

Artigo

Tenofovir: Relação Estrutura-Atividade e Métodos de Síntese**Leite, D. I.; Faria, J. V.; Azevedo, L. D.; Figueiredo, Y. V.; Martins, W. A.; Bianco, M. C. A. D.; Bernardino, A. M. R.; Bastos, M. M.; Boechat, N.****Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (6), 2347-2376. Data de publicação na Web: 25 de agosto de 2015<http://www.uff.br/rvq>**Tenofovir: Structure-Activity Relationship and Synthetic Methods**

Abstract: Acyclic nucleosides phosphonates (ANPs) belong to a class of antiviral agents, which exhibited activity against several infections. Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) was the first ANP licensed for use as nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTI) of HIV. TDF is an adenosine-5'- monophosphate analogue and pro-drug of (*R*)-9-(2-phosphonomethoxypropyl) adenine (PMPA), also known as tenofovir (TEN). Currently, is one of the most used drugs in the antiretroviral therapy due to excellent results in reducing viral load. In the last few years, the emergence of resistant cases has led to development of new analogs of TDF. Thus, the aims of this revision are to analyze the structure-activity relationships of TDF and its analogs and to describe the main synthetic routes for obtaining this drug.

Keywords: AIDS-HIV; tenofovir; acyclic nucleoside phosphonates; reverse transcriptase.

Resumo

Os fosfonatos de acilonucleosídeos (ANPs) pertencem a uma classe de agentes antivirais que exibem atividade contra uma série de infecções. O fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) foi o primeiro ANP licenciado para uso como Inibidor da Transcriptase Reversa Nucleotídica (ITRNT) do HIV. É análogo da adenosina 5'-monofosfato e pró-fármaco do (*R*)-9-(2-fosfonometoxilpropil) adenina (PMPA), também conhecido como tenofovir (TEN). Atualmente, é um dos fármacos de primeira escolha mais utilizados na terapia antirretroviral devido aos bons resultados na redução da carga viral. Nos últimos anos, os casos de resistência têm levado à busca de novos análogos do TDF. Esta revisão teve como objetivo analisar a relação estrutura-atividade do TDF e seus análogos, bem como descrever as principais metodologias de síntese para a sua obtenção.

Palavras-chave: AIDS; tenofovir; fosfonatos de acilonucleosídeos; transcriptase reversa.

* Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Farmanguinhos, Fiocruz, Departamento de Síntese de Fármacos, Manguinhos, CEP 21041-250, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ boechat@far.fiocruz.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20150140](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150140)

Tenofovir: Relação Estrutura-Atividade e Métodos de Síntese

Débora I. Leite,^{a,b} Jéssica V. Faria,^{a,b} Liviane D. de Azevedo,^{a,c} Yasmin V. Figueiredo,^a Wagner Alexandre Martins,^a Maria da Conceição A. D. Bianco,^a Alice Maria R. Bernardino,^b Mônica M. Bastos,^a Núbia Boechat^{a,*}

^aFundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Farmanguinhos, Departamento de Síntese de Fármacos, Manguinhos, CEP 21041-250, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^bUniversidade Federal Fluminense, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Campus do Valonguinho, CEP 24020-150, Niterói-RJ, Brasil.

^cUniversidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Bloco J, Sala J-1, Ilha do Fundão, CEP 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* boechat@far.fiocruz.br

Recebido em 30 de março de 2015. Aceito para publicação em 23 de agosto de 2015

1. Introdução

2. Fumarato de tenofovir desopoxila (TDF)

2.1. Relação estrutura-atividade

2.2. Farmacocinética

2.3. Métodos de Síntese

3. Conclusões

1. Introdução

Os fosfonatos de aciclonucleosídeos (ANPs, do inglês “Acyclic Nucleoside Phosphonate”) pertencem à classe de agentes antivirais que exibe atividade contra uma série de infecções causadas pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), do Papiloma Humano (HPV), BK (BKV) da família *Poliomavirus*, da Hepatite B (HBV), da Herpes Simplex (HSV), o adenovirus da família *Adenoviridae* e o poxvirus da família *Poxviridae*. Baseado neste amplo espectro de ação, alguns compostos desta classe foram desenvolvidos e aprovados pela Vigilância Sanitária americana (FDA, do inglês “Food

and Drug Administration”) para o tratamento de infecções virais, tais como citomegalovírus, hepatite B e a Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS, do inglês “Acquired Immune Deficiency Syndrome”).¹

Os ANPs foram desenvolvidos a partir de três principais classes: os nucleosídeos, os nucleotídeos e os análogos de nucleotídeos (Figura 1). Os nucleosídeos são constituídos por uma base nitrogenada; em geral, um heterociclo purínico ou pirimidínico, ligado a um carboidrato, que pode ser a D-ribose ou a desoxirribose.² O nucleotídeo é formado por um grupo fosfato, ligado ao nucleosídeo, através de uma ligação éster, que pode ser facilmente hidrolisada pelas enzimas esterases ou catabólicas. Nos análogos de

nucleotídeos, há um grupo fosfonato ligado ao nucleosídeo através de um éter, também chamado de fosfonometiléter, que apresenta maior estabilidade e maior tempo de meia vida.¹

Os ANPs são classificados como fosfonatos de acilonucleosídeos, acilonucleotídeos ou

análogos de acilonucleotídeos. O termo aciclo refere-se à ausência de ligações C-C na porção furanosídica, tornando-a aberta. De acordo com o número de ligações C-C ausentes, eles podem ser denominados como seco, diseco, triseco, tetraseco ou pentaseco.^{3,4}

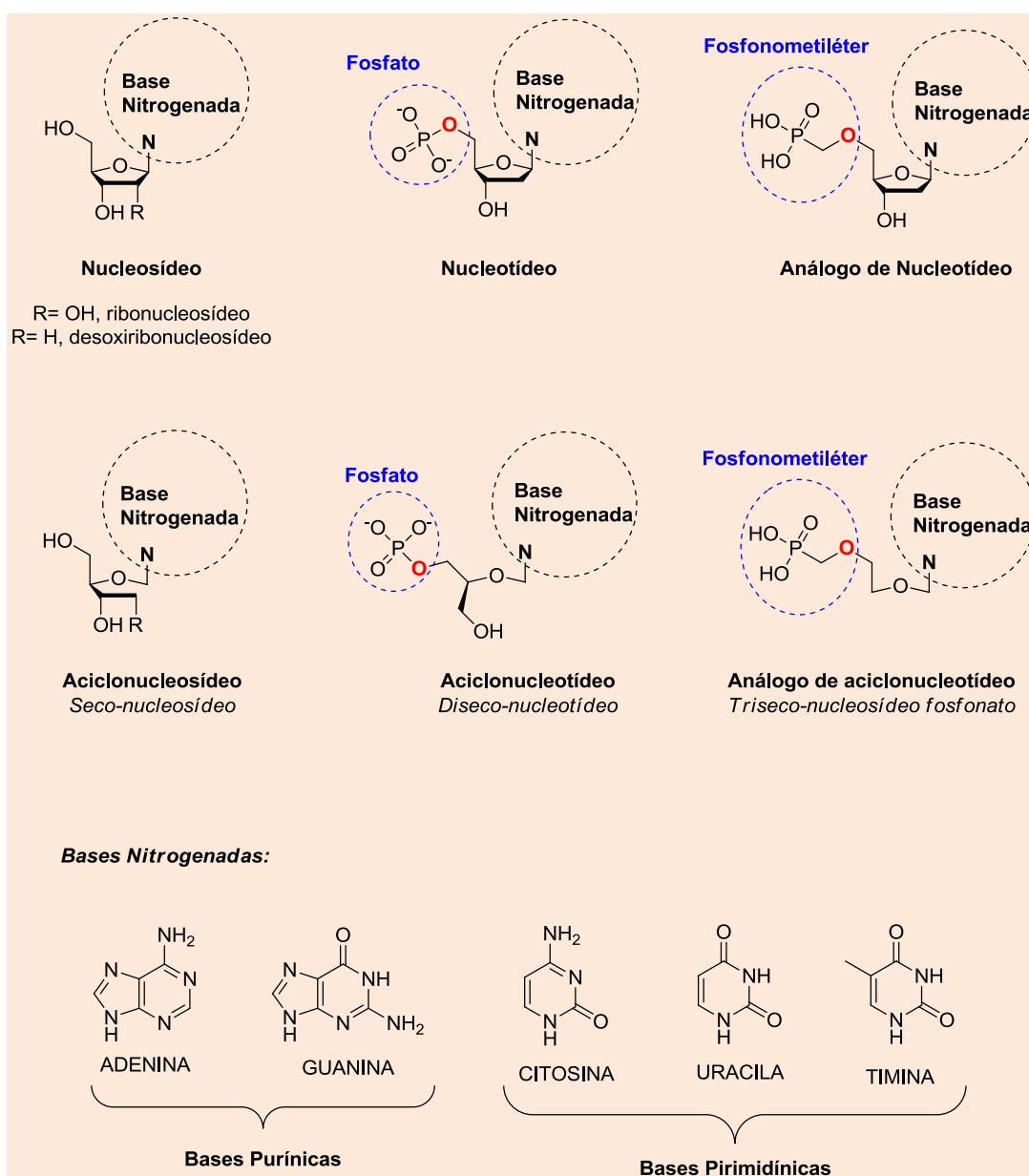


Figura 1. Nucleosídeos, nucleotídeos e análogos de nucleotídeos e seus respectivos análogos acíclicos

A história dos ANPs inicia com a descoberta de dois importantes acilonucleosídeos, o aciclovir (ACV - Zovirax®) (**1**) e [(S)-9-(2,3-diidroxiopropil)

adenina] (DHPA) (**2**) (Figura 2).¹ Em 1977, Elion e colaboradores descreveram **1**, que mostrou excelentes resultados contra o vírus da herpes simples e o vírus da Varicela Zoster

(VZV) e da catapora, também conhecido como HHV3 (do inglês, "Human Herpes Vírus 3").⁵⁻⁷ Este composto foi desenvolvido com objetivo de minimizar a degradação que ocorre nos nucleosídeos por enzimas presentes em células virais infectadas.⁵ Em

1978, De Clercq e colaboradores desenvolveram **2**, que atua na inibição da enzima *S*-adenosil-L-homocisteína hidrolase (SAH), e foi considerado excelente protótipo para o planejamento de novos agentes antivirais.^{8,9}

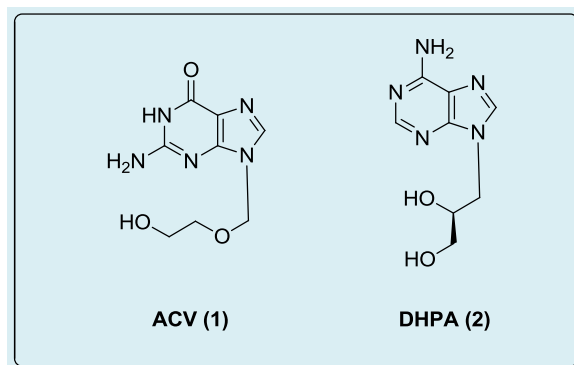


Figura 2. Estruturas químicas dos aciclonucleosídeos ACV (**1**) e DHPA (**2**)

Posteriormente, foram desenvolvidos o penciclovir (PCV) (**3**),¹⁰ o valaciclovir (VACV) (Valtrex®) (**4**),¹¹ o famciclovir (FCV) (Famvir®) (**5**) e o ganciclovir (Gancvirax®) (**6**)^{12,13} (Figura 3). O PCV foi planejado a partir do ACV, e as avaliações biológicas mostraram atividade inibitória similar ao seu protótipo; contudo,

houve redução da biodisponibilidade oral. O VACV e o FCV foram os primeiros pró-fármacos antivirais aprovados para o uso clínico.⁵ O GCV é um fármaco empregado no tratamento do citomegalovírus em pacientes imunossupressores, contudo apresenta baixa biodisponibilidade oral.

