



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 656778 E**

(51) *Classificação Internacional:* (E.C. 6)
A61K031/52 A C07D405/04 B
C07D473/00 B C07F009/6561 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1993.08.25	(73) <i>Titular(es):</i> UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION INC 632 BOYD GRADUATE STUDIES RESEARCH CENTER ATHENS, GA 30602-7411 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1992.08.25 US 935515	EMORY UNIVERSITY 1364 CLIFTON ROAD, N.E., BOX M-11 ATLANTA, GA 30322 US
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1995.06.14	(72) <i>Inventor(es):</i> CHUNG K. CHU US RAYMOND F. SCHINAZI US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.05.30	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* NUCLEÓSIDOS DE BETA-D-DIOXOLANO SOB A FORMA DE ENANTIÓMEROS PUROS

(57) *Resumo:*

NUCLEÓSIDOS DE BETA-D- DIOXOLANO SOB A FORMA DE ENANTIÓMEROS
PUROS



DESCRIÇÃO


"NUCLEÓSIDOS DE β -D-DIOXOLANO SOB A FORMA DE ENANTIÓMEROS PUROS"

Antecedentes da invenção

A presente invenção situa-se no domínio de compostos orgânicos com actividade antiviral e da utilização dos mesmos para o tratamento de doenças virais, o qual inclui a administração de uma quantidade eficaz de um ou de vários dos compostos descritos.

Verificou-se que vários 2',3'-didesoxinucleósidos são agentes antivirais potentes contra o vírus da imunodeficiência humano (HIV), o agente etiológico do síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). O primeiro composto aprovado pela Food and Drug Administration dos E. U. para o tratamento da SIDA ou do complexo relacionado com a SIDA foi a AZT (3'-azido-2'-desoxitimidina, Mitsuya, H.; Broder, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1986 83, 1911). Até agora têm sido aprovados ou estão em curso de várias fases de ensaios clínicos outros nucleósidos sintéticos, incluindo a 2',3'-didesoxiinosina (DDI), a 2',3'-didesoxicitidina (DDC) (cfr. Yarchoan, R. et al., *Science*, 1989, 245, 412) e a 2'-fluoroarabinofuranosil-2',3'-didesoxicitidina (Martin, T.A., et al., *J. Med. Chem.*, 1990, 33, 2145; Sterzycki, R.Z., et al., *J. Med. Chem.*, 1990 33, 2150).

Após fosforilação celular por quinases celulares com obtenção do 5'-trifosfato, estes nucleósidos sintéticos podem ser incorporados numa cadeia em crescimento ou em ADN viral, causando a terminação da cadeia devido à ausência do grupo 3'-hidroxilo.



A estereoquímica dos derivados nucleósidos desempenha um papel importante na respectiva actividade biológica. A posição C1' da ribose no nucleósido (o átomo de carbono ligado ao azoto da base heterocíclica) é um centro quiral porque o carbono está ligado a quatro fracções diferentes. De modo análogo, há um centro opticamente activo em C4' do nucleósido (o átomo de carbono do anel está ligado ao grupo hidroximetilo que se encontra fosforilado nos nucleótidos). Nos nucleósidos de ocorrência natural, a base ligada ao átomo C1' e o grupo hidroximetilo ligado ao átomo C4' encontram-se na configuração β (para cima do plano do açúcar). Os isómeros α que não ocorrem na natureza (nos quais as fracções se situam para baixo do plano do açúcar) raramente possuem actividade biológica e normalmente são tóxicos.

Com o fim de tentar correlacionar a presença ou a ausência de determinadas características estereoquímicas com a elevada actividade contra o HIV, foi recentemente efectuada uma análise das conformações em estado sólido de seis agentes nucleósidos activos e de dois inactivos anti-HIV. Van Roey, P., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 2277; e Van Roey, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, 86, 3929.

Tem havido recentemente interesse na síntese de derivados nucleósidos em que o carbono 3' do nucleósido foi substituído por um heteroátomo. Norbeck, D.W., et al., em *Tet. Lett.*, 1989, 30, 6263, descreveram a síntese de (\pm) -1-[2 β ,4 β]-2-(hidroximetil)-4-dioxolanil]timina (em seguida referida como (\pm) -dioxolano-T, ver Figura 1), que resulta numa mistura racémica de diastereómeros em redor do átomo C4'. O produto é um derivado de 3'-desoxitimidina no qual o átomo C3' foi substituído por um átomo O3'. O produto foi sintetizado em cinco fases a partir de dimetilacetal do benziloxialdeído e de (\pm) -glicerato de metilo a fim de produzir um rendimento de 79 % da mistura diastereomérica 1:1. A análise por cristalografia de raios X do produto revelou que o anel de dioxolano adopta a conformação 3T_4 observada normalmente nos ribonucleótidos, com o



átomo O3' na posição endo. Norbeck descreve que a mistura racémica do dioxolano-T apresenta uma actividade anti-HIV de 29 μM em células ATH8 e atribuiu a baixa eficácia contra o vírus a um efeito da conformação endo do átomo O3'. Tetrahedron Letters 30 (46), 6246, (1989).

A Publicação de Pedido de Patente Europeia n.º 0 337 713 e a Patente US n.º 5 041 449, requeridas por IAF BioChem International, Inc., dão a conhecer que uma fórmula genérica de 1,3-dioxolanos substituídos em 2 e em 4 apresentam actividade antiviral.

Belleau et al., em Fifth International Conf. on AIDS, Montreal, Canadá 4 a 9 de Junho de 1990, artigo n.º T.C.O.1., relatam um método de síntese de nucleósidos de citidina que contêm oxigénio ou enxofre na posição 3'. O anel de dioxolano foi preparado pela condensação de $\text{RCO}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ com glicerina. Tal como na síntese de Norbeck, a síntese de Belleau dá como resultado uma mistura racémica de diastereómeros ao redor do átomo de carbono C4' do nucleósido. Belleau descreve que o análogo de enxofre, designado por NGBP-21 ou (\pm) BCH-189 (ver Figura 1), tem actividade anti-HIV.

