

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

N.º 95 261

REQUERENTE: THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED,  
britânica, com sede em 160 Euston  
Road, London NW1 2BP, Inglaterra

EPIGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE  
2'-DESOXI-2'-FLUORO-RIBONUCLEOSIDOS E DE  
COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE OS CONTEM"

INVENTORES: Sylvia Margaret Tisdale,  
Martin Jhon Slater, Joel Van  
Tuttle, Susan Mary Daluge,  
Thomas Anthony Krenitsky e  
George Walter Kosalka

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris  
de 20 de Março de 1883.

Reino Unido em 11 de Setembro de 1989, sob o No.8920534.8.

Descrição da patente de invenção de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, britânica, industrial e comercial, com sede em 160 Euston Road, London NW1 2BP, Inglaterra, (inventores: Sylvia Margaret Tisdale e Martin Jhon Slater, residentes em Inglaterra, e Joel Van Tuttle, Susan Mary Daluge, Wayne Howard Miller, Thomas Anthony Krenitsky e George Walter Kosalka, residentes nos E.U.A.), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE 2'-DESOKI-2'-FLUORO-RIBONUCLEOSIDOS E DE COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS QUE OS CONTÊM"

Descrição

A presente invenção refere-se a compostos químicos que possuem actividade anti-infecciosa, aos métodos para a sua preparação, às composições que os contêm e à sua utilização em particular no tratamento de doenças parasiticas e víricas. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a 2'-desoxi-2'-fluoro-ribonucleosidos e seus derivados.

No âmbito da quimioterapia anti-vírica existem poucos fármacos que combatem eficazmente o vírus de per si, devido à dificuldade de atacar o vírus sem simultaneamente prejudicar as células hospedeiras não infectadas. Recentemente verificou-se que algumas fases de desenvolvimento do ciclo de vida do vírus, as quais variam de espécie para espécie, são especificadas do próprio vírus. Contudo, devido à grande semelhança entre as funções víricas e do hospedeiro, tem sido difícil identificar tratamentos eficazes.

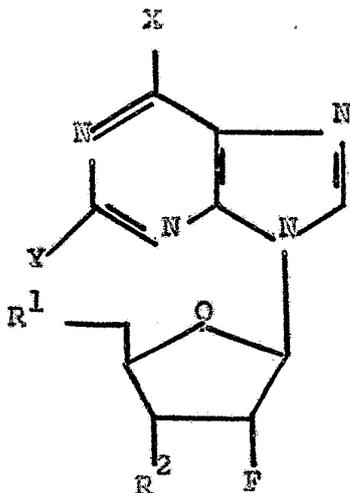
Existe um grupo de agentes patogénicos víricos que tem afligido a humanidade desde tempos imemoriais e que tem sido responsável pela morte de muitos milhões de pessoas ao longo dos séculos e que é constituído pelos vírus da gripe. Esses vírus particularmente os da gripe A e B, constituem ainda hoje um dos principais agentes que provocam doenças respiratórias agudas em todo o mundo.

Os vírus da gripe são membros da família dos vírus Orthomyxoviridas de cordão negativo. Existe outro vírus de cordão negativo que possui importante implicação sobre a saúde que é o vírus sincicial respiratório (VSR), o qual é um pneumovírus, um género da família Paramixoviridas. O VSR é uma causa essencial das doenças do tracto respiratório inferior durante a infância e adolescência.

Os nucleósidos fluorados tem sido prescritos para o tratamento de doenças víricas e parasíticas. Por exemplo, o Pedido de Patente Europeia EP-A-O 287 313 refere-se aos 2',3'-didesoxinucleosidos, substituídos com fluor na posição 2' para utilização no tratamento dos vírus da imunodeficiência humana. O Pedido de Patente Europeia EP-A-O 219 829 descreve 2'-desoxi-2'-fluoro- $\beta$ -D-arabino-furanosil-nucleósidos para utilização como agentes anti-parasíticos, especialmente contra a leishmaniose. Os processos para a preparação de alguns 2'-fluoro-2'-desoxi-ri-

bonucleosidos foram descritos por "Uesugi et al., (Nu-  
cleosides and Nucleotides 2, 373-, 1983) e Ikehara et al.  
(Chem. Pharm. Bull. 29, 1034-, 1981).

Descobriu-se agora que os compostos de  
fórmula (I) e seus sais farmacologicamente aceitáveis consti-  
tuem agentes anti-infecciosos, particularmente contra virus.  
Por exemplo, os compostos de fórmula (I) são activos contra  
o virus da gripe, particularmente nos casos da gripe A e B  
e infecções provocadas pelo VSR, e ainda no caso de certos  
protozoários, por exemplo, Trichomonas vaginalis e  
Giardia lamblia. Na fórmula (I):



(I)

Y representa H ou NH<sub>2</sub>;

X representa um grupo -NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> no qual R<sup>3</sup>  
e R<sup>4</sup> podem ser iguais ou diferentes e cada um deles re-  
presenta individualmente hidrogênio, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alque-  
nilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), ciclo-alquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), sendo cada grupo facultati-  
vo substituído por um ou vários átomos de hidrogênio, ou  
X representa um grupo Z-R<sup>5</sup> no qual Z representa o átomo de  
oxigênio ou de enxofre e R<sup>5</sup> possui as mesmas significações  
de R<sup>3</sup>, ou X representa um átomo de halogênio ou de hidrogê-  
nio; e

R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup>, os quais podem ser iguais ou di-  
ferentes, representam individualmente:

- um grupo hidróxi;  
- um grupo de fórmula  $-OCOR^6H$  em que  $R^6$  representa um grupo divalente que pode ser alquilenos ( $C_1-C_6$ ) alquênilenos ( $C_2-C_6$ ), ou ciclo-alquilenos ( $C_3-C_7$ ) de cadeia linear ou ramificada, sendo cada um deles facultativamente substituído por ou por vários grupos hidróxi;

- um grupo de fórmula  $-COOR^7H$  em que  $R^7$  representa uma ligação covalente ou possui as significações definidas para  $R^6$ ;

- um grupo de fórmula  $-OCOR^6-COOR^8$  em que  $R^6$  possui as significações definidas antes e  $R^8$  é seleccionado entre hidrogénio, alquil ( $C_1-C_6$ ) ou alquênilo ( $C_1-C_6$ ) de cadeia linear ou ramificada, sendo qualquer deles facultativamente substituído por um ou vários grupos hidróxi;

- um grupo de fórmula  $-OCOR^7-Z-Ar$  em que  $R^7$  possui as significações definidas antes, Z representa alternativamente uma ligação covalente ou um átomo de oxigénio e Ar representa um anel aromático, por exemplo, um anel arilo monocíclico (por exemplo fenilo) ou heteroarilo (por exemplo, piridina), insubstituído ou substituído por um ou vários átomos de halogénio ou por um grupo alquilo ( $C_1-C_6$ ) ou alcoxi ( $C_1-C_6$ );

- um grupo de fórmula  $-OR^6H$  em que  $R^6$  possui as significações definidas antes;

- um grupo de fórmula  $-OR^6-Z-Ar$  em que  $R^6$ , Z e Ar possuem as significações definidas antes;

- um grupo de fórmula  $-OCOCAR^9NR^{10}R^{11}$  em que  $R^{10}$  e  $R^{11}$  possuem as significações definidas antes para  $R^8$  e  $R^9$  representa

- - hidrogénio,
- - alquilo ( $C_1-C_4$ ) de cadeia linear ou ramificada facultativamente substituído por um ou vários grupos hidróxi, mercapto, alcoxi ( $C_1-C_3$ ) ou alquil ( $C_1-C_3$ )-tio,

- - um grupo de fórmula  $-R^{12}-A$  em que  $R^{12}$  representa um grupo alquilenos ( $C_1-C_4$ ) facultativamente substituído por um ou vários grupos hidróxi e A representa um grupo de fórmula  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NH_2$  ou  $-NH-C(NH)NH_2$  ou A representa um sistema em anel cíclico ou heterocíclico, aromático ou não aromático, possuindo entre 4 e 11 membros e contendo entre 3 e 10 átomos de carbono e ainda 0, 1, 2 ou 3 átomos de azoto no anel, sendo os átomos de carbono e/ou os átomos de azoto do anel facultativamente substituídos por um ou vários grupos hidróxi;

- um grupo de fórmula  $-OCO-R^{13}$  em que  $R^{13}$  representa um anel heterocíclico possuindo entre 4 e 7 membros e contendo entre 3 e 6 átomos de carbono e 0, 1 ou 2 átomos de azoto, sendo os átomos de carbono e /ou os átomos de azoto do anel facultativamente substituídos por um ou vários grupos hidróxi; ou

- um grupo ester mono-, di- ou tri-fosfato,

A presente invenção engloba adicionalmente os compostos de fórmula (I) e os seus sais para utilização em terapia média.

Os grupos ester preferenciais de fórmulas  $-OCOCH(R^9)NR^{10}R^{11}$  e  $-OCO-R^{13}$  são ésteres de  $\alpha$ -aminoácidos que ocorrem naturalmente abrangidos pela definição anterior. Como grupos ester especialmente preferidos de fórmula  $-OCOCH(R^9)NR^{10}R^{11}$  refere-se aqueles em que  $R^9$  representa um grupo alquilo ( $C_1-C_4$ ) e  $R^{10}$  e  $R^{11}$  representam ambos átomos de hidrogénio, por exemplo, valina ou alanina.

Faz-se observar que os compostos de fórmula (I) podem existir em diversas formas tautoméricas e que no caso de X representar um grupo-OH, também pode representar um grupo oxo. Os compostos de fórmula (I) e os seus sais também podem existir nas formas  $\alpha$ - ou  $\beta$ -anoméricas. Em consequência, considera-se englobado no âmbito da presente invenção

qualquer anómero anteriormente  $\alpha$  e  $\beta$  dos compostos de fórmula (I) e correspondentes misturas.

Os compostos de fórmula (I) e seus sais farmacêuticamente aceitáveis serão daqui em diante designados apenas por compostos de acordo com a invenção. O termo "ingrediente activo" tal como usado daqui em diante, salvo quando especificado de outro modo, refere-se a um composto de acordo com a invenção.

A actividade dos ingredientes activos contra as gripes A e B não era previamente conhecida e a presente invenção proporciona também composições farmacêuticas que incorpora um composto de fórmula (I) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, especialmente útil para inibir o desenvolvimento da gripe A ou B nos mamíferos e nos seres humanos. Em consequência proporciona-se formulações sólidas que incorporam o ingrediente activo e um veículo sólido ou uma formulação inalável que incorpora o ingrediente activo e um veículo fluido inalável.

A presente invenção engloba também:

- a) um método para o tratamento ou para a profilaxia de uma infecção vírica, particularmente provocada pelo vírus da gripe ou uma infecção provocada pelo VSR ou uma infecção provocada por protozoários, por exemplo, Trichomonas vaginalis ou Giardia lamblia, num determinado hospedeiro, por exemplo um mamífero incluindo os seres humanos e os murganhos, o qual consiste em tratar esses mamíferos com uma quantidade eficaz não tóxica de um composto de acordo com a invenção.
- b) a utilização de um composto de acordo com a invenção para a preparação de um medicamento para o tratamento ou para a profilaxia de uma infecção incluindo uma infecção vírica, particularmente provocada pelo vírus

da gripe ou uma infecção provocada pelo VSR ou uma infecção provocada por protozoários, por exemplo, Trichomonas vaginalis ou Giardia lamblia.

Alguns dos compostos de fórmula (I) e seus sais são compostos novos pelo que constituem um aspecto adicional da presente invenção. Esses compostos novos são os anteriormente definidos para a fórmula (I) com exceção dos casos em que  $R^1$  e  $R^2$  representam individualmente um grupo hidroxil ou  $R^1$  representa um ester mono-, di- ou tri-fosfato na posição 5' e  $R^2$  representa um grupo hidroxil ou  $R^1$  representa um grupo hidroxil e  $R^2$  representa um ester mono-, di- ou tri-fosfato na posição 3' e em alternativa (a) X representa um grupo OH e Y representa um grupo  $NH_2$  ou H ou (b) X representa um grupo  $NH_2$  e Y representa H.

Os compostos preferenciais de acordo com a invenção englobam aqueles em que  $R^1$  e  $R^2$  representam ambos o grupo OH ou em alternativa  $R^1$  representa um mono-fosfato e  $R^2$  representa um grupo OH, Y representa H ou  $NH_2$  e X representa um grupo  $-NR^3R^4$  no qual  $R^3$  e  $R^4$ , os quais podem ser iguais ou diferentes, representam H, alquilo ( $C_1-C_6$ ), ou X representa um grupo  $Z-R^5$  no qual Z representa O ou S e  $R^5$  representa alquilo ( $C_1-C_6$ ) ou X representa um átomo de halogênio ou de hidrogênio.

Os compostos particularmente preferenciais de fórmula (I) englobam aqueles em que  $R^1$  e  $R^2$  representam ambos o grupo OH, Y representa  $NH_2$  e X representa H, OH,  $NH_2$  ou  $Z-R^5$  em que Z representa O e  $R^5$  representa alquilo ( $C_1-C_6$ ).

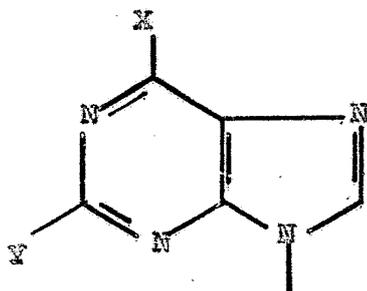
Como exemplos de compostos especialmente preferidos de fórmula (I) indica-se:

- (1) 2,6-diamino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-  
-9H-purina

- (2) 2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina
- (3) 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanida
- (4) 2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-6-metoxi-9H-purina.

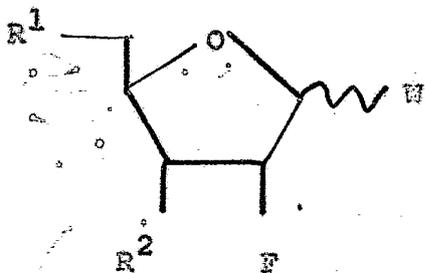
A presente invenção engloba também um processo para a preparação de novos compostos de fórmula (I) e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, o qual consiste, em alternativa:

- (A) fazer reagir uma base de purina de fórmula PuII em que Pu representa o resíduo purina;



(Pu)

(em que X e Y possuem as significações definidas antes), ou um seu sal, com um composto de fórmula (II)

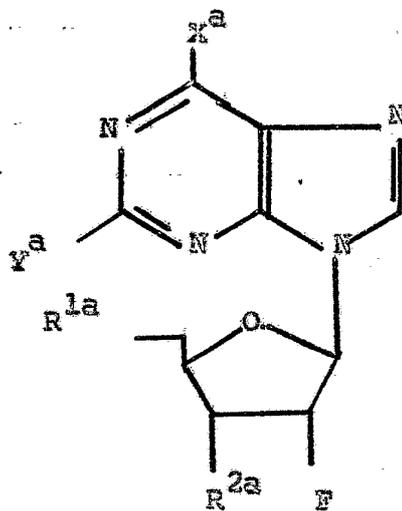


(II)

em que  $R^1$  e  $R^2$  possuem as significações definidas antes e W representa um ester fosfato ou um seu sal ou em alternativa um radical purina ou pirimidina (diferente de Pu), para pro-

porcionar um composto de fórmula (I);

(B) fazer reagir um composto de fórmula (III)

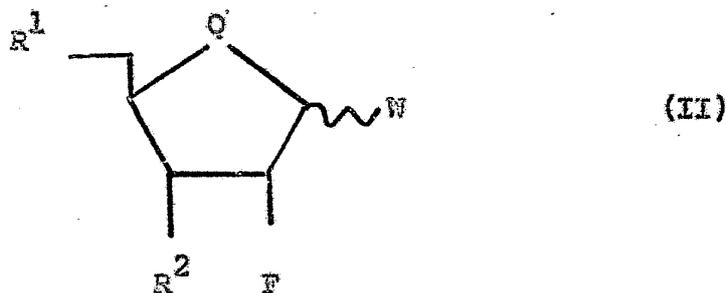


(III)

(em que  $X^a$ ,  $Y^a$ ,  $R^{1a}$  e  $R^{2a}$  representam respectivamente os grupos  $X$ ,  $Y$ ,  $R^1$ , e  $R^2$  anteriormente definidos ou uma forma precursora, por exemplo, protegida, de um grupo desse tipo desde que pelo menos um dos símbolos  $X$ ,  $Y$ ,  $R^1$  e  $R^2$  represente uma forma precursora) com um agente que sirva para converter a referida forma precursora do(s) grupo(s) no(s) correspondente(s) grupo(s) desejado(s);

- (i) por reacção de um composto de fórmula (I) em que pelo menos um dos radicais  $R^1$  e  $R^2$  representam um grupo hidroxil com um agente adequado que sirva para converter esse grupo hidroxil num grupo alternativa representado pelos radicais  $R^1$  e/ou  $R^2$ .
- (ii) por reacção de um composto de fórmula (I) em que  $R^1$  e/ou  $R^2$  não representam hidroxil, com um agente que sirva para converter os referidos radicais  $R^1$  e/ou  $R^2$  num grupo hidroxil.

O processo (A), que é particularmente adequado para a preparação de compostos de fórmula (I) em que  $R^1$  e  $R^2$  representam ambos hidroxil e Y representa H ou  $NH_2$ , pode ser realizado enzimaticamente fazendo reagir a base de purina de fórmula Pu em que X e Y possuem as significações definidas antes, ou um seu sal, com um composto de fórmula (II)



(em que  $R^1$  e  $R^2$  possuem as significações definidas antes e W representa um ester fosfato ou um seu sal ou um radical purina ou pirimidina (diferentes de Pu)), em presença de pelo menos uma enzima fosforilase tal como a fosforilase do nucleosido da purina e a fosforilase da timidinas um fosfato orgânico ou um seu sal, ou uma enzima transferese, por exemplo, N-desoxiribosil-transferase. Para os objectivos desta reacção é preferível que o radical purina ou pirimidina se encontre na posição  $\beta$  e que o ester fosfato ou o sal se encontre na posição  $\alpha$ .

A base de purina adequado de fórmula PuH pode ser obtida comercialmente, por exemplo, em "Pacific Chemical Laboratories ou Sigma Chemical Company" ou pode ser preparada por métodos convencionais bem conhecidos pelos especialistas na matéria ou por processos vulgarmente descritos na literatura química. Por exemplo, as bases de purina em que o substituinte da posição 2 é amino ou hidrogénio e o substituinte da posição 6 é amino ou metil-tio, podem ser obtidas comercialmente, as purinas em que os substituinte da posição 2 é amino e o substituinte da posição 6 é um grupo metil-amino podem ser preparados em conformidade com o método de Montgomery e Holum (J.A.C.S. 80:404, 1958). As pu-

rinas em que o substituinte da posição 2 é amino e o substituinte da posição 6 é alcoxi, por exemplo, metoxi, podem ser preparadas pelo método descrito por Belsiger e Montgomery (J. Org. Chem. 20 : 1573, 1960).

Os compostos de fórmula (II) podem ser preparadas por métodos bem conhecidos por um especialista na matéria ou podem ser facilmente preparados por processos descritos na literatura química. Por exemplo, é possível preparar 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracil pelo método descrito por Codington et al. (J. Org. Chem. 29 : 558, 1964). É possível preparar 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina pelo método descrito por S. Uesugi et al. (Nucleosides und Nucleotides 2, 373-, 1983).

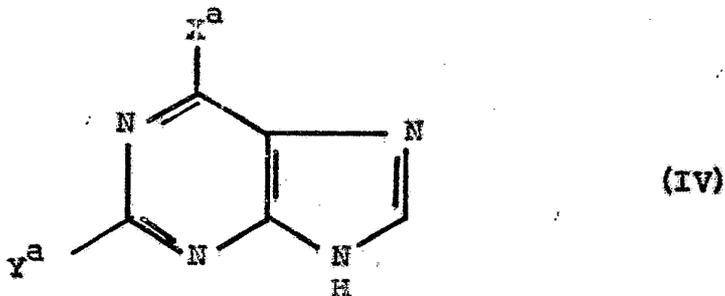
No que diz respeito ao processo (B), o qual é particularmente adequado para a preparação de compostos de fórmula (I) a partir de compostos de fórmula (III) em que  $R^{1a}$  e  $R^{2a}$  representam ambos hidroxil, os grupos protegidos  $X^a$ ,  $Y^a$ ,  $R^{1a}$  e  $R^{2a}$  dos compostos de fórmula (III) podem ser protegidos com grupos de protecção hidroxil e amino convencionais tais como os grupos acilo, por exemplo, alcanóilo tal como o benzóilo, ou grupos aroilo tais como acetilo; grupos aralquilo, por exemplo, um grupo benzilo; ou grupostrialquil-sililo tais como o grupo terc-butil-dimetil-sililo, sendo o tipo particular de grupo de protecção utilizado dependendo da natureza do grupo que se pretende proteger.

