



INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 831852 E**

(51) Classificação Internacional:  
**A61P 31/12 (2006.01)**

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1996.06.07**

(30) Prioridade(s): **1995.06.07 US 0485716**

(43) Data de publicação do pedido: **1998.04.01**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.11.29**  
**002/2007**

(73) Titular(es):

**THE UAB RESEARCH FOUNDATION**  
**UNIVER. OF ALABAMA AT BIRMIN., 1825**  
**UNIVER. BOULEV BIRMINGHAM, AL 35294-2010**

**US**

**EMORY UNIVERSITY**

**US**

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**

**FR**

(72) Inventor(es):

**JEAN-PIERRE SOMMADOSSI**

**US**

**JEAN-LOUIS IMBACH**

**FR**

**RAYMOND F. SCHINAZI**

**US**

**GILLES GROSSELIN**

**FR**

(74) Mandatário:

**PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA**  
**RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1350-232 LISBOA**

**PT**

(54) Epígrafe: **NUCLEÓSIDOS COM ACTIVIDADE ANTI-VÍRUS DA HEPATITE B**

(57) Resumo:

## RESUMO

### **"NUCLEÓSIDOS COM ACTIVIDADE ANTI-VÍRUS DA HEPATITE B"**

É proporcionado um método para o tratamento de um hospedeiro e, em particular, um humano infectado com HBV que inclui administrar uma quantidade de tratamento para HBV do nucleótido estabilizado de um nucleósido que exhibe actividade anti-hepatite B.

## **DESCRIÇÃO**

### **"NUCLEÓSIDOS COM ACTIVIDADE ANTI-VÍRUS DA HEPATITE B"**

#### **Antecedentes da Invenção**

Esta invenção proporciona a utilização de uma quantidade eficaz de um ou mais dos compostos activos aqui revelados, ou de um pró-fármaco ou derivado farmacêuticamente aceitável de um destes compostos, para a preparação de um medicamento para o tratamento de um doente infectado com vírus da hepatite B (também referido como "HBV").

O HBV é apenas superado pelo tabaco como uma causa do cancro humano. O mecanismo pelo qual o HBV induz o cancro é desconhecido, embora seja postulado que possa desencadear, directamente, o desenvolvimento do tumor ou desencadear, indirectamente, o desenvolvimento do tumor através de inflamação crónica, cirrose e regeneração celular associada com a infecção.

O vírus da hepatite B atingiu níveis epidémicos a nível mundial. Após um período de incubação de dois a seis meses, durante o qual o hospedeiro não se apercebe da infecção, a infecção por HBV pode conduzir a hepatite aguda e danos hepáticos, que provocam dor abdominal, icterícia e níveis sanguíneos elevados de certas enzimas. O HBV pode provocar hepatite fulminante, uma forma rapidamente progressiva, muitas vezes fatal, da doença, na qual são destruídas grandes secções do fígado. Normalmente, os doentes recuperam da hepatite viral aguda. No entanto, nalguns doentes, os elevados níveis de

antigénio viral persistem no sangue durante um período prolongado ou indefinido, provocando uma infecção crónica. As infecções crónicas podem conduzir a hepatite persistente crónica. Os doentes infectados com HBV persistente crónica são muito comuns em países em desenvolvimento. Em meados de 1991, existiam, aproximadamente, 225 milhões de portadores crónicos de HBV apenas na Ásia e quase 300 milhões de portadores a nível mundial. A hepatite persistente crónica pode provocar fadiga, cirrose do fígado e carcinoma hepatocelular, um cancro hepático primário. Nos países ocidentais industrializados, os grupos de elevado risco para a infecção por HBV incluem aqueles em contacto com portadores de HBV ou suas amostras de sangue. A epidemiologia do HBV é, de facto, muito semelhante ao da síndrome da imunodeficiência adquirida, que explica porque a infecção por HBV é comum entre doentes com infecções associadas com SIDA e VIH. No entanto, o HBV é mais contagioso que o VIH.

Os tratamentos diários com interferão- $\alpha$ , uma proteína de engenharia genética manuseada, mostraram ser promissores. Também foi desenvolvida uma vacina derivada de soro humano para imunizar doentes contra o HBV. As vacinas têm sido produzidas através de engenharia genética. Embora a vacina tenha demonstrado ser eficaz, a produção da vacina é problemática porque o fornecimento de soro humano de portadores crónicos é limitado e o processo de purificação é longo e dispendioso. Além disso, cada lote da vacina preparado a partir de soro diferente deve ser testado em chimpanzés, de modo a garantir segurança. Além disso, a vacina não ajuda os doentes já infectados com o vírus.

O Pedido de Patente Europeia N° 92304530.6 revela que um grupo de nucleósidos 1,2-oxatiolano são úteis no tratamento de

infecções por hepatite B. Foi referido que o 2-hidroximetil-5-(citosin-1-il)-1,3-oxatiolano apresenta actividade anti-hepatite B. Doong, *et al.*, Proc. of Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8495-8499 (1991); Chang, *et al.*, J. of Biological Chem., Vol 267(20), 13938-13942. A actividade anti-hepatite B dos enantiómeros (+) e (-) do 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano foi publicada por Furman, *et al.*, em Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Dez. 1992, páginas 2686-2692.

O documento PCT/US92/03144 (Publicação Internacional N° WO 92/18517), apresentado pela Yale University, revela vários  $\beta$ -L-nucleósidos para o tratamento de HBV e VIH. Outros fármacos explorados para o tratamento do HBV incluem adenosina arabinósido, timosina, aciclovir, fosfonoformato, zidovudina, (+)-cianidanol, quinacrina e 2'-fluoroarabinosil-5-iodouracilo.

Um passo essencial no modo de acção dos nucleósidos de purina e pirimidina contra as doenças virais e, em particular, HBV e VIH, é a sua activação metabólica por cinases celulares e virais, para proporcionar derivados mono-, di- e trifosfatos. A espécie biologicamente activa de muitos nucleósidos é a forma trifosfato, que inibe a polimerase de ADN ou a transcriptase reversa ou provoca a interrupção da cadeia. Os derivados nucleósidos que foram desenvolvidos para o tratamento de HBV e VIH até ao momento, foram apresentados para administração, ao hospedeiro, na forma não fosforilada, não obstante o facto de que o nucleósido deve ser fosforilado na célula, antes de exhibir o seu efeito antiviral, porque a forma trifosfato foi, normalmente, ou desfosforilada antes de alcançar a célula ou é pouco absorvida pela célula. Em geral, os nucleótidos atravessam as membranas celulares de um modo muito pouco eficaz e não são, geralmente, muito potentes in vitro. As tentativas de modificar

nucleótidos para aumentar a absorção e potência dos nucleótidos foram descritas por R. Jones e N. Bischofberger, *Antiviral Research*, **27** (1995) 1-17.

O documento WO 93/00910 descreve certos análogos modificados com lípido, para o tratamento de HBV. Hostetler et al., (*Antiviral Rsch*, 24: 59-67 (1994)) descrevem pró-fármacos de fosfolípido de  $\beta$ -D-didesoxicitidina. Perigand et al., (*Bioch. Pharm.*, 48: 11-14(1994)) revelam a eficácia de fosfotriésteres de  $\beta$ -D-didesoxiadenosina no VIH.

À luz do facto de que o vírus da hepatite B atingir níveis epidémicos a nível mundial e ter efeitos graves e, muitas vezes, trágicos nos doentes infectados, existe uma forte necessidade para proporcionar novos agentes farmacêuticos, eficazes para tratar humanos infectados com o vírus, que apresentem baixa toxicidade para o hospedeiro.

Assim, é outro objectivo da presente invenção proporcionar uma composição para o tratamento de doentes humanos ou outros hospedeiros infectados com HBV.

#### Sumário da Invenção

A utilização de um pró-fármaco de nucleótido de  $\beta$ -L-2',3'-didesoxiadenosina para a preparação de um medicamento para o tratamento de um doente infectado com a hepatite B, em que:

- a) o nucleótido é 5'-mono, di- ou tri-fosforilado no carbono 5' ;

- b) um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por uma porção independentemente seleccionada de alquilo, arilo, esteróide, hidrato de carbono, 1,2-diacilglicerol, álcool e S-acil-2-tioetilo, e
- c) o nucleótido está, pelo menos, 95% livre do seu  $\beta$ -D-enantiómero oposto.

Numa forma de realização preferida, o nucleósido é proporcionado como o enantiómero indicado e substancialmente na ausência do seu enantiómero correspondente (*i. e.*, na forma enantiomericamente enriquecida).

Um pró-fármaco, como aqui utilizado, refere-se a um derivado farmacologicamente aceitável do nucleósido especificamente revelado, que é convertido no nucleósido após administração in vivo, ou que apresenta actividade por si próprio. Exemplos não limitantes são derivados acilados ou alquilados de 5' e N<sup>6</sup>-purina do composto activo.

O nucleósido é proporcionado como um derivado monofosfato, difosfato ou trifosfato (*i. e.*, um pró-fármaco de nucleótido), por exemplo, um éster, que estabiliza o fosfato in vivo.

Os pró-fármacos farmacologicamente aceitáveis revelados de formulações farmacologicamente aceitáveis de  $\beta$ -L-2',3'-didesoxiadenosina contendo estes compostos são úteis na prevenção e tratamento de infecções por HBV e outras patologias relacionados, tais como patologias positivas para anticorpo anti-HBV e positivas para o HBV, inflamação hepática crónica provocada por HBV, cirrose, hepatite aguda, hepatite

fulminante, hepatite crónica persistente e fadiga. Estes compostos ou formulações podem também ser utilizados profilaticamente para prevenir ou retardar a progressão da doença clínica em indivíduos que são positivos para o anticorpo anti-HBV ou para o antigénio HBV ou que foram expostos ao HBV.

Numa forma de realização da invenção, um ou mais dos compostos activos é administrado alternado ou combinado com outro ou outros agentes anti-HBV, para proporcionar tratamento anti-HBV eficaz. Exemplos de agentes anti-HBV que podem ser utilizados em terapia alternada ou combinada incluem mas não estão limitados a 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano ("FTC", ver documento WO 92/14743), um seu derivado fisiologicamente aceitável ou um seu sal fisiologicamente aceitável; o 2-hidroximetil-5-(citosin-1-il)-1,3-oxatiolano (incluindo a forma BCH-189 racémica ou 3TC (BCH-189 enriquecido com o (-)-enantiómero)), um seu derivado fisiologicamente aceitável ou um seu sal fisiologicamente aceitável; 2'-fluoro-5-etil-arabinosiluracilo (FEAU); carbovir ou interferão.

Pode ser utilizado qualquer método alternado que proporcione tratamento ao doente. Exemplos não limitantes de padrões alternados incluem 1-6 semanas de administração de uma quantidade eficaz de um agente, seguida por 1-6 semanas de administração de uma quantidade eficaz de um segundo agente anti-HBV. O programa alternado pode incluir períodos sem tratamento. A terapia de combinação inclui, geralmente, a administração simultânea de uma proporção eficaz de dosagens de dois ou mais agentes anti-HBV.

Uma vez que o HBV é, muitas vezes, observado em doentes que também são positivos para o anticorpo anti-VIH ou para o



antigénio mY, ou que foram expostos ao VIH, os compostos activos anti-HBV aqui revelados ou seus derivados ou pró-fármacos podem ser administrados, na circunstância apropriada, em combinados ou alternados com medicamentos anti-VIH, incluindo mas não limitado a 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 2',3'-didesoxiinosina (DDI), 2',3'-didesoxicitidina (ddC), 2',3'-didesoxi-2',3'-didesidrotimidina (D4T), 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano (FTC) ou 2-hidroximetil-5-(citosin-1-il)-1,3-oxatiolano (BCH-189 racémico ou BCH-189 enriquecido com o (-)-enantiómero, 3TC). Os inibidores da RT não nucleósidos, tais como a classe Tibo de compostos, nevirapina ou pirimidinona podem também ser administrados em combinação com os compostos reivindicados.