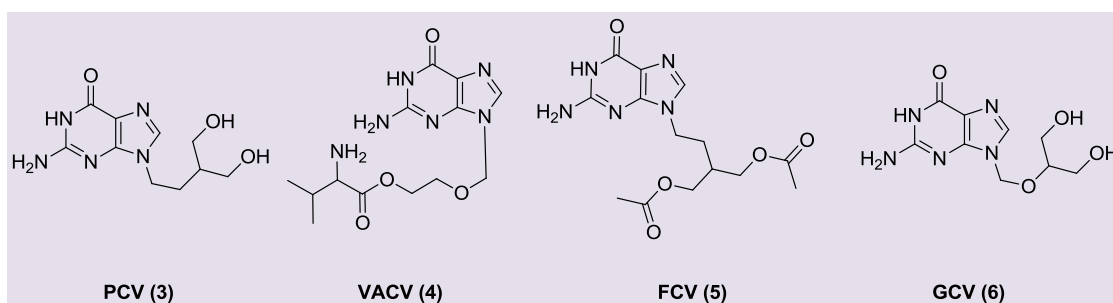


Figura 3. Estruturas químicas dos aciclonucleosídeos PCV (**3**), VACV (**4**), FCV (**5**) e GCV (**6**)

Em 1978, dois anos após o início dos estudos em colaboração entre os grupos de Holý e De Clercq, foi desenvolvido o (*S*)-9-(3-hidroxi-2-fosfonil-metoxipropil) adenina (*S*-HMPA) (**7**) como primeiro ANP. Ele foi planejado utilizando como estratégia da química medicinal a hibridação molecular, que consiste na união de características estruturais de duas ou mais substâncias

bioativas distintas em uma nova molécula¹⁴. As moléculas precursoras do *S*-HMPA (**7**) foram o ácido fosfonofórmico (PFA) (**8**) e DHPA (**2**), este já descrito na literatura com elevada atividade anti-herpética (Figura 4).^{15,16}

O *S*-HMPA (**7**) foi empregado como protótipo para o desenvolvimento de uma

série de ANPs, tais como, o cidofovir (HPMPC) (**9**), adefovir (PMEA) (**10**) e o (*R*)-9-(2-fosfonometilpropil) adenina (PMPA) (**11**), também conhecido como tenofovir (TEN) (Figura 4).¹⁷ Estes, apesar da elevada atividade, apresentaram baixa biodisponibilidade oral, sendo necessário o desenvolvimento dos seus respectivos pró-fármacos **12-14** (Figura 4), que foram capazes de gerar os metabólitos ativos **9-11**, após

biotransformação.¹⁸ O desenvolvimento de pró-fármacos é uma estratégia amplamente descrita para contornar o caráter polar dos ANPs, limitante para a administração via oral. Desta forma, algumas estratégias químicas são empregadas no planejamento destes compostos, com objetivo de aumentar a concentração do fármaco na corrente sanguínea.¹⁹

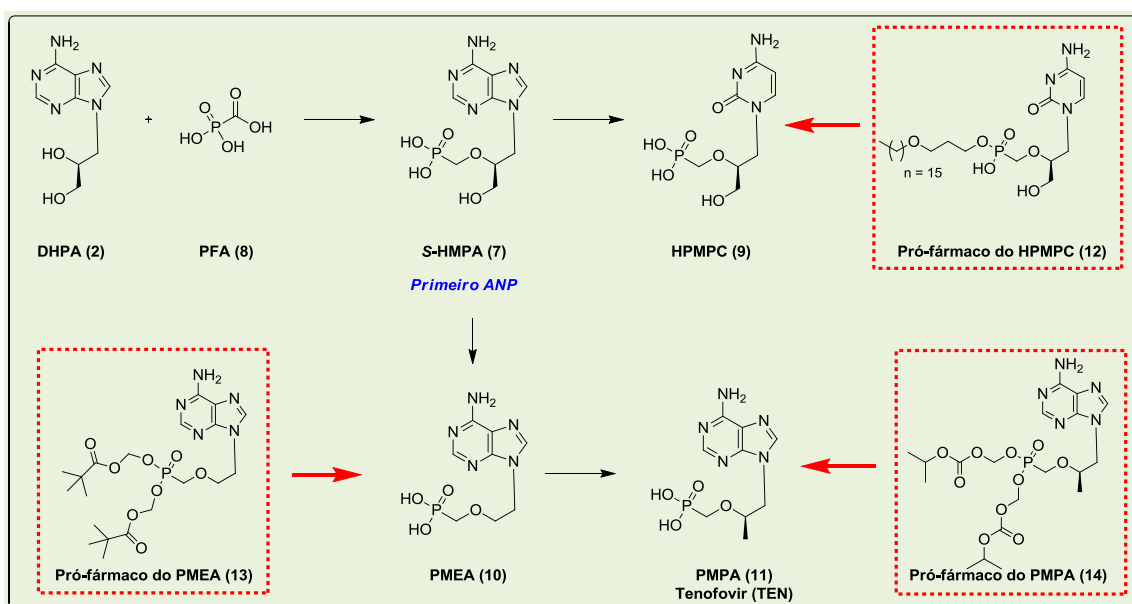


Figura 4. Desenvolvimento da série dos análogos de acilonucleosídeos S-HMPA (**7**), HPMPC (**9**), PMEA (**10**) e PMPA (**11**). Estruturas químicas dos pró-fármacos do HPMPC (**12**), PMEA (**13**) e PMPA (**14**)

O HPMPC (**12**) foi desenvolvido por De Clercq e colaboradores em 1987²⁰ e comercializado como Vistide®, para o tratamento da retinite por citomegalovírus, em 1996. É administrado por via intravenosa e, recentemente, o seu potencial para uso clínico contra outras infecções virais causadas pelo HPV, BKV, adenovírus e poxvírus tem sido avaliado.^{1,18}

Inicialmente, o PMEA (**13**) foi planejado como antirretroviral, mas devido a sua nefrotoxicidade, foi liberado somente para o tratamento da hepatite B crônica, sendo administrado por via oral em dosagem inferior.^{17,21,22} Também apresentou atividade contra outros vírus, tais como, HSV, VZV, HIV, o vírus Epstein Barr (EBV), o vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) e o vírus da

Imunodeficiência Felina (FIV).²³

Em 1993, o TEN (**11**) teve sua atividade antirretroviral descrita por Balzarini e colaboradores.²⁴ Contudo, somente em 2001, foi aprovado pelo FDA na forma de fumarato de tenofovir desopoxila (TDF) (Viread®) (**15**), para o tratamento do HIV (Figura 5). Atualmente, o TDF também é empregado para o tratamento da hepatite B, sendo mais recomendado em casos de resistência à lamivudina e coinfeções HIV-HBV. É um medicamento administrado por via oral, que possui elevada eficácia na redução da carga viral quando comparado a outros fármacos da mesma classe.^{1,25}

2. Fumarato de tenofovir desoproxila (TDF)

O fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) (**15**) é o pró-fármaco do TEN (Figura 5),²⁶ a sua nomenclatura oficial é fumarato de 9-[(*R*)-2-[[bis[[[(isopropoxicarbonil)oxi]metoxi]fosfonil]metoxi]propil] adenina.²⁷ O TDF foi obtido a

partir da adição de dois grupamentos ésteres de carbonato de metila ao TEN. Como resultado, pode-se observar uma melhora na estabilidade, absorção intestinal e biodisponibilidade oral do TEN, permitindo a sua formulação em comprimidos.^{26,28} Apesar dos estereoisômeros *R* e *S* apresentarem atividade antirretroviral semelhantes, o composto *R* apresenta maior afinidade e especificidade com a TR.²⁹

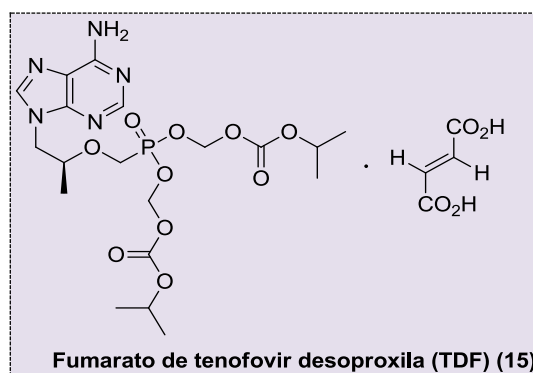


Figura 5. Estruturas química do pró-fármaco do TEN

O TDF foi o primeiro fármaco liberado para uso como um Inibidor da Transcriptase Reversa Nucleotídico (ITRNt) do HIV. É comercializado na forma de comprimidos revestidos de 300 mg,³⁰ sendo um dos poucos fármacos que exibem atividade contra o HIV-1 e o HIV-2.^{31,28}

Após administração oral, o TDF sofre hidrólise por enzimas esterases, que removem os dois grupos ésteres, dando origem ao TEN (Figura 6). Em seguida, o TEN é absorvido pelas células e fosforilado por quinases celulares. A primeira fosforilação é promovida pela enzima adenilato quinase

(AQ), que forma o intermediário monofosfato. Este é rapidamente convertido pela quinase difosfato nucleosídeo (QDN) à forma ativa difosfato, como mostrado na Figura 7.^{32,33} O tenofovir difosfato inibe a transcriptase reversa (TR) do HIV por competição com o substrato natural desoxiadenosina 5'-trifosfato. Uma vez ligado à enzima, ocorre a interrupção do alongamento da cadeia de DNA, devido à ausência do grupo 3'-OH na molécula do fármaco, onde seria o ponto de ligação do próximo deoxiribonucleosídeo trifosfato.^{27,34}

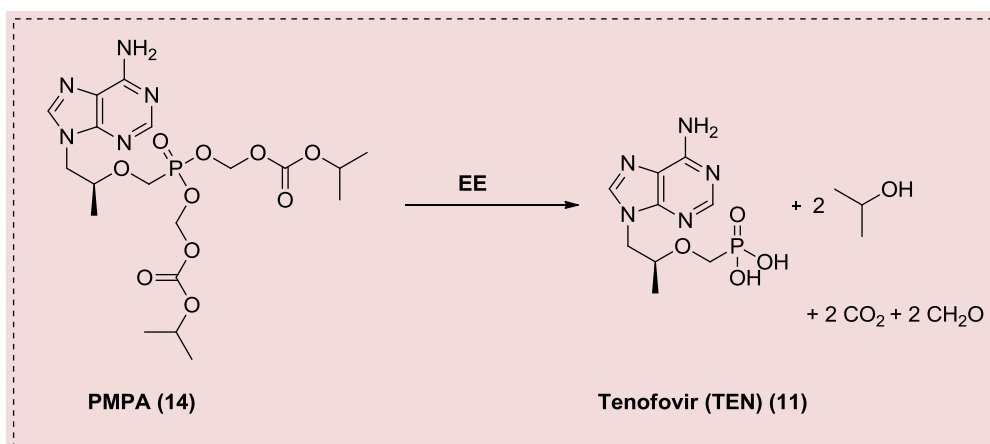


Figura 6. Conversão intracelular do PMPA ao tenofovir. EE = enzima esterase²⁶

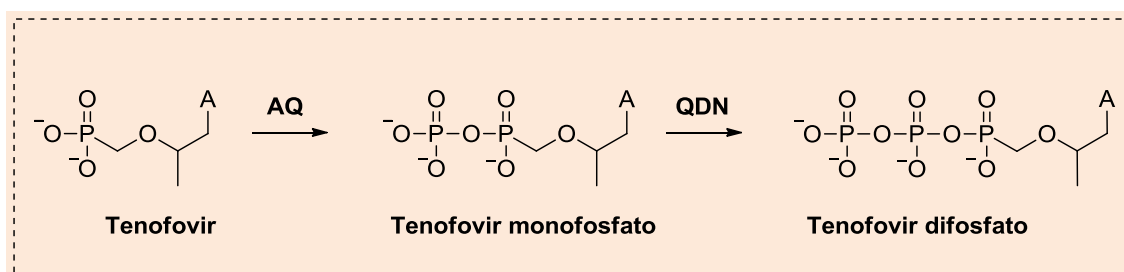


Figura 7. Conversão intracelular do tenofovir ao tenofovir difosfato. A = Adenina; AQ = adenilato quinase; QDN = quinase difosfato nucleosídeo. Fonte: adaptada²⁶

A presença da ligação fosfonato no TEN tem o objetivo de evitar a etapa de fosforilação inicial, que é limitante para os análogos de nucleosídeos. Além disso, a ligação do ácido fosfônico é quimicamente e metabolicamente estável. Outra importante característica é que não estão sujeitos a desaminação ou desglicosilação,³⁴ e o radical fosfato é isostérico ao fosfato presente nos nucleotídeos naturais.²⁸

A primeira patente do TDF foi concedida nos Estados Unidos (EUA), em 1998, para a empresa Gilead Sciences. Em setembro de 2000, foi solicitado um pedido de patente no Brasil; contudo, em agosto de 2008, o Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), por iniciativa de Farmanguinhos/Fiocruz, indeferiu a solicitação, devido ao desacordo com os artigos 8º e 13º da LPI 9.279. Embora o uso de TEN como antirretroviral não fosse reportado até então, a molécula já era conhecida, o que não caracterizava inovação

e o patenteamento. Assim, em 2009 o TDF pode ser produzido e comercializado por qualquer laboratório brasileiro. Esta medida permitiu a redução do custo do medicamento para o Ministério da Saúde (MS), que passou a adotar este fármaco como primeira escolha na terapia antirretroviral (TAR) e no tratamento de hepatite B.³⁵

No tratamento de infecções em geral, a prática da “monoterapia funcional”, que consiste na administração de apenas um medicamento, levou ao aparecimento de resistências. Visando minimizar esta problemática, é recomendado o uso de combinações de fármacos. Estas associações podem ser feitas através do emprego de coquetéis (diferentes medicamentos ingeridos simultaneamente) ou de formulações em dose fixa combinada (DFC). As formulações DFCs têm as vantagens de simplificar o esquema terapêutico e aumentar a adesão do paciente ao tratamento. A primeira DFC contendo o TDF,

Truvada[®], foi aprovada pelo FDA em 2004 e, desde então, várias outras associações foram licenciadas (Tabela 1). Posteriormente, em julho de 2012, o FDA aprovou o uso do TDF como profilaxia de pré-exposição (PrEP), que consiste em uma forma de prevenção da infecção pelo HIV em indivíduos não infectados, que vivem em situação de risco, tais como usuários de drogas injetáveis e

profissionais do sexo. Nos últimos anos, outros estudos que utilizaram o TDF sob a forma de gel vaginal mostraram a redução da contaminação pelo HIV, além de prevenir as infecções de herpes genitais. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar a eficácia e segurança destes resultados.^{36,37}

Tabela 1. Associações de TDF em DFC aprovadas para o tratamento da AIDS

Data de aprovação no FDA	Nome de marca e composição	Empresa
2004	Truvada [®] : tenofovir e emtricitabina	Gilead Sciences
2006	Atripla [®] : efavirenz, emtricitabina e tenofovir	Bristol-Myers Squibb e Gilead Sciences
2011	Complera [®] /Eviplera [®] : emtricitabina, rilpivirina e tenofovir	Gilead Sciences
2012	Stribild [®] : elvitegravir, cobicistat, emtricitabina e tenofovir	Gilead Sciences

Infelizmente, o tratamento contínuo com o TDF tem levado ao aparecimento de resistências. Em geral, elas estão associadas a duas principais mutações genéticas, a K65R e a K70E. A K65R provoca a redução de 3 a 4 vezes na atividade do TDF na TR,³⁸ e também foi identificada em pacientes que fazem uso de Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídicos (ITRN).³⁹ A mutação K70E foi observada em pacientes em tratamento com TDF, em combinação com outro ITRN. Essas duas mutações são antagonistas e acredita-se que não existam no mesmo genoma.⁴⁰

2.1. Relação estrutura-atividade

A elevada eficácia do TDF e os casos de resistência a este fármaco têm levado à busca de novos análogos. Estes estudos buscam modificações estruturais, tanto na cadeia lateral do fosfonato, quanto na porção heterocíclica, com objetivo de melhorar a atividade.