O grupo de protecção pode ser depois removido enzimaticamente, por hidrogenólise ou por hidrólise ácida ou alcalina. Os grupos acilo tipicamente removidos por hidrólise alcalina. Os grupos acilo são tipicamente removidos por hidrólise alcalina e os grupos sililo por hidrólise ácida ou pelo ião fluoreto. Os grupos aralquilo tais como o benzilo são removidos vantajosamente por hidrogenólise catalítica, tipicamente em presença de um catalisador tal como o paládio-em-carvão ou por reacção redutora, por exemplo, com

um metal alcalino (porexemplo, o sódio) num solvente adequado tal como a amónia líquida. Descobriu-se que a utilização de um grupo de protecção benzilo, é particularmente vantajosa para a preparação de compostos de fórmula (I) em que X representa um grupo hidroxí ou amino.

Para a preparação de um composto de fórmula (I) na qual  $R^1$  e/ou  $R^2$  representam um grupo de fórmula  $OC(=O)CHR^9NR^{10}R^{11}$ , em que conformidade com o processo (B), os grupos  $R^{1a}$  e/ou  $R^{2a}$  podem ser protegidos, por exemplo, com 9-fluorenil-metil-oxi-carbonilo (FMOC), terc-butil-oxi-carbonilo (tBOC) ou carbobenziloxi (CBZ) e podem ser desprotegidos por meios convencionais para proporcionar um aminoácido de fórmula  $CHR^9NR^{10}R^{11}$ .

O composto inicial de fórmula (III) pode ser preparado convenientemente fazendo reagir uma base de purina adequada de fórmula (IV)



em que  $X^a$  e  $Y^a$  possuem as significações definidas antes, ou o seu sal, com um nucleósido da pirimidina contendo o resíduo açúcar adequado, por exemplo, 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracil em presença de uma ou várias enzimas fosforilase, por exemplo, a fosforilase do nucleósido da purina e a fosforilase da timidina, ou uma enzima transferase, por exemplo, N-desoxiribosil-transferase.

Em alternativa é possível preparar quimicamente um composto inicial da fórmula (III) anteriormente definida, fazendo reagir um composto de fórmula (IV) em que  $X^a$  e  $Y^a$  possuem as significações definidas antes, ou um seu



derivado siliado, ou um seu sal, com um composto de fórmula (II) em que  $R^1$  e  $R^2$  possuem as significações definidas antes ou outras formas de hidroxí protegidas e W representa um grupo removível adequado, por exemplo, um átomo de halogéneo tal como cloro, um grupo aciloxi tal como o acetoxi, um grupo alcoxi tal como o metoxi, em presença de um catalisador tal como o cloreto de estanho (IV) ou o triflato de trimetil-sililo num solvente adequado tal como o acetonitrilo.

As bases de purina de fórmula (IV) podem ser preparadas a partir de uma correspondente base de purina em que o substituinte da posição 6 é um grupo removível adequado, por exemplo, um átomo de halogéneo tal como o cloro, por deslocamento nucleofílico do referido grupo. Deste modo, é possível preparar uma base de purina de fórmula (IV) em que  $X^a$  representa um grupo benziloxi, por exemplo, fazendo o tratamento da correspondente 6-cloro-purina com um álcool tal como o álcool benzílico em presença de uma base, por exemplo, o hidreto de sódio num solvente adequado tal como o tetra-hidrofurano (THF). As bases de purina de fórmula (IV) em que  $X^a$  representa um grupo benzil-amino podem ser preparadas por tratamento da correspondente 6-cloro-purina com uma amina, por exemplo, com benzil-amina em presença de uma base, por exemplo, uma amina tal como a trietil-amina num solvente adequado tal como o metanol. Essas bases de purina utilizadas anteriormente como materiais de partida podem ser obtidas comercialmente (Aldrich Chemical Company) ou preparadas por métodos bem conhecidos pelos especialistas na matéria ou que se encontram amplamente descritos na literatura química.

Os nucleósidos de pirimidina utilizados na preparação anterior dos compostos de fórmula (III) podem ser preparados por métodos bem conhecidos pelos especialistas na matéria ou por métodos amplamente descritos na literatura química. Por exemplo, é possível preparar 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-pirimidinas, tal como 1-(2-

-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracil pelo método descrito por Codington et al (J. Org. Chem. 29 : 558, 1964).

Faz-se observar que os compostos de fórmula (III) podem representar compostos de acordo com a invenção pelo que, por exemplo,  $X^a$  pode representar um grupo de fórmula  $-NR^3R^4$  em que  $R^3$  e  $R^4$  possuem as significações definidas antes. Esses compostos podem ser tratados com uma enzima desaminase tal como a desaminase da adenosina para serem convertidos num composto de fórmula (I) em que X representa um grupo hidroxil.

É possível converter um composto de fórmula (I) em que  $R^1$  e/ou  $R^2$  representam um grupo hidroxil, num correspondente ester farmacologicamente aceitável de fórmula (I), conforme anteriormente definido, por reacção com um agente de esterificação adequado de acordo com métodos conhecidos na especialidade, por exemplo, recorrendo ao método descrito por Martin et al. J. Pharm. Sci. (1987) 76, 180-(). Sendo assim, para a preparação de esteres de ácidos carboxílicos apropriados tal como definido antes, o composto inicial de fórmula (I) pode reagir com um anidrido ácido ou com um halogeneto ácido, por exemplo, o cloreto correspondente a um ácido carboxílico de fórmula  $QCOOH$  em que Q representa um grupo  $-R^6H$ ,  $-R^6COOR^8$ ,  $-R^7-Z-Ar$ ,  $-CHR^9NR^{10}R^{11}$  ou  $-R^{13}$  em que  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{13}$ , Z e Ar possuem as significações definidas antes, em presença de uma base adequada tal como a trietil-amina. Em alternativa, o ácido de fórmula  $QCOOH$  pode reagir com um composto de fórmula (I) em que  $R^1$  e/ou  $R^2$  representam um grupo hidroxil, em presença de um agente de acoplamento tal como a diciclo-hexil-carbo-di-imida.

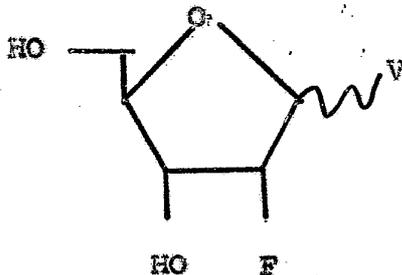
O anterior material de partida de fórmula (II) em que  $R^1$  e/ou  $R^3$  representam hidroxil pode reagir com um agente de esterificação e o composto resultante pode reagir com a base de purina de fórmula  $PuH$  em conformidade

com o processo (A).

Os compostos de acordo com a invenção em que  $R^1$  e/ou  $R^2$  representam esteres mono-, di-, ou tri-fosfato podem ser preparados a partir de compostos de fórmula (I) em que  $R^1$  e/ou  $R^2$  representam hidróxi por sucessivas fosforilações através de derivados mono-, di-, e tri-fosfato por meios químicos convencionais ou por meios enzimáticos, por exemplo, utilizando uma quinase de um nucleósido ou a fosfotransferase em presença de um trifosfato de um nucleótido, por exemplo o ATP.

É possível converter um composto de fórmula (I) em que  $R^1$  e/ou  $R^2$  representam hidróxi num correspondente éter farmacêuticamente definido, por reacção com um agente de alquilação adequado por um processo convencional, por exemplo, utilizando um composto de fórmula  $Q^1Hal$  em que  $Q^1$  representa um grupo  $-R^6$  ou  $-R^6-Z-Ar$  em que  $R^6$  e  $Ar$  possuem as significações definidas antes e  $Hal$  representa um átomo de halogéneo, por exemplo, o iodo.

Em alternativa, esse agente de alquilação pode reagir com um açúcar de fórmula



(em que  $V$  representa um grupo alcoxi tal como metoxi, ou um grupo aciloxi tal como acetoxi) para proporcionar um correspondente 3'-, 5'- ou 3',5'-di-éter, (Bessodes M et al, Synthesis (1988)560) e depois faz-se a condensação do éter resultante com uma base de purina adequada de fórmula  $PuH$  para proporcionar um nucleósido que é seguidamente desprotegi-

do em conformidade com o processo (B) anterior.

No caso de o produto obtido a partir do primeiro passo do processo anterior ser um monoéter, por exemplo, um 5'-éter, o outro grupo hidroxil pode reagir com um ácido carboxílico ou com um seu derivado, por exemplo, um anidrido ácido ou um halogeneto ácido, por exemplo um cloreto correspondente a um ácido carboxílico de fórmula  $QCOOH$  em que Q possui as significações definidas antes, para proporcionar um açúcar monoéter-monoéster, por exemplo, um açúcar 3'-éster-5'-éter. Este açúcar pode ser condensado com uma purina adequada para proporcionar um nucleósido conforme referido antes, ou conforme descrito por Codington J. F. *et al.* Carbohydr. Res. (1966) 1,455.

Os compostos da invenção também podem ser obtidos a partir dos compostos de fórmula I', em que I' representa um composto correspondente ao composto de fórmula (I) na qual os grupos  $R^1$  e  $R^2$  são substituídos por outros grupos de protecção. Esses grupos de protecção diferentes podem ser removidos ou podem reagir para proporcionar grupos  $R^1$  e  $R^2$  conforme definido antes.

Os compostos da invenção, no caso de serem produzidos pelo processo descrito antes, podem ser utilizados para proporcionar compostos da invenção em que  $R^1$  e/ou  $R^2$  representam o grupo hidroxil, fazendo a desprotecção dos grupos éter e/ou éster.

Consoante as condições de processo e os materiais de partida assim se obtém o produto final de fórmula (I) na forma de base livre ou de um sal. Os produtos finais na forma de base livre ou de sal consideram-se englobados no âmbito da invenção. Assim, é possível obter sais alcalinos, neutros ou mistos e também sob a forma de hemi-, mono-, sesqui- ou poli-hidratos. Os sais por adição de ácido destes novos compostos podem ser transformados, por um pro

cesso conhecido de per si, numa base livre utilizando agentes alcalinos tais como os compostos alcalinos ou por permuta iónica. As bases livres obtidas também podem formar sais com ácidos orgânicos ou inorgânicos.

Os sais de acordo com a invenção que podem ser utilizados convenientemente em terapia englobam os sais de bases farmacologicamente aceitáveis, por exemplo, derivados de uma base adequada, tais como os sais de metais alcalinos (por exemplo, o sódio), e de metais alcalino-terrosos (por exemplo, o magnésio), sais de amónio e  $\text{NR}_4$  (em que X representa alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )).

A presente invenção também engloba os novos intermediários seguintes:

2-amino-6-benzil-amino-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina,

2-amino-6-benzil-oxi-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina, e

2-amino-6-benzil-tio-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina.

Os compostos de acordo com a presente invenção podem ser administrados a pacientes tais como os mamíferos incluindo os seres humanos, por qualquer via adequada ao estado que se pretende tratar, sendo as vias adequadas a oral, pulmonar, rectal, nasal, tópica (incluindo a bucal e a sublingual), vaginal e parenteral (incluindo a subcutânea, a intramuscular, a intravenosa, a intradermal, a intracecal e epidural). Faz-se observar que a via preferencial variará, por exemplo, com o estado do paciente.

A quantidade necessária de ingrediente activo individual para o tratamento de uma infecção virica

incluindo as infecções de gripe e de VSR dependerá de numerosos factores incluindo a gravidade do estado que se pretende tratar e a identidade do paciente e deverá ser prescrita de acordo com o critério do médico assistente. Em geral, considera-se uma dose eficaz adequada a que está compreendida entre 0,1 e 100 mg por quilograma de peso corporal de paciente por dia, e de preferência compreendida entre 5 e 30 mg por quilograma de peso corporal por dia e mais preferencialmente compreendida entre 10 e 20 mg por quilograma de peso corporal por dia; a dose óptima é de 15 mg por quilograma de peso corporal por dia (salvo quando especificado de outro modo todos os pesos de ingrediente activo são calculados tomando como referência o composto original; para os correspondentes sais e esteres os números serão acrescidos proporcionalmente). A dose eficaz pode ser apresentada facultativamente sob a forma de duas, três, quatro ou mais sub-doses administradas a intervalos de tempo adequados ao longo do dia. Essas sub-doses podem ser administradas em formas de dosagem unitárias, por exemplo, contendo entre 1 e 2 000 mg e preferencialmente entre 20 e 500 mg e mais preferencialmente entre 100 e 400 mg de ingrediente activo por forma de dosagem unitária.

Os compostos de acordo com a presente invenção podem ser administrados isoladamente ou em combinação com outros agentes terapêuticos, por exemplo, com a mantida ou com rebavirina, os quais são agentes anti-gripe conhecidos, ou com um analgésico, por exemplo, codeína, paracetamol, aspirina, ibuprofeno ou com um agente anti-inflamatório tal como a indometacina, o ácido mefenâmico, o naproxeno ou o ibuprofeno ou com quaisquer outros agentes que ao serem combinados com um composto de acordo com a invenção proporcionem um efeito terapêutico benéfico.

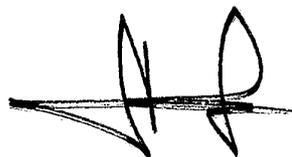
Embora seja possível administrar os compostos da invenção isoladamente torna-se preferível incorporá-los em formulações farmacêuticas. As formulações de acordo com a presente invenção incorporam pelo menos um ingrediente

activo, tal como definido antes, em conjunto com um ou vários veículos farmacêuticamente aceitáveis e facultativamente contendo também outros agentes terapêuticos. Os veículos devem ser aceitáveis significativamente isto que devem ser compatíveis com os outros ingredientes da formulação e não devem ser nocivos para os pacientes.

As formulações englobam todos aqueles que são adequados para a administração oral, pulmonar, retal, nasal, tópica (incluindo a bucal e a sublingual) vaginal ou parenteral (incluindo a subcutânea, a intramuscular, a intravenosa, a intradermal, a intracecal e a epidural). A apresentação das formulações faz-se convenientemente numa forma de dosagem unitária podendo ser preparadas por quaisquer métodos conhecidos na especialidade de farmácia. Esses métodos englobam o passo de misturar o ingrediente activo com o veículo o qual constitui um ou vários ingredientes acessórios. Em geral, as formulações são preparadas misturando uniforme e intimamente o ingrediente activo com veículos líquidos ou com veículos sólidos finamente divididos ou com ambos e depois, se necessário, dando uma configuração adequada ao produto.

As formulações de acordo com a presente invenção adequadas para administração oral podem ser apresentadas sob a forma de unidade discretas tais como as cápsulas, as pilulas ou os comprimidos contendo cada unidade uma quantidade predeterminada de ingrediente activo; sob a forma de pó ou de grânulos; sob a forma de uma solução ou de uma suspensão num líquido aquoso ou num líquido não aquoso; ou sob a forma de uma emulsão de tipo óleo-em-água ou de tipo água-em-óleo. O ingrediente activo também pode ser apresentado em ampola ou sob a forma de pasta ou pode estar contido em lipossomas.

As pastilhas podem ser preparadas por compressão ou por moldagem, opcionalmente com um ou vários in-



gredientes acessórios. As pastilhas comprimidas podem ser preparadas utilizando uma máquina adequada para comprimir o ingrediente activo sob uma forma que flua livremente tal como o pó ou os grânulos, facultativamente misturados com um ligante (por exemplo, povidona, gelatina, hidroxipropilmetilcelulose), com um lubrificante, com um diluente inerte, um conservante, um agente desintegrador (por exemplo, o glicolato de amido de sódio, povidona reticulada, carboximetilcelulose de sódio reticulada), e com um agente tensio-activo ou dispersante. As pastilhas moldadas podem ser preparadas fazendo a moldagem, numa máquina adequada; de uma mistura de composto pulverizado misturando com um diluente líquido inerte. Facultativamente as pastilhas podem ser revestidas ou entalhadas e podem ser formuladas de tal modo que proporcionem a libertação lenta ou controlada do ingrediente activo nelas contido, por exemplo, hidroxipropilmetilcelulose em proporções variáveis para proporcionar o perfil de libertação desejado.

É possível preparar uma cápsula enchendo-a com um pó solto ou comprimido utilizando uma máquina de enchimento adequada, opcionalmente com um ou vários aditivos. Como exemplos de aditivos adequados refere-se os ligantes tais como a povidona, e a gelatina, os lubrificantes, os diluentes inertes, e os agentes desintegrantes para as pastilhas. Também é possível preparar formulações de cápsulas contendo grânulos ou sub-unidades discretas que proporcionem a libertação lenta ou controlada do ingrediente pretendido. Isto pode ser conseguido fazendo a extrusão e a esferonização de uma mistura húmida contendo o fármaco mais um auxiliar de extrusão (por exemplo, a celulose microcristalina) e ainda um diluente tal como a lactose. Os grânulos esferóides assim obtidos podem ser revestidos com uma membrana semi-permeável (por exemplo, etilcelulose, Eudragit WE30D) de modo a conseguir-se propriedades de libertação sustentada.

Para administração tópica as formulações são aplicadas preferencialmente como unguentos ou como cremes contendo o ingrediente activo numa quantidade compreendida por exemplo entre 0,075 e 20% p/p, e de preferência entre 0,2 e 15% p/p e mais preferencialmente entre 0,5 e 10% p/p. Se a formulação for sob a forma de unguento, os ingredientes activos podem ser incorporados numa base parafínica ou de um unguento miscível com água. Em alternativa os ingredientes activos podem ser incorporados numa formulação sob a forma de um creme à base de uma emulsão de tipo óleo-em-água ou água-em-óleo.

Se desejado, a fase aquosa do creme pode incorporar, por exemplo, pelo menos 30% p/p de um álcool poli-hídrico, isto é, um álcool que possua dois ou vários grupos hidroxilo tais como o propileno-glicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol e polietileno-glicol e suas misturas. As formulações para aplicação tópica podem incorporar desejavelmente um composto que melhore a absorção ou a penetração do ingrediente activo através da pele e de outras áreas afectadas. Como exemplos desses agentes que incrementam a penetração dérmica refere-se o dimetil-sulfoxido e compostos afins.

A fase oleosa das emulsões da presente invenção podem ser constituídas por ingredientes conhecidos e por um processo conhecido. Apesar desta fase poder incorporar apenas um emulsionante (também conhecido por emoliente) é desejável que incorpore uma mistura de pelo menos um emulsionante com uma gordura ou com um óleo ou simultaneamente com uma gordura e com um óleo. De preferência incorpora-se também um emulsionante hidrofílico em conjunto com um emulsionante lipofílico que actua como estabilizador. Também é preferível incorporar simultaneamente um óleo e uma gordura. Contuntamente, o(s) emulsionante(s) com ou sem estabilizador(s) forma(m) a designada cera emulsionante e essa cera em conjunto com o óleo e/ou a gordura cons-

tituem a designada base de unguento emulsionante a qual forma a fase dispersa oleosa das formulações cremosas.

Os emulsionantes e os estabilizadores em emulsão adequados para utilização nas formulações da presente invenção englobam "Tween 60", "Span 80", álcool cetosteárico, álcool miristílico, monoestearato de glicerol e lauril-sulfato de sódio.

A escolha de óleos ou gorduras adequados para a formulação baseia-se nas propriedades cosméticas desejadas uma vez que é muito baixa a solubilidade do ingrediente activo na maior parte dos óleos frequentemente utilizados em formulações de emulsões farmacêuticas. Deste modo, o creme deverá ser preferencialmente um produto não gorduroso, que não manche e que seja lavável, e com uma consistência adequada para evitar que escape dos tubos ou de outros recipientes. É possível utilizar esteres alquílicos mono- ou di-básicos de cadeia linear ou ramificada tais como o di-isoadipato, o estearato de isocetilo, e diester propileno-glicólico de ácidos gordos de coco, o miristato de isopropilo, o oleato de decilo, o palmitato de isopropilo, o estearato de butilo, o palmitato de 2-etil-hexilato ou uma mistura de esteres de cadeia ramificada conhecidos por "Crodamol CAP", sendo os três últimos os esteres preferidos. Podem ser utilizados isoladamente ou em combinação consoante as propriedades pretendidas. Em alternativa, é possível utilizar lípidos de elevado ponto de fusão tais como a parafina macia refinada e/ou a parafina líquida e ainda outros óleos minerais.

As formulações adequadas para administração tópica sobre os olhos englobam também as gotas ou colares em que o ingrediente activo se encontra dissolvido ou em suspensão num veículo adequado, especialmente um solvente aquoso para o ingrediente activo. O ingrediente activo encontra-se presente nessas formulações de preferência numa concentração variável entre 0,5 e 20%, vantajosamente

compreendida entre 0,5 e 10% e particularmente cerca de 1,5% p/p.

As formulações adequadas para administração tópica no interior da boca englobam os lozangos que incorporam o ingrediente activo numa base aromatizada, geralmente a sacarose e a goma de acácia ou a goma alcântira; pastilhas que incorporam o ingrediente activo numa base inerte tal como a gelatina e a glicerina, ou sacarose e goma de acácia; e ainda líquidos para bochechar que incorporam o ingrediente activo num veículo líquido adequado.