Os agentes activos anti-HBV também podem ser administrados em combinação com outros antibióticos, outros compostos antivirais, agentes antifúngicos ou outros agentes farmacêuticos administrados para o tratamento de infecções secundárias.

Numa forma de realização, o nucleósido é proporcionado como um derivado fosfato que é estabilizado para diminuir ou eliminar a desfosforilação antes da entrada na célula infectada. São conhecidos e têm sido publicados na literatura vários grupos do derivado fosfato estabilizado na posição 5' do nucleósido. Numa forma de realização, o nucleósido é administrado como um derivado SATE, como revelado em maior detalhe abaixo. Qualquer derivado fosfato estabilizado alternativo pode ser colocado na posição 5' que não afecte, adversamente, de forma relevante a actividade do composto.

### **Breve Descrição das Figuras**

A Figura 1 é uma ilustração das estruturas químicas de  $\beta$ -L-2',3'-didesoxicitidina ( $\beta$ -L-ddC),  $\beta$ -D-2',3'-didesoxicitidina ( $\beta$ -D-ddC),  $\beta$ -L-2',3'-didesoxi-5-fluorocitidina ( $\beta$ -L-FddC), (-)- $\beta$ -L-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxadiazolano ((-)- $\beta$ -L-FTC), (+)- $\beta$ -D-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-dioxolano ((+)- $\beta$ -D-FDOC) e  $\beta$ -L-2-amino-6-(R<sup>4</sup>)-9-[(4-hidroximetil)-tetra-hidrofuran-1-il]purina.

A Figura 2 é uma ilustração do esquema de numeração utilizado na nomenclatura química para os nucleósidos neste texto.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

Como aqui utilizado, o termo "enantiomericamente pura" refere-se a uma composição de nucleósido que inclui, pelo menos, aproximadamente 95% e, de um modo preferido, aproximadamente, 97%, 98%, 99% ou 100% de um único enantiómero desse nucleósido.

O termo alquilo, como aqui utilizado, excepto quando especificado o contrário, refere-se a um hidrocarboneto de C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>, primário, secundário ou terciário, de cadeia linear, ramificada ou cíclica saturada e inclui, especificamente, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, iso-hexilo, ciclo-hexilo, ciclo-hexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo e 2,3-dimetilbutilo. O grupo alquilo pode ser opcionalmente substituído com uma ou mais porções seleccionadas

do grupo consistindo de hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxilo, ariloxilo, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfórico, fosfato ou fosfonato, quer desprotegido ou protegido como necessário, como conhecido pelos especialistas na técnica, por exemplo, como explicado em Greene, *et al.*, "Protective Groups in Organic Synthesis," John Wiley and Sons, Segunda Edição, 1991. O termo alquilo inferior, como aqui utilizado e excepto se especificado em contrário, refere-se a um grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo ou t-butilo.

Como aqui utilizado, o termo acilo inclui, especificamente, mas não está limitado a acetilo, propionilo, butirilo, pentanoílo, 3-metilbutirilo, hidrogenossuccinato, 3-clorobenzoato, benzoílo, acetilo, pivaloílo, mesilato, valerilo, caprónico, caprílico, capríco, láurico, mirístico, palmítico, esteárico e oleico.

O termo arilo, como aqui utilizado e excepto se especificado em contrário, refere-se a fenilo, bifenilo ou naftilo e, de um modo preferido, fenilo. O grupo arilo pode ser opcionalmente substituído com uma ou mais porções seleccionadas do grupo consistindo de hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxilo, ariloxilo, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato ou fosfonato, quer desprotegido ou protegido consoante necessário, como conhecido pelos especialistas na técnica, por exemplo, como explicado em Greene, *et al.*, "Protective Groups in Organic Synthesis," John Wiley and Sons, Segunda Edição, 1991.

O termo base purina ou pirimidina inclui, mas não está limitado a adenina, N<sup>6</sup>-alquilpurinas, N<sup>6</sup>-acilpurinas (em que

acilo é C(O) (alquilo, arilo, alquilarilo ou arilalquilo), N<sup>6</sup>-benzilpurina, N<sup>6</sup>-halopurina, N<sup>6</sup>-vinilpurina, purina N<sup>6</sup>-acetilénica, N<sup>6</sup>-acilpurina, N<sup>6</sup>-hidroxialquilpurina, N<sup>6</sup>-tioalquilpurina, N<sup>2</sup>-alquilpurinas, N<sup>2</sup>-alquil-6-tiopurinas, timina, citosina, 6-azapirimidina, 2- e/ou 4-mercaptopirimidina, uracilo, C<sup>5</sup>-alquilpirimidinas, C<sup>5</sup>-benzilpirimidinas, C<sup>5</sup>-halopirimidinas, C<sup>5</sup>-vinilpirimidina, pirimidina C<sup>5</sup>-acetilénica, C<sup>5</sup>-acilpirimidina, C<sup>5</sup>-hidroxialquilpurina, C<sup>5</sup>-amidopirimidina, C<sup>5</sup>-cianopirimidina, C<sup>5</sup>-nitropirimidina, C<sup>5</sup>-aminopirimidina, 5-azacitidinilo, 5-azauracililo, triazolopiridinilo, imidazolopiridinilo, pirrolopirimidinilo, pirazolopirimidinilo. Os grupos funcionais de oxigénio e azoto na base podem ser protegidos consoante necessário ou desejado. Os grupos de protecção adequados são bem conhecidos pelos especialistas na técnica e incluem trimetilsililo, dimetilhexilsililo, *t*-butildimetilsililo e *t*-butildifenilsililo, tritilo, grupos alquilo, grupos acilo, tais como acetilo e propionilo, metilsulfonilo e *p*-toluilsulfonilo.

Como aqui utilizado, o termo aminoácido natural inclui mas não está limitado a, alanilo, valinilo, leucinilo, isoleucinilo, prolinilo, fenilalaninilo, triptofanilo, metioninilo, glicinilo, serinilo, treoninilo, cisteinilo, tirosinilo, asparaginilo, glutaminilo, aspartoílo, glutaoílo, lisinilo, argininilo e histidinilo.

A invenção como aqui revelada é como descrita na reivindicação 1.

## I. Estrutura e Preparação de Nucleósidos Activos

### Estereoquímica

Os compostos utilizados são enantiómeros de 2',3'-didesoxicitidina, 2',3'-didesoxi-5-(halogeno ou metil)citidina, 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-dioxolano ou 2-amino-6-(OH, Cl, NH<sub>2</sub> ou H)-9-[(4-hidroximetil)-tetra-hidrofuran-1-il]purina.

Uma vez que os carbonos 1' e 4' do açúcar ou porção dioxolanilo (abaixo referido, genericamente, como a porção açúcar) dos nucleósidos são quirais, os seus substituintes não hidrogénio (CH<sub>2</sub>OR e a base pirimidina ou purina, respectivamente) pode ser cis (no mesmo lado) ou trans (em lados opostos) em relação ao sistema de anel açúcar. Os quatro isómeros ópticos são, por isso, representados pelas seguintes configurações (quando orientando a porção açúcar num plano horizontal, de modo que o oxigénio "primário" (aquele entre os átomos C1' e C4'; ver Figura 2) esteja atrás): cis (com ambos os grupos "em cima", que corresponde à configuração de nucleósidos que ocorrem naturalmente), cis (com ambos os grupos "em baixo", que é a configuração que ocorre não naturalmente), trans (com o substituinte C2 "em cima" e o substituinte C5 "em baixo") e trans (com o substituinte C2 "em baixo" e o substituinte C5 "em cima"). Como esquematicamente indicado na Figura 1, os "D-nucleósidos" são nucleósidos cis numa configuração natural e os "L-nucleósidos" são nucleósidos cis na configuração que não ocorre naturalmente.

Os nucleósidos úteis na preparação de um medicamento para o tratamento de infecção por HBV são β-L-enantiómeros, com a

excepção de FDOC, que é utilizado na sua forma enantiomérica, porque se verificou que o  $\beta$ -D-enantiómero de FDOC é, surpreendentemente, menos tóxico que o  $\beta$ -L-enantiómero de FDOC.

#### Formulações de Pró-fármaco

O nucleósido  $\beta$ -L-2',3'-didesoxiadenosina aqui revelado pode ser administrado como qualquer derivado que após administração ao receptor, é capaz de proporcionar directamente ou indirectamente, o composto activo derivado ou que exhibe actividade por si próprio. Numa forma de realização, o hidrogénio do grupo 5'-OH é substituído por um alquilo $C_1$ - $C_{20}$ , incluindo alquilo  $C_1$  a  $C_5$ ; acilo no qual a porção não carbonilo do grupo éster é seleccionada de alquilo $C_1$ - $C_{20}$  linear, ramificada ou cíclica, incluindo alquilo  $C_1$  a  $C_5$ , fenilo ou benzilo; um aminoácido que ocorre naturalmente ou não naturalmente; alcoxialquilo incluindo metoximetilo; aralquilo incluindo benzilo; ariloxialquilo tal como fenoximetilo; arilo incluindo fenilo opcionalmente substituído com halogéneo, alquilo $C_1$  a  $C_4$  ou alcoxilo  $C_1$  a  $C_4$ ; um ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico; ésteres de sulfonato, tal como alquilo ou aralaquilsulfonilo incluindo metanossulfonilo; ou um éster de mono, di ou trifosfato.

Um ou ambos os hidrogénios dos grupos amino na base purina podem ser substituídos por um alquilo $C_1$ - $C_{20}$ , incluindo alquilo  $C_1$  a  $C_5$ ; acilo no qual a porção não carbonilo do grupo éster é seleccionada de alquilo $C_1$ - $C_{20}$  linear, ramificada ou cíclica, incluindo alquilo  $C_1$  a  $C_5$ , fenilo ou benzilo; alcoxialquilo incluindo metoximetilo; aralquilo incluindo benzilo; ariloxialquilo, tal como fenoximetilo; arilo incluindo fenilo

opcionalmente substituído com halogéneo, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> ou alcoxiC<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>.

O nucleósido activo também pode ser proporcionado como um 5'-éter de lípido, como revelado na seguinte referências, que são aqui incorporadas por referência: Kucera, L.S., N. Iyer, E. Leake, A. Raben, Modest E.J., D. L.W. e C. Piantadosi. 1990. Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation. *AIDS Res Hum Retrovíruses*. 6: 491-501; Piantadosi, C., J. Marasco CJ., S.L. Morris-Natschke, K.L. Meyer, F. Gumus, J.R. Surlis, K.S. Ishaq, L.S. Kucera, N. Iyer, C.A. Wallen, S. Piantadosi, e E.J. Modest. 1991. Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV activity. *J Med Chem*. 34: 1408-1414; Hostetler, K.Y., D.D. Richman, D.A. Canon, L.M. Stuhmiller, G.M. T. van Wijk, e H. van den Bosch. 1992. Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3',-deoxythymidine. *Antimicrob Agents Chemother*. 36: 2025.2029; Hostetler, K.Y., L.M. Stuhmiller, H.B. Lenting, H. van den Bosch, e D.D. Richman, 1990. Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides. *J. Biol Chem*. 265: 6112.7.