Uma das principais pesquisas realizadas, visando estabelecer uma relação estrutura-atividade (SAR, do inglês "Structure-Activity Relationship") para os ANPs foi descrita em 1999. Holý e colaboradores realizaram modificações estruturais no PME A (**10**), substituindo a base nitrogenada adenina por guanina (Figura 8). Estes compostos foram avaliados para a inibição *in vitro* do HIV-1, HIV-2 e do vírus do sarcoma moloney (MSV).⁴¹

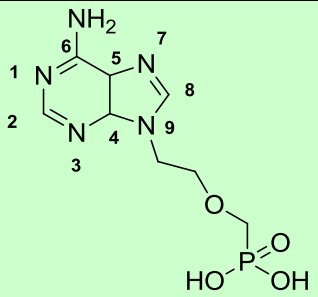
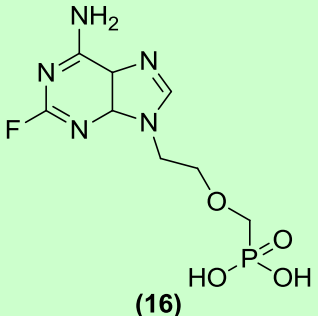
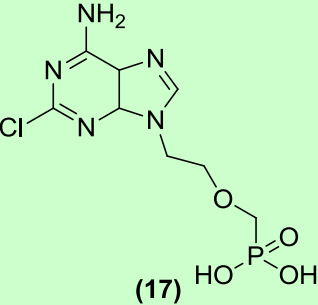
Com relação a atividade anti-HIV, somente os compostos **21** e **23** mostraram-se ativos. Para a atividade anti-MSV, os resultados mostraram redução de atividade antiviral quando são introduzidos os átomos de flúor (**16**) e cloro (**17**) no C-2 da adenina.⁴¹ No entanto, a substituição do grupamento amino na posição 6 por uma metila (**18**) provocou a total perda da atividade. Este comportamento também foi observado quando foram introduzidos o bromo em C-8 de **19** e a hidroxila em C-2 de **20**. Contudo, a introdução do grupo amino na posição 2 da adenina **21**, aumentou a atividade, sendo

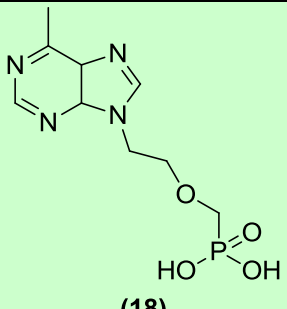
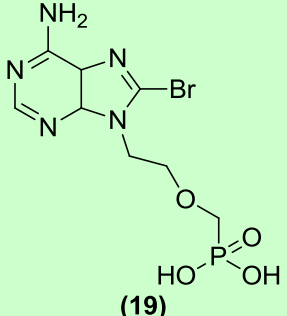
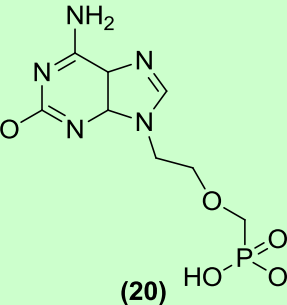
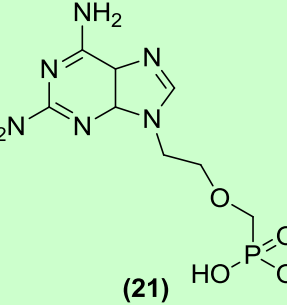
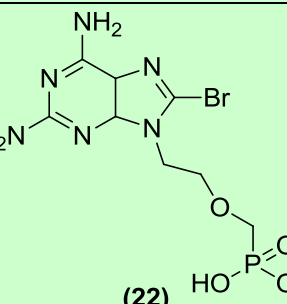
esta reduzida com a inclusão do átomo de bromo em C-8 (**22**). O aumento da atividade no derivado **21** pode ser explicado pela participação do par de elétrons do nitrogênio do grupo amino na posição 2 do anel purínico, uma vez que a basicidade deste grupo aumenta a densidade eletrônica no heterocíclico (Quadro 1).¹⁹

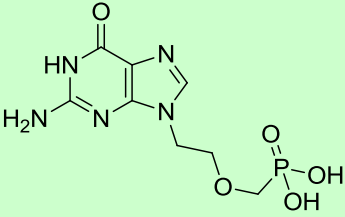
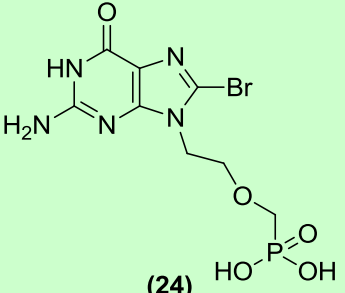
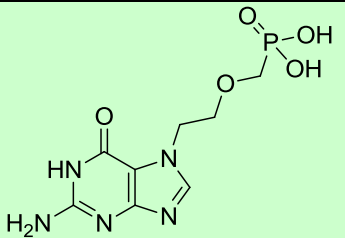
A substituição da adenina pela guanina resultou na formação do derivado PMEA (**23**) com atividade antiviral 1900 vezes superior

ao PMEA (**10**). A introdução do átomo de bromo (**24**) na posição 8 da guanina acarretou redução da atividade, enquanto que a troca da cadeia acíclica para a posição 7 (**25**) ocasionou total perda da atividade. Isto sugere que o sítio de interação dos análogos de PMEA (**10**) com a enzima é regioespecífico, visto que todos os derivados ativos suportam a cadeia acíclica somente na posição 9 da base (Quadro 1).⁴¹

Quadro 1. Atividade biológica anti-HIV (em células MT-4 e CEM) e anti-MSV (em células fibroblastos embrionários C3H/3T3 murino) de derivados N-[2-(fosfonometoxi)etil

Compostos	HIV-1 Concentração Efetiva (μM) – EC ₅₀ [*]		HIV-2 Concentração Efetiva (μM) – EC ₅₀ [*]		MSV Concentração Efetiva (μM) – EC ₅₀ [*]
	MT-4	CEM	MT-4	CEM	
 <p>PMEA (10)</p>	-	-	-	-	1,14 ± 0,04
 <p>(16)</p>	-	> 100	-	40,00 ± 0,0	22,3 ± 6,1
 <p>(17)</p>	> 100	-	> 100	-	18,2 ± 6,5

 <p>(18)</p>	> 400	-	-	-	>200
 <p>(19)</p>	> 100		> 100		> 200
 <p>(20)</p>	> 100	-	> 100	-	123 ± 23
 <p>(21)</p>	2,67 ± 1,53	-	-	-	0,60 ± 0,33
 <p>(22)</p>	-	> 100	-	> 100	2,43 ± 1,86

 <p>(23)</p>	> 0,2		> 0,2	0,03	0,0006 ± 0,003
 <p>(24)</p>	-	> 0,16	-	> 0,16	> 0,16
 <p>(25)</p>	-	> 100	-	> 100	96 ± 14,8

*Concentração Efetiva (CE, do inglês "Effective Concentration", EC); EC₅₀ – concentração da substância para qual 50% do efeito é observado

As modificações estruturais realizadas nos ANPs permitiram a construção da relação estrutura atividade, descrita na Figura 8:¹⁹

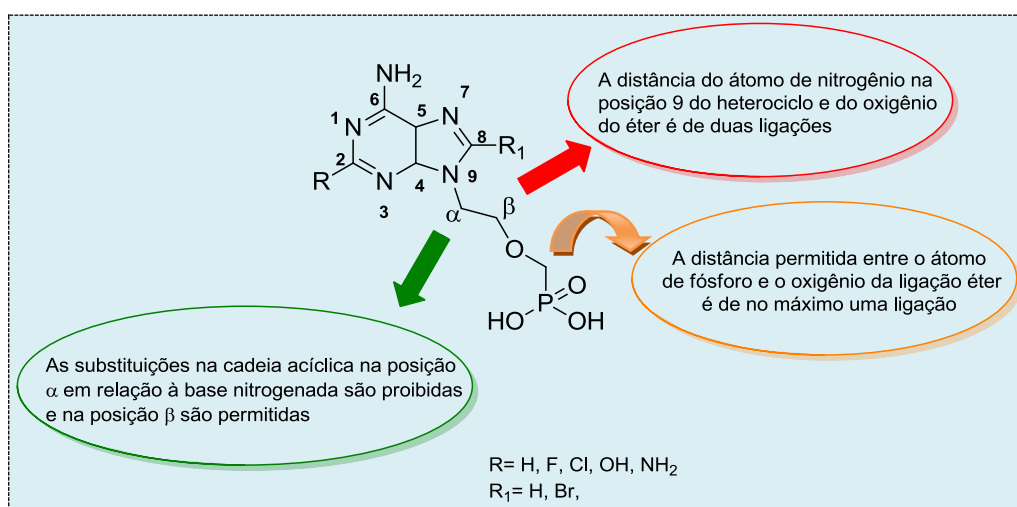


Figura 8. Estudo de SAR dos análogos de TEN 16-25

Outros estudos de SAR nos derivados PMEA (**10**) e TEN (**11**) foram descritos por Tang e colaboradores. Eles realizaram substituições na cadeia acíclica com diferentes ésteres, como mostrado no Quadro 2. Todos os compostos foram avaliados quanto à inibição *in vitro* do HBV e HIV, utilizando as células 2.2.15 e MT-4, respectivamente.

Os resultados de atividade inibitória do HBV (Quadro 2) mostraram que as moléculas **27** e **31** foram as mais promissoras, apresentando um valor de IC₅₀ de 2,46 µM e 2,15 µM, respectivamente; superiores ao PMEA (**10**) (IC₅₀ = 42,1 µM), ao PMPA (**11**) (IC₅₀ = 12,3 µM) e ao TDF (**15**) (IC₅₀ = 5,10 µM). As atividades dos compostos **28-30** foram similares a do TDF (**15**), e os compostos **26** e **32-35** exibiram atividade nas concentrações entre 7,20-43 µM. Vale ressaltar que, a estereoquímica destes compostos foram definidas com base nos resultados de atividade biológica para os estereoisômeros do TDF.

Com relação a atividade anti-HIV, as substâncias **28**, **29** e **35** se mostraram ativas, quando comparadas com a emtricitabina (IC₅₀ = 27,7 µM), já utilizada na terapia. O composto **32** foi mais ativo, apresentando valor de IC₅₀ de 1,61 µM, sendo mais potente que o TDF (**15**) (IC₅₀ = 2,31 µM). Contudo, a molécula **27** foi citotóxica em baixas concentrações (22,1 µM).⁴² Os valores de

atividade antirretroviral para as substâncias **26**, **30**, **31** e **33**, **34** foram superiores à 30 µM (Quadro 2).


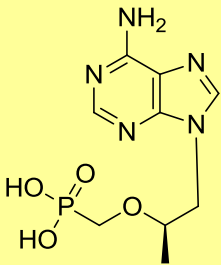
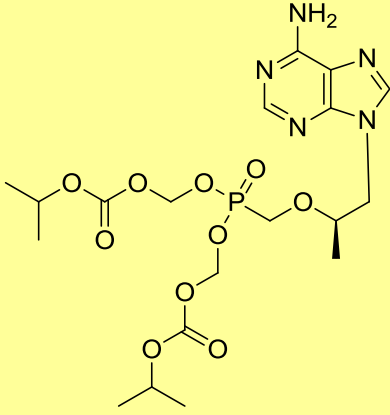
Em outro trabalho, De Clercq e colaboradores utilizaram como protótipos o 2,4-diamino-6-[2(fosfometoxi)etoxi] piridina (**36**) e o 2,4-diamino-6-(R)-[2(fosfonometoxi)propoxi]-pirimidina (**37**), já descritos como ativos contra o HSV, o VZV e o HIV.^{43,44} Quando os valores de IC₅₀ dos compostos **36** (IC₅₀ = 1,9 µM), **37** (IC₅₀ = 0,9 µM), PMEA (**10**) (IC₅₀ = 2,9 µM) e TEN (IC₅₀ = 1,1 µM) foram comparados, verificou-se que a troca da base nitrogenada por outro heterociclo pôde ser realizada, sem a perda da atividade (Figura 9).