O pedido de Patente Europeia n.º 92300056 depositado por Belleau dá a conhecer a utilização de BCH-189 para o tratamento do vírus da hepatite B (HBV).

A Patente US n.º 5 047 407 e a Publicação do Pedido de Patente Europeia n.º 0 382 526, também requeridos por IAF Biochem International, Inc., dão a conhecer que uma fórmula genérica de 1,3-oxatiolano substituído em 2 e em 5 possuem actividade antiviral.

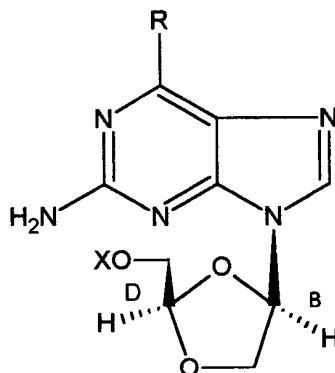
A Patente WO 92/10407 (EP 562 009) dá a conhecer uma síntese assimétrica para a preparação de nucleósidos de β -(D)-dioxolano, incluindo a (-)-(2R,4R)-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]guanina, que compreende a preparação de dioxolano

a partir de 1,6-anidromanose.

É um outro objecto da presente invenção proporcionar nucleósidos de dioxolano sob a forma de enantiómeros puros com actividade anti-HIV significativa.

Sumário da invenção

A utilização para o tratamento de seres humanos infectados com o HIV que inclui a administração de uma quantidade terapêutica para HIV de um nucleósido de purina de β -D-dioxolanilo da fórmula:



em que R é Cl, NH₂ ou H, ou um sal ou derivado farmacêutica-mente aceitável do composto, opcionalmente num veículo ou diluente farmacêutica-mente aceitável. O composto em que R é cloro é especificamente referido como (-)-(2R,4R)-2-amino-6-cloro-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]purina. o composto em que R é amina é a (-)-(2R,4R)-2-amino-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]adenina. O composto em que R á hidrogénio é a (-)-(2R,4R)-2-amino-9[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]purina.

Os nucleósidos de β -D-dioxolano especificamente dados a conhecer ou os seus derivados ou sais farmacêutica-mente aceitáveis ou as formulações farmacêutica-mente aceitáveis que contêm estes compostos são úteis para o tratamento de infecções por HIV e de outras condições relacionadas tais como o complexo relacionado com a SIDA (CRS), a linfadenopatia persistente



generalizada (LPG), condições neurológicas relacionadas com a SIDA, condições de anticorpos anti-HIV positivos e de HIV positivo, sarcoma de Kaposi, trombocitopenia púrpura e infecções oportunistas. Para além disso, estes compostos e estas formulações podem ser utilizados com fins profiláticos a fim de retardar a progressão de afecções clínicas em indivíduos que são positivos no que se refere a anticorpos anti-HIV ou antigénios de HIV ou que estiveram expostos ao HIV.

Numa outra forma de concretização, a presente invenção inclui a utilização para o tratamento de seres humanos infectados com HIV que inclui a administração de uma quantidade terapêutica em relação ao HIV de um pró-fármaco dos nucleósidos de purina de β -D-dioxolanilo sob a forma de enantiómeros puros especificamente dados a conhecer. Na presente descrição, designa-se por pró-fármaco um derivado farmacologicamente aceitável do nucleósido especificamente dado a conhecer, o qual será convertido no nucleósido após administração in vivo. São exemplos não limitativos os sais farmacologicamente aceitáveis (em alternativa referidos como "sais fisiologicamente aceitáveis") e os derivados acilados ou alquilados em 5' e N⁶ do composto activo (em alternativa referidos como derivados fisiologicamente ou farmacologicamente aceitáveis"). Numa outra forma de concretização, o grupo acilo é um éster carboxílico no qual a fracção não carbonilo do grupo éster é seleccionado de entre alquilo C₁-C₂₀ linear, ramificado ou cíclico, alcoxi-alquilo incluindo metoximetilo; aralquilo incluindo benzilo; ariloxialquilo como seja fenoximetilo; arilo incluindo fenilo opcionalmente substituído com halogénio, alquilo C₁ a C₄ ou alcoxilo C₁ a C₄; um ácido dicarboxílico tal como ácido succínico; ésteres de ácidos sulfónicos tais como alquil-sulfonilo ou aralquilsulfonilo incluindo metanossulfonilo; e os ésteres mono, di e trifosfatos.

Na acepção que lhe é dada na presente descrição, o termo alquilo inclui especificamente mas não está limitado a metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, isopropilo, isobutilo,




sec-butilo, t-butilo, isopentilo, amilo, t-pentilo, ciclo-pentilo e ciclo-hexilo. Na acepção que lhe é dada na presente descrição, o termo acilo inclui especificamente mas não está limitado a acetilo, propionilo, butirilo, pentanoílo, 3-metil-butirilo, hidrogenossuccinato, 3-clorobenzoato, benzoílo, acetilo, pivaloílo, mesilato, propionilo, valerilo, capríco, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico e oleico. As modificações do composto activo, especificamente nas posições N⁶ e 5'-O, podem afectar a biodisponibilidade e a velocidade de metabolismo da espécie activa, proporcionando deste modo um controlo da libertação da espécie activa.

O nucleósido de purina de β -D-dioxolanilo sob a forma de enantiómeros puros pode ser convertido num éster farmacologicamente aceitável por reacção com um agente de esterificação apropriado, por exemplo, um halogeneto ou um anidrido de ácido. O nucleósido ou o seu derivado farmacologicamente aceitável pode ser convertido num seu sal farmacologicamente aceitável de um modo convencional, por exemplo, por tratamento com uma base apropriada. O éster ou o sal pode ser convertido no nucleósido original, por exemplo, por hidrólise.

A presente invenção, tal como dada a conhecer, inclui também um processo assimétrico para a preparação de β -D-dioxolano-nucleósidos sob a forma de enantiómeros puros. O processo inclui a preparação inicial de (2R,4R)- e (2R,4S)-4-acetoxi-2-(oximetil protegido)-dioxolano a partir de 1,6-anidromanose, um açúcar que contém toda a estereoquímica necessária para o produto final sob a forma de enantiómero puro, incluindo a configuração diastereomérica correcta ao redor da posição 1 do açúcar (que dá origem à posição 4' do nucleósido que se vai formar).