As formulações para administração rectal podem ser apresentadas sob a forma de supositórios com uma base adequada contendo, por exemplo, manteiga de cacau ou um álcool gordo superior (por exemplo, cera dura referida na "European Pharmacopeia") ou triglicéridos e ácidos gordos saturados (por exemplo, Witepsol).

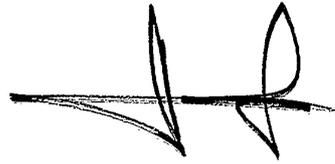
As formulações adequadas para administração nasal em que o veículo é um sólido incorporam um pó grosso que possui partículas com dimensões compreendidas entre 20 e 500 micra o qual é administrado por aspiração, isto é, por rápida inalação através da passagem nasal a partir de um recipiente que contém o pó e o qual é mantido próximo do nariz. As formulações adequadas em que o veículo é um líquido, para administração de tipo aspersão nasal ou como gotas nasais incorporam soluções aquosas ou oleosas contendo o ingrediente activo.

As formulações adequadas para administração por inalação englobam as poeiras de partículas finas ou as névoas geradas recorrendo à utilização de diversos tipos de aerossóis, nebulizadores ou insufladores pressurizados de doses calibradas.

Para administração pulmonar através da boca, as dimensões das partículas de pó ou das gotículas varia tipicamente entre 0,5 e 10  $\mu\text{m}$ , e de preferência entre 1 e 5  $\mu\text{m}$ , para garantir o seu fornecimento à árvore bronquica. Para administração nasal é preferível que as partículas tenham dimensões compreendendo entre 10 e 500  $\mu\text{m}$  para garantir a retenção na cavidade nasal.

Os inaladores de doses calibradas são distribuidores de tipo aerosol, contendo tipicamente uma formulação do ingrediente activo em suspensão ou solução num líquido propulsor. Durante a utilização destes dispositivos efectua-se uma descarga da formulação através de uma válvula adaptada para fornecer um volume calibrado, tipicamente compreendido entre 10 e 150  $\mu\text{l}$ , proporcionando uma aspersão de partículas finas contendo o ingrediente activo. Os propulsores adequados englobam o propano e o butano, alguns compostos de cloro-fluoro-carbono, vulgarmente designados por "CFC", por exemplo, o dicloro-difluoro-metano, o tricloro-fluoro-metano, o dicloro-tetrafluoro-etano, ou suas misturas. Adicionalmente as formulações podem conter co-solventes, por exemplo, o etanol e agentes tensio-activos tais como o ácido oleico ou o trioleato de sorbitano, anti-oxidantes e/ou agentes aromatizantes adequados.

Os nebulizadores são dispositivos comercialmente disponíveis que transformam soluções ou suspensões do ingrediente activo numa névoa terapêutica de tipo aerosol acelerando um gás comprimido através de um orifício de Venturi estreito, sendo esse gás tipicamente o ar ou o oxigénio, ou ainda recorrendo à agitação ultra-sónica. As formulações adequadas para utilização nos nebulizadores são constituídas pelo ingrediente activo num veículo líquido e contém até 40% p/p da formulação e preferencialmente menos do que 20% p/p. Tipicamente o veículo é a água ou uma solução alcoólica aquosa diluída, a qual se tornou preferencialmente isotónica com os fluidos corporais por adição, por exemplo, de cloreto de sódio. Os aditivos facultativos englobam os conservantes



no caso de a formulação não ser estéril, por exemplo, o hidróxi-benzoato de metilo, anti-oxidantes, agentes aromatizantes, óleos voláteis, agentes tampão e agentes tensio-activos.

As formulações adequadas para administração por insuflação englobam os pós finamente triturados que podem ser fornecidos por meio de um insuflador ou introduzidos pela cavidade nasal por aspiração. Para utilização com um insuflador o pó encontra-se contido em cápsulas ou cartuchos, normalmente feitos de gelatina ou de plástico, os quais são perfurados ou abertos in situ sendo o pó exposto ao ar removido por um dispositivo para inalação ou em alternativa fornecido por meio de uma bomba activada manualmente. O pó utilizado no insuflador é constituído apenas pelo ingrediente activo ou é uma mistura pulverulenta que contém o ingrediente activo, um diluente pulverulento adequado tal como a lactose e facultativamente incorpora também um agente tensio-activo. O ingrediente activo constitui tipicamente entre 0,1 e 100% p/p da formulação.

As formulações para aerossóis pressurizados para inalação são calculadas de tal modo que cada dose calibrada contenha entre 0,05 e 5 mg de um composto da invenção. De modo idêntico, as formulações em pó para insuflação são calculadas de tal modo que cada dose unitária contenha entre 0,5 e 50 mg. As formulações em solução ou em suspensão para nebulização são calculadas de tal modo que as doses fornecidas variem entre 1 e 1500 mg. Os compostos de acordo com a presente invenção ou correspondentes formulações podem ser administradas através desses dispositivos uma ou várias vezes por dia, aplicando-se em cada ocasião uma ou várias doses, por exemplo, três ou quatro.

As formulações adequadas para administração vaginal podem ser apresentadas sob a forma de pessários, tampões, cremes geles, pastas, espumas ou formulações para aspersão contendo para além do ingrediente activo veículos

conhecidos na especialidade conforme for apropriado.

As formulações adequadas para administração parenteral englobam as soluções injectáveis estéreis aquosas e não aquosas as quais podem conter anti-oxidantes, tampões, bacteriostatos e soluções que tornam a formulação isotónica com o sangue do paciente visado; e as suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem conter agentes de suspensão e agentes espessantes, e lipossomas ou outros sistemas constituídos por micropartículas concebidos para dirigir o composto para os componentes sanguíneos ou para um ou vários órgãos. As formulações podem ser apresentadas em recipientes de dose única ou de dose múltipla, por exemplo, ampolas e frascos vedados, e podem ser armazenados no estado de liofilizadas sendo apenas necessário adicionar o veículo líquido estéril, por exemplo a água para injeções, imediatamente antes da sua utilização. As soluções e as suspensões para injeção podem ser preparadas extemporaneamente a partir de pós, grânulos e pastilhas estéreis do tipo descrito antes.

As formulações para dosagem unitária preferenciais são as que contém uma dose ou unidade diária, uma sub-dose diária tal como anteriormente referido, ou uma fracção adequada, de um ingrediente activo.

Faz-se observar que para além dos ingredientes particularmente referidos antes, as formulações da presente invenção podem incorporar outros agentes convencionais utilizados na especialidade tendo em consideração o tipo de formulação em questão, por exemplo, as formulações adequadas para administração oral podem incorporar agentes aromatizantes.

Os exemplos que se seguem são proporcionados a título ilustrativo da presente invenção e não devem ser considerados como qualquer limitação.



### Exemplo 1

#### Preparação de 9-(2-desoxi-3,5-di-O-propionil-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)guanina

A uma solução de 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)guanina (170 mg; 0,6 mmol), de DMAP (4-dimetil-amino-piridina) (8 mg) e de trietil-amina (0,41 ml; 5 equivalentes) em DMF (N-N-dimetil-formamida) (4 ml) à temperatura ambiente adicionou-se anidrido propiônico (0,16 ml; 2,1 equivalentes) sob agitação. Decorridas 20 horas adicionou-se metanol (2 ml). Decorrida 1 hora evaporou-se a mistura in vacuo e submeteu-se o resíduo a cromatografia intermitente sobre SiO<sub>2</sub>. A eluição com CHCl<sub>3</sub>/MeOH (10:1) e depois (6:1), proporcionou o composto em epígrafe no estado sólido e de cor branca.

p.f. 198-200°C.

Anal. Calc. para 0,2 hidrato; C, 47,93; H, 5,13; N, 17,47

Encontrado; C, 48,22; H, 4,94; N, 17,0

### Exemplo 2

#### Preparação de 9-(2-desoxi-3,5-di-O-acetil-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)guanina e de 9-(2-desoxi-2-fluoro-3,5-di-O-acetil-β-D-ribofuranosil)-2-N-acetil-guanina

A uma solução de 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)guanina (160 mg; 0,56 mmol), de DMAP (8 mg) e de trietil-amina (400 ul; 5 equivalentes) em DMF (4 ml) adicionou-se anidrido acético (0,16 ml; 2,5 equivalentes) sob agitação à temperatura ambiente. Decorridas 22 horas evaporou-se a solução amarela in vacuo, fez-se a evaporação conjunta com etanol e com tolueno e submeteu-se a cromatografia intermitente sobre SiO<sub>2</sub> e depois fez-se a eluição com CHCl<sub>3</sub>/MeOH (6:1). Evaporou-se o primeiro componente eluído e fez-se a evaporação conjunta com tolueno para proporcionar o derivado triacetílico com o aspecto de uma

espuma branca.

Anal. Calc. para 0,1 toluato: C, 47,69; H, 4,51; N, 16,65  
Encontrado: C, 47,47; H, 4,37; N, 16,82

A recolha e a evaporação das fracções que continham o segundo componente eluído proporcionou o derivado diacetílico no estado sólido e de cor branca.

p. f. 232-234°C (dec.)

Anal. Calc. para 0,25 etanolato: C, 45,73; H, 4,63; N, 18,39  
Encontrado: C, 46,02; H, 4,34; N, 18,19

### Exemplo 3

Preparação de 9-(2-desoxi-2-fluoro-3-O-pivaloil-β-D-ribofuranosil)guanina e de 9-(2-desoxi-2-fluoro-3,5-di-O-pivaloil-β-D-ribofuranosil)guanina

A uma solução de 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)guanina (200 mg; 0,70 mmol), de DMAP (10 mg) e de trietil-amina (0,5 ml) em DMF (6 ml) a temperatura ambiente adicionou-se anidrido trimetil-acético (160 μl; 1,1-equivalentes) e agitou-se a solução durante 24 horas. Depois adicionou-se mais 80 μl de anidrido trimetil-acético e manteve-se a agitação durante 5 dias. Temperou-se a reacção com metanol (1 ml), evaporou-se sob pressão reduzida para proporcionar um sólido branco e depois submeteu-se a cromatografia intermitente sobre SiO<sub>2</sub>, tendo-se feito a eluição com CHCl<sub>3</sub>/MeOH (15:1) e depois (10:1), (6:1), e finalmente (4:1).

Por absorção de UV verificou-se que a terceira fracção eluída era o éster 3',5'-bis-pivalato com o aspecto de um sólido ceroso após trituração com éter.

p. f. 250-252°C (dec.)

Anal. C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>6</sub>·0,5H<sub>2</sub>O calculado:

C, 51,94; H, 6,32; N, 15,15

Encontrado: C, 51,99; H, 6,23; N, 14,83

Por absorção de UV verificou-se que a quarta fracção eluída era o ester 3'-pivalato com o espectro de um pó branco. Verificou-se o seu escurecimento gradual a partir de 260-320°C. (p.f.).

Anal.  $C_{15}H_{20}FN_5O_5 \cdot 0.7H_2O$  calculado: C, 47,17; H, 5,65; N, 18,34  
encontrado: C, 47,10; H, 5,36; N, 17,93

#### Exemplo 4

Preparação de 9-(2-desoxi-2-fluoro-3,5-di-O-pivaloil-β-D-ribofuranosil)adenina, de 9-(2-desoxi-2-fluoro-3-O-pivaloil-β-D-ribofuranosil)adenina e de 9-(2-desoxi-2-fluoro-5-O-pivaloil-β-D-ribofuranosil)adenina

A uma solução de 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)adenina (250 mg; 0,93 mmol), de DMAP (10 mg) e de trietil-amina (0,65 ml) em DMF seco (7 ml) adicionou-se anidrido trimetil-acético (225 ul; 1,2 equivalentes) à temperatura ambiente, sob agitação. Decorridas 24 horas adicionou-se mais 50 ul de anidrido trimetil-acético e decorridas mais 24 horas fez-se nova adição de 20 ul. Deixou-se decorrer mais 1 dia e temperou-se a reacção com MeOH, evaporou-se in vacuo, fez-se a evaporação conjunta com etanol e purificou-se por cromatografia intermitente sobre  $SiO_2$ . Efectuou-se a eluição com  $CHCl_3/MeOH$  nas concentrações (18:1), (15:1) e finalmente (10:1). Por absorção de UV verificou-se que a primeira fracção eluída era o 3',5'-bis-ester que se apresentou no estado sólido e de cor branca após trituração com éter.

p. f. 157-158°C.

Anal.  $C_{20}H_{28}FN_5O_5 \cdot 0.3H_2O$  calculado: C, 54,24; H, 6,51; N, 15,82  
encontrado: C, 54,40; H, 6,33; N, 15,48

Por absorção de UV verificou-se que a segunda fracção eluída era o éster 3'-pivalato o que se apresentou no estado sólido e de cor branca; p. f. 204-205°C.

Anal. para  $C_{15}H_{20}FN_5O_4 \cdot 0.3 H_2O$

calculado: C, 50,22; H, 5,79; N, 19,53

encontrado: C, 50,25; H, 5,58; N, 19,31

Por absorção por UV verificou-se que a terceira fracção diluída era o éster 5'-pivalato que se apresentou com o aspecto de uma espuma branca.

p. f. 130-134°C

Anal.  $C_{15}H_{20}FN_5O_4 \cdot 0.2 H_2O$

calculado: C, 50,46; H, 5,76; N, 19,62

encontrado: C, 50,57; H, 5,65; N, 19,45

#### Exemplo 5

Preparação de 9(2-desoxi-2-fluoro-3,5-di-O-valeril- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina, de 9(2-desoxi-2-fluoro-3-O-valeril- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina e de 9(2-desoxi-2-fluoro-5-O-valeril- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina

A uma solução de 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina (300 mg; 1,11 mmol), de DMAP (10 g) e de trietil-amina (0,9 ml) em DMF seco (8 ml) adicionou-se anidrido valérico (263  $\mu$ l; 1,2 equivalentes), à temperatura ambiente, sob agitação. Decorridas 24 e 48 horas adicionou-se mais 30  $\mu$ l de anidrido valérico de cada vez. No dia seguinte ao fim da adição temperou-se a mistura com MeOH e depois fez-se o processamento e submeteu-se a cromatografia tal como para a preparação dos ésteres pivalato. Por absorção de UV verificou-se que a primeira fracção eluída era 3',5'-bis-éster que cristalizou sob a forma de agulhas após trituração com éter.

p. f. 96-98°C.

Anal.  $C_{20}H_{28}FN_5O_5$  calculado: C, 54,91; H, 6,45; N, 16,01

encontrado: C, 54,93; H, 6,49; N, 15,89

Por absorção de UV verificou-se que a segunda fracção eluída era o ester 3'-valerato.

p.f. 182-183°C.

Anal.  $C_{15}H_{20}FN_5O_4$  calculado: C, 50,98; H, 5,71; N, 19,82  
encontrado : C, 50,91; H, 5,82; N, 19,46

Por absorção de UV verificou-se que a terceira fracção eluída era o éster 5'-valerato o qual cristalizou após trituração com éter.

p.f. 115-117°C

Anal.  $C_{15}H_{20}FN_5O_4$  calculado: C, 50,98; H, 5,71; N, 19,82  
encontrado : C, 50,76; H, 5,81; N, 19,44

#### Exemplo 6

2,6-diamino-9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-9H-purina

Com 2,6-diamino-purina (Pacific Chemical Laboratories; 0,8 g; 4,8 mmol) de 1-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)uracilo (0,4 g; 1,6 mmol) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J.F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 50 ml de tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-se fosforilase da timidina (3 850 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (3 760 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao 12º dia filtrou-se a reacção. Aplicou-se o filtrado a uma coluna de 1,5 x 15 cm de resina de permuta aniónica (Bio-Rad AG1x2 forma de hidróxido). Após a lavagem da coluna com água/metanol (7/3) fez-se a eluição do produto com água/metanol (1/1). Combinou-se as fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o

resíduo em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise demonstrou ser 1,2 hidrato.

p.f. 124°C UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\xi \times 10^{-3}$ ); HCl 0,1N, 291 (10,2), 252 (11,8); pH 7, 278,5 (10,3), 255 (9,69); NaOH 0,1N, 279 (10,6), 255 (9,69).

Anal. para  $C_{10}H_{13}FN_6O_{31} \cdot 2 H_2O$ :

Calculado: C, 39,27; H, 5,07; N, 27,48; F, 6,21

encontrado: C, 39,22; H, 5,09; N, 27,39; F, 6,45.

RMN-<sup>1</sup>H (80 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>);  $\delta$  7,94 (s, 1H, H-8); 6,74 e 5,79 (2 sb, 4H, 2-NH<sub>2</sub> e 6-NH<sub>2</sub>); 6,04 (qd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,5 Hz, J = 3,4 Hz); 5,64 (m, 1,5H, 0,5 (H-2') e 3'-OH); 5,25 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,5 Hz); 4,98 (m, 0,5H, 0,5 (H-2')); 4,41 (m, 1H, H-3'); 3,93 (m, 1H, H-4'); 3,65 (m, 2H, H<sub>a</sub>-5' e H<sub>b</sub>-5').

#### Exemplo 7

#### 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina

Dissolveu-se 2,6-diamino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina (0,20 g; 0,64 mmoles); preparada conforme descrito no Exemplo 6, em 15 ml de água. Adicionou-se desaminase de adenosina intestinal da vitela (4 U.I., Boehringer Mannheim) e efectuou-se a incubação da solução à temperatura de 37°C durante 4 dias. Depois arrefeceu-se a solução para a temperatura de 4°C. Decorridas 3 horas filtrou-se a suspensão para remoção do primeiro lote de cristais de produto. Reduziu-se o volume do filtrado no vácuo e arrefeceu-se a suspensão para a temperatura de 4°C. Filtrou-se a suspensão para remoção do segundo lote de cristais de produto. Procedeu-se à combinação dos lotes de cristais de produto, preparou-se com eles uma suspensão em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise demonstrou ser 1,3 hidrato.

p. f.  $> 250^{\circ}\text{C}$  (dec.)

UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\xi \times 10^{-3}$ ): HCl 0,1 N, 257 (12,2), 280 (sh);  
NaOH 0,1N, 257-264 (10,9).

Anal. Calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FN}_5\text{O}_4 \cdot 1,3 \text{H}_2\text{O}$ :

Calculado: C, 38,91; H, 4,77; N, 22,69; F, 6,16

Encontrado: C, 38,60; H, 4,82; N, 22,51; F, 6,44.

RMN- $^1\text{H}$  (80 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  10,63 (sb, 1H, N1-H); 7,94 (s, 1H, H-8); 6,51 (bs, 2H, 2-NH $_2$ ); 6,00 (qd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,5 Hz, J = 2,9 Hz); 5,59 (m, 1,5H, (H-2') e 3'-OH); 5,10 (t, 1H, 5'-OH, J = 4,5 Hz); 4,90 (m, 0,5H, 0,5 (H-2')); 4,37 (m, 1H, H-3'); 3,90 (m, 1H, H-4'); 3,65 (m, 2H, H $_{\alpha}$ -5' e H $_{\beta}$ -5').

### Exemplo 8

#### 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina

Utilizando adenina (Mann Research Laboratories, Inc., 0,8 g; 5,9  $\mu\text{moles}$ ) e 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracil (0,4 g; 1,6  $\mu\text{moles}$ ) cuja preparação foi feita em conformidade com J. F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 20 ml de tampão de fosfato de potássio 10 mM, 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Agicionou-se fosforilase da timidina (2 400 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (3 900 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:36:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) e agitou-se a suspensão à temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . Ao 6º dia diluiu-se a reação até 100 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Ao 17º dia filtrou-se a suspensão e evaporou-se o filtrado. Com o resíduo preparou-se uma suspensão em água tépida. Filtrou-se a suspensão e aplicou-se o filtrado a uma coluna de 1,5 x 12 cm de resina de permuta aniônica) ((Bio-Rad

AGLX2-forma de hidróxido). Fez-se a eluição do produto com água. Procedeu-se à combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise demonstrou ser 0,6 hidrato.

p. f. 225-227°C nm (dec.)

UV  $\lambda$  max nm (  $\xi$  10<sup>-3</sup>); HCP-0,1N, 257 (14,6); NaOH 0,1N, 260 (14,9).

Anal. Calc. para C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>.O.H<sub>2</sub>O:

Calculado : C, 42,89; H, 4,57; N, 25,01; F, 6,78.

Encontrado: C, 42,94; H, 4,76; N, 24,98; F, 6,89.

RMN-<sup>1</sup>H (250 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8,35 e 8,14 (2s, 2H, H-8 e H-2); 7,36 (s, 2H, 6-NH<sub>2</sub>); 6,21 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,8 Hz, J = 3,0 Hz); 5,71 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,0 Hz); 5,42 (ddd, 1H, H-2', JF,2' = 53,0 Hz, J1',2' = 3,0 Hz, J2',3' = 4,5 Hz); 5,25 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,6 Hz); 4,47 (m, 1H, H-3'); 3,97 (m, 1H, H-4'); 3,74 (m, 1H, H<sub>C</sub>-5'); 3,56 (m, 1H, H<sub>B</sub>-5').