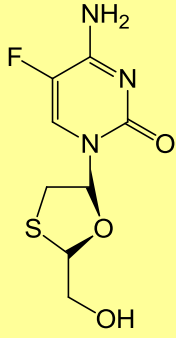
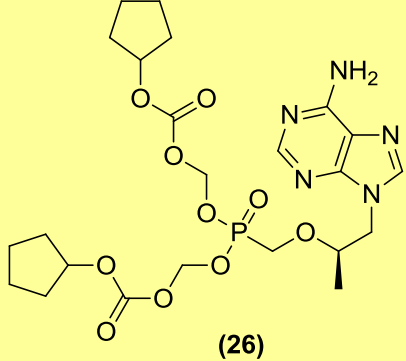
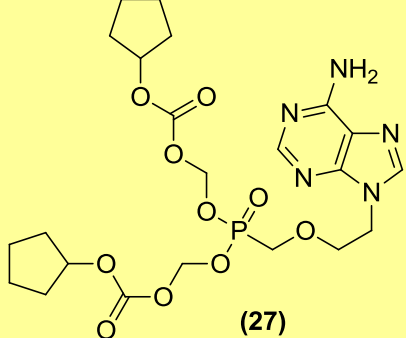
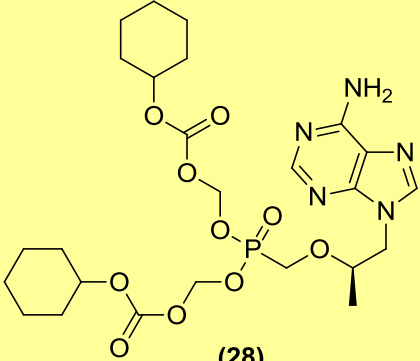
A partir dos compostos **36** e **37**, várias modificações estruturais foram planejadas, com objetivo de construir um estudo de SAR. Com relação às substituições em C-5 do anel pirimidínico, pôde-se observar que (Figura 9):

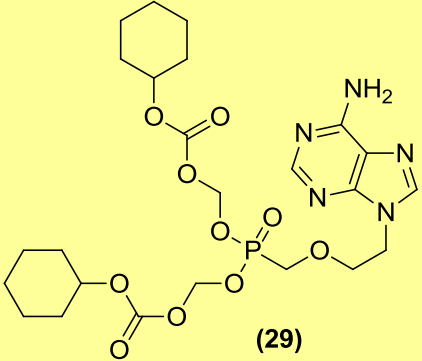
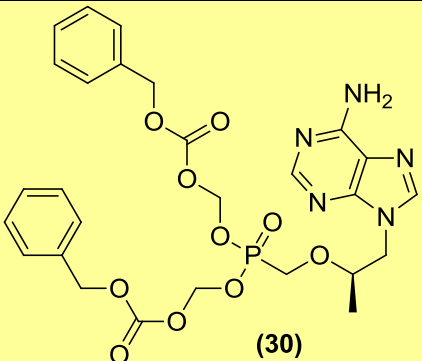
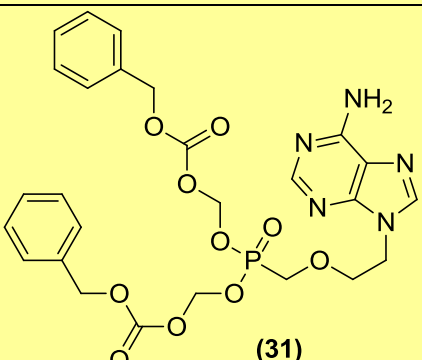
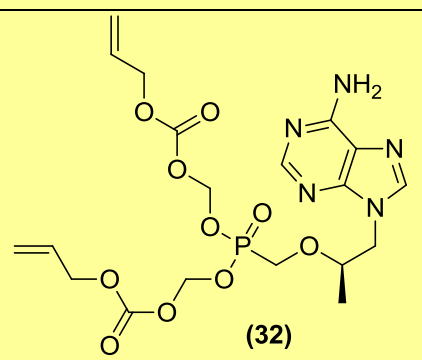
- A introdução do grupo metil (**39**) proporcionou uma melhora da atividade em mais de dez vezes, quando comparada ao TEN;

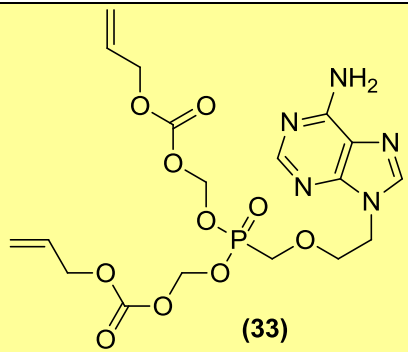
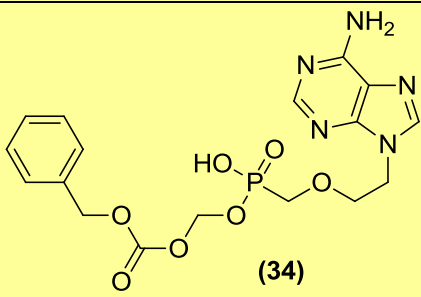
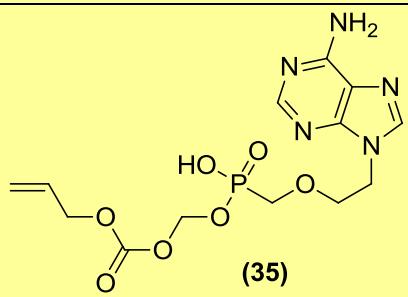
A substituição por carbaldeído (**38**) e cloro (**41**) não promoveu alterações significativas na atividade antirretroviral; no entanto, quando foi substituído pelo átomo de bromo (**42**) e ciano (**40**), ocorreu redução da atividade em mais de duas vezes em relação ao TEN.

Quadro 2. Avaliação biológica anti-HBV (em células 2.2.15) e anti-HIV (em células MT-4) dos derivados de bis-ésteres de PMEa e PMPa

COMPOSTO	Atividade Anti-HBV			Atividade Anti-HIV
	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM) ^a	IS ^b	IC ₅₀ (μM)
 <p>PMEa (10)</p>	42,1	1,83 x 10 ³	43,5	-
 <p>PMPa (11)</p>	12,3	0,39 x 10 ³	31,4	-
 <p>TDF (15)</p>	5,10	55,2	10,8	2,31

 <p>Emtricitabina</p>	-	-	-	27,7
 <p>(26)</p>	7,20	80,2	-	> 30
 <p>(27)</p>	2,46	22,1	-	3,51
 <p>(28)</p>	5,94	92,8	15,6	17,5

 <p>(29)</p>	5,33	63,2	11,9	23,1
 <p>(30)</p>	5,50	70,1	12,7	> 30
 <p>(31)</p>	2,15	26,5	12,3	> 30
 <p>(32)</p>	7,98	30,9	-	1,61

 <p>(33)</p>	8,20	24,6	-	> 30
 <p>(34)</p>	43,0	$0,59 \times 10^3$	13,7	> 30
 <p>(35)</p>	10,6	$0,67 \times 10^3$	-	23,7

^a Concentração citotóxica (CC); CC_{50} – concentração da substância necessária para reduzir em 50% as células viáveis; ^b Índice de seletividade (IS) - consiste na razão entre o CC_{50} e o IC_{50} . É grau de seletividade do fármaco para produzir seus efeitos desejáveis *versus* efeitos adversos

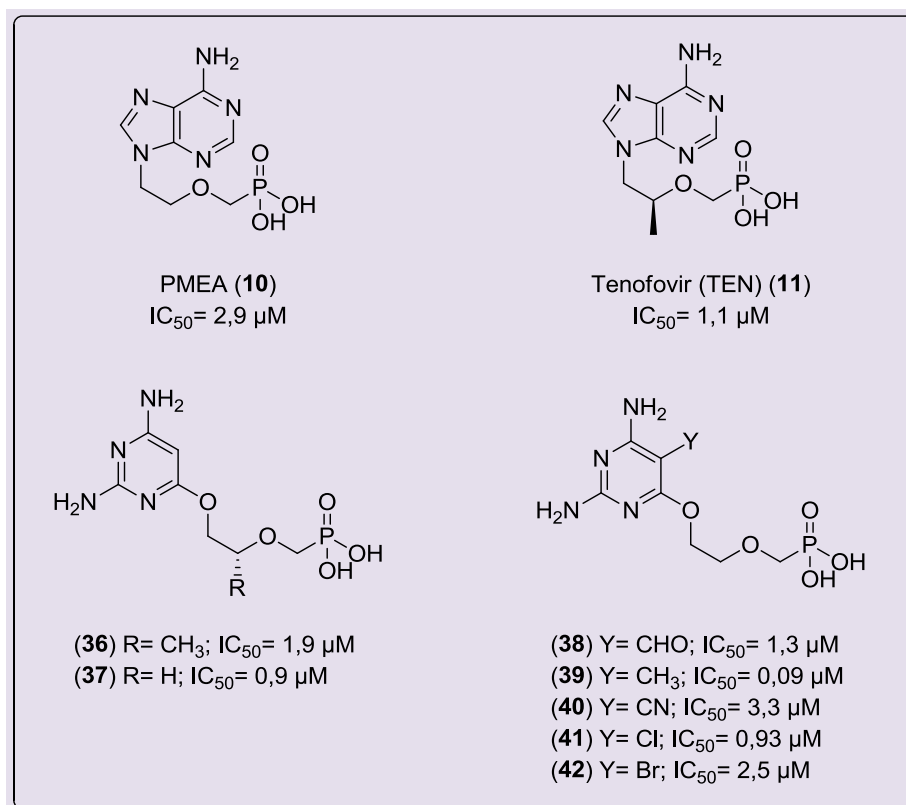


Figura 9. Estruturas químicas dos compostos **36-42** sintetizados e testados, com os respectivos valores de IC_{50}

Em 2011, Valiaeva e colaboradores descreveram a síntese e avaliação antiviral de análogos de 9-(S)-[3-alcóxi-2-(fosfonometoxi)-propil] (**43**) como inibidores do HBV, HIV e do vírus da hepatite C (HCV). As avaliações biológicas mostraram que o composto **44**, derivado da guanina,

apresentou maior potência na inibição da atividade antiviral do HIV-1, quando comparado a **43**. Além de ser o mais ativo da série, apresentou índice de seletividade (IS) maior do que 4,4 milhões em células MT-2 humanas leucêmicas (Figura 10).⁴⁵

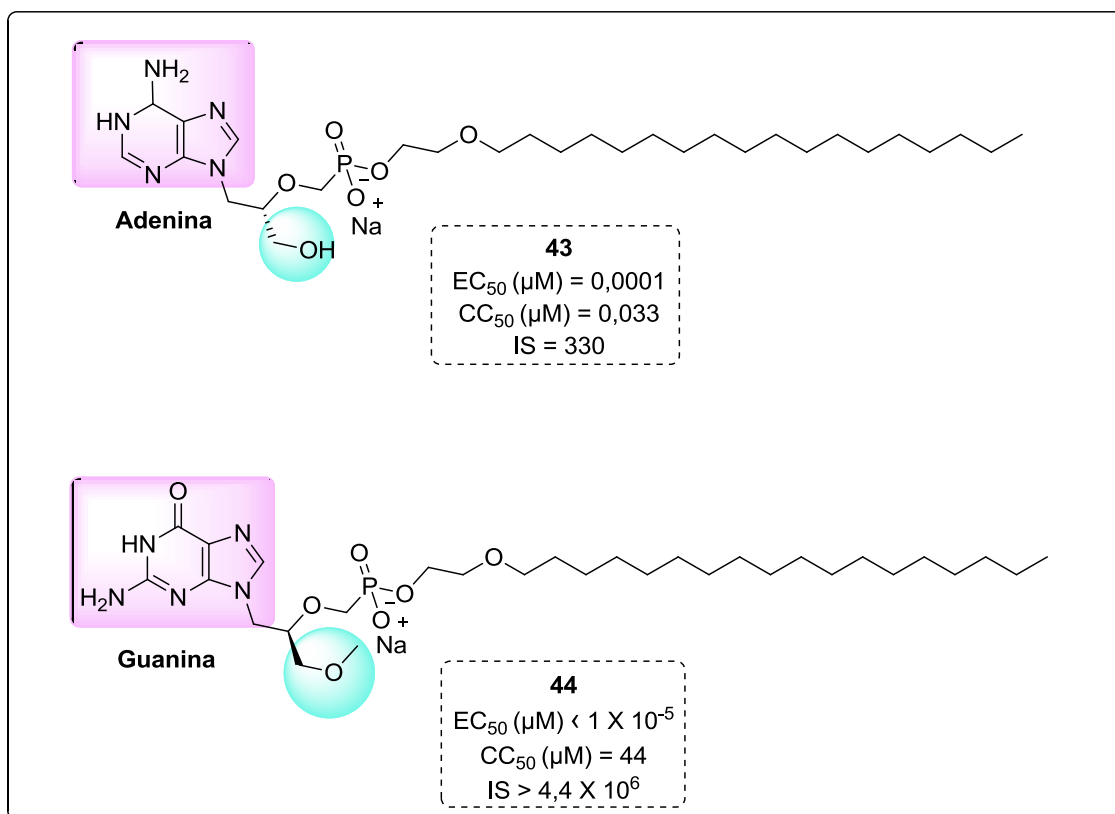


Figura 10. Atividade anti-HIV, citotoxicidade IS de análogos do TDF (**43-44**) em células humanas leucêmicas MT-2