#### Pró-Fármacos de Nucleótidos

A  $\beta$ -L-2',3'-didesoxiadenosina aqui descrita é administrada, ou qualquer outro nucleósido que apresente actividade anti-hepatite B pode ser administrado, como um pró-fármaco de

nucleótido para aumentar a actividade, biodisponibilidade, estabilidade ou, de outro modo, alternar as propriedades do nucleósido. São conhecidas vários ligandos do pró-fármaco nucleótido. Um pró-fármaco nucleótido, como aqui descrito, refere-se a uma nucleósido que tem um derivado fosfato na posição 5' que é mais estável *in vivo* que o fosfato derivado, e que não afecta de modo substancialmente adverso a actividade anti-hepatite B do nucleósido. Os fosfonatos são incluídos como derivados fosfato. Em geral, a alquilação, alcilação ou outra modificação lipofílica do mono, di ou trifosfato do nucleósido irá aumentar a estabilidade do nucleótido. Exemplos de grupos substituintes que podem substituir um ou mais hidrogénios na porção fosfato são alquilo, arilo, esteróides, hidratos de carbono incluindo açúcares, 1,2-diacilglicerol e álcoois. Muitos são descritos em R. Jones e N. Bischofberger, *Antiviral Research*, **27** (1995) 1-17. Qualquer um destes pode ser utilizado em combinação com o nucleósido  $\beta$ -L-2',3'-didesoxiadenosina revelado, para alcançar um efeito desejado. Exemplos de pró-fármacos de nucleótidos são descritos nas seguintes referências.

Ho, D.H.W. (1973) Distribution of Kinase and deaminase of  $1\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and muse. *Cancer Res.* **33**, 2816-2820; Holy, A. (1993) Isopolar phosphorous-modified nucleotide analogues. Em: De Clercq (Ed.), *Advances in Antiviral Drug Design*, Vol. I, JAI Press, pp. 179-231; Hong, C.L, Nechaev, A., e West, C.R. (1979a) Synthesis and antitumor activity of  $1\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine conjugates of cortisol and cortisone. *Biochem. Biophys. Rs. Commun.* **88**, 1223-1229; Hong, C.I., Nechaev, A., Kirisits, A.J. Buchheit, DJ. e West, C.R. (1980) Nucleoside conjugates as potential antitumor agents. 3. Synthesis and antitumor activity of 1-( $\beta$ -D-arabinofuranosyl)cytosine conjugates of corticosteriods



and selected lipophilic alcohols. *J. Med. Chem.* **28**, 171-177; Hostetler, K.Y., Stuhmiller, L.M., Lenting, H.B.M. van den Bosch, H. e Richman, D.D. (1990) Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides. *J. Biol. Chem.* **265**, 6112-6117; Hostetler, K.Y., Carson, D.A. e Richman, D.D. (1991); Phosphatidylazidothymidine: mechanism of antiretroviral action in CEM cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 11714-11717; Hostetler, K.Y., Korba, B. Sridhar, C., Gardener, M. (1994a) Antiviral activity of phosphatidyl-dideoxycytidine in hepatitis B-infected cells and enhanced hepatic uptake in mice. *Antiviral Res.* **24**, 59-67; Hostetler, K.Y., Richman, D.D., Sridhar, C.N. Felgner, P.L., Felgner, J., Ricci, J., Gardener, M.F. Selleseth, D.W. e Ellis, M.N. (1994b) Phosphatidylazidothymidine and phosphatidyl-ddC: Assessment of uptake in mouse lymphoid tissues and antiviral activities in human immunodeficiency virus-infected cells and in raucher leukemia virus-infected mice. *Antimicrobial Agents Chemother.* **38**, 2792-2797; Hunston, R.N., Jones, A.A. McGuigan, C., Walker, R.T., Balzarini, J., e De Clercq, E. (1984) Synthesis and biological properties of some cyclic phosphotriesters derived from 2'-deoxy-5-fluorouridine. *J. Med. Chem.* **27**, 440-444; Ji, Y.H., Moog, C., Schmitt, G., Bischoff, P. e Luu, B. (1990); Monophosphoric acid diesters of 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and of pyrimidine nucleosides as potential antitumor agents: synthesis and preliminary evaluation of antitumor activity. *J. Med. Chem.* **33**, 2264-2270; Jones, A.S., McGuigan, C., Walker, R.T., Balzarini, J. e DeClercq, E. (1984) Synthesis, properties, and biological activity of some nucleoside cyclic phosphoramidates. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1471-1474; Juodka, B.A. e Smrt, J. (1974) Synthesis of ditribonucleoside phosph(P $\rightarrow$ N) amino acid derivatives. *Coll. Czech. Chem. Comm.* **39**, 363-968; Kataoka, S., Imai, J., Yamaji,

N., Kato, M., Saito, M., Kawada, T. e Imai, S. (1989) Alkylated cAMP derivatives; selective synthesis and biological activities. *Nucleic Acids Res. Sym. Ser.*, **21**, 1-2; Kataoka, S., Uchida, R. e Yamaji, N. (1991) A convenient synthesis of adenosine 3',5'cyclic phosphate (cAMP) benzyl and methyl triesters. *Heterocycles* **32**, 1351-1356; Kinchington, D., Harvey, J.J., O'Connor, T.J., Jones, B.C.N.M., Devine, K.G., Taylor-Robinson, D., Jeffries, D.J. e McGuigan, C. (1992) Comparison of antiviral effects of zidovudine phosphoramidate and phosphorodiamidate derivatives against HIV and ULV *in vitro*. *Antiviral Chem. Chemother.* **3**, 107-112; Kodama, K., Morozumi, M., Saitoh, K.I., Kuninaka, H., Yoshino, H. e Saneyoshi, M. (1989) Antitumor activity and pharmacology of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine-5'-stearylphosphate; an orally active derivative of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine. *Jpn. J. Cancer Res.* **80**, 679-685; Korty, M. e Engels, J. (1979) The effects of adenosine- and guanosine 3',5'phosphoric and acid benzyl esters on guinea-pig ventricular myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **310**, 103-111; Kumar, A., Goe, P.L., Jones, A.S. Walker, R.T. Balzarini, J. e De Clercq, E. (1990) Synthesis and biological evaluation of some cyclic phosphoramidate nucleoside derivatives. *J. Med. Chem.* **33**, 2368-2375; LeBec, C., e Huynh-Dinh, T. (1991) Synthesis of lipophilic phosphate triester derivatives of 5-fluorouridine and arabinocytidine as anticancer prodrugs. *Tetrahedron Lett.* **32**, 6553-6556; Lichtenstein, J., Barner, H.D. e Cohen, S.S. (1960) The metabolism of exogenously supplied nucleotides by *Escherichia coli.*, *J. Biol. Chem.* **235**, 457-465; Luchty, J., Von Daeniken, A., Friederich, J. Manthey, B., Zweifel, J., Schlatter, C. e Benn, M.H. (1981) Synthesis and toxicological properties of three naturally occurring cyanoepithioalkanes. *Mitt. Geg. Lebensmittelunters. Hyg.* **72**, 131-133 (*Chem. Abstr.* **95**, 127093); McGuigan, C. Tollerfield,

S.M. e Riley, P.A. (1989) Synthesis and biological evaluation of some phosphate triester derivatives of the anti-viral drug Ara. *Nucleic Acids Res.* 17, 6065-6075; McGuigan, C., Devine, K.G., O'Connor, T.J., Galpin, S.A., Jeffries, D.J. e Kinchington, D. (1990a) Synthesis and evaluation of some novel phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) as anti-HIV compounds. *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 107-113; McGuigan, C., O'Connor, T.J., Nicholls, S.R. Nickson, C. e Kinchington, D. (1990b) Synthesis and anti-IUV activity of some novel substituted dialky phosphate derivatives of AZT and ddCyd. *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 355-360; McGuigan, C., Nicholls, S.R., O'Connor, T.J., e Kinchington, D. (1990c) Synthesis of some novel dialkyl phosphate derivative of 3'-modified nucleosides as potential anti-AIDS drugs. *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 25-33; McGuigan, C., Devine, K.G., O'Connor, T.J., e Kinchington, D. (1991) Synthesis and anti-HIV activity of some haloalky phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT); potent activity of the trichloroethyl methoxyalaninyl compound. *Antiviral Res.* 15, 255-263; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Mahmood, N., Devine, K.G. e Hay, A.J. (1992) Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV 1 in cell lines which are resistant to the action of AZT. *Antiviral Res.* 17, 311-321; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Choi, S.M., Kinchington, D. e O'Connor, T.J. (1993a) Phosphoramidate derivatives of AZT as inhibitors of HIV; studies on the carboxyl terminus. *Antiviral Chem. Chemother.* 4, 97-101; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Balzarini, J. e De Clercq, E. (1993b) Intracellular delivery of bioactive AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT. *J. Med. Chem.* **36**, 1048-1052.

Alky hydrogen phosphonate derivatives of the anti-HIV agent AZT may be less toxic than the parent nucleoside analogue.

*Antiviral Chem. Chemother.* 5, 271-277; Meyer, R. B., Jr., Shuman, D.A. e Robins, R.K. (1973) Synthesis of purine nucleoside 3',5'-cyclic phosphoramidates. *Tetrahedron Lett.* 269-272; Nagyvary, J. Gohil, R.N., Kirchner, C.R. e Stevens, J.D. (1973) Studies on neutral esters of cyclic AMP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 1072-1077; Namane, A. Gouyette, C., Fillion, M.P., Fillion, G. e Huynh-Dinh, T. (1992) Improved brain delivery of AZT using a glycosyl phosphotriester prodrug. *J. Med. Chem.* 35, 3039-3044; Nargeot, J. Nerbonne, J.M. Engels, J. e Leser, H.A. (1983) *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 2395-2399; Nelson, K.A., Bentrude, W.G., Stser, W.N. e Hutchinson, J.P. (1987) The question of chair-twist equilibria for the phosphate rings of nucleoside cyclic 3',5'-monophosphates. <sup>1</sup>HNMR and x-ray crystallographic study of the diastereomers of thymidine phenyl cyclic 3',5'-monophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 4058-4064; Nerbonne, J.M., Richard, S., Nargeot, J. e Lester, H.A. (1984) New photoactivatable cyclic nucleotides produce intracellular jumps in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations. *Nature* 301, 74-76; Neumann, J.M., Hervé, M., Debouzy, J.C., Guerra, F.I., Gouyette, C., Dupraz, B. e Huynh-Dinh, T. (1989) Synthesis and transmembrane transport studies by NMR of a glucosyl phospholipid of thymidine. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 4270-4277; Ohno, R., Tatsumi, N., Hirano, M., Imai, K. Mizoguchi, H., Nakamura, T., Kosaka, M., Takatuski, K., Yamaya, T., Toyama, K., Yoshida, T., Masaoka, T., Hashimoto, S., Ohshima, T., Kimura, I., Yamada, K. e Kimura, J. (1991) Treatment of myelodysplastic syndromes with orally administered 1-β-D-rabinofuranosylcytosine-5'-stearylphosphate. *Oncology* 48, 451-455. Palomino, E., Kessle, D. and Horwitz, J.P. (1989) A dihydropyridine carrier system for sustained delivery of 2',3'dideoxynucleosides to the brain. *J. Med. Chem.* 32, 622-625; Perkins, R.M., Barney, S., Wittrock, R., Clark, P.H., Levin, R. Lambert, D.M., Petteway, S.R.,

Serafinowska, H.T., Bailey, S.M., Jackson, S., Harnden, M.R. Ashton, R., Sutton, D., Harvey, J.J. e Brown, A.G. (1993) Activity of BRL47923 and its oral prodrug, SB203657A against a raucher murine leukemia virus infection in mice. *Antiviral Res.* 20 (Suppl. I). 84; Piantadosi, C., Marasco, C.J., Jr., Morris-Natschke, S.L., Meyer, K.L., Gumus, F., Surles, J.R., Ishaq, K.S., Kucera, L.S. Iyer, N., Wallen, C.A., Piantadosi, S. e Modest, E.J. (1991) Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV-1 activity. *J. Med. Chem.* 34, 1408-1414; Pompon, A., Lefebvre, I., Imbach, J.L., Kahn, S. e Faiquhar, D. (1994) Decomposition pathways of the mono- and bis(pivaloyloxymethyl) esters of azidothymidine-5'-monophosphate in cell extract and in tissue culture medium; an application of the 'on-line ISRP-cleaning' HPLC technique. *Antiviral Chem. Chemother.* 5, 91-98; Postemark, T. (1974) Cyclic AMP and cyclic GMP. *Annu. Rev. Pharmacol.* 14, 23-33; Prisbe, E.J., Martin, J.C.M., McGee, D.P.C., Barker, M.F., Smee, D.F. Duke, A.E., Matthews, T.R. e Verheyden, J.P.J. (1986) Synthesis and antiherpes virus activity of phosphate an phosphonate derivatives of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl] guanine. *J. Med. Chem.* 29, 671-675; Pucch, F., Gosselin, G., Lefebvre, I., Pompon, A., Aubertin, A.M. Dim, A. e Imbach, J.L. (1993) Intracellular delivery of nucleoside monophosphate through a reductase-mediated activation process. *Antiviral Res.* 22, 155-174; Pugaeva, V.P., Klochkeva, S.I., Mashbits, F.D. e Eizengart, R.S. (1969).