O (2R,4R)- e o (2R,4S)-4-acetoxi-2-(oximetil protegido)-dioxolano são condensados com uma base heterocíclica pretendida na presença de SnCl₄, outro ácido de Lewis, ou de triflato de trimetilsililo num solvente orgânico tal como



dicloroetano, acetonitrilo ou cloreto de metileno a fim de proporcionar o nucleósido de dioxolano sob a forma estereoquimicamente pura.

Qualquer nucleósido de purina ou de pirimidina de β -D-dioxolano sob a forma de enantiómero puro pode ser preparado de acordo com o processo dado a conhecer no presente pedido de patente. O produto pode ser utilizado como uma ferramenta de investigação a fim de estudar a inibição de HIV in vitro ou pode ser administrado numa composição farmacêutica a fim de inibir o crescimento de HIV in vivo.

Breve descrição das figuras

A Figura 1A é uma ilustração da estrutura química da (\pm)-1-[(2 β , 4 β)-2-(hidroximetil)-4-(1,3-tioxolano)]timina (BCH-189).

A Figura 1B é uma ilustração da estrutura química da (\pm)-1-[(2 β , 4 β)-2-(hidroximetil)-4-(dioxolanil)]timina (dioxolano-T).

A Figura 2 é uma ilustração do método de síntese de β -D-(-)-dioxolano-timina sob a forma de enantiómero puro.

A Figura 3 é uma ilustração do método de preparação de uma variedade de nucleósidos de purina de β -D-(-)-dioxolanilo sob a forma de enantiómeros puros (reagentes: (a) TMSOTf, CH₂Cl₂; (b) NH₃, DME; (c) HSCH₂CH₂OH, NaOMe; (d) NH₃, EtOH; (e) n-Bu₄NF, THF.)

Descrição pormenorizada da invenção

O termo "sob a forma de enantiómero puro", conforme utilizado na presente descrição, refere-se a uma composição de nucleósidos que inclui pelo menos 97 % de um único enantiómero desse nucleósido.



I. Preparação de nucleósidos de dioxolano sob a forma de enantiómeros puros

Na preparação de nucleósidos de dioxolano sob a forma de enantiómeros puros deve ser tomado cuidado a fim de evitar condições acídicas fortes que poderiam provocar a cisão do anel de dioxolano. As reacções devem ser efectuadas, se possível, em condições básicas ou neutras e quando são necessárias condições acídicas o tempo de reacção deve ser minimizado.

A. Preparação de β -D-dioxolano-nucleósidos sob a forma de enantiómeros puros

O material de partida fundamental para a síntese de β -D-dioxolano-nucleósidos sob a forma de enantiómeros puros é a 1,6-anidromanose (composto 1, Figura 2). Este açúcar contém toda a estereoquímica necessária para o produto final sob a forma de enantiómero puro (ver por exemplo, o composto 1), incluindo a configuração diastereomérica correcta ao redor da posição 1 do açúcar (que se vai transformar na posição 4' do nucleósido a formar em seguida). A 1,6-anidromanose pode ser preparada de acordo com procedimentos descritos em Knauf, E.E.; Hann, R.M.; Hudson, C.S. *J. Am Chem. Soc.*, 1941, 63, 1447; e Zottola, M.A.; Alonso, R.; Vite, G.D.; Fraser-Reid, B. *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 6123. Em síntese anteriores de nucleósidos de dioxolano tinham sido utilizadas misturas racémicas de matérias primas para a preparação da fracção de ribose. Quando as sínteses se iniciam com uma mistura racémica de reagentes, obtinham-se misturas racémicas indesejáveis de produtos nucleosídicos enantioméricos. As misturas são muito difíceis de separar e aumentam de modo significativo o custo do produto final. Para além disso, a inclusão de isómeros que não ocorrem na natureza aumenta a toxicidade do produto.

A 1,6-anidromanose é convertida no respectivo derivado de isopropilideno com dimetoxipropano e ácido p-toluenossulfónico, o qual é benzoilado sem isolamento na posição 4, obtendo-se o



composto 2 (ver Figura 2). Pode-se também utilizar um grupo acilo para proteger a posição 4. O grupo isopropilideno do composto 2 é em seguida removido por uma quantidade catalítica de um ácido, tal como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fórmico, ácido trifluoroacético ou ácido sulfâmico, em dioxano aquoso a 60 % ou outro solvente orgânico adequado a uma temperatura entre os limites de aproximadamente 0 a 5 °C, obtendo-se (-)-1,6-anidro-4-O-benzoil- β -D-manopiranosose com um rendimento elevado sob a forma de um sólido branco.

Na fase seguinte, cinde-se com oxidação o glicol de (-)-1,6-anidro-4-O-benzoil- β -D-manopiranosose por tratamento com NaIO₄ em H₂O/EtOH (1:1) durante uma hora aproximadamente à temperatura ambiente de modo a obter o dialdeído correspondente. Pode também utilizar-se tetra-acetato de chumbo como oxidante para esta reacção. O dialdeído é imediatamente reduzido in situ com qualquer redutor adequado, incluindo NaBH₄, hidreto de diisobutilalumínio (DIBAL-H), boro-hidreto de lítio (LiBH₄) ou hidreto de bis(2-metoxietoxi)alumínio sódico (Red-Al) aproximadamente à temperatura ambiente ou abaixo desta. Sob as condições de reacção, o composto 4 é isomerizado por migração do benzoílo de uma posição secundária para uma posição primária, dando origem a (-)-(2R,4R)-4-(2-benzoxi-1-hidroxietil)-2-(hidroximetil)-dioxolano (composto 5, Figura 2).