Posteriormente, Roux e colaboradores sintetizaram e avaliaram a atividade anti-HIV de novos análogos do TDF. A análise dos resultados mostrou que todos os compostos inibiram significativamente a replicação do HIV-1 e HIV-2 em culturas de células CEM (Figura 11). Os pró-fármacos **45-48** foram 60 vezes mais ativos que o PMEA (**10**), e 300 vezes mais ativos que o TEN. No entanto, **46** apresentou atividade antiviral seis vezes menor que **45**, levando-se a propor que, apesar de exibir elevada potência, a troca do oxigênio pelo enxofre faz com que haja significativa redução da atividade.⁴² Em relação ao índice de seletividade (IS), que avalia a segurança terapêutica dos compostos, os derivados **45** e **46** foram mais seletivos (IS \geq 10-35) que os análogos **47** e **48** (IS \geq 270-1900). Isto porque após biotransformação, os pró-fármacos **47** e **48** geraram ácido pivalico, e os produtos **45** e **46**

formam álcool isopropílico, que é menos citotóxico.⁴⁶

As várias modificações estruturais realizadas no TDF permitiram a descoberta de dois novos candidatos a fármacos que em 2012, entraram em fase II dos ensaios clínicos. O primeiro é o GS-7340 (TAF), da Gilead Sciences, que apresentou atividade aumentada em cerca de 500 a 1000 vezes contra o HIV-1, quando comparado ao TDF. O segundo é o CMX157, licenciado pela Chimerix para a Merck, que apresenta melhor perfil farmacocinético de absorção, pois não é um substrato para os transportadores de ânions orgânicos, como no caso do TDF. Isto permite manter as concentrações celulares do fármaco elevadas, sugerindo o seu potencial uso para uma dose semanal. Além disso, o composto é capaz de tratar algumas cepas resistentes (Figura 12).^{47,48}

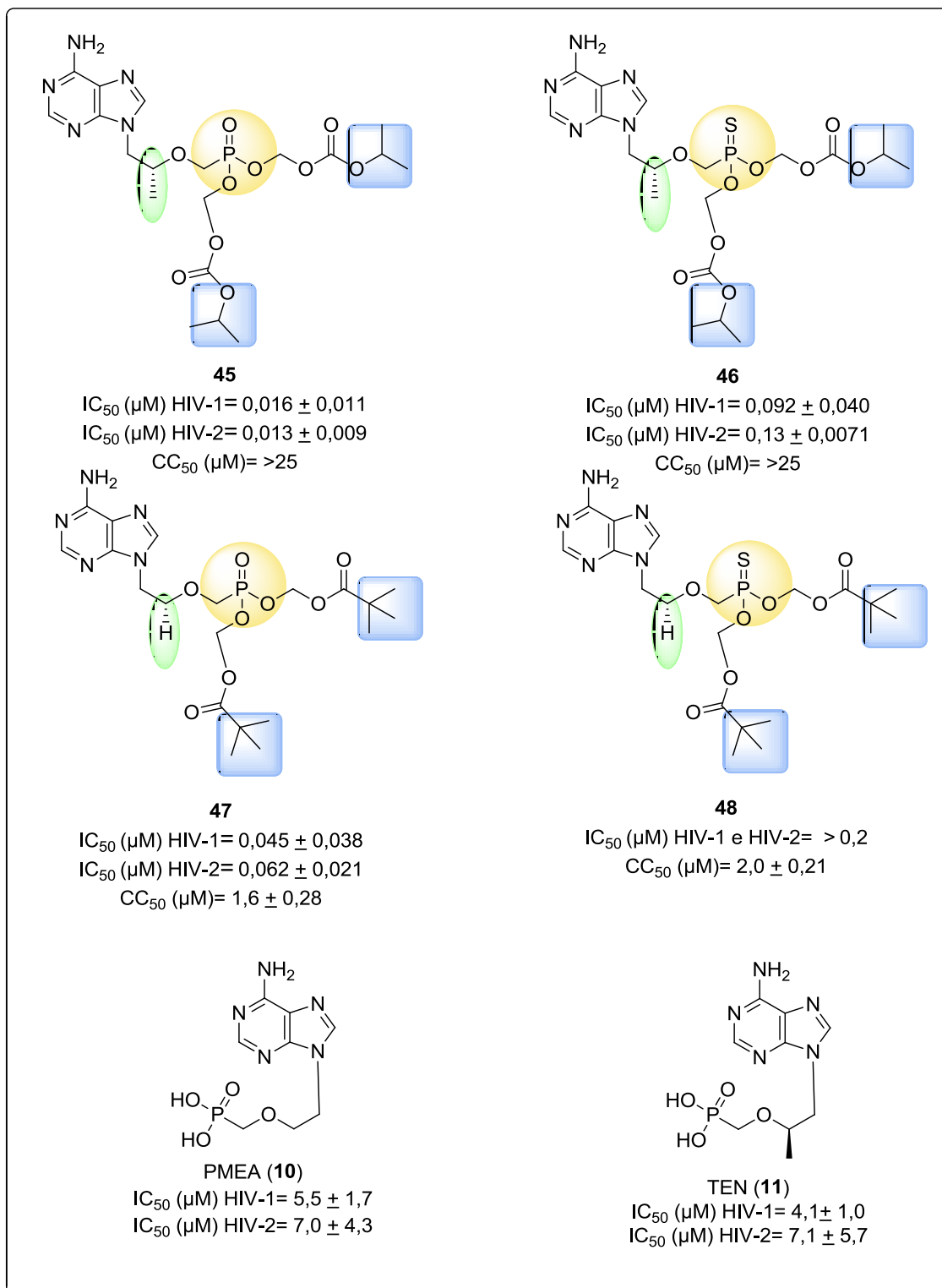


Figura 11. Atividade anti-HIV e citotoxicidade dos análogos do TDF sintetizados por Roux e colaboradores

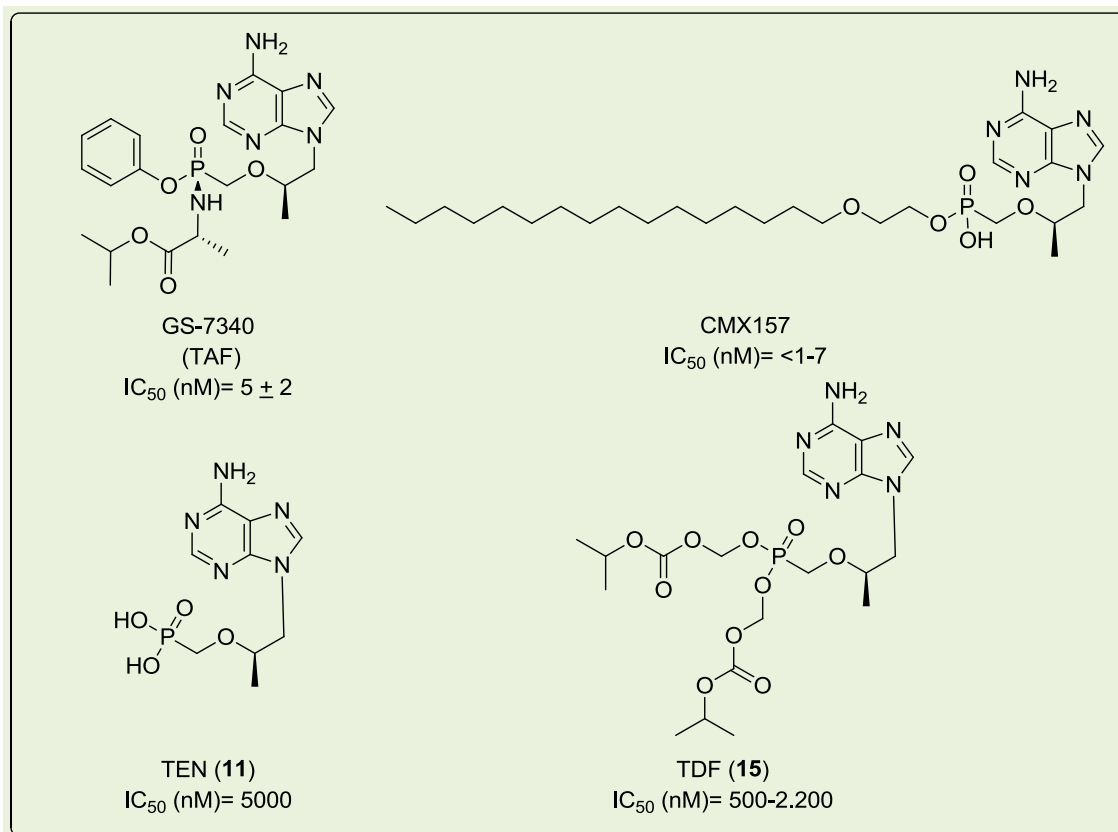


Figura 12. Análogos do TDF em ensaios clínicos e seus respectivos valores de IC₅₀

2.2. Farmacocinética

A biodisponibilidade oral do TDF é de aproximadamente 25% quando administrado em jejum, e a concentração máxima (C_{max}) é atingida em 1 hora. Se ingerido com refeição com elevado teor de gordura (700-1000 calorias e 40-50% de gordura), sua biodisponibilidade é aumentada para 40%; porém, sua C_{max} é atingida em 2 horas.⁴⁹

O TDF não é metabolizado por isoenzimas do citocromo P450 (CYP), e sua eliminação é feita através da filtração glomerular e secreção tubular ativa. Cerca de 70-80% da dose do fármaco é recuperada inalterada na urina, após 72 horas, por administração intravenosa e 10% por administração oral, ao longo de 24 horas.²⁶ A meia vida plasmática longa do fármaco (17 h) e meia vida intracelular (>60 h), permitem que ele seja administrado apenas uma vez ao dia, o que representa uma vantagem em relação aos

seus análogos de nucleosídeos.⁵⁰

Apenas 1-7,2% do TDF se ligam a proteínas do plasma e soro, respectivamente, e a concentração não é determinante para a extensão desta ligação.^{26,51} A média do volume de distribuição no estado estacionário é de 1,3 L/Kg, a partir de uma dose intravenosa. Devido à sua natureza polar, o TDF é encontrado em maior concentração no sangue na forma não-ionizada, o que explica sua ampla distribuição pelo organismo e tecidos. Além disso, não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica por ser hidrofílico.^{52,53}

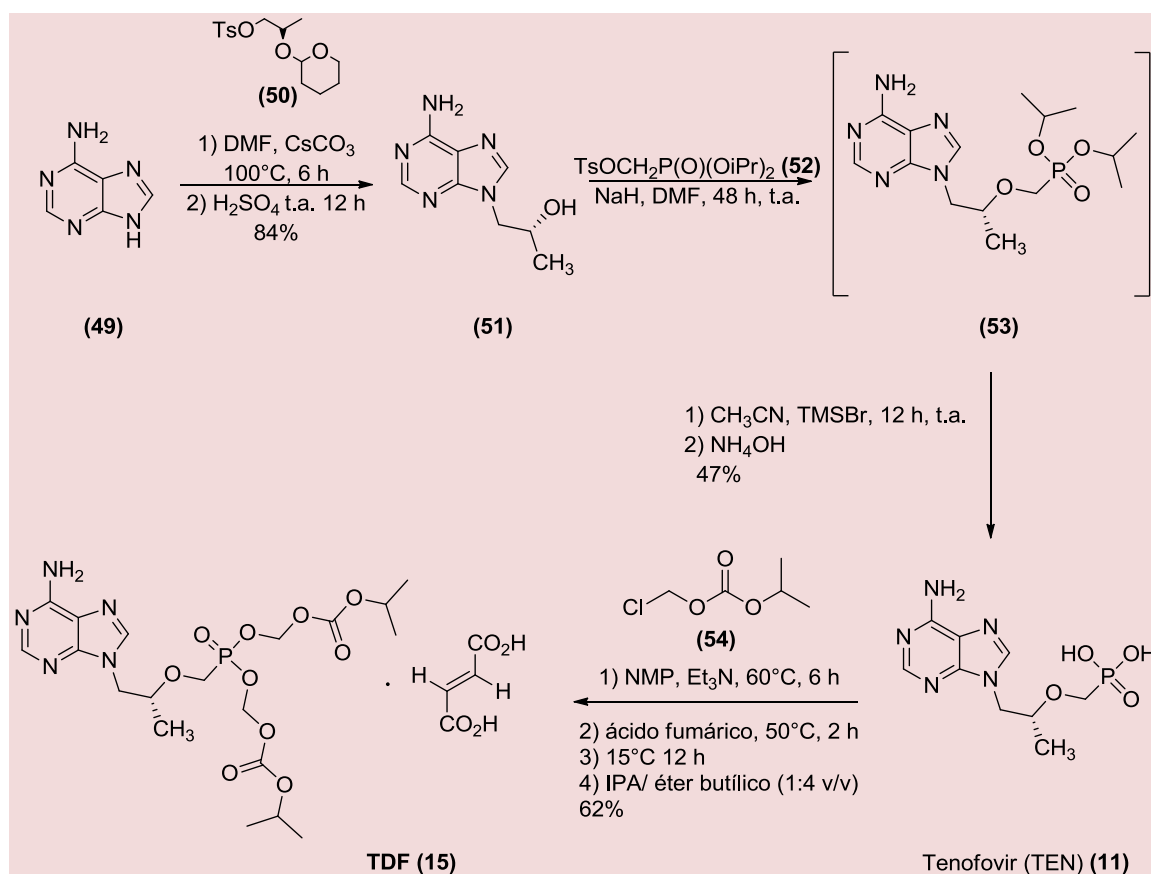
O TDF apresenta interação medicamentosa com a didanosina e o atazanavir, porém é possível minimizar estes problemas com o ajuste nas doses. As doses também devem ser ajustadas para pacientes que apresentam insuficiência renal, não sendo necessário para pacientes com insuficiência hepática.²⁶