Toxicological assessment and health standard ratings for ethylene sulfide in the industrial atmosphere. *Gig. Trf. Prof. Zabol.* 13, 47-48 (Chem. Abstr. 72, 212); Robins, R.K. (1984) The potential of nucleotide analogs as inhibitors of retroviruses and tumors. *Pharm. Res.* 11-18; Rosowsky, A., Kim. S.H., Ross e

J. Wick, M.M. (1982) Lipophilic 5'-(alkylphosphate) esters of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine and its N<sup>4</sup>-acyl and 2,2'-anhydro-3'0-acyl derivatives as potential prodrugs. *J. Med. Chem.* 25, 171-178; Ross, W. (1961) Increased sensitivity of the walker turnout towards aromatic nitrogen mustards carrying basic side chains following glucose pretreatment. *Biochem. Pharm.* 8, 235-240; Ryu, e.K., Ross, R.J. Matsushita, T., MacCoss, M., Hong, C.I. e West, C.R. (1982). Phospholipid-nucleoside conjugates. 3. Synthesis and preliminary biological evaluation of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine 5'diphosphate[-], 2-diacylglycerols. *J. Med. Chem.* 25, 1322-1329; Saffhill, R. e Hume, W.J. (1986) The degradation of 5-iododeoxyuridine and 5-bromoeoayuridine by serum from different sources and its consequences for the use of these compounds for incorporation into DNA. *Chem. Biol. Interact.* 57, 347-355; Saneyoshi, M., Morozumi, M., Kodama, K., Machida, J., Kuninaka, A. e Yoshino, H. (1980) Synthetic nucleosides and nucleotides. XVI. Synthesis and biological evaluations of a series of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine 5'-alky or arylphosphates. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2915-2923; Sastry, J.K., Nehete, P.N., Khan, S., Nowak, B.J., Plunkett, W., Arlinghaus, R.B. e Farquhar, D. (1992) Membrane-permeable dideoxyuridine 5'-monophosphate analogue inhibits human immunodeficiency virus infection. *Mol. Pharmacol.* 41, 441-445; Shaw, J.P., Jones, R.J. Arimilli, M.N., Louie, M.S., Lee, W.A. e Cundy, K.C. (1994) Oral bioavailability of PMEA from PMEA prodrugs in male Sprague-Dawley rats. 9th Annual AAPS Meeting. San Diego, CA (Abstract). Shuto, S., Ueda, S., Imamura, S., Fukukawa, K. Matsuda, A. e Ueda, T. (1987) A facile one-step synthesis of 5'phosphatidyl nucleosides by an enzymatic two-phase reaction. *Tetrahedron Lett.* 28, 199-202; Shuto, S., Itoh, H., Ueda, S., Imamura, S., Kukukawa, K., Tsujino, M., Matsuda, A. e Ueda, T. (1988) A facile enzymatic

synthesis of 5'-(3-sn-phosphatidyl)nucleosides and their antileukemic activities. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 209-217. Um grupo pró-fármaco fosfato preferido é o grupo S-acil-2-tioetilo, também referido como "SATE".

### Preparação dos Compostos Activos

Os nucleósidos utilizados na preparação de um medicamento para o tratamento de infecções por HBV, num organismo hospedeiro, podem ser preparados de acordo com os métodos publicados. Os  $\beta$ -L-nucleósidos podem ser preparados a partir de métodos revelados, ou modificações convencionais de métodos revelados, por exemplo, nas seguintes publicações: Jeong, *et al.*, *J. of Med. Chem.*, 36, 182-195, 1993; Pedido de Publicação de Patente Europeia N° 0285884; Génu-Dellac, C., G. Gosselin, A.-M. Aubertin, G. Obert, A. Kim, e J.-L. Imbach, 3-Substituted thymine  $\alpha$ -L-nucleoside derivatives as potential antiviral agents; synthesis and biological evaluation, Antiviral Chem, Chemother. 2:83-92 (1991); Johansson, K. N. G., B. G. Lindborg, e R. Noreen, Pedido de Patente Europeia 352248; Mansuri, M. M., V. Farina, J. E. Starrett, D. A. Benigni, V. Brankovan e J. C. Martin, Preparation of the geometric isomers of ddC, ddA, D4C and D4T as potential anti-HIV agents; Bioorg, Med, Chem, Lett, 1:65-68(1991); Fujimori, S., N. Iwanami, Y. Hashimoto e K. Shudo, A convenient and stereoselective synthesis of 2'-deoxy- $\beta$ -L-ribonucleosides, Nucleosides & Nucleotides 11:341-349 (1992); Génu-Dellac, C., G. Gosselin, A.-M. Aubertin, G. Obert, A. Kim, e J.-L. Imbach, 3-Substituted thymine  $\alpha$ -L-nucleoside derivatives as potential antiviral agents; synthesis and biological evaluation, Antiviral Chem. Chemother. 2:83-92 (1991); Holy, A, Synthesis of 2'-deoxy-L-uridine, Tetrahedron Lett. 2:

189-192 (1992); Holy, A., Nucleic acid components and their analogs. CLIII. Preparation of 2'-deoxy-L-ribonucleosides of the pyrimidine series. Collect Czech Chem Commun. 37:4072-4087 (1992); Holy, A, 2'-deoxy-L-uridine: Total synthesis of a uracil 2'-deoxynucleoside from a sugar 2-aminooxazoline through a 2.2'-anhydronucleoside intermediate. Em: Townsend LB, Tipson RS, ed. Nucleic Acid Chem. New York: Wiley, 1992: 347-353. vol 1) (1992); Okabe, M., R.-C. Sun, S. Tan, L. Todaro e D. L. Coffen, Synthesis of the dideoxynucleosides ddC and CNT from glutamic acid, ribonolactone, and pyrimidine bases. J Org Chem. **53**: 4780-4786 (1988); Robins, M. J., T. A. Khwja e R. K. Robins. Purine nucleosides. XXIX. Synthesis of 2'-deoxy-L-adenosine and 2'-deoxy-L-guanosine and their alpha anomers. J Org Chem. **35**:363-639 (1992); Génu-Dellac. C., Gosselin G., Aubertin A-M, Obert G., Kim A. e Imbach J-L, 3'-Substituted thymine  $\alpha$ -L-nucleoside derivatives as potential antiviral agents; synthesis and biological evaluation. Antiviral Chem. Chemother, 2(2): 83-92 (1991); Génu-Dellac, C., Gosselin G., Imbach J-L; Synthesis of new 2'-deoxy-3'-substituted- $\alpha$ -L-threo-pentofuranonucleosides of thymine as a potential antiviral agents. Tet Lett 32(1):79-82 (1991); Génu-Dellac, C., Gosselin G., Imbach J-L. Preparation of new acylated derivatives of L-arabino-furanose and 2-deoxy-1-erythro-pentofuranose as precursors for the synthesis of 1-pentofuranosyl nucleosides. 216: 240-255 (1991); e Génu-Dellac, C., Gosselin G., Puech F, et al. Systematic synthesis and antiviral evaluation of  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl and 2'-deoxy- $\alpha$ -L-erythro-pentofuranosyl nucleosides of the five naturally occurring nucleic acid bases. 10(b):1345-1376 (1991).

A 2',3'-didesoxicitidina (ddC) é um composto conhecido. O D-enantiómero da DDC está actualmente a ser comercializado por



Hoffman-LaRoche sob o nome Zalcitabine para utilização no tratamento de pessoas infectadas com VIH. Ver Patentes U.S. N° 4879277 e 4900828.

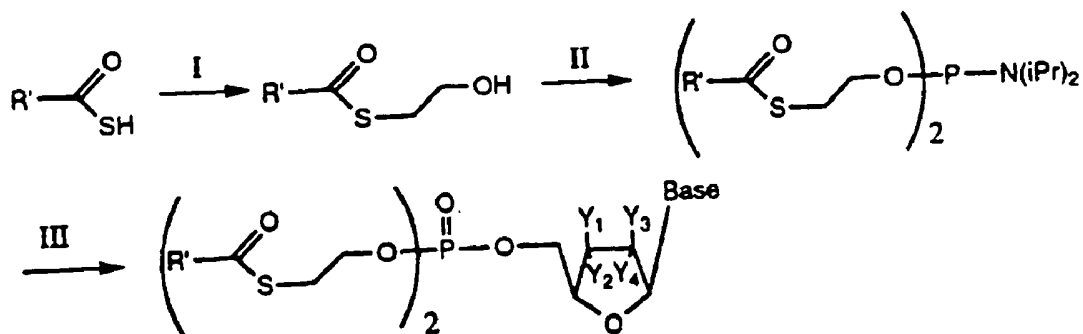
Os  $\beta$ -D-dioxolano-nucleósidos enantiomericamente puros, tais como  $\beta$ -D-FDOC podem ser preparados como revelado em detalhe no documento PCT/US91/09124. O processo envolve a preparação inicial de (2R,4R)- e (2R,4S)-4-acetoxi-2-(oximetil protegido)-dioxolano a partir de 1,6-anidromanose, um açúcar que contém toda a estequiometria necessária para o produto final enantiomericamente puro, incluindo a configuração diastereomérica correcta em redor da posição 1 do açúcar (que se torna a posição 4' no nucleósido formado em último). O (2R,4R)- e (2R,4S)-4-acetoxi-2-(oximetil protegido)-dioxolano é condensado com uma base heterocíclica desejada na presença de  $\text{SnCl}_4$ , outro ácido de Lewis ou triflato de trimetilsililo num solvente orgânico, tal como dicloroetano, acetonitrilo ou cloreto de metileno, para proporcionar o dioxolano-nucleósido estereoquimicamente puro.

Os métodos enzimáticos para a separação dos enantiómeros D e L de cis-nucleósidos são revelados em, por exemplo, *Nucleosides and Nucleotides*, 12(2), 225-236 (1993); Pedidos de Patente Europeia N° 92304551.2 e 92304552.0 apresentados por Biochem Pharma, Inc.; e Publicações PCT N° WO 91/11186, WO 92/14729 e WO 92/14743 apresentados por Emory University.

A separação da mistura racémica acilada ou alquilada de enantiómeros D e L de cis-nucleósidos pode ser efectuada por cromatografia líquida de alto desempenho com fases estacionárias quirais, como revelado na Publicação PCT N° WO 92/14729.

O derivado mono, di e trifosfato dos nucleósidos activos podem ser preparados como descrito de acordo com os métodos publicados. O monofosfato pode ser preparado de acordo com o processo de Imai *et al.*, J. Org. Chem., 34(6), 1547-1550 (Junho de 1969). O difosfato pode ser preparado de acordo com o processo de Davisson *et al.*, J. Org. Chem., 52(9), 1794-1801 (1987). O trifosfato pode ser preparado de acordo com o processo de Hoard *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 87(8), 1785-1788 (1965).