A posição 2 do dioxolano é em seguida protegida com um grupo protector de oxigénio adequado, por exemplo, um grupo sililo trissubstituído tal como trimetilsililo, dimetil-hexil-sililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, tritilo, um grupo alquilo, grupos acilo tais como acetilo, propionilo, benzoílo, p-NO₂-benzoílo ou toluílo, metilsulfonilo ou p-toluilsulfonilo. Um grupo protector preferido é o t-butildifenilsililo. Após a protecção da posição 2 do dioxolano, o grupo benzoílo é removido da posição 2-hidroxietilo com uma base forte tal como metóxido de sódio ou amónia em metanol a uma temperatura de aproximadamente 0 a 50 °C, dando origem a



(-)-(2R,4R)-2-(O-metilo protegido)-4-(1,2-di-hidroxietilo)-dioxolano (composto 6, Figura 2) com um elevado rendimento.

Na fase seguinte, o grupo 1,2-di-hidroxietilo na posição 4 do dioxolano é convertido num ácido carboxílico com um oxidante tal como $\text{NaIO}_4/\text{RuO}_2$ ou tetra-acetato de chumbo a uma temperatura de aproximadamente 0 a 50 °C, dando origem a (+)-(2R,4R)-2-(oximetilo protegido)-4-carboxildioxolano (ver composto 7, Figura 2).

Leva-se então a efeito uma reacção de Hunsdiecker modificada (Dhavale, D.; et al., *Tetrahedron Lett.*, 1988, 29, 6163) em acetato de etilo com $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ para converter o (+)-(2R,4R)-2-(oximetilo protegido)-4-carboxildioxolano nos intermediários chave correspondentes (2R,4R)- e (2R,4S)-4-acetoxi-2-(oximetilo protegido)-dioxolano (ver composto 8, Figura 2) com elevado rendimento.

B. Condensação de uma base heterocíclica com o derivado de dioxolano

Na fase seguinte deste esquema reaccional, o dioxolano sob a forma de enantiómero puro preparado conforme descrito na Secção A. é condensado com uma base protegida na presença de triflato de trimetilsililo (trifluorometanossulfonato de trimetilsililo) ou de um ácido de Lewis num solvente orgânico seco.

Pode ser utilizado na reacção de condensação qualquer composto aromático, e em particular uma purina ou pirimidina, que contenha um azoto que é capaz de reacção com um centro de deficiência em electrões. As bases purínicas incluem, mas não são limitadas a adenina, hipoxantina, 2,6-diaminopurina, 6-amino-2-cloropurina, 2-aminopurina, N^6 -alquilpurinas, N^6 -benzilpurina, N^6 -halopurina e guanina. As bases pirimidínicas incluem, mas não são limitadas a timina, citosina, 6-azapirimidina, 2-mercaptopirimidina e uracilo. Os grupos



funcionais com oxigénio e azoto na base heterocíclica devem ser protegidos antes da condensação com o açúcar se ocorrerem reacções secundárias indesejáveis durante o procedimento de síntese. Os grupos protectores são bem conhecidos dos especialistas na técnica e incluem trimetilsililo, dimetil-hexilsililo, t-butildimetilsililo e t-butildifenilsililo, tritilmétilo, grupos alquilo, grupos acilo tais como acetilo e propionilo, metilsulfonilo e p-toluilsulfonilo.

Os catalisadores de Friedel-Crafts (ácidos de Lewis) que podem ser utilizados na reacção de condensação incluem SnCl_4 , ZnCl_4 , TiCl_4 , AlCl_3 , FeCl_3 , BF_3 -éter dietílico e BCl_3 . Estes catalisadores necessitam de condições anidras porque a presença de água reduz a sua actividade. Os catalisadores são também inactivados na presença de solventes orgânicos com hidrogénios activos, tais como álcoois e ácidos orgânicos. Os catalisadores são normalmente utilizados em solventes tais como dissulfureto de carbono, cloreto de metileno, nitrometano, 1,2-dicloroetano, nitrobenzeno, tetracloroetano, clorobenzeno, benzeno, tolueno, dimetilformamida, tetra-hidrofurano, dioxano ou acetonitrilo. O cloreto de alumínio anidro não é solúvel em dissulfureto de carbono. Niedballa et al., J. Org. Chem. 39, 25 (1974). O catalisador preferido é o SnCl_4 . O solvente preferido é o 1,2-dicloroetano. O triflato de trimetilsililo pode ser utilizado nas mesmas condições descritas anteriormente para os catalisadores de Friedel-Crafts. A reacção decorre a uma temperatura entre os limites de $-10\text{ }^\circ\text{C}$ a $200\text{ }^\circ\text{C}$. A escolha do catalisador para a condensação afecta a proporção no produto final entre nucleósidos α e β . Por exemplo, a condensação dos intermediários (2R,4R)- e (2R,4S)-4-acetoxi-2-(t-butildifenilsililoximetil)-dioxolano (composto **8**, Figura 2) com timidina sililada na presença de triflato de trimetilsililo em CH_2Cl_2 deu origem a uma mistura de (-)-1-[(2R,4R)-2-(t-butildifenilsililoximetil)-4-dioxolanil]timina **9- β** (45 %) e (+)-1-[(2R,4S)-2-(t-butildifenilsililoximetil)-4-dioxolanil]timina **10- α** (29 %). No entanto, a reacção com SnCl_4 deu origem exclusivamente ao isómero β **9** com traços do isómero α **10**



detectável por CCF.

Os derivados de purina dissustituídos em 2,6 foram sintetizados pela condensação do acetato **8** com a 6-cloro-2-fluoropurina sililada, dando origem a uma mistura ($\alpha/\beta=1/1,3$) de **14** e **13** (Figura 3). O isómero N⁷ inicialmente formado foi novamente convertido no isómero N⁹ durante a agitação de um dia para o outro à temperatura ambiente. A amostra analítica foi obtida a partir da separação da mistura α, β dos isómeros individuais **13** e **14** por CCF preparativa utilizando CH₂Cl₂ / acetona (19:1) como solventes de desenvolvimento. No entanto, para o objectivo de preparação dos produtos finais **21-24**, a mistura de **13** e **14** foi tratada com NH₃ em DME (Robins, M.J.; Vznanski, B. Nucleic acid related compounds. 34. Non-aqueous Diazotization with tert-Butyl nitrite. Introduction of Fluorine, Chlorine, and Bromine at C-2 of Purine Nucleosides. *Can. J. Chem.* **1981**, 2608) dando origem a uma mistura de **21-24**, a qual foi separada nos isómeros individuais **15** (24 %), **16** (18,6 %), **17** (25,8 %) e **18** (16 %). Os derivados de guanina **19** e 2,6-diamina **20** foram preparados por tratamento de **15** com 2-mercaptoetanol / NaOMe e amónia em etanol, respectivamente. Os nucleósidos livres **21-26** foram obtidos por meio de tratamento dos correspondentes nucleósidos sililados em 5' com n-Bu₄NF com bons rendimentos. Os isómeros α **23** e **24** foram também preparados por um procedimento semelhante ao dos isómeros β .