#### Exemplo 9

#### 2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina

Utilizando 2-amino-purina (Vega Biochemicals, 0,4 g; 3,0 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracilo (0,2 g; 0,71 mmoles) cuja preparação foi feita em conformidade com J. F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 35 ml de tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-se fosforilase de timidina (1 930 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos de purina (1 880 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte-Americana nº 4 381 344) e agitou-

-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao 24º dia diluiu-se a reacção até 200 ml utilizando água e adicionou-se 1 390 U.I. de fosforilase da timidina e 1 880 U.I. de fosforilase de nucleosidos da purina. Ao 35º dia evaporou-se a suspensão, Dissolveu-se o resíduo em água/metanol (7/3) e aplicou-se a uma coluna de 1,5 x 15 cm de resina de permuta aniônica (Bio-Rad AGLX2-forma de hidróxido). Fez-se a eluição do produto com água/metanol (7/3). Procedeu-se à combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise demonstrou ser 0,6 hidrato.

p. f. 151-153°C.

UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): HCl 0,1N, 313 (4,00), 240-245);  
pH 7, 304 (7,00), 243; NaOH 0,1N, 304 (7,30), 243.

Anal. calcul. para  $C_{10}H_{12}FN_5O_3 \cdot 0,6 H_2O$ .

Calculado: C, 42,89; H, 4,75; N, 25,01; F, 6,78.

Encontrado: C, 43,02; H, 4,71; N, 25,12; F, 6,58

RMN-<sup>1</sup>H (80 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>): 8,62 e 0,31 (2s, 2H, H-8 e H-6);  
6,62 (sb, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,16 (dd, 1H, H-1', JF-1' = 16,7 Hz,  
J = 2,7 Hz); 5,71 (m, 1,5H, 3'-OH e 0,5 (H-2')); 5,12 (m,  
1,5H, 5'-OH e 0,5 (H-2')); 4,40 (m, 1H, H-3'); 3,97 (m,  
1H, H-4'); 3,66 (m, 2H, H<sub>C</sub>-5' e H<sub>P</sub>-5').

#### Exemplo 10

#### Cloridrato de 2-amino-6-ciclopropil-amino-9H-purina

Durante 18 horas aqueceu-se à temperatura de 50°C uma solução de 2-amino-6-cloro-purina (Aldrich Chemical Company; 4,66 g; 27,5 mmoles) e de ciclopropil-amina (Aldrich Chemical Company; 12,5 g; 220 mmoles) em MeOH (100 ml). Depois adicionou-se-lhe 2-metoxi-etanol (50 ml) e aqueceu-se a reacção à temperatura de 70°C durante mais 6

horas. Após o arrefecimento filtrou-se uma pequena quantidade de material inicial que não reagiu e evaporou-se o filtrado e purificou-se em coluna de gel de sílica com  $\text{CHCl}_3$ : 5% até 10% de MeOH. O produto recristalizou depois duas vezes a partir de MeOH e uma vez a partir de EtOH sob a forma de sal cloridrato para proporcionar 1,45 g (23%) de produto, p.f. 253-257°C

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  6,70-6,82 (m, 4,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3,04 (s, br, 1,  $\text{CHN}$ ), 7,35-7,55 (s, br, 2,  $\text{NH}_2$ ), 8,13 (s, 1, CH), 9,49 (s, br, 1,  $\text{NHCH}$ ), 13,0-13,3 (s, br, 2,  $\text{NH}_2^+$ ).

Anal. Calc. para  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_6 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ :

Calculado, C, 41,57; H, 5,01; N, 36,35; Cl, 15,34.

Encontrado, C, 41,55; H, 5,01; N, 36,28; Cl, 15,4.

2-amino-6-(ciclopropil-amino)-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina

Dissolveu-se cloridrato de 2-amino-6-(ciclopropil-amino)-9H-purina (0,3 g; 1,3 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracilo (0,4 g; 1,6 mmoles) cuja preparação foi feita em conformidade com J. F. Coddington e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) em 20 ml de tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-se fosforilase da timidina (2 000 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (5 540 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 444) e fez-se a incubação da reacção à temperatura de 37°C. Ao 5º dia adicionou-se 2 000 U.I. de fosforilase da timidina e 5 540 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 21º dia aplicou-se a mistura de reacção a uma coluna de 2,5 x 8 cm de resina de permuta aniónica (Bio-Rad AG1X2-forma de hidróxido). Após a lavagem da coluna com água procedeu-se à eluição do produto com água/metanol (7/3). Efectuou-se a combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no

vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise demonstrou ser 0,6 hidrato.

p.f. 120°C (fusão parcial a 80°C)

UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon$  10<sup>-3</sup>): HCl 0,1N, 295,5 (14,3), 254 (12,7); pH 7, 282 (14,8) 262 (sh); NaOH 0,1N, 282 (15,2), 262 (sh).

Anal. calculada para C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>·0,6 H<sub>2</sub>O:

Calculado: C, 46,59; H, 5,47; N, 25,08; F, 5,67.

Encontrado: C, 46,46; H, 5,35; N, 25,03; F, 5,91.

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7,93 (s, 1H, H-8); 7,38 (db), 1H, 6-NH, J = 4,5 Hz); 6,04 (dd, 1H, H-1', JF, 1 = 16,4 Hz, J = 3,3 Hz); 5,88 (sb, 2H, 2-NH); 5,62 (d, 1H, 3'-OH, J = 5,9 Hz); 5,30 (dt aparente, 1H, H-2', JF, 2 (53,7 Hz, J 3,8 Hz); 5,23 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,4 Hz); 4,38 (m, 1H, H-3'); 3,92 (m, 1H, H-4'); 3,69 (m, 1H, H<sub>O</sub>-5'); 3,59 (m, 1H, H<sub>B</sub>-5'); 3,10 (m, 1H, N-CH); 0,62 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

### Exemplo 11

#### 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-6-metoxi-9H-purina

Utilizando 6-metoxi-purina (Sigma Chemical Company; 0,8 g; 5,3 nmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracilo (0,4 g; 1,6 nmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J. F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29:553, 1964) preparou-se uma suspensão em 20 ml de tampão de fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-se fosforilase de timidina (2 400 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (3 900 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros. Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao 6º dia diluiu-se a mistura de reacção até 100 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04%

(p/v) de azida de potássio. Ao 16º dia adicionou-se-lhe 2 640 U.I. de fosforilase da timidina e 4 360 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 45º dia evaporou-se a mistura de reacção. Com o resíduo preparou-se uma suspensão em metanol tépido e filtrou-se a suspensão. Evaporou-se o filtrado. Dissolveu-se o resíduo em água tépida e aplicou-se a uma coluna de 2,5 x 7 cm de resina de permuta aniónica (Bio-Red AG1x2-forma de hidróxido). Após a lavagem com água fez-se a eluição do produto com metanol/água (9/1). Procedeu-se à combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise demonstrou ser 0,3 hidrato.

p.f. 182°C UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): HCl 0,1N, 250 (8,72), 259 (sh); pH 7, 248 (8,95), 259 (sh); NaHO 0,1N, 250 (9,14) 259 (sh).

Anal. Calculada para  $C_{11}H_{13}FN_4O_4 \cdot 0,3 H_2O$ :

Calculado: C, 45,61; H, 4,73; N, 19,34; F, 6,56.

Encontrado: C, 45,72; H, 4,66; N, 19,47; F, 6,72.

RMN  $^1H$  (300 MHz,  $Me_2SO-d_6$ ):  $\delta$  8,63 e 8,58 (2s, 2H, H-8 e H-2); 6,34 (dd, 1H, H-1', JT-1' = 17,1 Hz, J = 2,4 Hz); 5,76 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,1 Hz); 5,45 (ddd, 1H, H-2', JF, 2' = 52,7 Hz, J1', 2' = 2,4 Hz, J2', 3' = 4,4 Hz); 5,17 (t, 1H, 5'-OH, J = 4,1 Hz); 4,50 (m, 1H, H-3'); 4,11 (s, 3H- O-CH<sub>3</sub>); 4,00 (m, 1H, H-4'); 3,75 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,62 (m, 1H, H<sub>\beta</sub>-5').

### Exemplo 12

2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-6-metoxi-9H-purina

Utilizando 2-amino-6-metoxi-purina (0,8 g; 4,8 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com R.M. Balsiger e J. A. Montgomery (J. Org.

Chem. 20:1573, 1960) e 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofurano-silo)uracilo (0,4 g; 1,6 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J. F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29-558, 1964) preparou-se uma suspensão em 20 ml de tampão de fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-se-lhe fosforilase da timidina (2 400 U.I.) e fosforilase dos nucleótidos da purina (3 900 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao 6º dia diluiu-se a reacção até 100 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio.

Ao 10º dia diluiu-se a reacção até 200 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Ao 16º dia adicionou-se-lhe 2 640 U.I. de fosforilase da timidina e 4 360 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 24º dia filtrou-se a mistura de reacção e evaporou-se o filtrado. Com o resíduo preparou-se uma suspensão em metanol. Filtrou-se a suspensão e evaporou-se o filtrado. Dissolveu-se o resíduo em água e aplicou-se a uma coluna de 2,5 x 7 cm de resina de permuta aniónica (Bio-Rad AGLN2-forma de hidróxido). Após lavagem da coluna com água procedeu-se à eluição do produto com metanol/água (9/1). Após a remoção do solvente no vácuo dissolveu-se o resíduo em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise demonstrou ser 0,5 hidrato.

p.f. 200-202°C UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): HCl 0,1 N, 288 (7,85), 244,5 (6,43); pH 7, 279,5 (8,09), 248 (8,85); NaHO 0,1N, 280 (8,40), 248,5 (8,59).

Anal. calculado para  $C_{11}H_{14}FN_5O_4 \cdot 0,5 H_2O$ :

Calculado.: C, 42,86; H, 4,90; N, 22,78; F, 6,16

Encontrado: C, 42,81; H, 4,92; N, 22,69; F, 6,29

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  8,12 (s, 1H, H-8); 6,57 (sb); 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,11 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,6 Hz, J = 2,6 Hz); 5,69 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,10 Hz); 5,31 (ddd, 1H, H-2', JF, 2' = 53,0 Hz, J1', 2' = 2,7 Hz, J2', 3' = 4,4 Hz); 5,17 (t, 1H, 5'-OH, J = 4,2 Hz); 4,40 (m, 1H, H-3'); 3,95 (m, 4H, H-4' e O-CH<sub>3</sub>); 3,74 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,58 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5').

### Exemplo 13

#### 6-ciclopropil-amino-9H-purina

Durante 48 horas aqueceu-se à temperatura de 50°C uma solução de 6-cloro-purina (Aldrich Chemical Company; 4,23 g; 27 mmoles) e de ciclopropil-amina (Aldrich Chemical Company; 12,5 g; 22 mmoles) em MeOH (100 ml). Removeu-se o solvente e purificou-se o produto impuro em coluna de gel de sílica fazendo a eluição com  $\text{CHCl}_3$ : 5 % de MeOH para proporcionar 5,90 g de um sólido cor de creme. Este sólido recristalizou a partir de MeOH para proporcionar duas colheitas, de 2,69 g e de 1,16 g (rendimento total de 81,4%); p.f. 237-240°C.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ ):  $\delta$  0,6-0,71 (m, 4,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3,03 (br s, 1,  $\text{CHNH}$ ); 7,73 (d, 1, NH), 8,05 (s, 1, CH), 8,18 (s, 1, CH), 12,7 (br), 1, NH).

Anál. calculada  $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_5$ : C, 54,85; H, 5,18; N, 39,97.

Encontrado: C, 54,69; H, 5,22; N, 39,87.

#### 6-(ciclopropil-amino)-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina

Utilizando 6-(ciclopropil-amino)-9H-purina (0,2 g; 1,1 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracilo (0,4 g; 1,6 mmoles) cuja preparação pode ser feita em conformidade com J. F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em

20 ml de tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Ajustou-se o pH da suspensão para o valor 7,0 utilizando KOH. Adicionou-se-lhe fosforilase (2 000 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (5,540 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) e Agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao 5º dia adicionou-se 0,2 g de 6-(ciclopropil-amino)purina e 2 000 U.I. de fosforilase da timidina e 5 540 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 9º dia adicionou-se 0,2 g de 6-(ciclopropil-amino)-purina e ajustou-se o pH da reacção para o valor 7,0 utilizando KOH. Depois adicionou-se fosforilase da timidina (2 000 U.I.) e fosforilase dos nucleótidos da purina (5 540 U.I.). Ao 20º dia ajustou-se o pH da reacção para o valor 9,4 utilizando NH<sub>4</sub>OH e aplicou-se a mistura de reacção a uma coluna de 2,5 x 8,5 cm de resina e lavagem com água efectuou-se a eluição do produto com água/metanol (7/3). Procedeu-se à combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise demonstrou ser 0,4 hidrato.

p.f. 207-208°C UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): HCl 0,1N, 264 (19,1); pH 7, 268 (18,2); NaOH 0,1N, 268 (18,6).

Anal. calculada para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>·0,4 H<sub>2</sub>O:

Calculado: C, 49,33; H, 5,35; N, 22,13; F, 6,00.

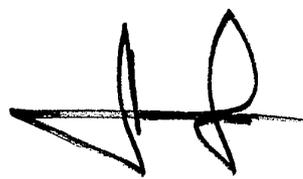
Encontrado: C, 49,33; H, 5,33; N, 22,11; F, 6,14.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8,35 e 8,24 (2s, 2H, H-8 e H-2); 7,98 (bd, 1H, 6-NH, J = 4,10 Hz), 6,23 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,8 Hz, J = 2,9 Hz); 5,68 (d, 1H, 3'-OH, J = 5,9 Hz); 5,42 (ddd, 1H, H-2', JF, 2 = 53,0 Hz, J1', 2' = 2,9 Hz, J2', 3' = 4,6 Hz); 5,20 (t, 1H, 5-OH, J = 5,6 Hz); 4,46 (m, 1H, H-3'); 3,97 (m, 1H, H-4'); 3,73 (m, 1H, H <sub>$\alpha$</sub> -5'); 3,55 (m, 1H, H <sub>$\beta$</sub> -5'); 3,04 (m, 1H, N-CH); 0,66 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

#### Exemplo 14

#### 2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-6-etoxi-9H-purina

Utilizando 2-amino-6-etoxi-purina (0,8 g; 4,5 mmoles); cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com R.W. Balsiger e J.A. Montgomery (U. Org. Chem. 25:1573, 1969) e utilizando 1-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)uracilo (0,5 g; 2,1 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J. P. Codington e outros (U. Org. Chem. 29:550, 1964) preparou-se uma suspensão em 50 ml de tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Ajustou-se o pH da suspensão para o valor 7,0 com HCl. Adicionou-se-lhe fosforilase da timidina (4 000 U.I.) e fosforilase dos nucleótidos da purina (14 000 U.I.) (S.A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 391 344) e agitou-se a mistura de reacção à temperatura de 37°C. Ao 4º dia adicionou-se-lhe 2 000 U.I. de fosforilase da timidina e 6 900 U.I. de fosforilase dos nucleótidos da purina e diluiu-se a mistura de reacção até 250 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Ao 14º dia removeu-se o solvente no vácuo. Com o resíduo preparou-se uma suspensão em água e adicionou-se-lhe metanol para precipitar a proteína. Depois filtrou-se a suspensão e evaporou-se o filtrado. Dissolveu-se o resíduo em água quente e aplicou-se a uma coluna de 1,5 x 15 cm de resina de permuta aniónica (Bio-Rad MB3M2-forma de hidróxido). Após a lavagem da coluna com água procedeu-se à eluição do produto com metanol/água (1/1). Efectuou-se a combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água e liofilisou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise demonstrou ser 0,7 hidrato.



p.f. 85°C (fusão parcial a 50°C) UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ );  
HCl 0,1N, 288 (8,78), 244,5 (7,19); pH 7, 280 (8,96), 247,5  
(9,55); NaOH 0,1N, 280 (9,25), 249 (9,15).

Anal. calc. para  $C_{12}H_{16}FN_5O_4 \cdot 0,7 H_2O$ :

Calculado: C, 44,23; H, 5,38; N, 21,49; F, 5,83.

Encontrado: C, 44,30; H, 5,43; N, 21,39; F, 5,81.

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8,09 (s, 1H, H-8); 6,49 (sb, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,08 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,4 Hz, J = 2,7 Hz); 5,67 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,1 Hz); 5,42 (m, 0,5M, 0,5 (H-2')); 5,15 (m, 1,5H, 0,5 (H-2') e 5'-OH); 4,44 (q, 2H, 6-OCH<sub>2</sub>, J = 7,0 Hz); 4,40 (m, 1H, H-3'); 3,92 (m 1H, H-4'); 3,73 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,56 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5'); 1,34 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 7,0 Hz).

#### Exemplo 15

2-amino-6-cloro-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-riburanosil)-9H-purina

Reacção 1 : Utilizando 2-amino-6-cloropupira (Sigma Chemical Company; 0,8 g; 4,7 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracilo (0,4 g; 1,6 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J.F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 50 ml de tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Ajustou-se o pH da suspensão para o valor 7,0 utilizando KOH. Adicionou-se-lhe fosforilase da timidina (3,850 U.T.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (6 500 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao 22º dia diluiu-se a mistura de reacção até 100 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM,

pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio e adicionou-se-lhe 1 270 U.I. de fosforilase da timidina e 2 180 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 32º dia diluiu-se a mistura de reacção até 200 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio e adicionou-se-lhe 2 540 U.I. de fosforilase da timidina e 4 360 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 61º dia filtrou-se a mistura de reacção, evaporou-se o filtrado e armazenou-se o resíduo à temperatura de 4°C.

Reacção 2: Utilizando 2-amino-6-cloropurina (Sigma Chemical Company; 0,8 g; 4,7 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracilo (0,4 g; 1,6 mmoles) preparou-se uma suspensão em 25 ml de tampão de fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-se-lhe fosforilase da timidina (4 000 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (6 500 U.I.) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao 16º dia diluiu-se a mistura de reacção até 100 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Ao 20º dia diluiu-se a mistura de reacção até 200 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio, e adicionou-se-lhe 2 640 U.I. de fosforilase da timidina e 4 360 U.I. de fosforilase dos nucleótidos da purina. Ao 53º dia filtrou-se a mistura de reacção. Evaporou-se o filtrado e armazenou-se o resíduo à temperatura de 4°C. Utilizando os resíduos das Reacções 1 e 2 preparou-se uma suspensão em água e fez-se a sua combinação. Aqueceu-se a suspensão e depois filtrou-se. Purificou-se o produto que continha o filtrado por cromatografia em coluna de 7,5 x 90 cm de Biogel P-2 (Bio-Rad) utilizando como solvente n-

-propanol/água (3/7), seguindo-se a cromatografia em coluna de 5 x 90 cm Sephadex G-10 (Pharmacia LKB) utilizando como solvente n-propanol/água (3/7). Procedeu-se à combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Com o resíduo preparou-se uma suspensão em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe (lote 1). Procedeu-se à combinação das fracções que continham o produto mais as impurezas cuja eluição foi feita em coluna de "Sephadex G-10" e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água/MeCN (49/1), e depois purificou-se o produto por cromatografia de fase inversa sobre sílica G18 (Hi-Chrom Pre-4-ODS, Regis Chemical Co.), utilizando como solvente água/MeCN (49/1). Procedeu-se à combinação das fracções que continham o produto e filtrou-se através de nylon filtrante com poros de 0,2 um para a remoção da sílica residual. Após remoção do solvente no vácuo dissolveu-se o resíduo em água e filtrou-se através de uma membrana filtrante com poros de 0,22 um (Millipore GS). A liofilização do filtrado proporcionou o composto em epígrafe (lote 2) cuja análise revelou ser 0,5 hidrato.

Resultados para o lote 1:

p.f. 212°C (fusão parcial a 205°C) UV  $\lambda$  max  
( $\epsilon$  X10-3); HCl 0,1N, 309 (6,00), 247 (5,60);  
pH 7, 307,5 (6,30), 247 (5,80); NaOH 0,1N, 307  
(6,40), 247 (5,30).

Anal. Calcu. para  $C_{10}H_{11}ClFN_5O_3$ :

Calc. C, 39,55; H, 3,65; N, 23,06; Cl, 11,67;  
F, 6,26.

Encont. C, 39,69; H, 3,82; N, 22,84; Cl, 11,64;  
F, 6,14.

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>): δ 8,37 (s, 1H, H-8); 7,07 (sb, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,12 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,6 Hz, J = 2,0 Hz); 5,72 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,4 Hz); 5,34 (ddd, 1H, H-2', JF, 2' = 52,9 Hz, J1', 2' = 2,0 Hz, J2', 3' = 4,2 Hz); 5,19 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,3 Hz); 4,42 (m, 1H, H-3'); 3,96 (m, 1H, H-4'); 3,76 (m, 1H, H<sub>α</sub>-5'); 3,61 (m, 1H, H<sub>β</sub>-5').