O TDF é geralmente bem tolerado e os efeitos adversos mais comuns incluem astenia, dor de cabeça, diarreia, flatulência e náuseas. Sua toxicidade fisiológica é substancialmente menor quando comparada aos ITRN. A associação do TDF com outros fármacos excretados por via renal pode ser um fator de risco potencial para o surgimento de nefrotoxicidade.^{27,54,55}

2.3. Métodos de Síntese

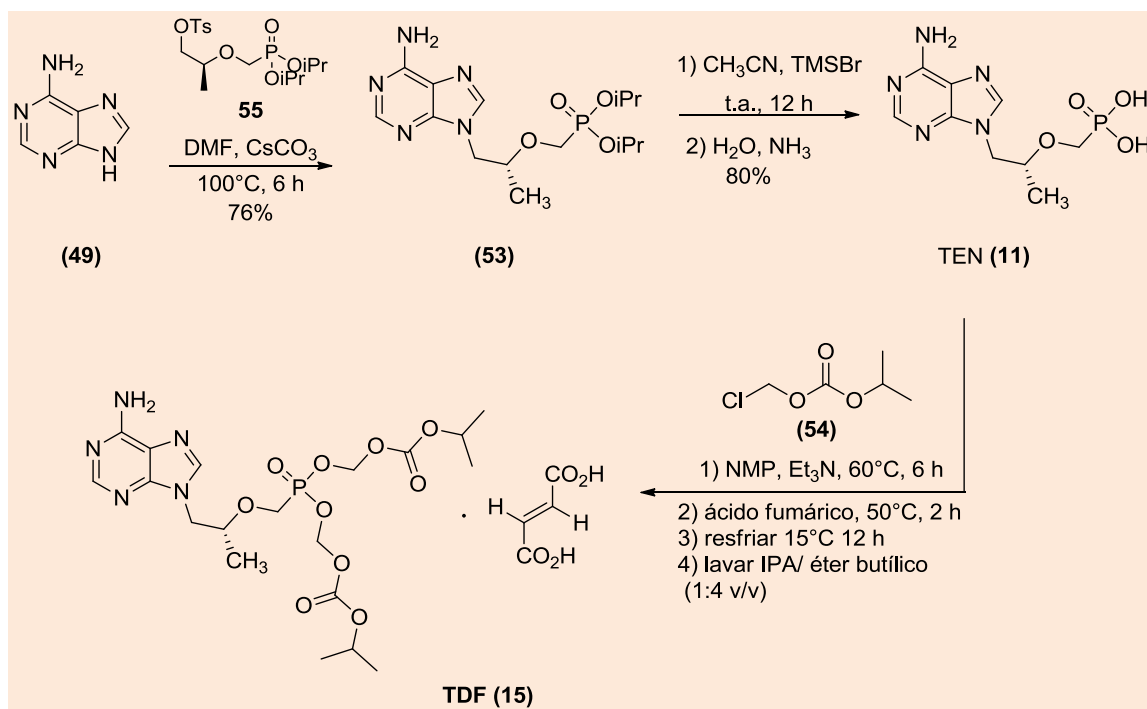
Em 1994, foi descrita por Holý e colaboradores a primeira síntese do TDF,⁵⁶ com quatro etapas reacionais. A etapa inicial

consiste em uma *N*-alquilação da adenina **49**, através da reação com um reagente quiral **50**. Este foi obtido a partir de uma rota sintética com cinco etapas reacionais.⁵⁶⁻⁵⁸ Posteriormente, ocorre a eterificação do intermediário hidróxi **51**, utilizando o diisopropil *p*-toluenossulfoniloximetila (**52**), com a formação do ANP **53**. A terceira etapa desta síntese é a hidrólise do intermediário **53**, que permite a obtenção do TEN (**11**). Este é submetido à reação de esterificação, com cloreto de metilisopropilcarbonato (CMIC) **54**, e posterior adição de ácido fumárico para a obtenção do pró-fármaco TDF (**15**). O rendimento da última etapa reacional não foi descrito na patente (Esquema 1).⁵⁷



A segunda metodologia, também descrita por Holý e colaboradores, realiza a etapa de *N*-alquilação utilizando o reagente quiral (**55**), em substituição ao composto **50**.⁵⁶ Contudo,

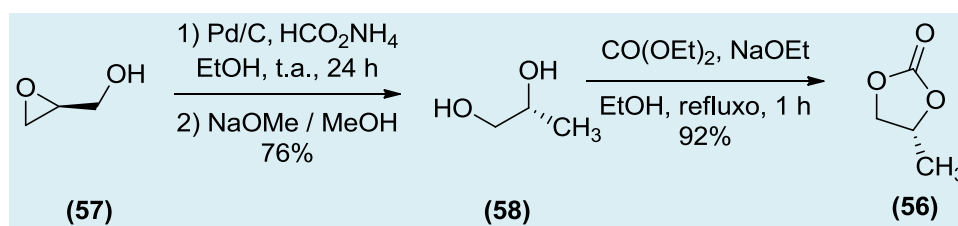
a rota sintética proposta para a formação do reagente **55** é composta de nove etapas reacionais (Esquema 2).^{56,57}



Esquema 2. Segunda rota sintética proposta por Holý e colaboradores para a síntese do TDF.^{56,57}

O reagente quiral mais empregado na etapa de *N*-alquilação é o (*R*)-propileno carbonato (**56**), descrito por Bischofberger e colaboradores⁵⁹ (Esquema 3). Este carbonato

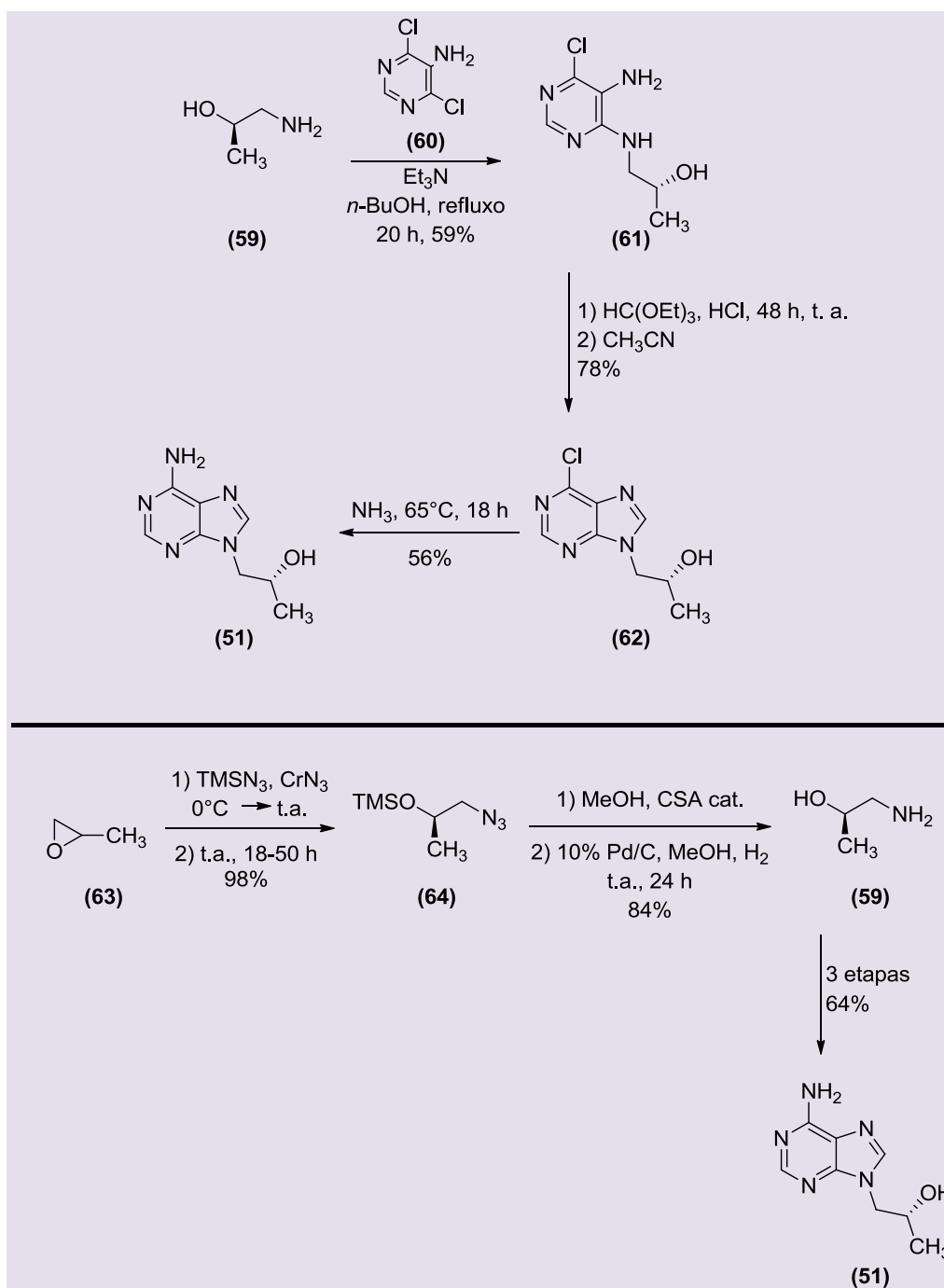
(**56**) pode ser obtido a partir de uma rota sintética de duas etapas, com rendimento global de 70%.



Esquema 3. Rota descrita para síntese do (*R*)-propileno carbonato (**56**).⁵⁹ **Legenda:** Pd/C - paládio sobre carbono; HCO₂NH₄ - formiato de amônio; EtOH – etanol; NaOMe - metóxido de sódio; MeOH – metanol; CO(OEt)₂ - carbonato de dietila; NaOEt - etóxido de sódio

Outros métodos, que não realizam a reação de *N*-alquilação da adenina (**49**), foram desenvolvidos para a obtenção do intermediário *N*-substituído **51**. Descritos por

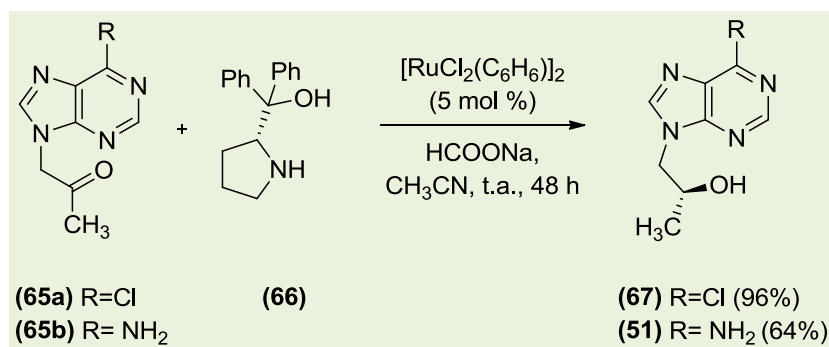
Zhang e colaboradores, são compostos por várias etapas reacionais, podendo ser iniciadas a partir dos substratos **59** e **63** (Esquema 4).⁶⁰⁻⁶²



Esquema 4. Metodologias descritas por Zhang e colaboradores para a síntese do intermediário hidroxilado **51**.⁶⁰⁻⁶² **Legenda:** *n*-BuOH – 1-butanol; HC(OEt)₃ - ortofomiato de trietila; HCl - ácido clorídrico; TMSN₃ – azido de trimetilsilano; CrN₃ - azida de salen cromo; CSA - ácido clorossulfônico

A obtenção do intermediário **51** também pode ser feita a partir da cetona **65**, ao contrário dos tradicionais álcoois quirais. O

produto é obtido em uma única etapa de reação e com bom rendimento (Esquema 5).⁶⁰