Na fase final deste método de preparação de (-)- β -D-dioxolano-nucleósidos sob a forma de enantiómeros puros, remove-se a protecção da posição 5'-O do nucleósido. A dessililação pode ser levada a efeito com vários reagentes, incluindo ácido acético, ácido trifluoroacético, fluoreto de hidrogénio, fluoreto de n-tetrabutílamónio, fluoreto de potássio e cloridrato de piridínio. Por exemplo, a dessililação dos compostos **9** e **10** com fluoreto de tetrabutílamónio dá origem aos nucleósidos livres pretendidos **11** e **12**, respectivamente (Figura 2). Para a execução em escala industrial é preferido o



ácido acético por razões de economia. Outros reagentes para a dessililação são conhecidos dos especialistas na técnica. A desacilação é levada a efeito em ácido ou base. Os 5-O-éteres podem ser cindidos com BCl_3 ou iodeto de trimetilsililo.

O método de preparação de β -D-dioxolano-nucleósidos é ilustrado mais em pormenor nos exemplos que se seguem. O Exemplo 1 descreve em pormenor um método para a preparação de (2R,4R)- e (2R,4S)-4-acetoxi-2-(t-butildifenilsililoximetil)-dioxolano (composto **8**, Figura 2). O Exemplo 2 descreve a preparação de (-)-1-[(2 β ,4 β)-2-(hidroximetil)-4-dioxolanil]-timina, referido como (-)- β -D-dioxolano-T. A enumeração de compostos no Exemplo 2 refere-se a estruturas apresentadas na Figura 2. O Exemplo 3 proporciona exemplos pormenorizados para a preparação de vários nucleósidos de β -D-dioxolanilo sob a forma de enantiómeros puros, incluindo a (-)-(2R,4R)-2-amino-6-cloro-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]guanina e (-)-(2R,4R)-2-amino-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]adenina.

Exemplo 1 Preparação de (2R,4R)- e (2R,4S)-4-acetoxi-2-(t-butildifenilsililoximetil)dioxolano (Composto 8).

(-)-1,6-Anidro-2,3-isopropilideno-4-O-benzoíl- β -D-manopiranosose

Misturou-se 1,6-anidro- β -D-manopiranosose (composto 1) com acetona (800 ml) e metanol (300 ml) e agitou-se durante aproximadamente trinta minutos até que se obteve apenas um sólido em partículas soltas. Adicionaram-se em seguida dimetoxipropano (300 ml) e ácido p-toluenossulfónico (5 g) e agitou-se a mistura durante 2 horas.

A mistura reaccional foi em seguida alcalinizada com trietilamina (pH 8) e filtrada a fim de remover o material sólido branco. O solvente foi evaporado e o resíduo foi retomado em acetato de etilo e em seguida cristalizado a fim de obter 4 gramas do produto derivado com o grupo 2,3-isopropilideno sob a



forma de agulhas transparentes.

A uma solução de 1,6-anidro-2,3-isopropilideno- β -D-manopiranosose (5,01 g, 0,025 mol) em piridina (40 ml) adicionou-se gota a gota cloreto de benzoílo (3,74 ml, 0,062 mol) a 0 °C. A mistura foi agitada durante 45 minutos a 0 °C. Adicionou-se em seguida gel à mistura reaccional a fim de remover o excesso de cloreto de benzoílo. O solvente foi evaporado sob vácuo e o resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (200 ml). A camada orgânica foi lavada com água, NaHCO₃ e salmoura. O material resultante foi seco sobre MgSO₄ anidro, filtrado e em seguida evaporado, tendo-se obtido (-)-1,6-anidro-2,3-isopropilideno-4-O-benzoíl- β -D-manopiranosose bruto (composto 2, 8,7 g) sob a forma de um sólido amarelado.

(-)-1,6-Anidro-4-O-benzoíl- β -D-manopiranosose (3)

A uma solução de (-)-1,6-anidro-4-O-benzoíl-2,3-isopropilideno- β -D-manopiranosose 2 (10,0 g, 32,6 mmol) em dioxano aquoso a 60 % (820 ml) adicionou-se H₂SO₄ concentrado (3,36 ml). A mistura foi agitada a 70~80 °C durante 15 horas e em seguida arrefecida num banho de gelo, neutralizada com NaHCO₃ e concentrada até restar metade do volume original. A solução foi em seguida extraída com acetato de etilo e as camadas orgânicas combinadas foram lavadas com solução saturada de NaHCO₃ e água, secas e evaporadas, tendo-se obtido o composto 3 sob a forma de um sólido branco. O sólido foi cristalizado a partir de CH₂Cl₂/n-hexano, tendo-se obtido o composto 3 (7,4 g, 85,3 %) sob a forma de um sólido branco: $[\alpha]_D^{25} -154,7^\circ$ (C, 0,21 MeOH); RMN ¹H (DMSO-d₆): δ 3,56-4,61 (m, 5H, 2,3,5,6-H), 4,82 (d, J=8,1 Hz, 1H, OH D₂O permutável), 5,02 (s, 1H, 4-H), 5,09 (d, J=3,7 Hz, 1H, OH, D₂O permutável), 5,28 (s, 1H, 1-H), 7,46-8,05 (m, 5-H, Ar-H) ; IV (KBr) 3410, 1710 cm⁻¹; Análise Calculado para C₁₃H₁₄O₆: C, 58,64; H, 5,31, Determinado: C, 58,51; H, 5,34.