Resultado para o lote 2:

p.f. 215°C UV λ max nm: HCl, 0,1N, 309,5, 246,5; pH 7, 307,5, 247; NaOH 0,1N, 307,5, 247.

Anal. Calcul. para C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClF<sub>5</sub>O<sub>3</sub>·0,5 H<sub>2</sub>O:

Calculado: C, 38,41; H, 3,87; N, 22,40; Cl, 11,34; F, 6,08.  
Encontrado: C, 38,73; H, 3,79; N, 22,14; Cl, 11,16; F, 6,10.

RMN-<sup>1</sup>H (80 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>): δ 8,36 (s, 1H, H-8); 7,03 (sb, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,13 (dd, 1H, H-1', JF, 1' 16,8 Hz, J = 3,2 Hz); 5,68 (m, 1,5H, 0,5 (H-2') e 3'-OH); 5,15 (m, 1,5H, 0,5 (H-2') e 5'-OH); 4,35 (m, 1H, H-3'); 3,90 (m, 1H, H-4'); 3,72 (m, 2H, H<sub>α</sub>-5' e H<sub>β</sub>-5').

Exemplo 16

2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-6-metil-amino-9H-purina

Utilizando 2-amino-6-metil-amino-purina (J.A. Montgomery e L.B. Holum, J.A.C.S. 80:404, 1958; 0,51 g; 3,1 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil) uracilo (0,52 g; 2,1 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J.F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 50 ml de tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-se-lhe fosforilase da timidina (4 000 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (14 000 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistry

20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao 6º dia diluiu-se a mistura de reacção até 250 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio e 0,49 g de 2-amino-6-metil-amino-purina e adicionou-se-lhe 4.000 U.I. de fosforilase da timidina e 14 000 U.I. de fosforilase dos nucleótidos da purina. Ao 14º dia evaporou-se a mistura de reacção, com o resíduo preparou-se uma suspensão em metanol/água e filtrou-se a suspensão. Evaporou-se o filtrado. Dissolveu-se o resíduo em água e aplicou-se a uma coluna de 2,5 x 13 cm de resina de permuta aniônica (Bio-Rad AGLX2-forma de hidróxido). Após a lavagem da coluna com água procedeu-se à eluição do produto com metanol/água (1/1). Depois removeu-se o solvente no vácuo, dissolveu-se o resíduo em água e filtrou-se através de uma membrana filtrante com poros de 0,22 um. A liofilização do filtrado proporcionou o composto em epígrafe cuja análise revelou ser 0,5 hidrato.

p.f. 172°C UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): HCl 0,1N, 292,5 (11,5), 255 (12,1); pH 7, 279,5 (13,4), 263 (sh); NaOH 0,1N, 280 (13,7), 263 (sh).

Anal. Calc. para  $C_{11}H_{15}FN_6O_3 \cdot 0,5 H_2O$ :

Calculado: C, 43,00; H, 5,25; N, 27,35; F, 6,18.

Encontrado: C, 42,99; H, 5,28; N, 27,33; F, 6,16.

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7,92 (s, 1H, H-8); 7,28 (sb), 1H, 6-NH); 6,13 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,3 Hz, J = 3,3 Hz); 5,91 (sb), 2H, 2-NH2); 5,64 (d, 1H, 3'-OH, J = 5,8 Hz), 5,29 (ddd, 1H, H-2', JF,2' = 53,0 Hz, J1',2' = 3,3 Hz, J2',3' = 4,4 Hz); 5,27 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,5 Hz); 4,37 (m, 1H, H-3'); 3,92 (m, 1H, H-4'); 3,72 (m, 1H, H<sub>C</sub>-5'); 3,60 (m, 1H, H<sub>B</sub>-5'); 2,86 (sb, 3H, N-CH<sub>3</sub>).



Exemplo 17

9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)hidoxantina

Preparou-se 6-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-9H-purina (0,29g; 1,0 mmoles) conforme descrito no Exemplo 8 e dissolveu-se em 100 ml de água. Adicionou-se desaminase da adenosina intestinal da vitela (4 U.I., Boehringer Mannheim) e procedeu-se à incubação da solução à temperatura de 37°C durante 24 horas. Removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água/n-propanol (7/3) e submeteu-se a cromatografia em coluna de 5 x 90 cm de "Sphadex G-10" (Pharmacia LKB) utilizando como solvente água/n-propanol (7/3). Efectuou-se a combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise revelou ser um hidrato.

p.f. 175°C (fusão parcial a 125°C) UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ):  
HCl 0,1N, 249 (11,8); pH 7, 248,5 (12,0); NaOH 0,1N, 253 (13,0).

Anal. Calc. para  $C_{10}H_{11}FN_4O_4 \cdot H_2O$ :

Calculado: C, 41,67; H, 4,55; N, 19,44; F, 6,59.

Encontrado: C, 41,72; H, 4,58; N, 19,46; F, 6,37.

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8,33 e 8,09 (2s, 2H, H-8 e H-2); 6,21 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,8 Hz, J = 2,4 Hz); 5,75 (sb, 1H, 3'-OH), 5,36 (ddd, 1H, H-2', JF, 2' = 52,7 Hz, J1', 2' = 2,4 Hz, J1', 3' = 4,4 Hz); 5,20 (sb, 1H, 5'-OH); 4,43 (d m aparente, 1H, H-3', JF, 3' = 18,9 Hz); 3,97 (m, 1H, H-4'); 3,75 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,59 (m, 1H, H<sub>β</sub>-5')

Exemplo 18

2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-6-propoxi-9H-purina

Utilizando 2-amino-6-propoxi-purina S (0,3 g; 1,6 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com R.M. Balsiger e J.A. Montgomery (J. Org. Chem. 25:1573, 1960) e utilizando 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracilo (0,52 g; 2,1 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J. F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 50 ml de tampão de fosfato de potássio 2 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Ajustou-se o pH da suspensão para o valor 7,0 utilizando KOH. Adicionou-se-lhe fosforilase da timidina (4 000 U.T.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (14 000 U.I.) (T.A. Krenitski e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) e agitou-se a mistura de reacção à temperatura de 37°C. Ao 6º dia diluiu-se a mistura de reacção até 250 ml utilizando tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio e adicionou-se-lhe 4 000 U.I. de fosforilase de timidina e 14 000 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 14º dia removeu-se o solvente no vácuo. Com o resíduo preparou-se uma suspensão em metanol/água e depois filtrou-se a suspensão. Evaporou-se o filtrado. Dissolveu-se o resíduo em água quente e aplicou-se a uma coluna de 2,5 x 13 cm de resina de permuta aniónica (Bio-Rad AGLX2-forma de hidróxido). Após a lavagem da coluna com água precedeu-se à eluição do produto com metanol/água (1/1). Efectuou-se a combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise revelou ser 0,9 hidrato.

p.f. 93°C (fusão parcial a 65°C) UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ):  
HCl 0,1N, 289 (9,05), 245 (7,37); pH 7, 280 (9,28), 248 (9,82); NaOH 0,1N, 280,5 (9,67), 249,5 (9,55).

Anal. calculada para  $C_{13}H_{18}FN_5O_4 \cdot 0,9 H_2O$ :

Calculado: C, 45,69; H, 5,78; N, 20,49; F, 5,56.

Encontrado: C, 45,75; H, 5,61; N, 20,51; F, 5,60.

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>); δ 8,09 (s, 1H, H-8); 6,49 (sb), 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,08 (dd, 1H, H-1, JF, 1' = 16,4 Hz, J = 2,7 Hz); 5,65 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,0 Hz); 5,42 (t aparente, 0,5H, 0,5 (H-2'), J = 3,5 Hz); 5,14 (m, 1,5H, 0,5 (H-2') e 5'-OH); 4,36 (m, 3H, H-3'; e 6-OCH<sub>2</sub>) 3,92 (m, 1H, H-4'); 3,69 (m, 1H, H-5'); 3,60 (m, 1H, H<sub>β</sub>-5'); 1,75 (sexteto aparente, 2H, CH<sub>2</sub>, J = 7,1 Hz); 0,95 (t, 3H, CH<sub>3</sub>, J = 7,4 Hz).

### Exemplo 19

#### 2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-6-iodo-9H-purina

Utilizando 2-amino-6-iodo-purina (0,8 g; 3,1 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com R.T. Koda e outros (J. Pharm. Sci. 57:2056 1968) e utilizando 1-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil) uracilo (0,39 g; 1,6 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J.F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 20 ml de tampão de fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Ajustou-se o valor do pH da suspensão para 7,2 utilizando KOH. Adicionou-se-lhe fosforilase da timidina (2 000 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (3 250 U.I.) (T.A. Krenisky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao 12º dia ajustou-se o pH da reacção para o valor 6,8 utilizando ácido acético e adicionou-se-lhe 2 000 U.I. de fosforilase da timidina e 3 250 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 26º dia diluiu-se a mistura de reacção até 500 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio e adicionou-se-lhe 2 000 U.I. de fosforilase da timidina e 3 250 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 40º dia filtrou-se a mistura de reacção. Evaporou-se o filtrado. Com o resíduo preparou-se uma suspensão em água/n-propanol (7/3) e filtrou-se.

Evaporou-se o filtrado, Com o resíduo preparou-se uma suspensão em metanol e depois filtrou-se. Purificou-se o produto que continha o filtrado por cromatografia numa coluna de 5 x 90 cm de "Biogel P-2" (Bio-Rad) utilizando como solvente água/n-propanol (7/3), e depois submeteu-se a cromatografia numa coluna de 5 x 90 cm de "Sephadex G-10" (Pharmacia LKB) utilizando como solvente água/n-propanol (7/3). Depois removeu-se o solvente no vácuo, e com o resíduo preparou-se uma suspensão em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise demonstrou ser 0,6 hidrato.

p. f. 135°C (fusão parcial a 108-110°C) UV  $\lambda$  max ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): HCl 0,1N, 318 (7,94); pH 7, 315 (8,30); NaOH 0,1N, 315 (8,36).

Anal. Calc. para  $C_{10}H_{11}FIN_5O_3 \cdot 0,6 H_2O$ :

Calculado: C, 29,59; H, 3,03; N, 17,25; F, 4,68; I, 31,26,  
Encontrado: C, 29,69; H, 3,06; N, 17,22; F, 4,44; I, 31,47.

RMN-<sup>1</sup>H (300MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>);  $\delta$  8,33 (s, 1H, H-8); 6,96 (sb, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,09 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,7 Hz, J = 2,4 Hz); 5,69 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,3 Hz); 5,33 (ddd, 1H, H-2', JF,2' = 52,8 Hz, J1',2' = 2,4 Hz, J2',3' = 4,2 Hz); 5,16 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,3 Hz); 4,42 (m, 1H, H-3'); 3,95 (m, 1H, H-4'); 3,77 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,60 (m, 1H, H<sub>β</sub>-5').

#### Exemplo 20

9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-6-metil-amino-9H-purina

Utilizando 6-metil-amino-purina (Sigma Chemical Company; 0,8 g; 5,4 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)uracilo (0,39 g; 1,6 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J.F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 20 ml de tampão de fosfato de potássio 10 mM,

pH 0,7, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-se-lhe fosforilase de timidina (2 400 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (3 900 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistri 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao 6º dia diluiu-se a mistura de reacção até 100 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Ao 17º dia filtrou-se a mistura de reacção. Evaporou-se o filtrado. Com o resíduo preparou-se uma suspensão em metanol e depois filtrou-se. Evaporou-se o filtrado. Dissolveu-se o resíduo em água e aplicou-se a uma coluna de 2,5 x 7 cm de resina de permuta aniónica (Bio-Rad AGLX2-forma de hidróxido). Procedeu-se à eluição do produto com água. Efectuou-se a combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água e filtrou-se através de uma membrana filtrante com poros de 0,2  $\mu$ m. A liofilização do filtrado proporcionou o composto em epígrafe.

p.f. 140°C (retracção a 65°C, fusão parcial a 110°C) UV

$\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): HCl 0,1N, 261,5 (16,2); pH 7, 265,5 (15,0); NaOH 0,1N, 266 (15,3).

Anal. Calc. para  $C_{11}H_{14}FN_5O_3$ :

Calculado: C, 46,64; H, 4,98; N, 24,72; F, 6,71.

Encontrado: C, 46,48; H, 5,07; N, 24,63; F, 6,93.

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8,37 e 8,25 (2s, 2H, H-8 e H-2); 7,86 (sb, 1H, 6-NH); 6,24 (dd, 1H, H-1', JP, 1' = 16,8 Hz, J = 3,2 Hz); 5,74 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,1 Hz); 5,44 (ddd, 1H, H-2', JP, 2' = 53,0 Hz, 31', 2' = 3,2 Hz, J2', 3' = 4,4 Hz); 5,28 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,6 Hz); 4,49 (m, 1H, H-3'); 3,99 (m, 1H, H-4'); 3,75 (m, 1H, H<sub>a</sub>-5'); 3,58 (m, 1H, H<sub>b</sub>-5'); 2,95 (sb, 3H, N-CH<sub>3</sub>).



Exemplo 21

9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-6-etoxi-9H-purina

Utilizando 6-etoxi-purina chemical Company; 0,2 g; 1,2 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)uracilo (0,4 g; 1,6 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J. F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 20 ml de tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Ajustou-se o pH da suspensão para o valor 7,0 utilizando KOH e adicionou-se-lhe fosforilase da timidina (2 000 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (5 540 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) e depois agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao 5º dia adicionou-se-lhe mais 2 000 U.I. de fosforilase da timidina e 2 700 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 9º dia adicionou-se-lhe 0,2 g de 6-etoxi-purina. Ajustou-se o pH da reacção para o valor 7,0 utilizando KOH e adicionou-se-lhe 2 000 U.I. de fosforilase da timidina e 5 540 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 28º dia filtrou-se a suspensão. Aplicou-se o filtrado a uma coluna de 2,5 x 8,5 cm de resina de permuta aniónica (Bio-Rad AGLX2-forma de hidróxido). Após a lavagem com água procedeu-se à eluição do produto com metanol/água (3/7). Efectuou-se a combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. O produto contido no resíduo ainda foi purificado por cromatografia numa coluna de 2,5 x 90 cm de "Biogel P-2" (Bio-Rad) utilizando como solvente água/metanol (8/2), recorrendo à cromatografia numa coluna de 2,5 x 50 cm de gel de sílica utilizando como solvente acetoneitrilo/água (49/1). Efectuou-se a combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise revelou ser 0,5 hidrato.

p. f. 85-87°C (fusão parcial a 60°C UV  $\lambda$  max ( $\epsilon \times 10^{-3}$ );  
HCl 0,1N, 249 (11,4); pH 7, 248 (11,7); NaOH 0,1N, 249  
(12,0).

Anal. Calc. para  $C_{12}H_{15}FN_4O_4 \cdot 0,5 H_2O$ :

Calculado: C, 46,91; H, 5,25; N, 18,23; F, 6,18.

Encontrado: C, 46,80; H, 5,23; N, 18,21; F, 6,65.

RMN- $^1H$  (200 MHz,  $Me_2SO-d_6$ )  $\delta$  8,59 e 8,53 (2s, 2H, e H-2);  
6,31 (dd, H-1', JF,1' = 17,0 Hz, J = 2,5 Hz); 5,70 (d, 1H,  
3'-OH, J = 6,3 Hz); 5,43 (ddd, 1H, H-2', JF,1' = 52,9 Hz,  
J1',2' = 2,5 Hz, J2',3' = 4,4 Hz); 5,12 (t, 1H, 5'-OH, J =  
= 5,4 Hz); 4,59 (q, 2H, 6-OCH<sub>2</sub>, J = 7,0 Hz); 4,51 (m, 1H,  
H-3'); 3,98 (m, 1H, H-4'); 3,73 (m, 1H, H <sub>$\alpha$</sub> -4'); 3,61 (m, 1H,  
H <sub>$\beta$</sub> -5'); 1,40 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 7,0 Hz).

#### Exemplo 22

#### 2-Amino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-6-metil-tio- -9H-purina

Utilizando 2-amino-6-metil-tio-purina  
(Sigma Chemical Company; 0,6 g; 3,3 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-  
-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracilo (0,3 g; 1,2 mmoles) cuja  
preparação pode ser efectuada em conformidade com J.F. Coding-  
ton e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma  
suspensão em 200 ml de tampão de fosfato de potássio 5 mM,  
pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-  
-se-lhe fosforilase da timidina (4 000 U.I. e fosforilase dos  
nucleósidos da purina (6 500 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros,  
Biochemistry 20:3615, 1981 e Patentes Norte Americana nº  
4 381 344) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao  
14º dia diluiu-se a mistura de reacção até 400 ml com tampão  
de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de  
azida de potássio e adicionou-se-lhe 8 000 U.I. de fosfori-  
lase da timidina e 6 500 U.I. de fosforilase dos nucleósidos  
da purina. Ao 25º dia ajustou-se o pH da mistura de reacção

para o valor 6,9 utilizando KOH. Ao 39º dia filtrou-se a mistura de reacção. Aplicou-se o filtrado a uma coluna de 2,5 x 13 cm de resina de permuta aniónica (Bio-Rad AGLK2-forma de hidróxido) e procedeu-se à eluição do produto com metanol/água (3/7). Após a remoção do solvente no vácuo preparou-se com o resíduo uma suspensão em água e liofilizou-se para proporcionar o composto em epígrafe cuja análise revelou ser 0,5 hidrato.

p. f. 85-87°C UV  $\lambda$  max ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ); HCl 0,1N, 327 (11,6), 250 (11,2), 263 (sh); pH 7, 311 (12,8), 257 (sh), 246 (15,1); NaOH 0,1N, 311 (13,3), 257 (sh), 246 (14,8).

Anal. Calc. para  $C_{11}H_{14}FN_5O_3S \cdot 0,5 H_2O$ :  
Calculado: C, 40,74; H, 4,66; N, 21,59; F, 5,80; S, 9,89.  
Encontrado: C, 40,79; H, 4,66; N, 21,55; F, 5,89; S, 9,84.

RMN-<sup>1</sup>H (80 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8,17 (s, 1H, H-8); 6,57 (sb, 2H, 2-NH<sub>2</sub>); 6,14 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,4 Hz, J = 3,2 Hz); 5,64 (m, 1,5H, 0,5 (H-2') e 3'-OH); 5,11 (m, 1,5H, 0,5 (H-2') e 5,OH); 4,40 (m 1H, H-3'); 3,95 (m, 1H, H-4'); 3,65 (m, 1H, H<sub>α</sub>-5' e H<sub>β</sub>-5'); 2,58 (s, 3H, 6-SCH<sub>3</sub>).

Exemplo 23

9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-6-iodo-9H-purina

Utilizando 6-iodo-purina (Sigma Chemical Company: 0,7 g; 2,7 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)uracilo (0,4 g; 1,7 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J.F. Codington e outros (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 20 ml de tampão de fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-se-lhe fosforilase da timidina (2 640 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (4 360 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao

21<sup>o</sup> dia diluiu-se a mistura de reacção até 50 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio e adicionou-se-lhe 4 000 U.I. de fosforilase da timidina e 6 500 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 43<sup>o</sup> dia diluiu-se a mistura de reacção até 250 ml com água e adicionou-se-lhe 2 000 U.I. de fosforilase da timidina e 3 250 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 57<sup>o</sup> dia filtrou-se a mistura de reacção. Evaporou-se o filtrado, Com resíduo preparou-se uma suspensão em metanol tépico e depois filtrou-se. Evaporou-se o filtrado. Dissolveu-se o resíduo em água/n-propanol (7/3) e aplicou-se a uma coluna 7,5 x 90 cm de "Biogel P-2" (Bio-Rad) utilizando como solvente água/n-propanol (7/3). Efectuou-se a combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em metanol quente e adicionou-se-lhe água até se formar um precipitado. Removeu-se o metanol no vácuo. Depois de se ter deixado em repouso durante a noite procedeu-se à filtração da suspensão. O resíduo da filtração continha a massa principal de produto. Evaporou-se o filtrado e repetiu-se o procedimento anterior até se precipitar o produto remanescente. Efectuou-se a combinação dos resíduos de filtração e preparou-se uma suspensão em água. A liofilização proporcionou o composto em epígrafe.

p. f. 198-200<sup>o</sup>C (dec.)

UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ); HCl 0,1N. 275 (11,1), 257 (sh);  
pH 7, 275 (11,1), 258 (sh); NaOH 0,1N, 276 (9,98), (sh),  
303 (sh).

Anal. Calc. para  $C_{10}H_{10}FIN_4O_3$

Calculado: C, 31,60; H, 2,65; N, 14,74; F, 5,00; I, 33,39.  
Encontrado: C, 31,70; H, 2,70; N, 14,69; F, 4,96; I, 33,48.

RMN-<sup>1</sup>H (80 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8,87 e 0,66 (s, 2H, H-8 e H-2);  
6,35 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 17,0 Hz, J = 2,0 Hz); 5,76 (m,  
1.5H, 0.5 (H-2') e 3'-OH); 5,14 (m, 1,5H, 0.5 (H-2') e 5'-  
-OH); 4,51 (m, 1H, H-3'); 3,99 (m, 1H, H-4'); 3,70 (m, 2H,  
H <sub>$\alpha$</sub> -5' e H <sub>$\beta$</sub> -5').