**Processos Gerais para a Preparação de Bis(S-acil-2-tioetil)Fosfoéster de β-L-didesoxinucleósidos [Bis (SATE) β-L ddx MP]**

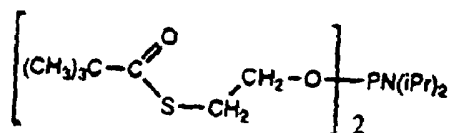


**Bis (SATE) β-L-ddxMP**

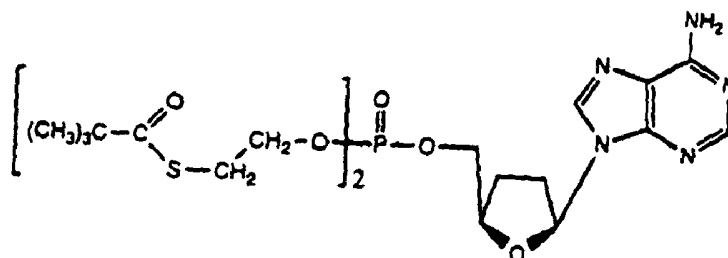
$Y^1$ ,  $Y^2$ ,  $Y^3$  e  $Y^4$  são independentemente H, OH,  $N_3$ ,  $NR^1R^2$ ,  $NO_2$ ,  $NOR^3$ , -O-alkilo, -O-arilo, halo (incluindo F, Cl, Br ou I), -CN, -C(O)NH<sub>2</sub>, SH, -S-alkilo ou -S-arilo e em que, tipicamente, três de  $Y^1$ ,  $Y^2$ ,  $Y^3$  e  $Y^4$  são quer H ou OH. O substituinte -OH, quando

presente, é tipicamente um grupo  $Y^1$  ou  $Y^3$ . Como ilustrado na estrutura,  $Y^2$  e  $Y^4$  estão na configuração arabino (eritro) e  $Y^1$  e  $Y^3$  estão na configuração treo (ribose). A base é uma purina ou pirimidina. Alternativamente, a porção pseudo-açúcar é um 1,3-oxatiolano (como em FTC e BCH-189 ou 3TC) ou é um derivado de 1,3-dioxolano. (i)  $ICH_2CH_2OH$ , DBU/ $C_6H_5CH_3$ ; (ii)  $Cl_2PN(iPr)_2$ .  $NEt_3/THF$ ; (iii)  $\beta$ -L-didesoxinucleósido, 1H-tetrazole/ $THF$ , depois, foi adicionado  $ClC_6H_4CO_3H/CH_2Cl_2$  1H-Tetrazole (0,21 g, 3,0 mmol) a uma solução agitada de  $\beta$ -L-didesoxinucleósido (1,0 mmol) e a fosforamidite C apropriada (1,2 mmol) em tetra-hidrofurano (2 mL) à temperatura ambiente. Após 30 minutos, a mistura reaccional foi arrefecida para  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  e foi adicionada uma solução de ácido 3-cloroperoxibenzóico (0,23 g, 1,3 mmol) em diclorometano (2,5 mL); a mistura foi depois deixada a aquecer até à temperatura ambiente durante 1 h. Foi adicionado sulfito de sódio (solução a 10%, 1,3 mL) à mistura para destruir o excesso de ácido 3-cloroperoxibenzóico, após o qual a camada orgânica foi separada e a camada aquosa foi lavada com diclorometano (2 x 10 mL). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com hidrogenocarbonato de sódio aquoso saturado (5 mL), depois água (3 x 5 mL), secas sob sulfato de sódio, filtradas e evaporadas até à secura sob pressão reduzida. A cromatografia em coluna do resíduo em sílica gel proporcionou o Bis(SATE)  $\beta$ -L-ddxMP do título.

EXEMPLO = bis(2-pivaloiltioetil) fosfato de  $\beta$ -L-2',3'-didesoxiadenosin-5'-ilo [Bis (SATE)  $\beta$ -L-ddAMP].



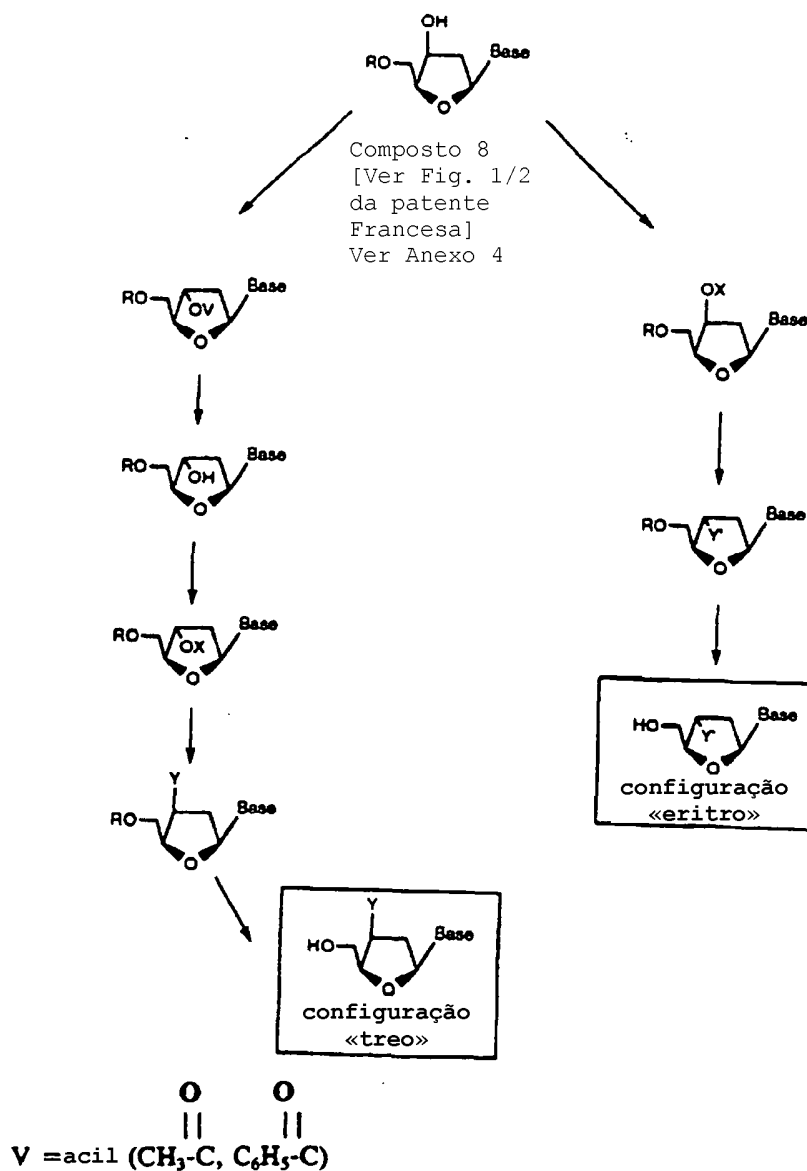
$\beta$ -L-ddA, 1H-treazole/THF  
depois, ClC<sub>6</sub>CO<sub>3</sub>H/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
depois, cromatografia em coluna de sílica gel



### Bis (SATE) $\beta$ -L-ddAMP

Seguindo o processo geral anterior, o Bis(SATE) $\beta$ -L-ddAMP puro foi obtido como um óleo incolor num rendimento de 72% após cromatografia em coluna de sílica gel [eluente: gradiente faseado de metanol (0-3%) em diclorometano]; <sup>1</sup>RMN (DMSO - d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 8,26 e 8,13 (2s, cada um 2H, H-2 e H-8), 7,20 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,24 (t, 1H, H-1'; J=6,0 Hz), 4,35-4,25 (m, 1H, H-4'), 4,25-4,00 (m, 2H, H-5', 5"), 3,96 (m, 4H, 2 SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3,04 (t, 4H, 2 SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O; J = 6,3 Hz), 2,5-2,4 (m, 2H, H-2', 2") 2,2-2,0 (m, 2H, H-3', 3"), 1,15 [s, 18H, 2 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C]; RMN de <sup>31</sup>P (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm = -0,76 (s); UV (EtOH),  $\lambda_{max}$  = 259 nm ( $\epsilon$  15400); espectro de massa (efectuado em: glicerol, tioglicerol, 1:1, v/v), FAB>0 604 (M+H)<sup>+</sup>, 136 (BH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>.

Esquema geral para a síntese estereoespecífica de  $\beta$ -L-didesoxinucleósidos substituídos em 3'

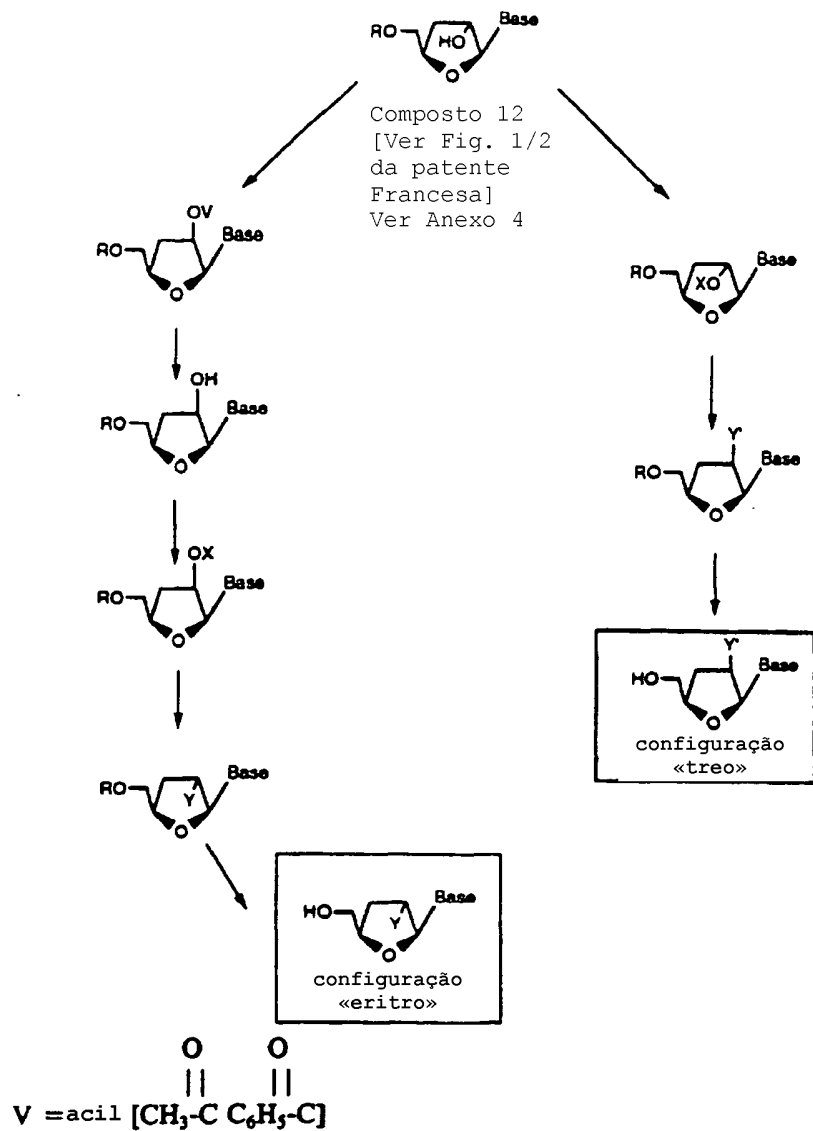


X = Grupo abandonante [ $\text{CH}_3\text{ SO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{ C}_6\text{H}_4\text{ SO}_2$ ,  $\text{CF}_3\text{ SO}_2$ ]

Y, Y' = F, N<sub>3</sub>, NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> [R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H, alquilo, arilo],

NO<sub>2</sub>, NOR [R = H, alquilo, acilo], O-alquilo, O-arilo, etc.