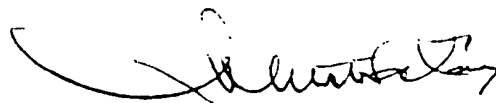


(-)-(2R,4R)-4-(2-Benzoxi-1-hidroxi-etil)-2-(hidroximetil)-dioxolano (5).

A uma solução de **3** (7,4 g, 27,8 mmol) em etanol a 95 % (200 ml) adicionou-se uma solução de NaIO₄ (6,54 g, 30,7 mmol) em água (200 ml). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora. Após verificação para assegurar a conversão completa do diol no dialdeído por cromatografia em camada fina, a mistura reaccional foi concentrada até metade do volume original. Adicionou-se metanol (200 ml) ao resíduo e arrefeceu-se a mistura até 50 °C. Adicionou-se boro-hidreto de sódio (4,2 g, 111,0 mmol) à mistura em pequenas porções durante 5 minutos e agitou-se a mistura a 50 °C durante 10 minutos, neutralizou-se com ácido acético glacial e concentrou-se, tendo-se obtido o composto **3** bruto sob a forma de um óleo amarelo. O óleo foi purificado por cromatografia em coluna através de gel de sílica, tendo-se obtido o composto **3** puro sob a forma de um óleo incolor, o qual foi a partir de éter dietílico / n-hexano, tendo-se obtido **5** (6,12 g, 82 %) sob a forma de um sólido branco: $[\alpha]^{25}_D -18,5^\circ$ (C 0,20, metanol); RMN ¹H (DMSO-d₆): δ 3,47 (dd, J=5,9, 3,7 Hz, 2H, CH₂OH), 3,72-4,14 (m, 4H, 4, 5-H e CHOH), 4,27-4,95 (m, 2H, CH₂OBz), 4,81-4,95 (m, 2-H e pri OH), 5,43 (d, J=5,5 Hz, 1H, sec OH, D₂O permutável), 7,43-8,09 (m, 5H, Ar-H); Análise Calculado para C₁₃H₁₆O₆: C, 58,19; H, 6,02. Determinado: C, 58,09; H, 6,01.

(-)-(2R,4R)-4-(2-Benzoxi-1-hidroxi-etil)-2-(t-butildifenil-sililoxi-metil)dioxolano.

A uma solução de **3** (2,8 g, 10,4 mmol) e imidazolo (2,04 g, 30,0 mmol) em dimetilformamida (40 ml) adicionou-se cloreto de t-butildifenilsililo (3 ml, 11,5 mmol). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas. A mistura reaccional foi evaporada, tendo-se obtido um óleo amarelo, que foi purificado por cromatografia em coluna através de gel de sílica, tendo-se obtido o composto **4** (4,48 g, 85 %) sob a forma de um óleo incolor; $[\alpha]^{25}_D -14,2^\circ$ (C 0,26, metanol); RMN ¹H (DMSO-d₆): δ



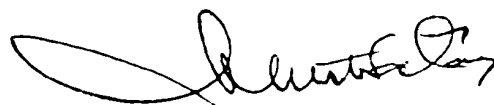
1,00 (s, 9H, t-Bu), 3,68-3,87 (m, 3H, CH₂OTBDPS e CHOH), 3,98-4,16 (m, 3H, 4,5-H), 4,20-4,55 (m, 2H, CH₂OBz), 5,07 (t, J=3,3 Hz, 1H, 2-H), 5,47 (d, J=5,7 Hz, 1H, OH, D₂O permutável), 7,40-8,33 (m, 10H, Ar-H); Análise Calculado para C₂₉H₃₄O₆Si: C, 68,73; H, 6,79, Determinado: C, 68,86; H, 6,83.

(-)-(2R,4R)-2-(t-Butildifenilsililoximetil)-4-(1,2-di-hidroxi-etil)-dioxolano (6).

A uma solução de (-)-(2R,4R)-4-(2-benzoxi-1-hidroxi-etil)-2-(t-butildifenilsililoxi-metil)-dioxolano (2,52 g, 5,0 mmol) em metanol (40 ml) adicionou-se uma solução 0,078 M de metóxido de sódio (7,3 ml) em metanol. Agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante duas horas. A mistura foi neutralizada com ácido acético e concentrada. O resíduo foi em seguida partilhado entre acetato de etilo e água e a camada aquosa foi extraída com acetato de etilo. As camadas orgânicas reunidas foram lavadas com solução saturada de NaHCO₃ e em seguida com água, depois foram secas, evaporadas e purificadas por cromatografia em coluna através de gel de sílica, tendo-se obtido **6** (1,9 g, 95 %) sob a forma de um óleo incolor: $[\alpha]_D^{25} -2^\circ$ (C 0,25, MeOH); RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 1,00 (s, 9H, t-Bu), 3,40-3,52 (m, 3H, CH₂OH e CHOH), 3,64 (d, J=3,7 Hz, 2H, CH₂OTBDPS), 3,82-3,95 (m, 3H, 4,5-H), 4,49 (t, J=5,3 Hz, 1H, pri OH, D₂O permutável), 4,82 (d, J=5,1 Hz, 1H, sec OH, D₂O permutável), 5,01 (t, J=3,7 Hz, 1H, 2-H), 7,36-7,71 (m, 10H, Ar-H); Análise Calculado para C₂₂H₃₃H₃₀O₅Si: C, 65,63; H, 7,53, Determinado: C, 65,72; H, 7,52.

(+)-(2R,4R)-2-(t-Butildifenilsililoximetil)-4-carboxildioxolano (7).

A uma solução bifásica de **6** (1,6 g, 4,0 mmol) em CH₃CN (8 ml), CCl₄ (8 ml) e H₂O (12 ml) adicionou-se NaIO₄ (3,59 g, 16,8 mmol) e hidrato de RuO₂ (8,5 mg). A mistura foi agitada vigorosamente à temperatura ambiente durante 5 horas. Adicionou-se cloreto de metileno (40 ml) à mistura. A fase



orgânica foi separada. A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 . As fases orgânicas reunidas foram lavadas com água, filtradas através de um leito de celite e em seguida concentradas, tendo-se obtido o composto **7** bruto (1,2 g, 77,4 %) sob a forma de um óleo negro, que foi utilizado na reação seguinte sem qualquer purificação adicional. Para fins analíticos, o composto **7** bruto foi purificado por cromatografia em coluna através de gel de sílica, tendo-se obtido o composto **7** sob a forma de uma espuma branca: $[\alpha]_D^{25} + 15,7^\circ$ (C 0,28, MeOH); RMN ^1H (DMSO- d_6) δ 0,99 (s, 9H, t-Bu), 3,43-4,05 (m, 4H, 5-H e CH_2OTBDPS), 4,25 (t, $J=6,8$ Hz, 1H, 4-H), 5,04 (dd, $J=5,1, 3,7$ Hz, 1H, 2-H), 7,38-7,72 (m, 10H, Ar-H).