Exemplo 24

Preparação de 9-(2-desoxi-2-fluoro-5-O-L-valinil-β-D-ribofuranosil)-adenina e do seu sal bis-cloridrato

A uma solução de 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)adenina (500 mg; 1,86 mmol), de FMOC L-valina (820 mg; 1,3 equivalentes) e de DMAP (10 mg) em DMF seco (14 ml) à temperatura de 0°C adicionou-se uma solução de DCC (diciclohexil-carbo-di-imida) (250 mg; 1,35 equivalentes) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml) sob agitação. Deixou-se a mistura atingir a temperatura ambiente, agitou-se durante 90 minutos e depois evaporou-se in vacuo. Após evaporação conjunta com etanol removeu-se o resíduo com CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1) e filtrou-se. A seguir evaporou-se o filtrado e depois submeteu-se a cromatografia intermitente sobre SiO<sub>2</sub>, tendo-se efectuado a eluição com um gradiente de EtOH em CHCl<sub>3</sub> (5%-10%).

A fracção cuja eluição ocorreu primeiro era o 3',5'-bis-ester (230 mg) contendo um pouco de diciclohexil-ureia. A segunda fracção foi o 3'-monoester e a terceira foi o 5'-monoester (190 mg).

O ester valinato protegido por FMOC na posição 5' foi depois tratado com uma solução de piperidina (1 ml) em DMF (4 ml) à temperatura ambiente durante 5 minutos, depois evaporou-se in vacuo, dissolveu-se em água (25 ml) e lavou-se com CHCl<sub>3</sub> (30 ml). Evaporou-se a água para proporcionar uma goma incolor a qual foi removida com uma solução aquosa de ácido acético e depois evaporou-se e co-evaporou-se com etanol e éter para proporcionar o éster 5'-O-valinato com o aspecto de um sólido amorfo higroscópico (100 mg).

Anal. C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> · 1,5 CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H · 1,5 H<sub>2</sub>O

Calculado: C 44,53; H, 6,23; N, 17,32

Encontrado: C 44,38; H, 6,32; N, 16,94

p. f. : Decompõe-se acima de 150°C.

Preparou-se o sal bis-cloridrato dissolvendo o éster 5'-O-valinato em isopropanol seguindo-se a adição de isopropanol previamente saturado com ácido clorídrico gasoso e depois evaporou-se o solvente. Removeu-se o sólido branco com MeOH e precipitou-se com éter à temperatura de 0°C. A filtração proporcionou o sal bis-cloridrato.

Anal.  $C_{15}H_{21}FN_6O_4 \cdot 2HCl \cdot 0.5 H_2O$

Calculado: C 40,00; H, 5,37; N, 18,67

Encontrado: C 40,26; H, 5,19; N, 18,74

p. f. 210-213° (dec.)

#### Exemplo 25

Bis-cloridrato de 2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina

A uma solução de 2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina (300 mg; 1,11 mmol) em MeOH (20 ml) adicionou-se isopropanol (2,5 ml) previamente saturado com ácido clorídrico (HCl) gasoso. Adicionou-se lige acetona (15 ml) e evaporou-se a solução praticamente até à secagem no vácuo e à temperatura ambiente. A trituração com acetato de etilo (15 ml) proporcionou um sólido branco o qual foi filtrado e lavado com éter.

p. f. 160-163° (dec)

Anal.  $C_{10}H_{12}FN_5O_3 \cdot 2HCl$

Calculado: C, 35,01; H, 4,12; N, 20,42; F, 5,55

Encontrado: C, 34,79; H, 4,23; N, 20,32; F, 5,66.

#### Exemplo 26

Bis-cloridrato de 2,6-diamino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina

A uma solução de 2,6-diamino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina (300 mg; 1,06 mmol)

em MeOH (30 ml) adicionou-se isopropanol (2 ml) previamente saturado com HCl gasoso. Evaporou-se a solução até se obter um pequeno volume (5 ml) à temperatura ambiente, e depois adicionou-se-lhe EtOH (15 ml) para precipitar o bis-cloridrato no estado sólido e de cor branca.

p.f. 165-168°C (dec)

Anal.  $C_{10}H_{13}FN_6O_3 \cdot 2 HCl$

Calculado: C, 33,62; H, 4,23; N, 23,53; F, 5,32

Encontrado: C, 33,54; H, 4,24; N, 22,98; F, 5,33.

#### Exemplo 27

#### Sal sódico de 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-guanina

Ao composto 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-guanina (50 mg; 0,175 mmol) adicionou-se uma solução de NaOH (7 mg) em água (2 ml) e aqueceu-se a mistura suavemente até se obter uma solução límpida. Depois liofilizou-se a solução para proporcionar o composto em epígrafe no estado sólido e de cor branca.

p.f. 185-190°C (dec)

Anal.  $C_{10}H_{11}FN_5O_4 \cdot N, 1,75 H_2O$

Calculado: C, 35,45; H, 4,31; N, 20,67

Encontrado: C, 35,59; H, 4,33; N, 20,64

#### Exemplo 28

#### Cloridrato de 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)guanina

A uma solução de 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)guanina (300 mg; 1,05 mmol) em MeOH (200 ml) adicionou-se uma solução de isopropanol (2 ml) previamente saturado com HCl gasoso, seguindo-se a adição de acetona (50 ml). Evaporou-se a solução até se obter um pequeno volume (30 ml), adicionou-se acetona (150 ml) e reduziu-se

novamente o volume da mistura para um valor menor. Repetiu-se esta operação sendo o volume final de 10 ml. Adicionou-se EtOH (20 ml) e depois adicionou-se EtOAc (40 ml). Deixou-se em repouso tendo-se observado a precipitação de um produto com o aspecto de um sólido branco.

p. f. 192-193°C (dec)

Anal.  $C_{10}H_{12}FN_5O_4 \cdot HCl \cdot 0.4 H_2O$

Calculado: C, 36,51; H, 4,23; N, 21,29; Cl, 10,77

Encontrado: C, 36,50; H, 4,54; N, 21,36; Cl, 10,90

#### Exemplo 29

#### Cloridrato de 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)adenina

A uma solução de 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)adenina (500 mg; 1,86 mmol) em MeOH em (40 ml) e água (10 ml) adicionou-se uma solução de isopropanol (15 ml) previamente saturado com HCl gasoso. Evaporou-se a solução no vácuo à temperatura ambiente e triturou-se com EtOH (25 ml) para proporcionar o composto em epígrafe no estado sólido e de cor branca.

p. f. 205-210°C (dec)

Anal.  $C_{10}H_{12}FN_5O_3 \cdot HCl$

Calculado: C, 39,29; H, 4,29; N, 22,91; Cl, 11,60

Encontrado: C, 39,36; H, 4,34; N, 22,89; Cl, 11,52

#### Exemplo 30

#### 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)adenina-5'-monofosfato

Dissolveu-se 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)adenina (do Exemplo 8; 0,47 g; 1,7 mmol) em 7 ml de 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetra-hidro-2(1H)-pirimidinona. Após o arrefecimento desta solução para a temperatura de 8°C em banho



de gelo/metanol adicionou-se-lhe 0,64 ml de oxiclreto de fósforo (7 mmol) sob agitação vigorosa. Decorridos três minutos interrompeu-se a reacção por adição de 10 ml de água fria. Manteve-se a mistura de reacção em banho de gelo durante 15 minutos e depois neutralizou-se para pH 8 utilizando hidróxido de amónio.

Efectuou-se a separação dos produtos de reacção recorrendo à cromatografia de permuta aniónica sobre "DEAE Sephadex A-25". Diluiu-se a mistura de reacção até 600 ml com água e aplicou-se a uma coluna de cromatografia contendo cerca de 80 ml de "DEAE Sephadex A-25" a qual havia sido previamente equilibrado com bicarbonato de amónio 50 mM. Lavou-se a coluna com 2,5 litros de bicarbonato de amónio 50 mM para se remover o fosfato inorgânico. Procedeu-se à eluição dos nucleótidos com 2 litros de um gradiente linear de bicarbonato de amónio 50-500 mM. Observou-se primeiro a eluição de 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina-5'-monofosfato e depois observou-se a eluição de 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina-3',5'-bisfosfato. Reuniu-se as fracções que continham cada um nucleótido e procedeu-se à secagem no vácuo para a remoção da água e do bicarbonato de amónio.

Obteve-se o composto 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina-5'-monofosfato sob a forma de sal de amónio em conformidade com o esquema anterior, mas o sal sódico, neste caso, é o sal farmacologicamente desejado. Permutou-se o sal de amónio pelo sal sódico utilizando resina de permuta iónica "Dowex 50". Preparou-se uma solução de 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina-5'-monofosfato (1,3 mmol) em 10 ml de água e aplicou-se a uma coluna contendo cerca de 10 ml de Bio Rad AG50W-X8 (forma sódica) a qual havia sido previamente equilibrada com água. O nucleótido foi eluído com água. Procedeu-se à combinação das fracções que continham o composto 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina-5'-monofosfato e liofilizou-se para proporcionar

0,49 g (1,2 mmol); 72% de rendimento),

RMN-<sup>1</sup>H d (d<sub>6</sub>-DMSO)  $\delta$  8,0 (1H, s, H<sub>2</sub>), 7,7 (1H, s, H<sub>8</sub>)  
5,7 e 5,9 (1H, dd, H<sub>1'</sub>, separado por H<sub>2'</sub>, F), 4,8 e 5,0 (1H,  
dd, H<sub>2'</sub>, separado por H<sub>1'</sub>, F), 4,1 (1H, m, H<sub>3'</sub>), 3,9 (1H, m,  
H<sub>4'</sub>), 3,6 (2H, m, H<sub>5'</sub>)

RMN-<sup>1</sup>H d, (D<sub>2</sub>O) 8,5 (1H, s, H<sub>2</sub>), 8,2 (1H, s, H<sub>8</sub>), 6,3 e  
6,5 (1H, d, H<sub>1'</sub>, separado por H<sub>2'</sub>, F), 5,3 e 5,6 (1H, d, H<sub>2'</sub>,  
separado por H<sub>1'</sub>, F), 4,7 (1H, m, H<sub>3'</sub>), 4,4 (1H, m, H<sub>4'</sub>),  
4,1 (2H, m, H<sub>5'</sub>).

RMN 31P,  $\delta$  (D<sub>2</sub>O) 1,46 (s)

Espectro de UV: em HCl, 0,1M,  $\lambda$  max a 256 nm; em fosfato de  
amônio 400 mM, pH 5,5,  $\lambda$  max a 259 nm; em fosfato de  
potássio 50 mM, pH 7,0, max a 259 nm; em Na OH 0,1M,  
max a 259 nm.

O espectro de massa proporcionou dois  
picos principais para os fragmentos iônicos com os pesos  
moleculares de 270 e 136, correspondentes respectivamente  
ao composto 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina.

A clivagem total que origina o nucleósido  
foi observada após incubação com 5'-nucleotidase (Sigma).

Proporções base/fosfato = 1,00/1,03. Deter-  
minou-se a concentração total de fosfato pelo método de Ames,  
B.N. em "Methods in Enzymology" Vol. 8 pp. 115-118, 1966.  
Determinou-se a concentração de nucleos-base recorrendo ao  
coeficiente de extinção dos nucleósidos por U.V.

### Exemplo 31

9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-adenina-5'-monofos-  
fato (EMAP)

Effectuou-se a combinação dos compostos 9-  
-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina (do Exemplo 8;

1,2 mg; 4,3 mmol); fosfato de p-nitrofenilo (22  $\mu\text{mol}$ ) (solução 1M de reserva ajustada para pH 5,4 com ácido acético) e 0,05 ml de fosfotransferase dos nucleósidos provenientes de Serratia marcescens [A. Fyfe; et al., J. Biol. Chem. 253 8721-8727 (1978) e Patente Norte Americana nº 4 136 175, 23 de Janeiro, 1979] com água para proporcionar um volume final de 0,22 ml. Efectuou-se a incubação à temperatura de 37°C durante a noite. Com toda a mistura de reacção produziu-se uma mancha numa placa de celulose para cromatografia de camada fina preliminar e depois efectuou-se o processamento em n-propanol/15 M de  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ : 6/3/1. Após a secagem da placa raspou-se a área que continha os nucleótidos e procedeu-se à eluição desses nucleótidos a partir de celulose com água. Obteve-se o composto 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina-5'-monofosfato com o rendimento de 25% (1,1  $\mu\text{mol}$ ).  
Espectro UV: em água,  $\lambda$  max a 257 nm.

Este composto foi completamente clivado pela fosfatase alcalina e pela 5'-nucleotidase para proporcionar o nucleósido 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina.

Proporção base/fosfato = 1/8, indicando a contaminação por fosfato inorgânico,

### Exemplo 32

#### 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina-3',5'-bisfosfato

Obteve-se o composto 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina-3',5'-bifosfato sob a forma de sal de amónio após evaporação de fracções provenientes de uma coluna de permuta iónica (do Exemplo 30) (0,35 mmol; 20% de rendimento).

Observou-se o diagrama característico de manchas por CCF após incubação com nuclease P1 (Boehringer

Mannheim), fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim), 3-nucleotidase (Sigma) e 5'-nucleoridase. A fosfatase alcalina clivou completamente o composto 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina-3',3'-bifosfato proporcionando o nucleósido original; a nuclease P1 e a 3-nucleotidase clivaram-no para proporcionar o composto 9-(2-desoxi-2-fluoro-2- $\beta$ -D-ribofuranosil)adenina-5'-monofosfato e a 5'-nucleotidase são o clivou. Estes resultados são consistentes com aquilo que se sabe sobre estas enzimas e com o que se sabe de outros análogos de fosfato dos nucleósidos conhecidos.

Espectro de UV: em fosfato de amónio 400 mM, pH 5,5, máximo a 259 nm.

### Exemplo 33

#### 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina-5'-monofosfato

Procedeu-se à combinação dos compostos 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina (do Exemplo 7; 0,9 mg; 2,9  $\mu$ mol), fosfato de p-nitrofenilo (solução 1M de reserva ajustada para pH 5,4 com ácido acético) e 0,04 ml de fosfotransferase dos nucleósidos provenientes de Serratia marcescens [Fyfe, et al., J. Biol. Chem. 253, 8721-8727 (1978) e Patente Norte Americana nº 4 136 175, de 23 de Janeiro, 1979] com água para proporcionar um volume final de 0,15 ml. Efectuou-se a incubação à temperatura de 37°C durante a noite. Com toda a mistura de reacção produziu-se uma mancha sobre uma placa de celulose para cromatografia de camada fina preliminar e depois efectuou-se o processamento em n-propanol/15 M de  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ :6/3/1. Após a secagem da placa raspou-se a área que continha os nucleótidos e depois efectuou-se a eluição desses nucleótidos a partir da celulose com água. Obteve-se o composto 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina-5'-monofosfato com um rendimento de 11% (0,33  $\mu$ mol). Espectro de UV: em água, máximo a 248 nm, pico a 267 nm.



Este composto foi totalmente clivado pela fosfatase alcalina e pela 5'-nucleotidase para proporcionar o nucleósido 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina.

Proporção base/fosfato = 1/30, indicando contaminação por fosfato inorgânico.

#### Exemplo 34

#### 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guaninina-5'-monofosfato (FGMP)

Dissolveu-se o composto 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina (0,0158 g;  $5,2 \times 10^{-5}$  mol) em 0,2 ml de fosfato de trietilo e arrefeceu-se para a temperatura de  $-8^{\circ}\text{C}$ . Adicionou-se-lhe oxiclreto de fosforo (0,015 ml;  $1,6 \times 10^{-4}$  mol) de uma só vez, sob agitação, e tapou-se o vaso de reacção com uma folha de alumínio para proteger os reagentes contra a luz. Deixou-se a temperatura variar até  $0^{\circ}\text{C}$  e agitou-se durante 4 horas. Depois temperou-se a reacção adicionando-lhe gelo e a seguir ajustou-se o valor do pH para 7 utilizando NaOH 1N. Extraiu-se esta solução aquosa com  $\text{CHCl}_3$  ( $2 \times 2$  ml). Registou-se o pH da solução aquosa para o valor 7,5.

Purificou-se este composto por cromatografia com "DEAE Sephadex" por um processo identico ao utilizado com "2'-FAMP" do Exemplo 30, mas com um gradiente de bicarbonato de amónio variável entre 50-600 mM. O rendimento na obtenção do sal de amónio foi de 40%, 9 mg; 0,02 mmol.

Espectro de OV: em HCl 0,1 M,  $\lambda$  max a 254 nm, pico a 275 nm.

Este composto foi completamente clivado pela fosfatase alcalina e pela 5'-nucleotidase para

proporcionar o nucleósido 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina.

Proporção base/fosfato = 1.0/0,9.

### Exemplo 35

9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina-5'-trifosfato (FGTP)

Sintetizou-se o trifosfato enzimáticamente a partir do 5'-monofosfato. Procedeu-se à incubação de 5 mg (12  $\mu$ mol) de 2'-FGMP do Exemplo 34 à temperatura de 37°C num volume final de 2 ml com (concentração final): trifosfato de adenosina, 10 mM, PIPES de potássio, 50 mM, pH 6.8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, piruvato de fosfoenol 12,5 mM, 4 UI/ml de difosfato-quinase dos nucleósidos (Boehringer Mannheim), 0,77 UI/ml de guanilato-quinase (Boehringer Mannheim) e 20 UI/ml de piruvato-quinase (Boehringer Mannheim). Verificou-se a existência de pequenas quantidades de 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina-5'-difosfato (FGDP) por CLER de permuta iónica analítica, mas o produto predominante foi 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina-5'-trifosfato. Procedeu-se ao seu isolamento recorrendo à CLER de permuta iónica preliminar em coluna de Whatman Partisil SAX Magnum 9, tendo-se feito a eluição com um gradiente de fosfato de potássio variável entre 10 mM - 1 M, pH 3,5. Purificou-se ainda as fracções que continham o composto 2'-FGTP sobre "DEAE Sephadex" conforme descrito no Exemplo 30. Após a secagem das fracções obteve-se 7 mg de 2'-FGTP sob a forma de sal de diamónio (80%; 10  $\mu$ mol).  
Espectro de UV: em HCl 0.1M,  $\lambda$  max a 254 nm, picr a 275 nm; em NaOH 0.1M,  $\lambda$  max a 255-262 nm.

Proporção base/fosfato = 1,0/2,5.

Exemplo 36

9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina-5'-trifosfato

Incubou-se 50 mg (120  $\mu$ mol) de 2'-FGMP, preparado por um processo análogo ao do Exemplo 34, à temperatura de 37°C num volume final de 20 ml de com (concentração final): trifosfato de adenosina 10 mM, PIPES de potássio 50 mM, pH 6,8, MgH<sub>2</sub> 10 mM, piruvato de fosfo-eanol 12,5 mM, 4 U.I./ml de difosfato-quinase dos nucleósidos (Boehringer Mannheim), 0,77 U.I./ml guanilato-quinase (Boehringer Mannheim) e 20 U.I./ml piruvato-quinase (Boehringer Mannheim). Verificou-se a existência de pequenas quantidades de 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina-5'-difosfato por CLER de permuta iônica analítica, mas o produto predominante foi o composto 9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)guanina-5'-trifosfato. Isolou-se este composto recorrendo a CLER de permuta iônica preliminar em coluna de Whatman Partisil SAX Magnum 9 tendo-se feito a eluição com um gradiente de fosfato de potássio variável desde 10 mM a 1 M, pH 3,5. As fracções que continham 2'-FGTP ainda foram purificados sobre "DEAD Sephadex" conforme descrito no Exemplo 30. Após a secagem das fracções obteve-se 50 mg de 2'-FGTP na forma de sal de diamónio mas estava contaminado com difosfato de adenosina, 2'-FGDP e trifosfato de adenosina. Repetiu-se depois a purificação por CLER preliminar sobre "DEAD Sephadex". Obteve-se o sal de triamónio (36 mg; 64  $\mu$ mol, 50% de rendimento).

Espectro de UV: em HCl 0,1 M,  $\lambda$  max a 254 nm, pico 275 nm.

Proporção base/fosfato = 1,0/2,9.

Exemplo 37

2,6-diamino-9-(2-desoxi-2-fluoro-3,5-di-O-pivaloil- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina e 2,6-diamino-9-(2-desoxi-2-fluoro-5-O-pivaloil- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina

A uma solução de 2,6-diamino-9-(2'-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina (100 mg; 0,35 mmol) numa solução de DMF (3 ml) e de Et<sub>3</sub>N (0,3 ml) adicionou-se anidrido trimetil-acético (78  $\mu$ l) e agitou-se a solução à temperatura ambiente durante a noite. Depois adicionou-se mais 80  $\mu$ l de anidrido trimetil-acético e manteve-se a agitação durante 3 dias. A seguir temperou-se a mistura com NaOH, evaporou-se in vacuo e submeteu-se a cromatografia intermitente sobre  $^{10}O_2$ , fazendo-se a eluição com CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH (30:1), (20:1), (10:1) (6:1), (4:1) e finalmente (3:1). Deste modo obteve-se o bis-ester (74 mg) com o aspecto de um semi-sólido incolor após trituração com éter.

p.f. 143-145°C (dec.)