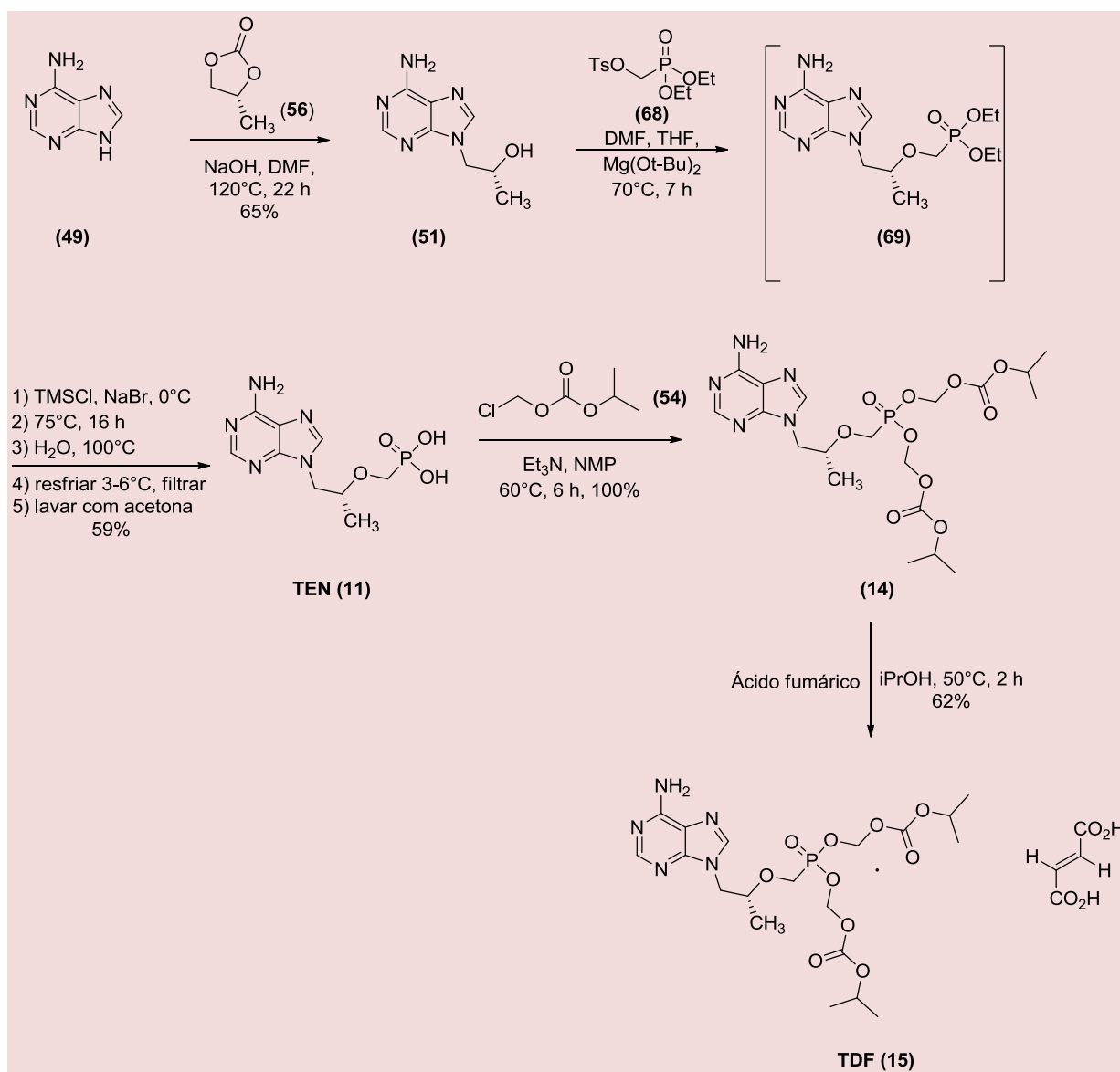
Esquema 5. Síntese para a obtenção do intermediário hidroxilado **51**.⁶⁰ **Legenda:** $[\text{RuCl}_2(\text{C}_6\text{H}_6)]_2$ - catalisador de bis(fenildicloro)rutênio(II); HCOONa - metanoato de sódio

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido desenvolvidos com objetivo de produzir uma metodologia mais eficiente para a obtenção do TDF. Desta forma, várias etapas reacionais da síntese original têm sido investigadas, visando melhorar os rendimentos reacionais. Para a etapa de eterificação do intermediário hidroxilado **51**, a literatura descreve o uso de diversas bases, tais como hidretos (NaH e LiH_3)⁵⁶⁻⁵⁹ e alcóxidos (*tert*-butóxido de lítio e isopropóxido de magnésio).^{63,64} Para a hidrólise do intermediário **53**, o reagente de desalquilação mais empregado é o brometo de trimetilsilano (TMSBr), mais reativo que o cloreto de trimetilsilano (TMSCl). Contudo, alguns artigos relatam que o uso concomitante de iodeto de sódio (NaI) ou iodeto de lítio (LiI), reduzem os tempos reacionais e melhoram os rendimentos.⁶⁵ Apesar de serem os mais empregados na etapa de hidrólise, os haletos de trimetilsilano são corrosivos e possuem custo elevado. Com base neste fato, Indukuri e colaboradores realizaram a desalquilação do

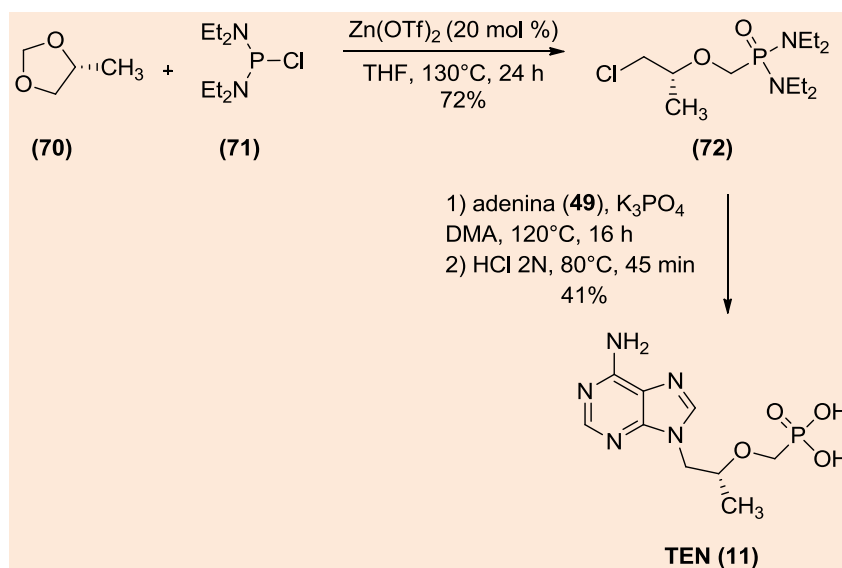
intermediário **53**, substituindo TMSBr por um complexo iônico, obtido a partir da mistura entre o DMF, HCl e o cloreto de alumínio (AlCl_3).⁶⁶ Esta metodologia resultou na formação do TEN com um rendimento global (60%). Contudo, observou-se a melhora da pureza do produto, redução do tempo de reação e do custo do processo.⁶⁶

Em 2010, Ripin e colaboradores desenvolveram uma excelente metodologia para a obtenção do TDF com rendimento global de 24% (Esquema 6).⁶⁷ Posteriormente, este rendimento foi elevado para 31%, através de uma síntese na qual o intermediário TEN não foi isolado.⁶⁸

Recentemente, Ocampo e colaboradores descreveram a síntese do TEN com apenas duas etapas e com rendimento global de 27%. O método consiste na alquilação da adenina (**49**) com o intermediário fosfonamida **72**, obtido a partir da reação entre **70** e **71**, seguido de hidrólise (Esquema 7).⁶⁹



Esquema 6. Processo descrito por Ripin e colaboradores para a síntese do TDF (15).⁶⁷ **Legenda:** NaOH – hidróxido de sódio; Mg(Ot-Bu)₂ - *terc*-butóxido de magnésio; TMSCl - cloreto de trimetilsilano; NaBr - brometo de sódio; iPrOH – isopropanol



Esquema 7. Síntese do TEN (11) descrita por Ocampo e colaboradores.⁶⁹ **Legenda:** ZnOTf₂ - trifluorometanossulfonato de zinco; K₃PO₄ - fosfato de potássio; DMA- *N,N*-dimetilacetamida

3. Conclusões

Este trabalho traçou o perfil histórico da descoberta dos ANPs até a aprovação do TDF na TAR. Também foram analisadas as relações estrutura-atividade do TDF e seus análogos, bem como a descrição das principais metodologias sintéticas para a sua obtenção.

O TDF foi o primeiro análogo de acilonucleotídeo comercializado pertencente à classe de ITRNt, e atualmente é o fármaco de primeira escolha mais empregado no tratamento do HIV. Ele está presente em quatro formulações de terapias combinadas e também é eficaz para o tratamento da hepatite B.

O TDF é considerado um valioso protótipo na busca de novos ITRNt, levando a vários estudos de SAR. A importância do TDF na TAR, associada aos casos de resistência, levou ao desenvolvimento de dois novos potenciais fármacos de segunda geração, GS-7340 e CMX157, que estão em fase II de ensaios clínicos desde 2012.

Referências Bibliográficas

- De Clercq, E. The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: historical perspective. *Antiviral Research* **2007**, *75*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwel, V. W. *Haper: Bioquímica*, 6ª ed, Atheneu, São Paulo, 1990.
- El Ashry, E. S. H. El Kliry, I. Acyclonucleosides, part. 1. Seconucleosides, *Advanced in Heterocyclic Chemistry* **1997**, *67*, 391. [CrossRef]
- El Ashry, E. S. H. El Kliry, I. Acyclonucleosides, part. 3 Tri-, tetra-, e pentaseco-nucleosides. *Advanced in Heterocyclic Chemistry* **1997**, *69*, 129. [CrossRef]
- De Clercq, E.; Field, J. H. Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *British Journal of Pharmacology* **2006**, *147*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- Elion, G. B.; Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; De Miranda, P.; Beauchamp, L.; Schaeffer, H. J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America* **1977**, *74*, 5716. [[PubMed](#)]
- ⁷ Schaeffer, H. J.; Beauchamp, L.; De Miranda, P.; Elion, G. B.; Bauer, D. J.; Collins, P. 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* **1978**, *272*, 583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸ De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P.; Holý, A. (s)-9-(2,3-dihydroxypropyl)-adenine: na aliphatic nucleoside analog with broad spectrum antiviral activity. *Science* **1978**, *200*, 563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Votruba, I.; Holý, A. Inhibition of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase by the aliphatic nucleoside analogue 9-(S)-(2,3-dihydroxypropyl)adenine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1980**, *45*, 3039. [[CrossRef](#)]
- ¹⁰ Boyd, M. R.; Bacon, T. H.; Sutton, D.; Cole, M. Antitherpesvirus activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl)guanine (BRL39123) in cell culture. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1987**, *31*, 1238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹¹ Crooks, R. J. Valaciclovir – a review of its potential in the management of genital herpes. *Antiviral Chemistry Chemotherapy* **1995**, *6*, 39. [[CrossRef](#)]
- ¹² Harnden, M. R.; Jarvest, R. L.; Boyd, M. R.; Sutton, D.; Vere Hodge, R. A. Prodrugs of the selective antitherpesvirus agent 9-[4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)but-1-yl]guanine (BRL 39123) with improved gastrointestinal absorption properties. *Journal of Medicinal Chemistry* **1989**, *32*, 1738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹³ Vere Hodge, R. A.; Perkins, R. M. Mode of action of 9-[4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)but-1-yl]guanine (BRL 39123) against herpes simplex virus in MRC-5 cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1989**, *33*, 223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, 2a edição, Editora Art Med Ltda, Porto Alegre, R. S., 2008.
- ¹⁵ De Clercq, E.; Holý, A. Alkyl ester of 3-adenin-9-yl-2-hydroxypropanoic acid: a new class of broad-spectrum antiviral agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **1985**, *28*, 282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶ De Clercq, E. Acyclic nucleoside phosphonates: past, present and future. Bridging Chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes- and poxvirus infections: the phosphonate bridge. *Biochemical Pharmacology* **2007**, *73*, 911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ De Clercq, E. Antiviral drug discovery and development: Where chemistry meets with biomedicine. *Antiviral Research* **2005**, *67*, 56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ De Clercq, E. The acyclic nucleoside phosphonates (ANPs): Antonín Holý's Legacy. *Medicinal Research reviews* **2013**, *33*, 1278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Holý, A. Antiviral acyclic nucleoside phosphonates structure activity studies. *Antiviral Research* **2006**, *71*, 248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ De Clercq, E.; Sakuma, T.; Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Rosenberg, I.; Holý, A. Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines. *Antiviral Research* **1987**, *8*, 261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹ De Clercq, E.; Holý, A.; Rosenberg, I.; Sakuma, T.; Balzarini, J.; maudgal, P. C.; 1986. A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature* **1986**, *323*, 464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² Hatse, S.; Princen, K.; Gerlach, L.-O.; Rosenkilde, M. M.; Schwartz, T. W.; Bridger, G.; De Clercq, E.; Schols, D. Mutations at the CXCR4 interaction sites for AMD3100 influence anti-CXCR4 antibody binding and HIV-1 entry. *FEBS Letter* **2003**, *546*, 300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ De Clercq, E. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nature*, **2005**, *4*, 928-940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Balzarini, J.; Holý, A.; Jindrich, J.; Naesens, L.; Snoech, R.; Schols, D.; De Clercq, E. Differential antitherpesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates: potent and antiretrovirus activities of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurine. *Antimicrobial Agents and*