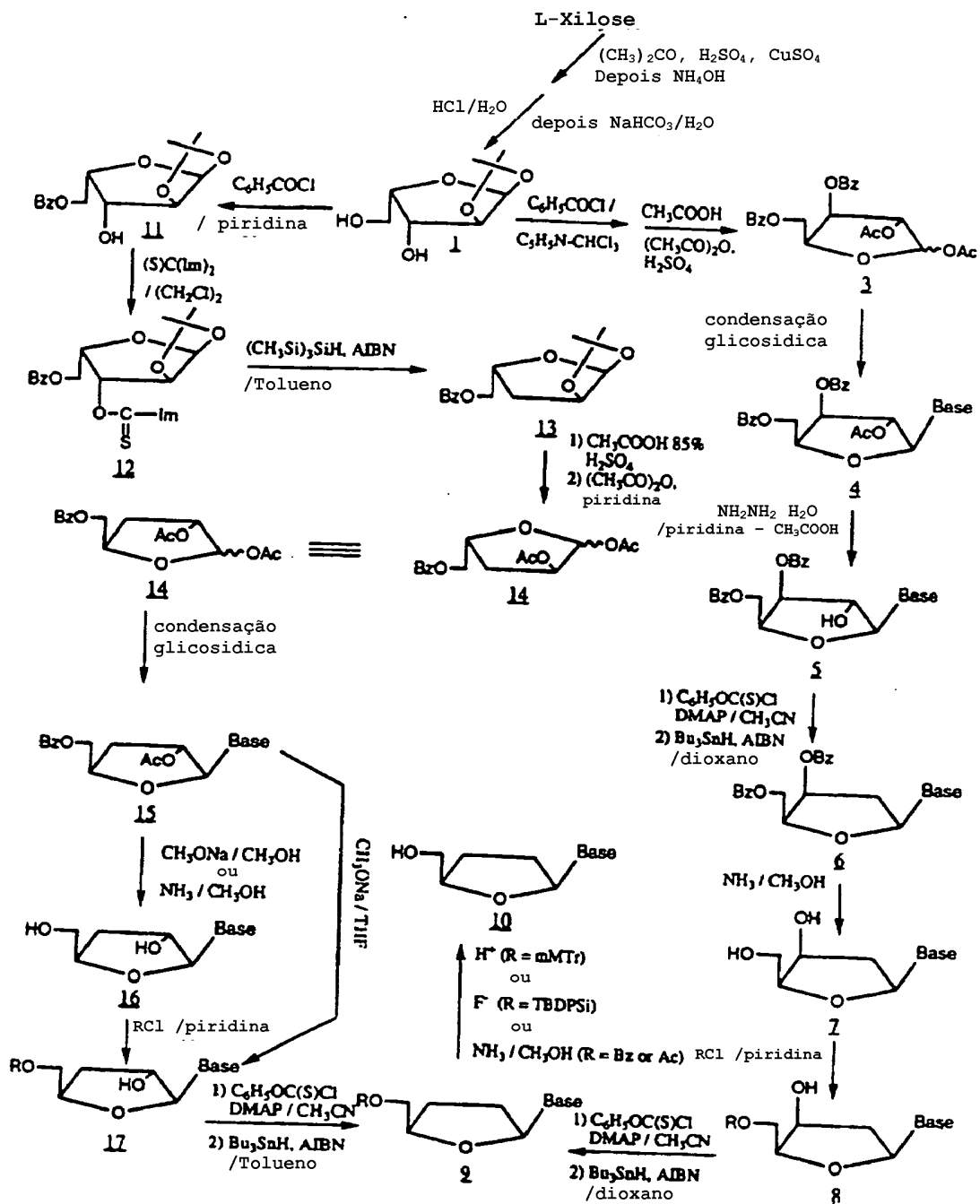
Esquema Geral para a Síntese Estereoespecífica de  
 $\beta$ -L-didesoxinucleósidos substituídos em 2'



X = Grupo abandonante [CH<sub>3</sub> SO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> SO<sub>2</sub>, H, CF<sub>3</sub> SO<sub>2</sub>]

Y, Y' = F, N<sub>3</sub>, NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> [R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H, alquilo, arilo],

NO<sub>2</sub>, NOR [R = H, alquilo, acilo], O-alquilo, O-arilo, etc.



Esquema I: Bases = purinas ou pirimidinas, eventualmente, protegidas de um modo conveniente; R = Benzoílo (Bz), Acetilo (Ac), monometoxitritilo (mMTr) ou terc-butildifenilsililo (TBDPSI)

## II. Actividade Anti-HBV dos Nucleósidos

A capacidade dos compostos activos em inibir o HBV pode ser determinada através de várias técnicas experimentais. O ensaio aqui utilizado para avaliar a capacidade dos compostos revelados para inibir a replicação do HBV é descrito em detalhe em Korba e Gerin, *Antiviral Res.* 19: 55-70 (1992). Apenas para objectivos de ilustração, os resultados da avaliação da toxicidade e actividade anti-HBV são proporcionados abaixo para  $\beta$ -L-2',3'-didesoxicidina ( $\beta$ -L-ddC), B-L-2',3'-didesoxi-5-aurocidina ( $\beta$ -L-FddC) e (+)- $\beta$ -D-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-dioxolano ((+)-B-D-FPOC). A toxicidade e actividade anti-HBV de (-)- $\beta$ -L-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano ((-)- $\beta$ -L-FTC) e  $\beta$ -D-2',3'-didesoxicytidina ( $\beta$ -D-ddC) são incluídos como controlo. Os outros compostos aqui revelados podem ser avaliados de um modo semelhante.

As amostras de  $\beta$ -L-ddC e  $\beta$ -L-5-FddC utilizadas nos ensaios anti-HBV foram caracterizadas como abaixo.

2',3'-Didesoxi- $\beta$ -L-citidina ( $\beta$ -L-ddC). p.f. = 220-220 °C; UV (EtOH 95) max 273 nm,  $\lambda$ min 252 nm; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ ppm = 7,89 (d. 1H, H-6; J = 7,4 Hz). 7,15-6,95 (d largo, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,91 (dd. 1H, H-1'; J = 3,0 e 6,5 Hz), 5,66 (d, 1H, H-5; J = 7,4 Hz), 4,99 [t 1H, OH-5'; J = 5,2 Hz]. 4,05-3,95 (m, 1H, H-4'), 3,60-3,70 (m, 1H, H-5'; após troca por D<sub>2</sub>O: dd, 3,64 ppm, J = 3,6 e 12,0 Hz). 3,60-3,50 (m. 1H, H-5'; após troca por D<sub>2</sub>O: dd, 3,50 ppm, J = 4,1 e 12,0 Hz), 2,30-2,15 (m. 1H, H-2'), 1,9-1,65 (m. 3H, H-2'', 3' e 3'');  $[\alpha]_D^{20}$ -103,6 (c 0,8 MeOH); espectro de massa (efectuado em: glicerol-tioglicerol, 50:50. v/v);



FAB>0423[2M+H]<sup>+</sup>, 304[M+glicerol+H]<sup>+</sup>. 212 [M+H]<sup>+</sup>, 112 [BH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 101 [s]<sup>+</sup>; FAB<0 210 [M-H]<sup>-</sup>. *Anal. Calc. para C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (M = 211,21); C 51,18; H 6,20; N 19,89 verificado; C 51,34; H 6,25; N 20,12.*

2',3'-Didesoxi-β-L-5-fluorocitidina (β-L-5-FddC).

p.f. = 158-160 °C; UV (EtOH 95) λ<sub>max</sub> 281 nm (ε, 8100) e 237 nm (ε, 8500); min 260 nm (ε, 5700) e 225 nm (ε, 7800); RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 8,28 (d, 1H, H-6; J = 7,4 Hz), 7,7-7,4 (d largo, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,83 (dd pouco resolvida, 1H, H-1'), 5,16 (t, 1H, OH-5'; J = 5,1 Hz), 4,05-3,95 (m, 1H, H-4'), 3,8-3,70 [m, 1H, H 5'; após troca por D<sub>2</sub>O: dd, 3,71 ppm. J = 2,7 e 12,3 Hz], 3,60-3,50 [m. 1H, H-5"; após troca por D<sub>2</sub>O: dd, 3,52 ppm; J = 3,3 e 12,3 Hz], 2,35-2,15 (m, 1H, H-2'), 1,95-1,75 (m, 3H, H-2", 3' e 3"): [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>-80,0 (-c 1,0, DMSO); Espectro de massa [efectuado em: álcool 3-nitrobenzílico] FAB>0 230 [M+H]<sup>+</sup> e 101 [s]<sup>+</sup>; FAB<0 228 [M-II]<sup>-</sup>. *Anal. Calculada para C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>FO<sub>3</sub> (M = 229,21); C 47,16; H 5,28; N 18,33, F 8,29, Verificada. C 16,90; H 5,28; N 18,07; F 8,17.*

As avaliações antivirais foram efectuadas em duas passagens de células separadas, duas culturas por passagem (4 culturas no total). Todos os poços, em todas as placas, foram semeados à mesma densidade e ao mesmo tempo.

Devido a variações inerentes aos níveis do ADN do HBV intracelular e extracelular, apenas depressões superiores a 3,0 vezes (para o ADN do virião HBV) ou 2,5 vezes (para intermediários da replicação do ADN de HBV) a partir de níveis médios destas formas de ADN de HBV em células não tratadas são, geralmente, consideradas como sendo estatisticamente significativas [P<0,05] (Korba e Gerin, Antiviral Res. 19: 55-70, 1992). Os níveis de ADN de HBV integrado em cada

preparação de ADN celular (que nestas experiências permanece constante numa base por célula) foram utilizados para calcular os níveis de formas de ADN de HBV intracelular eliminando, deste modo, as variações técnicas inerentes nos ensaios de hibridação por transferência.

Os valores típicos para o ADN do virião de HBV extracelular em células não tratadas variam de 50 a 150 pg/mL de meio de cultura (em média, aproximadamente, 76 Pg/mL). Os intermediários da replicação de ADN de HBV intracelular em células não tratadas variam de 50 a 100 pg/ $\mu$ g de ADN de célula (em média, aproximadamente, 74 pg/ $\mu$ g de ADN de célula). Em geral, as depressões nos níveis de ADN de HBV intracelular devido ao tratamento com compostos antivirais são menos pronunciadas e ocorrem mais lentamente do que depressões nos níveis de ADN do virião HBV.

Para referência, o modo pelo qual foram efectuadas as análises de hibridação para estas experiências, resultam numa equivalência de, aproximadamente, 1,0 pg de ADN de HBV intracelular/ $\mu$ g de ADN celular para 2-3 cópias genómicas por célula e 1,0 pg de ADN de HBV extracelular/mL de meio de cultura para  $3 \times 10^5$  de partículas viárias/mL.

As análises de toxicidade foram efectuadas de modo a avaliar se qualquer um dos efeitos antivirais observados fora devido a um efeito geral na viabilidade celular. O método utilizado foi baseado na entrada de corante vermelho neutro, um ensaio convencional e amplamente utilizado para a viabilidade celular em vários sistemas vírus-hospedeiro, incluindo HSV (vírus herpes simplex) e VIH.

Os compostos de teste foram utilizados na forma de soluções armazenamento curto 40 mM em DMSO (congeladas em gelo seco). Foram preparadas alíquotas diárias das amostras teste e congeladas a -20 °C para que cada alíquota individual possa ser submetida a um único ciclo de congelação-descongelação. As alíquotas de teste diárias foram descongeladas, suspensas em meio de cultura à temperatura ambiente e imediatamente adicionadas às culturas celulares. Os compostos foram testados a 0,01 até 10 µM para a actividade antiviral. Os compostos foram testados para a toxicidade a concentrações de 1 a 300 µM. Os resultados são proporcionados na Tabela 1.