Espectro de massa de alta resolução (I.E.):

Encontrado: 368.1612 C<sub>15</sub> H<sub>21</sub> FN<sub>6</sub> O<sub>4</sub> calculado 368.1608.

A recolha e a evaporação das fracções apropriadas proporcionou também o ester mono-5'-pivalato (16 mg).

p.f. 123-125°C.

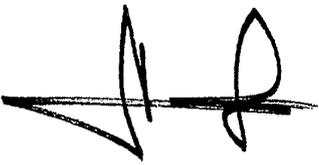
Espectro de alta resolução (I.E.)

Encontrado: 452,2181 C<sub>20</sub> H<sub>29</sub> FN<sub>6</sub> O<sub>5</sub> calculado: 452.2183.

### Exemplo 38

2-Amino-6-benzil-amino-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina

Combinou-se 2-amino-6-benzil-amino-purina (0,2 g; 0,83 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracilo (0,244 g; 1 mmoles) com 10 ml de tampão de fosfato de potássio 10 mM, pH 6,8. Adicionou-se-lhe 8 200 unidades de fosforilase da timidina e 7 850 unidades de fosforilase dos nucleósidos da purina (Krenitsky,



et al Biochemistry, 20, 3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 444) e agitou-se a mistura à temperatura de 45°C durante 40 horas. Efectuou-se o isolamento do produto adicionado-lhe metanol (15 ml), removendo os sólidos por filtração e evaporando o metanol em presença de 10 ml de gel de sílica, Aplicou-se o gel seco na cabeça de uma coluna de sílica (5 x 23 cm) e procedeu-se à eluição do produto com clorofórmio/metanol (99:1). Efectuou-se a combinação das fracções que continham apenas o produto e removeu-se o solvente no vácuo tendo-se obtido 0,097 g de 2-amino-6-benzil-amino-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina.

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz) :  $\delta$  7,95 (s, 1 H, H<sub>8</sub>), 7.85 (b, 1H, NH), 7.2-7.5 (m, 5H, fenilo), 6.04 (dd, 1H, H<sub>2</sub>, J<sub>1,2</sub>=16,4 Hz, J = 3.1 Hz), 5.93 (b, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.64 (d, 1H, OH, J = 5,9 Hz), 5.44, 5.17 (dt, 1H, H<sub>2</sub>), 5.26 (t, 1H, OH<sub>5</sub>), 4.64 (br, 2H, 4,38 (m, 1H H<sub>3</sub>), 3,9 (br, 1H, H<sub>4</sub>), 3.5-3.75 (m, 2H, H<sub>5</sub>).

É possível efectuar a redução do composto anterior em conformidade com os procedimentos de V. du Vigneaud e O.K. Behrens *J. Biol. Chem.* 117, 27 (1937).

### Exemplo 39

2-amino-6-benzil-tio-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina

Utilizando 2-amino-6-benzil-tio-purina (Sigma Chemical Company; 0,8 g; 3,1 mmoles) e 1(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracilo (0,4 g; 1,7 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J. F. Codington et al., (*J. Org. Chem.* 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 20 ml de tampão de fosfato de potássio 10 mM, pH 7.0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-se-lhe fosforilase da timidina (2 640 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (4 360 U.I.) (T.A. Krinitsky e outros, *Biochemistry* 20:3615. 1981 e Pa-

tente Norte Americana nº 4 381 344) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Ao 21º dia diluiu-se a mistura de reacção até 150 ml com tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio e adicionou-se-lhe 4 000 U.I. de fosforilase da timidina e 6 500 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 43º dia diluiu-se a mistura de reacção até 250 ml com água e adicionou-se-lhe 2 000 U.I. de fosforilase da timidina e 3 250 U.I. de fosforilase dos nucleósidos da purina. Ao 69º dia ajustou-se o pH da mistura de reacção para o valor 7,1 utilizando KOH. Ao 77º dia evaporou-se a mistura de reacção. Dissolveu-se o resíduo em metanol/água quente e aplicou-se a uma coluna de 2,5 x 7 cm de resina de permuta aniónica (Bio-Rad AGLX2-forma de hidróxido) e procedeu-se à eluição do produto como metanol/água (9/1). Efectuou-se a combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em acetoneitrilo/água (49/1) e aplicou-se a uma coluna de 2,5 x 20 cm de gel de sílica 60 (EM Science). Efectuou-se a eluição do produto com acetoneitrilo/água (49/1). Procedeu-se à combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Com o resíduo preparou-se uma suspensão em água e liofilizou-se para proporcionar 0,201 g do composto em epígrafe cuja análise revelou ser 0,1 hidrato. p.f. 180°C.

UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ); HCl 0,1N, 322,5 (11,8), 250 (10,6); pH 7, 311,5 (14,2), 247 (14,3); NaOH 0,1N, 312 (14,0), 247 (13,5).

Anal. Calc. para  $C_{17}H_{18}FN_5O_3S.O.1 H_2O$ :

Calculado: C, 51,93; H, 4,66; N, 17,81; F, 4,83; S, 8,15

Encontrado: C, 51,96; H, 4,66; N, 17,86; F, 4,68; S, 8,15.

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8.19 (s, 1H, H-8), 7.47 d-d-aparente, 2H, Ar, J = 7.6Hz), 7.28 (m, 3H, Ar), 6.74 (sb, 2H, 2-NH<sub>2</sub>), 6.10 (dd, 1H, H-1', J<sub>F</sub>, 1'=16.6Hz, J = 2,4 Hz), 5.68 (d, 1H, 3'-OH, J = 6.4Hz), 5.32 (ddd, 1H, H-2',



$J_{F,2'} = 53.0$  Hz,  $J_{1',2'} = 2,4$  Hz,  $J_{2',3'} = 4.4$  Hz, 5.15 (t, 1H, 5'-OH,  $J = 6.0$  Hz, 4.55 (quarteto ab, 2H, 6-SCH<sub>2</sub>,  $J$  geminado = 13.7 Hz), 4.41 (m, 1H, H-3'), 3,94 (m, 1H, H-4'), 3.74 (m, 1H, H<sub>α</sub>-5'), 3,58 (m, 1H, H<sub>β</sub>-5').

#### Exemplo 40

#### 42,6-diamino-9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosil)-9H-purina

Utilizando 2,6-diamino-purina (Pacific chemical Laboratories: 2,0 g; 12,7 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro-α-D-ribofuranosil)uracilo (0,8 g; 3,5 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J.F. Codington et al., (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 500 ml de tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-se-lhe foiforilase da timidina (41 700 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (83 300 U.I.) (T. A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) cuja absorção havia sido feita sobre 10.5 g de DEAE-celulose (25 ml) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Decorridas 24 horas adicionou-se-lhe 2,0 g de 1,6-diamino-purina e aumentou-se a temperatura até 50°C. Decorridas mais 24 horas filtrou-se a mistura de reacção. Lavou-se o resíduo da filtração com água e procedeu-se à combinação dos filtrados e à remoção do solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água quente e ajustou-se o pH para o valor de 9,4 utilizando NH<sub>4</sub>OH. Aplicou-se a solução a uma coluna de 2,5 x 13 cm de resina de permuta aniónica (Bio-Rad AG1X2-forma de hidróxido). Após a lavagem da coluna com água procedeu-se à eluição do produto com metanol/água (9/1). Efectuou-se a combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Tratou-se o resíduo conforme descrito anteriormente. Procedeu-se à combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo.

Dissolveu-se o resíduo em água e liofilizou-se para proporcionar 0,89 g do composto em epígrafe cuja análise revelou ser 0,5 hidrato.

p.f. 125-127°C

UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): pH 7, 279,5 (9,52, 256 (9.06);

Anal. Calc. para  $C_{10}H_{13}FN_6O_3 \cdot 0.5 H_2O$ :

Calculado: C, 40,96; H, 4,81; N, 28,66; F, 6,48

Encontrado: C, 41,03; H, 4,80; N, 28,69; F, 6,50.

A estrutura ainda foi confirmada por RMN-<sup>1</sup>H.

#### Exemplo 41

#### 2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina

Utilizando 2-amino-purina (Pacific Chemical Laboratories; 3,9 g; 22,2 mmoles) e 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracilo (0,5 g; 2,0 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J.F. Codington et al., (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 25 ml de tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Adicionou-se-lhe fosforilase da timidina (41 700 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (83 300 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) cuja absorção havia sido efectuada sobre 10,5 g de DEAE-celulose (25 ml) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Decorridas 24 horas adicionou-se-lhe 3,0 g de 2,6-diamino-purina e aumentou-se a temperatura até 50°C. Decorridas mais 24 horas filtrou-se a mistura de reacção. Lavou-se o resíduo da filtração com água e procedeu-se à combinação dos filtrados e removeu-se o solvente no vácuo. Com o resíduo preparou-se uma suspensão em água e filtrou-se. Extraiu-se o resíduo da filtração com água (25°C) até não ficar nenhum pro-

duto no aglomerado da filtração. Procedeu-se à combinação dos filtrados, ajustou-se o pH para o valor 9,4, utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$  e aplicou-se a solução a uma coluna de 2,5 x 20 cm de resina de permuta aniônica (Bio-Rad AGLX2-forma de hidróxido). Após a lavagem da coluna com água procedeu-se à eluição do produto com metanol/água (9/1). Efectuou-se a combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em clorofórmio/metanol/água (75:25:4) e aplicou-se a uma coluna de 5 x 25 cm de gel de sílica 60. Efectuou-se a eluição do produto com clorofórmio/metanol/água (75:25:4). Procedeu-se à combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água quente e filtrou-se através de uma membrana filtrante com poros de 0,22  $\mu\text{m}$ . A liofilização do filtrado proporcionou 0,50 g do composto em epígrafe cuja análise revelou ser 0,5 hidrato. p.f. 153-155°C.

UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ): pH 7, 304 (6,35), 243,5 (5,95).

Anal. calc.: para  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FN}_5\text{O}_3 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ :

Calculado: C, 43,17; H, 4,71; N, 25,17; F, 6,83  
Encontrado: C, 43,08; H, 4,74; N, 25,11; F, 6,89

A estrutura foi ainda confirmada por RMN-<sup>1</sup>H.

Exemplo 42

2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-6-metoxi-9H-purina.

Utilizando 2-amino-6-metoxi-purina (2,0 g; 12 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com R.W. Balsiger e J.A. Montgomery (J. Org. Chem. 20:1573, 1960) e utilizando 1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)uracilo (0,88 g; 3,6 mmoles) cuja preparação pode ser efectuada em conformidade com J. F. Codington

et al., (J. Org. Chem. 29:558, 1964) preparou-se uma suspensão em 250 ml de tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0, contendo 0,04% (p/v) de azida de potássio. Ajustou-se o pH da suspensão para o valor de 7,0, utilizando KOH. Adicionou-se-lhe fosforilase da timidina (41 700 U.I.) e fosforilase dos nucleósidos da purina (83 300 U.I.) (T.A. Krenitsky e outros, Biochemistry 20:3615, 1981 e Patente Norte Americana nº 4 381 344) cuja absorção havia sido feita sobre 10,5 g de DEAE-celulose (25 ml) e agitou-se a suspensão à temperatura de 37°C. Decorridas 24 horas adicionou-se-lhe 1,0 g de 2-amino-6-metoxi-purina e 250 ml do tampão anterior e aumentou-se a temperatura até 50°C. Decorridas mais 24 horas filtrou-se a mistura de reacção. Lavou-se o resíduo da filtração com água e procedeu-se à combinação dos filtrados e a remoção do solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em água tépica e ajustou-se o pH para o valor 9,4 com NH<sub>4</sub>OH. Aplicou-se a solução a uma coluna de 2,5 x 15 cm de resina de permuta aniónica (Bio-Rad AG1X2-forma de hidróxido). Após a lavagem da coluna com água procedeu-se à eluição do produto com metanol/água (9/1). Efectuou-se a combinação das fracções que continham o produto e removeu-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo numa mistura tépida de água/metanol e filtrou-se através de uma membrana filtrante de nylon com poros de 0,22 um. A liofilização do filtrado proporcionou 0,91 g do composto cuja análise demonstrou ser 0,5 hidrato.

p.f. 200°C

UV  $\lambda$  max nm ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ); pH7, 279.5 (9.24), 247.5 (9.99).

Anal. Calc. para C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>4</sub>-0.5H<sub>2</sub>O:

Calculado: C, 42,86; H, 4.90; N, 22.72; F, 6,16

Encontrado: C, 42.93; H, 4.90; N, 22.73; F, 6.15

A estrutura foi confirmada ainda por RMN-<sup>1</sup>H.

Exemplo 43

2-amino-6-benziloxi-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina

Procedeu-se à combinação de 2-amino-6-benzil-oxi-purina (2,5 g; 10,3 mmoles) e 2'-desoxi-2'-fluoro-uridina (2,64 g; 10,8 mmoles) com 50 ml de tampão de fosfato de potássio 10 mM, pH 6,8. Adicionou-se 8 000 unidades de fosforilase da timidina a 21 600 unidades de fosforilase dos nucleósidos da purina e agitou-se a mistura à temperatura de 45°C. Decorridos 5 dias adicionou-se mais 16 000 de fosforilase da timidina e 21 600 unidades de fosforilase dos nucleósidos da purina e agitou-se a mistura de reacção durante 48 horas à temperatura de 45°C. A maior parte do produto encontrava-se no precipitado que foi removido por filtração e dissolvido em metanol. Isolou-se o produto por cromatografia sobre sílica utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etilo/clorofórmio/metanol (8:1:1). Procedeu-se à combinação apenas das fracções que continham o produto e evaporou-se o solvente para proporcionar 1,44 g de 2-amino-6-benziloxi-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina.

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz em DMSO):  $\delta$  8.11 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.3-7.5 (m, 5H, fenilo), 6.59 (br. 2H, NH<sub>2</sub>), 6.09 (dd, 1H, H<sub>1'</sub>, J<sub>F,1'</sub> = 16.5 Hz, J<sub>2,1'</sub> = 2.6 Hz), 5.66 (d, 1H, OH, J  $\times$  6.1 Hz), 5.48 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.25-5.53 (bd, 1H, H<sub>2'</sub>), 5.20 (m, 1H, OH<sub>5'</sub>), 4.3-4.5 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 3.9 (br, 1H, H<sub>4'</sub>), 3.5-3.8 (m, 2H, H<sub>5'</sub>).

A preparação do composto do Exemplo 7 a partir de 2-amino-6-benziloxi-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina efectua-se recorrendo ao procedimento de El Main et al., J. Org. Chem., 44, 3442 (1979).

## Formulações Farmaceuticas

Nos Exemplos de formulação que se seguem o termo "ingrediente activo" refere-se a qualquer composto de fórmula (I) ou a um seu sal farmacologicamente aceitável, por exemplo, os compostos dos Exemplos 6, 7, 9 e 12.

### Exemplo 44      Formulação para Pastilhas

Procedeu-se à preparação das formulações A, B e C que se seguem fazendo a granulação a seco dos ingredientes com uma solução de povidona, seguindo-se a adição de estearato de magnésio e posterior compressão.

	<u>mg/pastilha</u>	<u>mg/pastilha</u>
<u>Formulação A</u>		
(a) Ingrediente activo	250	250
(b) Lactose B.P.	210	26
(c) Povidona B.P.	15	9
(d) Glicolato de amido de sódio	20	12
(e) Estearato de magnésio	<u>5</u>	<u>3</u>
	500	300

	<u>mg/pastilha</u>	<u>mg/pastilha</u>
<u>Formulação B</u>		
(a) Ingrediente activo	250	250
(b) Lactose	150	-
(c) Avicel PH 101	60	26
(d) Povidona F.P.	15	9
(e) Glicolato de amido de sódio	20	12
(f) Estearato de magnésio	<u>5</u>	<u>3</u>
	500	300

Formulação C

	<u>mg/pastilha</u>
Ingrediente activo	100
Lactose	200
Amido	50
Povidona	5
Estearato de magnésio	<u>4</u>
	359

As formulações D e E que se seguem foram preparadas por compreensão directa dos ingredientes misturados.

Formulação D

	<u>mg/cápsula</u>
Ingrediente activo	250
Amido pregelatinizado NF15	<u>150</u>
	400

Formulação E

	<u>mg/cápsula</u>
Ingrediente activo	250
Lactose	150
Avicel	<u>100</u>
	500

Formulação F (Formulação de Libertação Controlada)

Preparou-se esta formulação por granulação a húmido dos ingredientes que se seguem, com uma solução de povidona, seguindo-se a adição de estearato de magnésio e posterior compressão.

	<u>mg/pastilha</u>
(a) Ingrediente activo	500
(b) Hidroxipropilmetilcelulose (Methocel K4M Premium)	112
(c) Lactose B.P.	53
(d) Povidona B.P.G.	28
(e) Estearato de magnésio	<u>7</u>
	700

A libertação do fármaco ocorre durante um período de 6-8 horas e completa-se em 12 horas.

Exemplo 45 Formulações para Cápsulas

Formulação A

Prepara-se uma formulação para cápsulas misturando os ingredientes da Formulação D do Exemplo 4 anterior e procedendo depois ao enchimento de cápsulas de gelatina dura constituídas por duas peças.

Formulação B

	<u>mg/cápsula</u>
(a) Ingrediente activo	250
(b) Lactose B.P.	143
(c) Glicolato de amido de sódio	25
(d) Estearato de magnésio	<u>2</u>
	420

As cápsulas foram preparadas misturando os ingredientes anteriores e procedendo ao enchimento de cápsulas de gelatina dura de duas peças.

Formulação C

	<u>mg/cápsula</u>
(a) Ingrediente activo	250
(b) Microgol 4000 BP	<u>350</u>
	600

As cápsulas forma preparadas fundindo o componente "Macrogol 4000 BP", dispersando o ingrediente activo naquele componente fundido e enchendo com a mistura de fusão cápsulas de gelatina dura constituídas por duas peças.

Formulação D

	<u>mg/cápsula</u>
Ingrediente activo	250
Lecitina	100
Óleo araquídico	<u>100</u>
	450

As cápsulas foram preparadas dispersando o ingrediente activo na lecitina e no óleo araquídico e depois, como essa dispersão, procedeu-se ao enchimento de cápsulas de gelatina elástica e macia.

Formulação E (Cápsula de Libertação Controlada)

Procedeu-se à preparação das formulações para cápsulas de libertação controlada que se seguem, fazendo a extrusão dos ingredientes (a), (b) e (c) utilizando uma extrusora, seguindo-se a esterificação do extrudado e a secagem. A seguir procedeu-se ao revestimento (d) e a seguir procedeu-se ao enchimento de cápsulas de gelatina dura constituídas por duas peças.

	<u>mg/cápsula</u>
(a) Ingrediente activo	250
(b) Celulose microcristalina	125
(c) Lactose BP	125
(d) Etil-celulose	<u>13</u>
	513

Exemplo 46    Formulação injectável

Formulação A

Ingrediente activo	0,200g
Solução de ácido clorídrico 0,1M	q.s. para pH entre 4,0 e 7,0
Solução de hidróxido de sódio 0,1M	q.s. para pH entre 4,0 e 7,0
Água estéril	q.s. para 10 ml

Dissolveu-se o ingrediente activo na maior parte da água (35-40°C) e ajusta-se o pH para um valor entre 4,0 e 7,0 utilizando ácido clorídrico ou hidróxido de sódio, conforme apropriado. Depois ajustou-se o volume do lote com água e filtrou-se através de um filtro microporoso estéril e procedeu-se ao enchimento de frascos de vidro de cor âmbar e estéril com a capacidade de 10 ml (tipo 1) e efectuou-se a sua vedação com tampas e cintas estéreis.

Formulação B

Ingrediente activo	0,125 g
Tampão fosfato com pH 7 sem pirogénios e estéril,	q.s. até 25 ml.

Exemplo 47    Injecção Intramuscular

Ingrediente activo	0,20 g
Alcool benzílico	0.10 g
Glicofurol 75	1.45 g
Água para injeções q.s. até	3.00 ml

Dissolveu-se o ingrediente activo no glicofurol. Depois adicionou-se-lhe o álcool benzílico e dissolveu-se e adicionou-se água até 3 ml. A seguir filtrou-se a mistura através de um filtro microporoso estéril e procedeu-se ao enchimento de frascos de vidro cor de ambar com a capacidade de 3 ml, estéreis que foram vedados (tipo 1).

Exemplo 48      Xarope

Ingrediente activo	0.25 g
Solução de sorbitol	1.50 g
Glicerol	2,00 g
Benzoato de sódio	0.005 g
Aroma de pêssego 17.42.3169	0.0125 ml
Água purificada	5.00 ml

Dissolveu-se o ingrediente activo numa mistura de glicerol e da maior parte da água purificada. Adicionou-se-lhe uma solução aquosa de benzoato de sódio a essa solução e depois seguiu-se a adição da solução de sorbitol e finalmente adicionou-se o aroma. Ajustou-se o volume com água purificada e misturou-se muito bem.