(2R,4R)- e (2R,4S)-4-Acetoxi-2-(t-butildifenilsililoximetil)-dioxolano (8).

A uma solução de **7** (0,46 g, 1,14 mmol) em acetato de etilo (10 ml) adicionou-se piridina (0,09 ml, 1,25 mmol) e $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ (0,66 g, 1,49 mmol). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 15 horas sob N_2 e em seguida filtrada através de um leito de celite, depois foi concentrada e purificada por cromatografia em coluna através de gel de sílica, tendo-se obtido o composto **8** (0,29 g, 63,5 %) sob a forma de um óleo incolor: RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,06 e 1,10 (s, 9H, t-Bu), 1,92 e 2,06 (s, 1H, CH_3), 3,71-4,24 (m, 4H, 5-H e CH_2OTBDPS), 5,25 e 5,38 (t, $J=4,3$ e 3,3 Hz cada, 1H, 2-H), 6,27-6,41 (m, 1H, 4-H), 7,20-7,72 (m, 10H, Ar-H); IV (KBr) 3400, 1620 cm^{-1} .

Exemplo 2 Preparação de (-)-1-[(2R,4R)-2-(hidroximetil)-4-dioxolanil]timina (11).


(-)-1-[(2R,4R)-2-(t-Butildifenilsililoximetil)-4-dioxolanil]-timina (9) e (+)-1-[(2R,4S)-2-(t-butildifenilsililoximetil)-4-dioxolanil]timina (10).

A uma suspensão de timina (0,15 g, 1,2 mmol) em hexametildissilazano (10 ml) adicionou-se uma quantidade



catalítica de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e a mistura foi submetida a refluxo durante 3 horas. A solução límpida obtida foi concentrada, tendo-se obtido timina sililada sob a forma de um óleo incolor. Adicionou-se uma solução do composto **8** (0,24 g, 0,6 mmol) em CH_2Cl_2 (5 ml) a uma solução de timina sililada em CH_2Cl_2 (5 ml) e arrefeceu-se a mistura a 5 °C. À mistura arrefecida adicionou-se triflato de trimetilsililo (0,23 ml, 1,2 mmol) e agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante uma hora sob N_2 . Adicionou-se à mistura uma solução saturada de NaHCO_3 (20 ml) e agitou-se novamente a mistura à temperatura ambiente durante 30 minutos. A fase orgânica foi então separada e a fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 . As fases orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução saturada de NaHCO_3 e água, foram secas, concentradas e submetidas a separação por cromatografia em coluna através de gel de sílica, tendo-se obtido o composto **9** (0,125 g, 44,6 %) sob a forma de uma espuma branca e **10** (0,08 g, 28,6 %) sob a forma de uma espuma branca: **9** (forma β); $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -6,98^\circ$ (C 0,43, MeOH); RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,08 (s, 9H, t-Bu), 1,67 (s, 3H, CH_3), 3,92 (d, $J=3,2$ Hz, 2H, CH_2OTBDPS), 4,14 (d, $J=4,0$ Hz, 2H, 5-H), 5,06 (t, $J=3,2$ Hz, 1H, 2H), 6,36 (t, $J=4,0$ Hz, 1H, 4-H), 7,26-7,75 (m, 10H, Ar-H), 9,51 (bmr s, 1H, H=NH) : UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ 265,0 (pH 2); 264,4 nm (pH 11); Análise Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{N}_2\text{Si}$: C, 64,34; H, 6,49; N, 6,00, Determinado: C, 64,28; H, 6,51; N, 5,98:

10 (forma α); $[\alpha]^{25}_{\text{D}} + 11,3^\circ$ (C 0,23, MeOH); RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,08 (s, 9H, t-Bu), 1,94 (d, $J=1,2$ Hz, 3H, CH_3), 3,70 (d, $J=3,2$ Hz, 2H, CH_2OTBDPS), 4,01 (dd, $J=9,5, 2,3$ Hz, 1H, 5H), 4,35 (dd, $J=9,5, 5,3$ Hz, 1H, 5-H), 5,55 (t, $J=3,2$ Hz, 1H, 2-H), 6,32 (dd, $J=5,3, 2,3$ Hz, 1H, 4-H), 7,17 (d, $J=1,2$ Hz, 1H, 6'-H), 7,37-7,74 (m, 10H, Ar-H), 9,57 (s largo, 1H, NH); UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ 265,0; (pH 2); 264,5 nm (pH 11); Análise Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{N}_2\text{Si}$: C, 64,34; H, 6,49; N, 6,00, Determinado: C, 64,23; H, 6,51; N, 5,93.



(-)-1-[(2R,4R)-2-(Hidroximetil)-4-dioxolanil]timina (11).