- Chemotherapy* **1993**, *37*, 332. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Yang, H.; Qi, X.; Sabogal, A.; Miller, M.; Xiong, S.; Delaney, W. E. Cross-resistance testing of next-generation nucleoside and nucleotide analogues against lamivudine-resistance HBV. *Antiviral Therapy* **2005**, *10*, 625. [PubMed]
- ²⁶ Kearney, B. P.; Flaherty, J. F.; Shah, J. Tenofovir disoproxil fumarate clinical pharmacology and pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics* **2004**, *43*, 595. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷ DeChristoforo, R.; Penzak, S. R. Tenofovir: a nucleotide analogue reverse-transcriptase inhibitor for treatment of HIV infection. *American Journal of Health-system Pharmacy* **2004**, *61*, 86. [PubMed]
- ²⁸ De Clercq, E. The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates. The magic of the phosphonate bond. *Biochemical Pharmacology* **2011**, *82*, 99. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁹ Van Hemert, F. J.; Berkhout, B.; Zaaijer, H. L. Differential binding of tenofovir and adefovir to reverse transcriptase of hepatitis B virus. *Plos One* **2014**, *9*, e106324. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁰ Pozniak, A. Tenofovir: What have over 1 million years of patient experience taught us? *International Journal of Clinical Practice* **2008**, *62*, 1285. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Andreatta, K. M.; Miller, M. D. P.; White, K. L. P. HIV-2 antiviral potency and selection of drug resistance mutations by the integrase strand transfer inhibitor elvitegravir and NRTIs emtricitabine and tenofovir in vitro. *The Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **2013**, *62*, 367. [CrossRef] [PubMed]
- ³² Shaw, J. P.; Sueoka, C. M.; Oliyai, R.; Lee, W. A.; Arimilli, M. N.; Kim, C. U.; Cundy, K. C. Metabolism and pharmacokinetics of novel oral prodrugs of 9-[(R)-2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) in dogs. *Pharmacology Research* **1997**, *14*, 1824. [CrossRef] [PubMed]
- ³³ Van Gelder, J.; Deferme, S.; Naesens, L.; De Clercq, E.; Van den Mooter, G.; Kinget, R.; Augustijns, P. Intestinal absorption enhancement of the ester prodrug tenofovir disoproxil fumarate through modulation of the biochemical barrier by defined ester mixtures. *Drug Metabolism Disposition* **2002**, *30*, 924. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁴ Lee, W. A.; Martin, J. C. Perspectives on the development of acyclic nucleotide analogs as antiviral drugs. *Antiviral Research* **2006**, *71*, 254. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁵ Possas, C.; Larouzé, B. Propriedade intelectual e políticas públicas para o acesso aos antirretrovirais nos países do Sul. 1ª ed, E-Papers, Rio de Janeiro, 2013.
- ³⁶ Broder, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1 / AIDS pandemic. *Antiviral Research* **2010**, *85*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁷ CDC - Centers For Disease Control And Prevention. Pre-Exposure Prophylaxis (PrEP). CDC - Centers for Disease Control and Prevention, **2014**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hiv/prevention/research/prep/>>. Acesso em: 20 de Março de 2015.
- ³⁸ Wainberg, M. A.; Miller, M. D.; Quan, Y.; Salomon, H.; Mulato, A. S.; Lamy, P. D.; Margot, N. A.; Anton, K. E.; Cherrington, J. M. In vitro selection and characterization of HIV-1 with reduced susceptibility to PMPA. *Antiviral Therapy* **1999**, *4*, 87. [PubMed]
- ³⁹ Parikh, U. M.; Koontz, D. L.; Chu, C. K.; Schinazi, R. F.; Mellors, J. W. In vitro activity of structurally diverse nucleoside analogs against human immunodeficiency virus type 1 with the K65R mutation in reverse transcriptase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **2005**, *49*, 1139. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁰ Kagan, R. M.; Lee, T. S.; Ross, L.; Lloyd, R. M. Jr.; Lewinski, M. A.; Potts, S. J. Molecular basis of antagonism between K70E and K65R tenofovir-associated mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *Antiviral Research*, **2007**, *75*, 210. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴¹ Holý, A.; Gunter, J.; Dvoraková, H.; Masojdková, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J.; De Clercq, E. Structure-Antiviral activity relationship in the series of pyrimidine and purini N-[2-(2-phosphonomethoxy)ethyl]nucleotides analogues. 1. Derivatives substituted at the

- carbon atoms of the base. *Journal Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 2064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² Tang, Y. B.; Peng, Z. G.; Liu, Z. Y.; Li, Y. P.; Jiang, J. D.; Li, Z. R. Some new acyclic nucleotide analogues as antiviral prodrugs: synthesis and bioactivities in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 6350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³ De Clercq, E.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Leysen, P.; Naesens, L.; Neyts, J.; Pannecouque, C.; Snoeck, R.; Ying, C.; Hocková, D.; Holý, A. Antiviral potential of a new generation of acyclic nucleoside phosphonates, the 6-[2-(phosphonomethoxy)alkoxy]-2,4-diaminopyrimidines. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* **2005**, *24*, 331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ De Clercq, E. The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: historical perspective. *Antiviral Research* **2007**, *75*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁵ Valiaeva, N.; Wyles, D. L.; Schooley, R. T.; Hwu, J. B.; Beadle, J. R.; Prichard, M. N.; Hostetler, K. Y. Synthesis and antiviral evaluation of 9-(S)-[3-alkoxy-2-(phosphonomethoxy)-propyl]nucleoside alkoxyalkyl esters: Inhibitors of hepatitis C virus and HIV-1 replication. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 4616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁶ Roux, L.; Priet, S.; Payrot, N.; Weck, C.; Fournier, M.; Zoulim, F.; Balzarini, J.; Canard, B.; Alvarez, K. Ester prodrugs of acyclic nucleoside thiophosphonates compared to phosphonates: Synthesis, antiviral activity and decomposition study. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *63*, 869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Lee, W. A.; He, G. X.; Eisenberg, E.; Cihlar, T.; Swaminathan, S.; Mulato, A.; Cundy, K. C. Selective intracellular activation of a novel prodrug of the human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor tenofovir leads to preferential distribution and accumulation in lymphatic tissue. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49*, 1898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ Wainberg, M. A. The need for development of new HIV-1 reverse transcriptase and integrase inhibitors in the aftermath of antiviral drug resistance. *Scientifica* **2012**, 238278/1-238278/29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Viread (Tenofovir Disoproxil Fumarate) for the treatment of HIV-1 infection in adults in combination with other antiretroviral agents. Foster City, CA: Gilead Sciences, Inc. 2001 August. [[Link](#)]
- ⁵⁰ Gallant, J. E.; Deresinski, S. Tenofovir disoproxil fumarate. *Clinical Infectious Diseases* **2003**, *37*, 944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Kakuda, T. N.; Scholler-Gyure, M.; De Smedt, G.; Beets, G.; Aharchi, F.; Peeters, M. P.; Vandermeulen, K.; Woodfall, B. J.; Hoetelmans, R. M. Assessment of the steady-state pharmacokinetic interaction between etravirine administered as two different formulations and tenofovir disoproxil fumarate in healthy volunteers. *HIV Medicine* **2009**, *10*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵² Anthonypillai, C.; Gibbs, J. E.; Thomas, S. A. The distribution of the anti-HIV drug, tenofovir (PMPA), into the brain, CSF and choroid plexuses. *Cerebrospinal Fluid Research* **2006**, *3*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ Palombo, M. S.; Singh, Y.; Sinko, P. J. Prodrug and conjugate drug delivery strategies for improving HIV/AIDS therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2009**, *19*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ Parsonage, M. J.; Wilkins, E. G.; Snowden, N.; Issa, B. G.; Savage, M. W. The development of hypophosphataemic osteomalacia with myopathy in two patients with HIV infection receiving tenofovir therapy. *HIV Medicine* **2005**, *6*, 341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁵ Gupta, S. K.; Eustace, J. A.; Winston, J. A.; Boydston, I. I.; Ahuja, T. S.; Rodriguez, R. A.; Tashima, K. T.; Roland, M.; Franceschini, N.; Palella, F. J.; Lennox, J. L.; Klotman, P. E.; Nachman, S. A.; Hall, S. D.; Szczech, L. A. Guidelines for the management of chronic kidney disease in HIV-infected patients: recommendations of the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* **2005**, *40*, 1559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ Holý, A.; Dvorakova, H.; De Clercq, E.; Balzarini, J. M. Preparation of antiretroviral

- enantiomeric nucleotide analog. *USA Pat. Appl. WO09403467* **1994**. (CA 122: 106401). [\[Link\]](#)
- ⁵⁷ Munger, J. D.; Rohloff, J. C.; Schultze, L. M. Nucleotide analog composition and synthesis method. *USA Pat. Appl. 5935946* **1999**. (CA 130: 158419). [\[Link\]](#)
- ⁵⁸ Shultze, L. M.; Chapman, H. H.; Dubree, N. J. P.; Jones, R. J.; Kent, J. K. M.; Lee, T. T.; Louie, M. S.; Postich, M. J.; Prisbe, E. J.; Rohloff, J. C.; Yu, R. H. Practical Synthesis of the anti-HIV drug, PMPA. *Tetrahedron Letters*, **1998**, *39*, 1853. [\[CrossRef\]](#)
- ⁵⁹ Bischofberger, N. W.; Calif, S. C. PMPA preparation. *USA Pat. Appl. 5733788* **1998**. (CA 1998: 202644). [\[Link\]](#)
- ⁶⁰ Zhang, Q.; Ma, B-W.; Wang, Q-Q.; Wang, X-X.; Hu, X.; Xie, M-S.; Qu, G-R.; Guo, H-M. The synthesis of tenofovir and its analogues via asymmetric transfer hydrogenation. *Organic Letters* **2014**, *16*, 2014. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁶¹ Schaeffer, H. J.; Vince, R. Enzymes inhibitors. 18. Studies on the stereoselectivity of inhibition of adenosine deaminase by DL-, D-, and L-9(2-Hydroxypropyl)adenine. *Journal of Medicinal Chemistry* **1967**, *10*, 689. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁶² Larrow, J. F.; Schaus, S. E.; Jacobsen, E. N. Kinetic resolution of terminal epoxides via highly regioselective and enantioselective ring opening with TMSN₃. An efficient, catalytic route to 1,2-amino alcohols. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 7420. [\[CrossRef\]](#)
- ⁶³ Arimili, M. N.; Cundy, K. C.; Dougherty, J. P.; Kim, C. U.; Oliyai, R.; Stella, V. J. Antiviral phosphonomethoxy nucleotide analogs having increased oral bioavailability. *USA Pat. Appl. 5922695* **1999**. (CA 128: 140970). [\[Link\]](#)
- ⁶⁴ Becker, M. W.; Chapman, H. H.; Cihlar, T.; Eisenberg, E. J.; He, G-X.; Kernan, M. R.; Lee, W. A.; Prisbe, E. J.; Rohloff, J. C.; Sparacino, M. L. Prodrugs phosphonate nucleotide analogues. *USA Pat. Appl. US7390791* **2008**. (CA136: 118705). [\[Link\]](#)
- ⁶⁵ Gutierrez, A. J.; Prisbe, E. J.; Rohloff, J. C. Dealkylation of phosphonate esters with trimethylchlorosilane. *USA Pat. Appl. US6465649* **2002**. (CA 137: 295093). [\[Link\]](#)
- ⁶⁶ Indukuri, V. S. K.; Joga, S. R.; Gorantla, S. R.; Chava, S. Process for the preparation of tenofovir. *USA Pat. Appl. US0303368* **2014**. (CA 158: 728256). [\[Link\]](#)
- ⁶⁷ Ripin, D. H. B.; Teager, D. S.; Fortunak, J.; Basha, S. M.; Bivins, N.; Boddy, N. C.; Byrn, S.; Catlin, K. K.; Houghton, C. S. R.; Jagadeesh, S. T.; Kumar, K. A.; Melton, J.; Muneer, S.; Rao, L. N.; Rao, R. V.; Ray, P. C.; Reddy, N. G.; Reddy, R. M.; Shekar, K. C.; Silverton, T.; Smith, D. T.; Stringham, R. W.; Subbaraju, G. V.; Talley, F.; Williams, A. Process improvements for the manufacture of tenofovir disoproxil fumarate at commercial scale. *Organic Process Research & Development* **2010**, *14*, 1194. [\[CrossRef\]](#)
- ⁶⁸ Houghton, S. R.; Melton, J.; Fortunak, J.; Ripin, D. H. B.; Boddy, C. N. Rapid, mild method for phosphonate diester hydrolysis: development of a one-pot synthesis of tenofovir disoproxil fumarate from tenofovir diethyl ester. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8137. [\[CrossRef\]](#)
- ⁶⁹ Ocampo, C. E.; Lee, D.; Jamison, T. F. *Organic Letters* **2015**, *17*, 820. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)