Tabela 1

EFEITO DE D-ddC, L-ddC, L-FddC, FDOC e (-)-FTC CONTRA O VÍRUS DA HEPATITE B EM CÉLULAS HEPG-2 (2.2.15) TRANSFECTADAS							
Composto	Virião HBV <sup>a</sup>		RI HBV <sup>b</sup>		Citotoxicidade IC <sub>50</sub> _SD	Índice de Selectividade IC <sub>50</sub> / EC <sub>90</sub> Virião RI	
	EC <sub>50</sub> _SD	EC <sub>90</sub> _SD	EC <sub>50</sub> _SD	EC <sub>90</sub> _SD		IC <sub>50</sub> _SD	IC <sub>50</sub> / EC <sub>90</sub> Virião
β-D-ddC	1,3_0,2 <sup>c</sup> 1,5_0,7	2,1_0,3 9,4_2,5	8,1_1,7 3,2_0,6	12,0_2,4 11,0_2,0	219_28 <sup>c</sup> 216_22	104 23	18 20
β-L-ddC	0,033_0,003	1,1_0,2	0,107_0,012	1,8_0,2	493_64	448	274
β-L-FddC	0,12_0,01	0,30_0,03	2,8_0,4	4,8_0,6	438_57	1,460	91
(+)-β-D-FDOC	0,020_0,003	0,195_0,027	0,062_0,012	0,23_0,02	251_23	1,287	1,091
(-)-β-L-FTC	0,017_0,005	0,15_0,02	0,049_0,008	0,18_0,03	292_13	1,947	1,622

<sup>a</sup> ADN Extracelular  
<sup>b</sup> Intermediários Replicativos (ADN Intracelular)  
<sup>c</sup> µM

## Exemplo 2 Toxicidade dos Compostos

Foi avaliada a capacidade dos compostos activos para inibirem o crescimento de vírus em culturas celulares 2.2.15 (células HepG2 transformadas com viriões da hepatite). Como ilustrado na Tabela 1, não foi observada toxicidade significativa (superior a 50% de depressão nos níveis de absorção do corante, observados em células não tratadas) para qualquer um dos compostos de teste, a concentrações de 100  $\mu\text{M}$ . Os compostos foram moderadamente tóxicos a 300  $\mu\text{M}$ , no entanto, todos os três compostos exibiram menos toxicidade a esta concentração que o  $\beta\text{-D-ddC}$ . Parece que o  $\text{IC}_{50}$  do  $\beta\text{-L-ddC}$  e  $\beta\text{-L-FddC}$  é, aproximadamente, duas vezes superior ao do  $\beta\text{-D-ddC}$ .

As análises de toxicidade foram efectuadas em placas de cultura de tecidos de fundo plano de 96 poços. As células para as análises de toxicidade foram cultivadas e tratadas com os compostos de teste com o mesmo calendário como utilizado para as avaliações antivirais. Cada composto foi testado em 4 concentrações, cada um em culturas em triplicado. A absorção de corante vermelho neutro foi utilizada para determinar o nível relativo de toxicidade. A absorvância do corante internalizado a 510 nm ( $A_{510}$ ) foi utilizada para a análise quantitativa. Os valores são apresentados como uma percentagem dos valores médios de  $A_{510}$  ( $\pm$  desvios padrões) em 9 culturas separadas de células não tratadas mantidas na mesma placa de 96 poços como os compostos de teste. A percentagem de absorção de corante nas 9 culturas de controlo na placa 40 foi de  $100 \pm 3$ . Nestes ensaios, a 150-190  $\mu\text{M}$  de  $\beta\text{-D-ddC}$ , é tipicamente observada uma redução de 2 vezes na absorção de corante (*versus* os níveis observados em

culturas não tratadas) (Korba e Gerin, Antiviral Res. 19: 55-70, 1992).

### **Exemplo 3 Actividade Anti-Vírus da Hepatite B**

O controlo de tratamento positivo,  $\beta$ -D-2',3'-didesoxicitosina [ $\beta$ -D-ddC], induziu depressões significativas na replicação do ADN de HBV na concentração utilizada. Estudos anteriores indicaram que com 9-12  $\mu$ M de  $\beta$ -D-ddC, é tipicamente observada uma depressão de 90% na RI de HBV (em relação a níveis médios em células não tratadas), neste sistema de ensaio (Korba e Gerin, Antiviral Res. 19: 55-70, 1992). Isto é consistente com os dados apresentados na Tabela 1.

Os dados apresentados na Tabela 1 indicam que todos os três compostos de teste (( $\beta$ -L-FddC), ( $\beta$ -L-ddC) e  $\beta$ -D-FDOC)), foram potentes inibidores da replicação do HBV, provocando depressão do ADN do virião do HBV e RI do HBV para um nível comparável ao, ou superior ao, observado após tratamento com  $\beta$ -D-ddC.

### **Exemplo 4**

O efeito dos derivados  $\beta$ -L seleccionados contra a replicação do vírus da Hepatite B em células Hep G-2 transfectadas é descrito na Tabela 4.

**Tabela 1: Efeito de derivados L contra a replicação do vírus da Hepatite B em células Hep G-2 (2.2.15) transfectadas.**

Composto	Virião <sup>a</sup> DBV EC <sub>50</sub>	RI <sup>b</sup> HBV EC <sub>50</sub>	Citotoxicidade IC <sub>50</sub>	Índice de Selectividade IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>	
				Virião	RI
β-L-ddA	5,0 <sup>c</sup>	5,0	250	50	50
Bis (Sate) β-L-ddAMP	0,45	0,35	200	445	571
β-L-AZT	>10	>10	1000	NA	NA
Bis (Sate) β-L-AZTMP	7,5	8	200	27	25
2'-F-β-L-5FddC	1,7	5,0	210	124	42
<sup>a</sup> ADN Extracelular <sup>b</sup> Intermediários Replicativos (ADN Intracelular) <sup>c</sup> μM					

### **Exemplo 5**

O Efeito inibidor comparativo dos trifosfatos seleccionados na ADN polimerase do vírus da hepatite de marmota é apresentado na Tabela 5.

**Tabela 2: Actividades inibidoras comparativas de trifosfatos de L-nucleósido na ADN polimerase do vírus da hepatite de marmota e na ADN polimerase  $\alpha$  e  $\beta$  humana.**

Inibidor	ADN Pol de WHB IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	ADN Pol $\alpha$ Ki ( $\mu$ M)	ADN Pol $\beta$ Ki ( $\mu$ M)
$\beta$ -L-AZTPP	0,2	>100	> 100
$\beta$ -L-ddATP	2,1	>100	> 100
3-TC-TP	1,0	>100	> 100
$\beta$ -L-5FddCTP	2,0	>100	> 100

### **III. Preparação de Composições Farmacêuticas**

Os compostos aqui revelados e seus sais farmacêuticamente aceitáveis, pró-fármacos e derivados são úteis na prevenção e tratamento de infecções por HBV e outras patologias relacionadas, tais como patologias positiva para anticorpo anti-HBV e positiva para HBV, inflamação hepática crónica provocada por HBV, cirrose, hepatite aguda, hepatite fulminante, hepatite crónica persistente e fadiga. Estes compostos ou formulações podem também ser utilizados profilaticamente para prevenir ou retardar a progressão doença clínica em indivíduos que são positivos para o anticorpo anti-HBV ou antigénio HBV ou que foram expostos ao HBV.

Os humanos que sofrem de qualquer uma destas patologias podem ser tratados por administração, ao doente, de uma quantidade eficaz de tratamento para HBV de um ou uma mistura dos compostos activos aqui descritos ou um seu sal ou derivado farmacêuticamente aceitável, opcionalmente num veículo ou

diluyente farmacêuticamente aceitável. Os materiais activos podem ser administrados por qualquer via apropriada, por exemplo, oralmente, parentericamente, intravenosamente, intradematicamente, subcutaneamente ou topicamente, numa forma líquida ou sólida.

O composto activo é incluindo no veículo ou diluyente farmacêuticamente aceitável numa quantidade suficiente para distribuir, a um doente, uma quantidade terapêuticamente eficaz, sem provocar efeitos tóxicos graves num doente tratado.

Uma dose preferida do composto activo para todas as patologias acima mencionadas estará na gama desde cerca de 1 a 60 mg/kg, de um modo preferido, 1 a 20 mg/kg, de peso corporal por dia, de um modo mais geral, 0,1 até cerca de 100 mg por quilograma de peso corporal do receptor por dia. A gama de dosagem eficaz dos derivados farmacêuticamente eficazes pode ser calculada com base no peso do nucleósido derivado a ser distribuído. Se o derivado exibir actividade por ele próprio, a dosagem eficaz pode ser estimada como acima, utilizado o peso do derivado, ou por outros meios conhecidos pelos especialistas na técnica. Numa forma de realização, o composto activo é administrado como descrito no produto inserido ou Physician's Desk Reference para 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 2',3'-didesoainoaina (DDI), 2',3'-didesoxicitidina (ddC) ou 2',3','-didesoxi-2',3'-dide-hidrotimidina (D4T) para a infecção por VIH.

O composto é convenientemente administrado em qualquer forma de dosagem unitária adequada, incluindo mas não limitada a uma contendo 7 a 3000 mg, de um modo preferido, 70 a 1400 mg de ingrediente activo por forma de dosagem unitária. É normalmente conveniente uma dosagem oral de 50-1000 mg.



Idealmente, o ingrediente activo deve ser administrado para alcançar concentrações plasmáticas máximas do composto activo de cerca de 0,2 a 70  $\mu\text{M}$ , de um modo preferido, cerca de 1,0 a 10  $\mu\text{M}$ . Isto pode ser alcançado, por exemplo, pela injeccção intravenosa de uma solução 0,1 a 5% do ingrediente activo, opcionalmente, em solução salina ou administrada como um bolus do ingrediente activo.

O composto activo pode ser proporcionado na forma de sais farmacologicamente aceitáveis. Como aqui utilizado, o termo sais ou complexos farmacologicamente aceitáveis refere-se a sais ou complexos dos nucleósidos que retêm a actividade biológica desejada do composto derivado e exibe efeitos toxicológicos indesejados mínimos, se alguns. Exemplos não limitantes de tais sais são (a) sais de adição de ácido formados com ácidos inorgânicos (por exemplo, ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico e semelhantes) e sais formados com ácidos orgânicos, tais como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzóico, ácido tânico, ácido pamóico, ácido algínico, ácido poliglutâmico, ácidos naftalenossulfónico, ácidos naftalenodissulfónicos e ácido poligalacturónico; (b) sais de adição de base formados com catiões, tais como sódio, potássio, zinco, cálcio, bismuto, bário, magnésio, alumínio, cobrem, cobalto, níquel, cádmio, sódio, potássio e semelhantes ou com um catião orgânico formado a partir de N,N-dibenziletieno-diamina, amónio ou etilenidiamina; ou (c) combinações de (a) e (b); e. g., um sal de tanato de zinco ou semelhante.

As modificações do composto activo, especificamente nas posições N<sup>6</sup> ou N<sup>4</sup> e 5'-O, podem afectar a biodisponibilidade e taxa de metabolismo das espécies activas proporcionado, assim, controlo sobre a distribuição das espécies activas.

A concentração do composto activo na composição do fármaco irá depender das taxas de absorção, inactivação e excreção do fármaco, bem como outros factores conhecidos para os especialistas na técnica. Deve notar-se que os valores da dosagem irão também variar com a gravidade da patologia a ser aliviada. É também evidente que para qualquer indivíduo em particular, os regimes de dosagem específicos devem ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade individual e a decisão da pessoa que está a administrar ou supervisionar a administração das composições, e que as gamas de concentração aqui estabelecidas são apenas exemplos e não têm como intenção limitar o âmbito ou prática da composição reivindicada. O ingrediente activo pode ser administrado de uma vez, ou pode ser dividido em várias doses mais pequenas a serem administradas a tempos com intervalos variados.

Um modo de administração preferido do composto activo é a oral. As composições orais irão, geralmente, incluir um diluente inerte ou um veículo comestível. Podem ser incluídas em cápsulas de gelatina ou preparadas em comprimidos. Para o propósito de administração terapêutica oral, o composto activo pode ser incorporado com excipientes e utilizado na forma de comprimidos, pastilhas ou cápsulas. Os agentes de ligação farmacologicamente compatíveis e/ou materiais adjuvantes podem ser incluídos como parte da composição.