Exemplo 49      Cápsulas de Pó para Inalação

Ingrediente activo (pó de 0,5-0,7 um)	4 mg
Lactose (pó de 30-90 um)	46.0 mg

Misturou-se os pós muito bem até se obter homogeneidade e procedeu-se ao enchimento de cápsulas de gelatina dura com as dimensões adequadas contendo cada cápsula 50 mg de mistura.

Exemplo 50      Aerossol para Inalação

Ingrediente activo (pó de 0,5-7,0 um)	200 mg
Trioleato de sorbitano	100 mg
Sacarina de sódio (pó de 0,5-0,7 um)	5 mg
Metanol	2 mg
Triclorofluorometano	4,2 g
Diclorodifluorometano      até	10,0 ml

Dissolveu-se o trioleato de sorbitano e o metanol no tricloro-fluoro-metano. Com a sacarina de sódio e com o ingrediente activo preparou-se uma dispersão nessa mistura a qual foi depois transferida para um recipiente de aerossol adequado e injectou-se-lhe o dicloro-metano através de um sistema de válvula. Esta composição proporcionou 2 mg de ingrediente activo em cada dose de 100 ul.

Actividade anti-vírica

Procedeu-se ao ensaio de estirpes de gripe A e B em monocamadas de células embrionárias de pintainhos em tabuleiros de cavidade múltiplas. Determinou-se a actividade dos compostos em função do rendimento de redução ou de acordo com o ensaio de redução em placa, em que se infecta uma monocamada celular com uma suspensão de vírus da gripe e depois cobre-se com meio líquido (redução de produção) ou com agarose nutriente sob a forma de um gel para garantir que não há disseminação do vírus através da cultura (redução em placa). Incorporou-se no meio/cobertura de agarose nutriente uma concentração variável de composto de molaridade conhecida. Exprime-se a produção de vírus ou o nú-

mero de placas para cada concentração pela percentagem de controlo e traça-se uma curva dose/resposta. A partir dessa curva avalia-se a concentração inibidora a 50% ( $CI_{50}$ ). Ensaia-se o Virus Sincicial Respiratório (VSR) em células BS-C-1 (células do rim do Macaco Verde Africano) recorrendo a um ensaio idêntico de redução de focus/placas. Os resultados encontram-se representados nos Quadros I e II que se seguem.

Avaliou-se a actividade inibidora in vivo para as estirpes de gripe A e B num modelo de pulmão/tecido intranasal do ratinho. Os ratinhos foram infectados com vírus através de um aerossol num compartimento fechado e depois foram tratados com os compostos de ensaio em diversos momentos após a infecção através de diversas vias, incluindo a oral, a intraperitoneal e por aerossol. Os ratinhos foram sacrificados decorridas 24 horas e procedeu-se à preparação de suspensões de tecidos pulmonar a 10% e efectuou-se a sua trituração em presença do vírus. Os resultados foram registados indicando uma redução do desenvolvimento do vírus por comparação com os controlos não tratados.

### Referências

Appleyard, G and Maber, H. B. Plaque Formation by Influenza Viruses in the Presence of Trypsin. *J. Gen. Virol.*, 25, 351-357. (1974). Collins, P. and Bauer, D. J. Relative Potencies of Anti-Herpes Compounds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 284, 49-59, (1977). Hayden, F. G. Cotek, M. and Douglas, R.G., Plaque Inhibition Assay for Drug Susceptibility Testing of Influenza Viruses. *Antimicro Agents and Chemo.* 17. 865-870. (1980). Tisdale, M. and Bauer, D. J. A comparison of test methods in influenza chemotherapy. *J. Antimicrobio. Chemother.* 1 suppl. 55-62 (1975).

Quadro I

<u>Ex. Nº</u>	<u>Composto</u>				<u>Actividade anti-gripe</u>	
	R1	R2	X	Y	Células de CI <sub>50</sub> / $\mu$ M	log <sub>10</sub> da redução no ratinho em titulação vímica (média de 5 ra- tinhos)
6	OH	OH	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	0,6	+(2.1)
7	OH	OH	OH	NH <sub>2</sub>	0.8-2	+(2.4)
8	OH	OH	NH <sub>2</sub>	H	4	+(2.3)
9	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	-	+(1.6)
12	OH	OH	OMe	NH <sub>2</sub>	0.4	+(1.9)

Quadro I

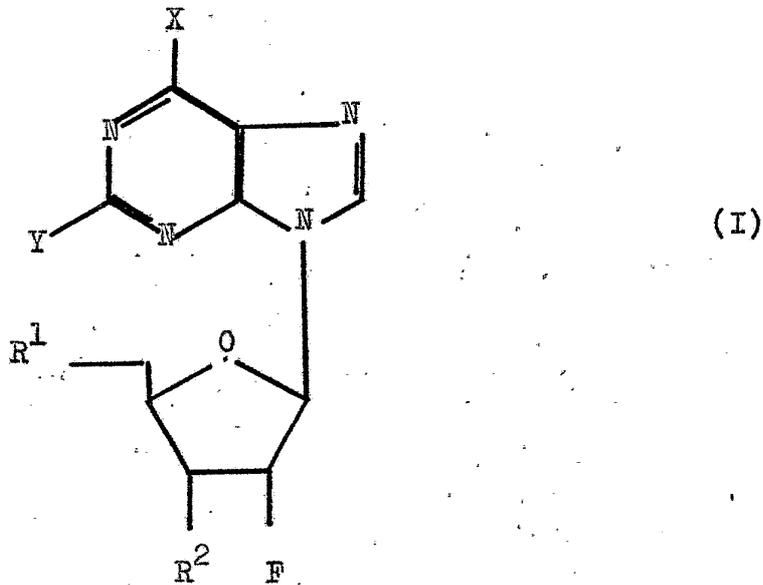
<u>Ex. Nº</u>	<u>Composto</u>				<u>Virus anti-sincicial respira- tório</u>	
					Células BS-C-1 CI <sub>50</sub> / $\mu$ M	
7	OH	OH	OH	NH <sub>2</sub>	26.2	
12	OH	OH	OMe	NH <sub>2</sub>	6.3	



## REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de um composto com a fórmula geral (I)



em que Y é hidrogénio ou  $\text{NH}_2$ ;

X representa um grupo  $-\text{NR}^3\text{R}^4$  no qual cada  $\text{R}^3$  e  $\text{R}^4$ , que podem ser iguais ou diferentes, representam hidrogénio; alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ), alquenilo ( $\text{C}_2-\text{C}_6$ ), ciclo-alquilo ( $\text{C}_3-\text{C}_7$ ), sendo cada grupo opcionalmente substituído por um ou mais halogéneos, ou X é um grupo  $\text{Z}-\text{R}^5$  no qual Z é oxigénio ou enxofre e  $\text{R}^5$  tem a mesma significação que  $\text{R}^3$ , ou X é halogéneo ou hidrogénio; e  $\text{R}^1$  e  $\text{R}^2$  que podem ser iguais ou diferentes, representam cada um;

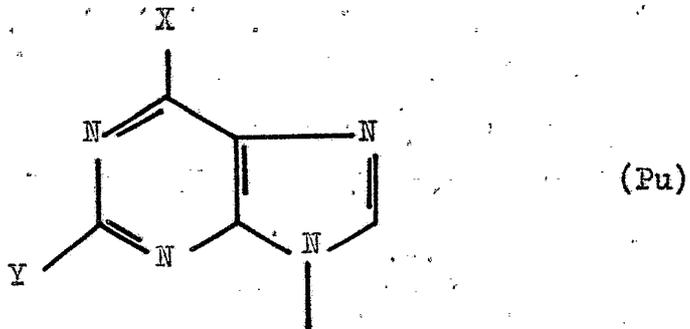
- um grupo hidroxi;
- um grupo  $-\text{OCOR}^6\text{H}$  em que  $\text{R}^6$  é um grupo divalente que é um alquilenilo ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ) de cadeia linear ou ramificada, alquenileno ( $\text{C}_2-\text{C}_6$ ) ou ciclo-alquilenilo ( $\text{C}_3-\text{C}_7$ ); sendo cada um opcionalmente substituído por um ou mais grupos hidroxi;

- um grupo  $-\text{OCO}_2\text{R}^7\text{H}$  em que  $\text{R}^7$  é uma ligação covalente ou é como definido para  $\text{R}^6$ ;
- um grupo  $-\text{OCOR}^6-\text{COOR}^8$  em que  $\text{R}^6$  é como definido anteriormente e  $\text{R}^8$  é seleccionado entre hidrogénio, ou alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ) de cadeia linear ou ramificada ou alquenilo ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ) sendo cada um opcionalmente substituído por um ou mais grupos hidroxí;
- um grupo  $-\text{OCOR}^7-\text{Z}-\text{Ar}$  em que  $\text{R}^7$  é como definido anteriormente, Z é ou é uma ligação covalente ou é oxigénio e Ar é um anel aromático eventualmente substituído por um ou mais halogéneos, alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ) ou alcoxi ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ );
- um grupo  $-\text{OR}^6\text{H}$  em que  $\text{R}^6$  é como definido anteriormente;
- um grupo  $-\text{OR}^6-\text{Z}-\text{Ar}$  em que  $\text{R}^6$ , Z e Ar são como definido anteriormente;
- um grupo  $-\text{OCOCHR}^9\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$  em que  $\text{R}^{10}$  e  $\text{R}^{11}$  são como definido para  $\text{R}^8$  e  $\text{R}^9$  é hidrogénio, alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_4$ ) de cadeia linear ou ramificada opcionalmente substituído por um ou mais grupos hidroxí, mercapto, alcoxi ( $\text{C}_1-\text{C}_3$ ) ou alquil-tio ( $\text{C}_1-\text{C}_3$ ), um grupo  $\text{R}^{12}-\text{A}$  em que  $\text{R}^{12}$  é um grupo alquileno ( $\text{C}_1-\text{C}_4$ ) opcionalmente substituído por um ou mais grupos hidroxí e A é um grupo  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{NH}_2$  ou  $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$  ou A é um sistema de anéis heterocíclicos ou cíclicos não aromáticos ou aromáticos de 4 a 11 membros possuindo entre 3 e 10 átomos de carbono e 0, 1, 2 ou 3 átomos de azoto no anel, sendo os átomos de carbono e/ou os átomos de azoto do anel opcionalmente substituídos por um ou mais grupos hidroxí;
- um grupo  $-\text{OCOR}^{13}$  em que  $\text{R}^{13}$  é um anel heterocíclico de 4 a 7 membros possuindo entre 3 e 6 átomos de carbono e 0, 1 ou 2 átomos de azoto, sendo os átomos

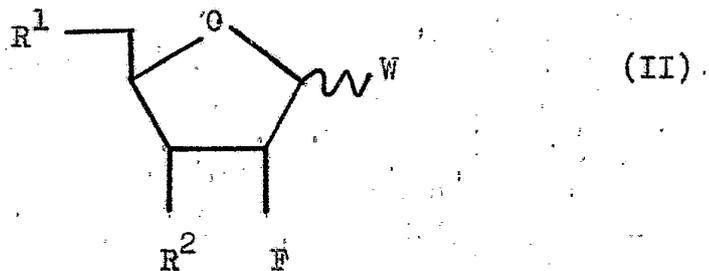
de azoto e/ou os átomos de carbono do anel opcionalmente substituídos por um ou mais grupos hidroxí; ou

um grupo ester de modo-, di- ou tri-fosfato ou de um seu sal farmacologicamente aceitável, caracterizado por:

A) se fazer reagir uma base de purina de fórmula PuH em Pu representa o resíduo purina;

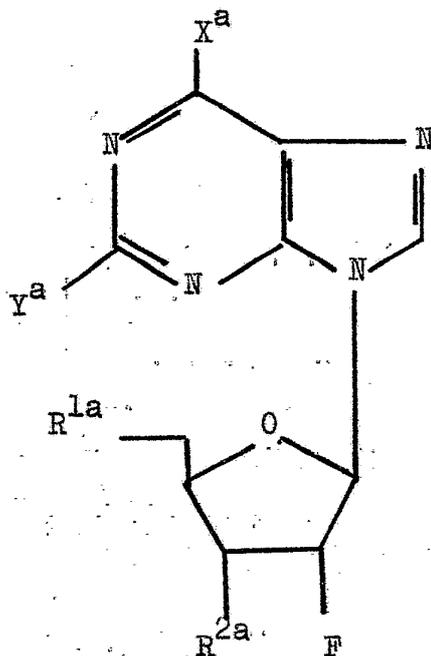


(em que X e Y são como definido anteriormente) ou um seu sal, com um composto de fórmula (II):



em que R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> são como definido anteriormente e W ou é um ester de fosfato ou um seu sal ou um radical de purina ou pirimidina (diferente de Pu) para formar um composto de fórmula (I):

B) se fazer reagir um composto de fórmula (III)



(III)

(em que  $X^a$ ,  $Y^a$ ,  $R^{1a}$  e  $R^{2a}$  representam respectivamente os grupos  $X$ ,  $Y$ ,  $R^1$  e  $R^2$  como definido anteriormente ou uma forma precursora, por ex. protegido, de tal grupo desde que pelo menos um de  $X$ ,  $Y$ ,  $R^1$  e  $R^2$  representa uma forma precursora) com um agente que serve para converter a referida forma precursora do grupo(s) no grupo(s) desejado; e depois ou simultaneamente se efectuar uma ou mais das seguintes conversões opcionais:

- i) se fazer reagir um composto de fórmula (I) em que pelo menos um de  $R^1$  e  $R^2$  é um hidroxí com um agente adequado que serve para converter o referido grupo hidroxí num grupo alternativo representado por  $R^1$  e/ou  $R^2$ .
- ii) se fazer reagir um composto de fórmula (I) em que  $R^1$  e/ou  $R^2$  não são hidroxí, com um agente que serve para converter o referido grupo  $R^1$  e/ou  $R^2$  num grupo hidroxí.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter um composto de fórmula I em que  $R^1$  e  $R^2$  ou são ambos OH, ou  $R^1$  é um monofosfato e  $R^2$  é OH; Y é H ou  $NH_2$  e X é um grupo  $-NR^3R^4$  no qual  $R^3$  e  $R^4$ , que podem ser iguais ou diferentes, representam H, alquilo ( $C_1-C_6$ ) ou X é um grupo  $Z-R^5$  no qual Z é O ou S e  $R^5$  é alquilo ( $C_1-C_6$ ) ou X é halogéneo ou hidrogénio, ou um seu sal farmacêuticamente aceitável,

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por se obter um composto de fórmula (I) em que  $R^1$  e  $R^2$  são ambos OH, Y é  $NH_2$  e X é H, OH,  $NH_2$  ou  $Z-R^5$  em que Z é O e  $R^5$  é alquilo ( $C_1-C_6$ ), ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

- 4ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter 2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina e seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

- 5ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter 2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-9H-purina e seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

-89-

- 6ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter 2-amino-9-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-ribofuranosil)-6-metoxi-9H-purina e seus sais farmacologicamente aceitáveis.

- 7ª -

Processo para a preparação de uma composição farmacéutica, caracterizado por se incorporar como ingrediente activo um composto de fórmula I quando preparado de acordo com as reivindicações anteriores, em associação com um veículo farmacologicamente aceitável.

A requerente declara que o primeiro pedido desta patente foi apresentado no Reino Unido em 11 de Setembro de 1989, sob o número 8920534.8.

Lisboa, 10 de Setembro de 1990

~~AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL~~

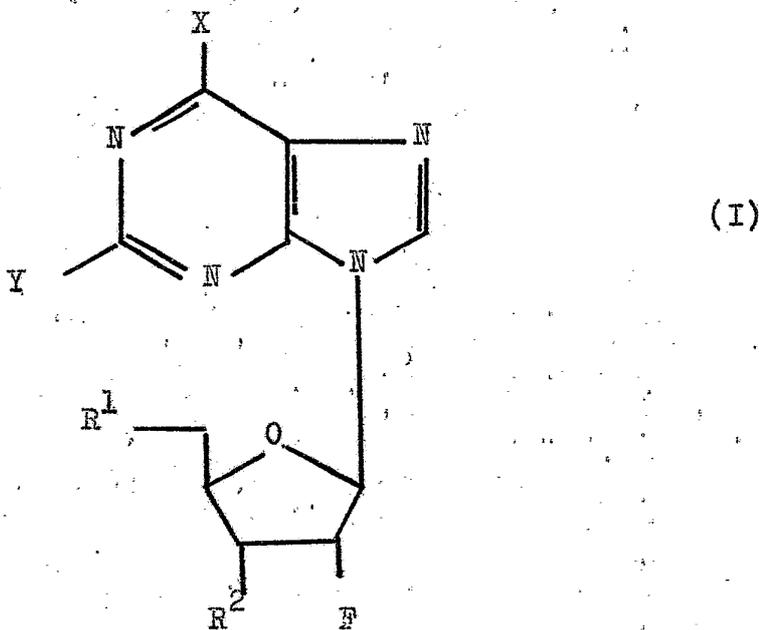


- 90 -

RESUMO

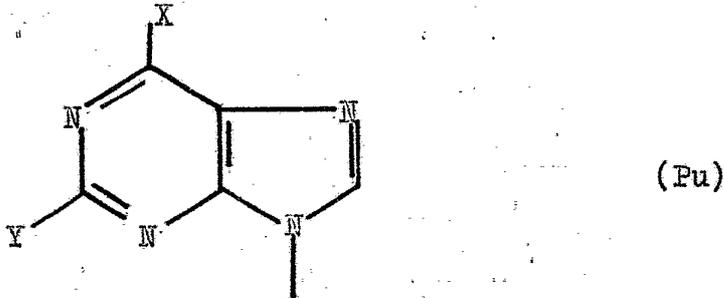
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE 2'-DESOXI-2'-  
-FLUORO-RIBONUCLEOSIDOS E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE  
OS CONTEM"

A invenção refere-se a um processo  
para a preparação de um composto de fórmula geral (I)

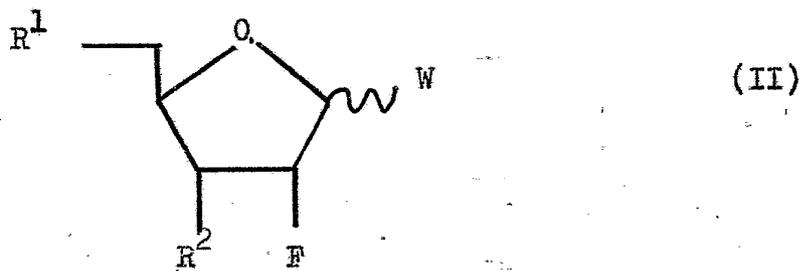


ou de um seu sal farmacologicamente aceitável, que compreen-  
de:

- A) fazer-se reagir uma base de purina de fórmula PuH  
em que Pu representa o resíduo purina:

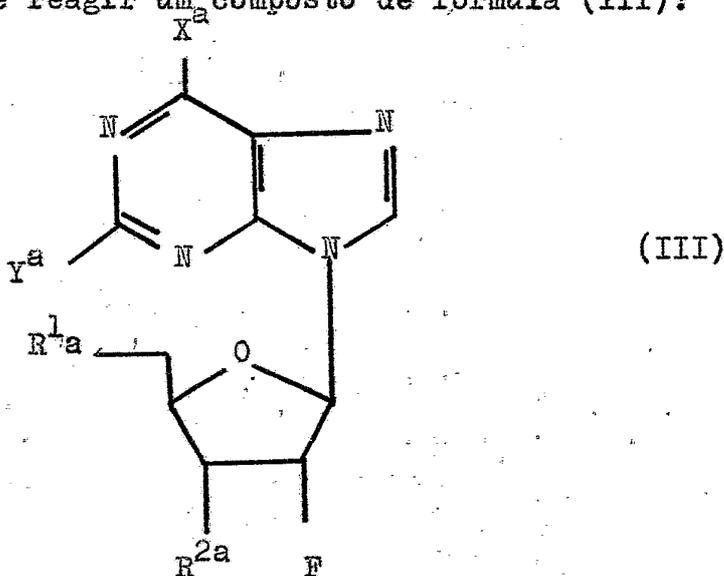


ou um seu sal, com um composto de fórmula (II):



para formar um composto de fórmula (I):

B) fazer-se reagir um composto de fórmula (III):



com um agente que serve para converter a forma precursora do grupo(s) no grupo(s) desejado:  
e depois ou simultaneamente efectuar-se uma ou mais das seguintes conversões opcionais:

- i) fazer-se reagir um composto de fórmula (I) em que pelo menos um de  $R^1$  e  $R^2$  é um grupo hidroxil com um agente adequado que serve para converter o referido grupo hidroxil num grupo alternativo representado por  $R^1$  e/ou  $R^2$ .
- ii) fazer-se reagir um composto de fórmula (I) em que  $R^1$  e/ou  $R^2$  não são hidroxil, com um agente que serve para converter o referido grupo  $R^1$  e/ou  $R^2$  num grupo hidroxil.