: 621. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/NCN-100002338>
- (34) [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), identificador: NCT02818582
- (35) Cho A.; Chang L.; Lee R.; Butler T.; Metobo S.; Lew W.; y colaboradores. Discovery of the first C-Nucleoside HCV polymerase inhibitor (GS-6620) with demonstrated antiviral response in HCV infected patients. *J. Med. Chem* 2014, 57 (5), 1812-1825. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23547794>

*Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia y el/la Tutor/a no se hacen responsables de la información contenida en el mismo.*