Os comprimidos, pílulas, cápsulas, pastilhas e semelhantes, podem conter qualquer um dos seguintes ingredientes ou compostos de uma natureza semelhante: um ligando, tal como celulose microcristalina, goma de tragacanto ou gelatina; um excipiente, tal como amido ou lactose, um agente desintegrante, tal como ácido algínico, Primogel ou amido de milho; um lubrificante, tal como estearato de magnésio ou Sterotes; um deslizante, tal como dióxido de silício coloidal; um agente adoçante, tal como sacarose ou sacarina; ou um agente aromatizante, tal como hortelã-pimenta, salicilato de metilo ou aroma de laranja. Quando a forma de dosagem unitária é uma cápsula, pode conter, para além do material do tipo anterior, um veículo líquido, tal como um óleo gordo. Além disso, as formas de dosagem unitárias podem conter muitos outros materiais que modificam a forma física da dosagem unitária, por exemplo, revestimentos de açúcar, goma-laca ou outros agentes entéricos.

O composto activo ou seu sal ou derivado farmacologicamente aceitável pode ser administrado como um componente de um elixir, suspensão, xarope, hóstia, pastilha elástica ou semelhante. Um xarope pode conter, para além dos compostos activos, sacarose como um agente adoçante e certos conservantes, corantes e tintas e aromas.

O composto activo, ou seu sal ou derivado farmacologicamente aceitável, pode também ser misturado com outros materiais activos que não prejudiquem a acção desejada, ou com materiais que suplementem a acção desejada, tal como antibióticos, antifúngicos, anti-inflamatórios ou outros antivirais, incluindo agentes anti-HBV, anticitomegalovírus ou anti-VIH.

As soluções ou suspensões utilizadas para aplicação parentérica, intradérmica, subcutânea ou tópica podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril, tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicóis ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos, tais como álcool benzílico ou parabenos de metilo; antioxidantes, tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes, tais como ácido etilenodiaminotetraacético; tampões, tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste da tonicidade, tais como cloreto de sódio ou dextrose. A preparação parentérica pode ser incluída em ampolas, seringas ou frascos de doses múltiplas descartáveis feitos de vidro ou plástico.

Se administrada intravenosamente, os veículos preferidos são solução salina fisiológica ou solução salina tamponada com fosfato (PBS). Numa forma de realização preferida, os compostos activos são preparados com veículos que irão proteger o composto contra a rápida eliminação do corpo, tal como formulação de libertação controlada, incluindo implantes e sistemas de distribuição microencapsulados. Podem ser utilizados polímeros biocompatíveis biodegradáveis, tais como acetato de etileno vinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres e ácido poliláctico. Os métodos para a preparação de tais formulações serão evidentes para os especialistas na técnica. Os materiais também podem ser obtidos comercialmente de Alza Corporation e Nova Pharmaceuticals, Inc.

As suspensões lipossomais (incluindo lipossomas direccionados para células infectadas com anticorpos monoclonais para antigénios virais) são também preferidas como veículos farmacologicamente aceitáveis. Estas podem ser preparadas de

acordo com os métodos conhecidos pelos especialistas na técnica, por exemplo, como descrito na Patente U.S. N° 4522811.

Por exemplo, as formulações lipossomais podem ser preparadas por dissolução do(s) lípido(s) apropriado(s) (tais como estearoilfosfatidiletanolamina, estearoilfosfatidilcolina, aracadoilfosfatidilcolina e colesterol) num solvente inorgânico que é, depois, evaporado deixando para trás um filme fino, de lípido seco, na superfície do recipiente. É depois introduzida uma solução aquosa do composto activo ou seu derivado monofosfato, difosfato e/ou trifosfato no recipiente. O recipiente é depois agitado à mão para libertar o material lipídico dos lados do recipiente e para dispersar os agregados lipídicos formando, assim, a suspensão lipossomal.

Esta invenção foi descrita com referência às suas formas de realização preferidas. As variações e modificações da invenção serão óbvias aos especialistas na técnica a partir da descrição anterior detalhada da invenção.

Lisboa, 24 de Janeiro de 2007

## REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um pró-fármaco de nucleótido de  $\beta$ -L-2',3'-didesoxiadenosina para a preparação de um medicamento, para o tratamento de um doente infectado com hepatite B, em que:
  - a) o nucleótido é 5'-mono, di-, ou tri-fosforilado no carbono 5';
  - b) um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por uma porção independentemente seleccionada de alquilo, arilo, esteróide, hidrato de carbono, 1,2-diacilglicerol, álcool e S-acil-2-tioetilo, e
  - c) o nucleótido está, pelo menos, 95% livre do seu  $\beta$ -D-enantiómero oposto.
2. Utilização da reivindicação 1, em que o nucleótido é um monofosfato.
3. Utilização da reivindicação 1, em que o nucleótido é um difosfato.
4. Utilização da reivindicação 1, em que o nucleótido é um trifosfato.
5. Utilização da reivindicação 1, em que um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por alquilo.

6. Utilização da reivindicação 1, em que um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por arilo.
7. Utilização da reivindicação 1, em que um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por um esteróide.
8. Utilização da reivindicação 1, em que um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por um hidrato de carbono.
9. Utilização da reivindicação 1, em que um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por 1,2-diacilglicerol.
10. Utilização da reivindicação 1, em que um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por um álcool.
11. Utilização da reivindicação 1, em que o nucleósido é fosforilado e um dos hidrogénios na porção fosfato é substituído por um grupo S-acil-2-tioetilo de fórmula  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ .
12. Utilização da reivindicação 1, compreendendo também a utilização no tratamento de uma quantidade eficaz de um segundo composto seleccionado do (-)-enantiómero ou mistura racémica de 2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano ou seu sal fisiologicamente aceitável; um enantiómero ou mistura racémica de 2'-fluoro-5-etil-arabinosiluracilo (FEAU) ou seu sal fisiologicamente aceitável; carbovir ou interferão.

13. Pró-fármaco do nucleótido de  $\beta$ -L-2',3'-didesoxiadenosina, em que:
- a) o nucleótido é 5'-mono, di-, ou tri-fosforilado no carbono 5';
  - b) um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por uma porção independentemente seleccionada de alquilo, arilo, esteróide, hidrato de carbono, 1,2-diacilglicerol, álcool e S-acil-2-tioetilo, e
  - c) o nucleótido está, pelo menos, 95% livre do seu  $\beta$ -D-enantiómero oposto.
14. Pró-fármaco do nucleótido da reivindicação 13, em que o nucleótido é um monofosfato.
15. Pró-fármaco do nucleótido da reivindicação 13, em que o nucleótido é um difosfato.
16. Pró-fármaco do nucleótido da reivindicação 13, em que o nucleótido é um trifosfato.
17. Pró-fármaco do nucleótido da reivindicação 13, em que um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por alquilo.
18. Pró-fármaco do nucleótido da reivindicação 13, em que um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por arilo.



19. Pró-fármaco do nucleótido da reivindicação 13, em que um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por um esteróide.
20. Pró-fármaco do nucleótido da reivindicação 13, em que um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por um hidrato de carbono.
21. Pró-fármaco do nucleótido da reivindicação 13, em que um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por um 1,2-diacilglicerol.
22. Pró-fármaco do nucleótido da reivindicação 13, em que um ou mais hidrogénios na porção fosfato são substituídos por um álcool.
23. Composição farmacêutica compreendendo o pró-fármaco da reivindicação 13.

Lisboa, 24 de Janeiro de 2007

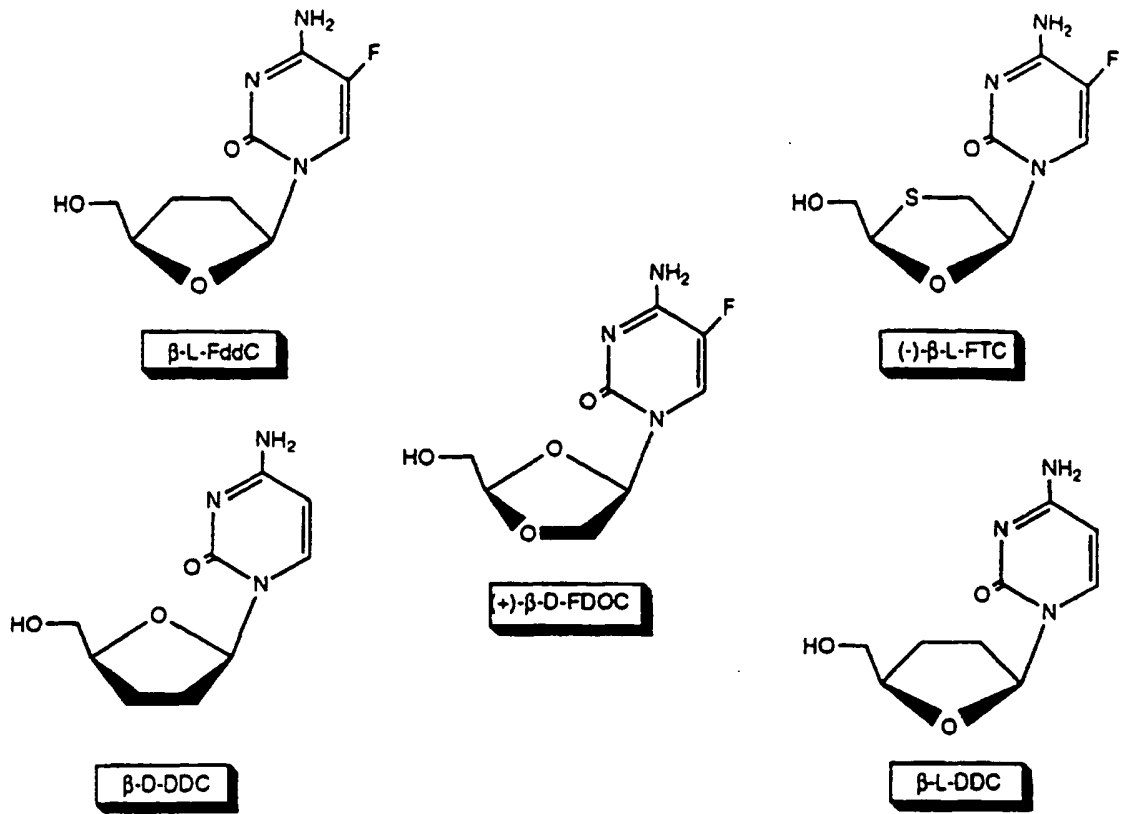


Figura 1

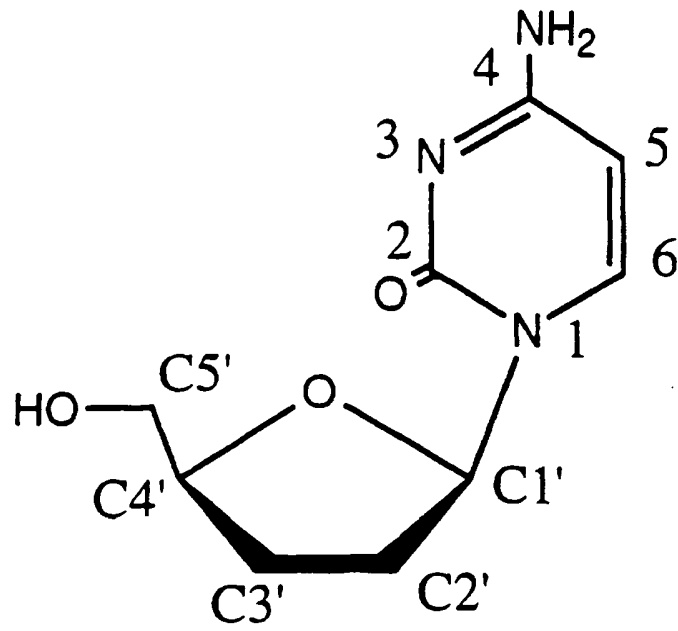


Figura 2