A uma solução de **9** (93,3 mg, 0,2 mmol) em tetra-hidro-furano (THF) (3 ml) adicionou-se uma solução 1,0 M de fluoreto de tetra-n-butilamónio em THF (0,24 ml, 0,24 mmol) e agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante uma hora. A mistura foi em seguida concentrada e purificada por cromatografia em coluna através de gel de sílica, tendo-se obtido o composto **11** (42 mg, 92,1 %) sob a forma de um sólido branco: $[\alpha]^{25}_D -18,8^\circ$ (C 0,17, MeOH); RMN 1H (DMSO- d_6) δ 1,75 (d, $J=1,2$ Hz, 3H, CH_3), 3,63 (dd, $J+6,0$, 2,6 Hz, 2H, CH_2OH), 4,03 (dd, $J=9,9$, 5,5 Hz, 1H, 5-H), 4,22 (dd, $J=9,9$, 2,0 Hz, 1H, 5-H), 4,90 (t, $J=2,6$ Hz, 1H, 2-H), 5,16 (t, $J-t,0$ Hz, 1H, OH), 6,21 (dd, $J=5,5$, 2,0 Hz, 1H, 4-H), 7,67 (d, $J=1,2$ Hz, 1H, 6'-H), 11,27 (s largo, 1H NH); UV (H_2) $\lambda_{m\acute{a}x}$ 266,0 (ϵ 10757); 266,5 (ϵ 9894) (pH 2); 266,3 (ϵ 8397) (pH 11); Análise Calculado para $C_9H_{12}O_5N_2$: C, 47,36; H, 5,31; N, 12,28, Determinado: c, 47,28; H, 5,34; N, 12,29.

(+)-1-[(2R,4S)-2-(Hidroximetil)-4-dioxolanil]timina (12).

A remoção da protecção de **10** (60 mg, 0,13 mmol) de acordo com o mesmo procedimento descrito anteriormente para **11** deu origem ao composto **12** (26 mg, 87,6 %) sob a forma de uma espuma branca: $[\alpha]^{25}_D + 10,7^\circ$ (C 0,15, MeOH); RMN 1H (DMSO- d_6) δ 1,79 (s, 3H, CH_3), 3,43 (dd, $J=6,0$, 3,7 Hz, 2H, CH_2OH), 4,02 (dd, $J=9,5$, 3,3 Hz, 1H, 5-H), 4,28 (dd, $J=9,5$, 5,6 Hz, 1H, 5-H), 5,00 (t, $J=6,0$ Hz, 1H, OH), 5,47 (t, $J=3,7$ Hz, 1H, 2-H), 6,17 (dd, $J=5,6$, 3,3 Hz, 1H, 4 H), 7,43 (d, $J=1,2$ Hz, 1H, 6'-H), 11,32 (s largo, 1H NH); UV (H_2O) $\lambda_{m\acute{a}x}$ 266,5 (ϵ 9454); 266,5 (ϵ 9199) (pH 2); 266,3 (ϵ 6925) (pH=11); Análise Calculado para $C_9H_{12}O_5N_2$: C, 47,36; H, 5,31; N, 12,28, Determinado: C, 47,22; H, 5,32; N, 12,16.



Exemplo 3 Preparação de nucleósidos de purina de β -D-dioxolanilo sob a forma de enantiómeros puros

(2R,4R) e (2R,4S)-9-[[2-[(terc-Butildifenilsilil)oxi]metil]-1,3-dioxolanil-4]-6-cloro-2-fluoropurina (13 e 14).

Uma mistura de 2-fluoro-6-cloropurina (4,05 g, 23,47 mmol) e sulfato de amónio (quantidade catalítica) em hexametildissilazano (940 mL) foi submetida a refluxo durante duas horas. A solução resultante foi concentrada sob condições anidras, tendo-se obtido 2-fluoro-6-cloropurina sililada sob a forma de um sólido branco. Uma solução arrefecida (0 °C) e sob agitação de obtido 2-fluoro-6-cloropurina sililada (5,69 g, 23,69 mmol) e do composto **8** (7,84 g, 19,57 mmol) em cloreto de metileno seco (175 mL) adicionou-se TMSOTf (4,41 mL, 23,44 mmol). A mistura reaccional foi aquecida à temperatura ambiente e agitada durante 16 horas, durante cujo período todo o produto condensado em N₇ inicialmente formado foi convertido no isómero N₉. A mistura reaccional foi abafada com solução saturada de NaHCO₃ (50 mL), agitada durante mais 20 minutos à temperatura ambiente e evaporada à secura sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (200 mL), lavado com água e salmoura, seco (Na₂SO₄ anidro), filtrado e evaporado, tendo-se obtido um resíduo sólido que foi purificado por cromatografia em coluna através de gel de sílica (EtOAc a 20 % em hexano), tendo-se obtido uma mistura do anómero β **19** com o anómero α **20** (1,3:1; β/α) sob a forma de um sólido branco cristalino (6,30 g, 62,8 %). A amostra analítica foi purificada por CCF preparativa utilizando CH₂Cl₂ / acetona (19:1) como sistema de desenvolvimento, tendo-se obtido o composto **13** (R_f = 0,5p0) e o composto **14** (R_f = 0,55) para caracterização por RMN: UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ 269,0 nm.



(-)-(2R,4R)-2-Amino-9-[[2-[(terc-butildifenilsilil)oxi]metil]-1,3-dioxolanil-4]-6-cloropurina (15), (-)-(2R,4R)-9-[[2-[(terc-butildifenilsilil)oxi]metil]-1,3-dioxolanil-4]-2-fluoroadenina (16), (+)-(2R,4S)-2-amino-9-[[2-[(terc-butildifenilsilil)oxi]metil]-1,3-dioxolanil-4]-6-cloropurina (17) e (+)-(2R,4S)-9-[[2-[(terc-butildifenilsilil)oxi]metil]-1,3-dioxolanil-4]-2-fluoroadenina (18).

Fez-se borbulhar gás amoníaco através de uma solução sob agitação dos compostos **13** e **14** (6,25 g, 12,18 mmol) em DME (125 mL de um dia para o outro). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi submetido a separação cromatográfica dos quatro compostos numa coluna de gel de sílica (acetato de etilo de 20 a 30 % em CH₂Cl₂). **15** (R_f = 0,35, 1,49 g, 24 %): um sólido cristalino branco, UV (MeOH) λ_{máx} 309,5 nm, Análise (C₂₅H₂₈ClN₅O₃Si) C, H, Cl, N. **16** (R_f = 0,21, 1,12 g, 18,6 %): agulhas incolores, UV (MeOH) λ_{máx} 261,0, 268,0 (sh) nm. Análise (C₂₅H₂₈FN₅O₃Si) C, H, F, N. **17** (R_f = 0,43, 1,60 g, 25,76 %): um sólido cristalino branco, UV (MeOH) λ_{máx} 261,0, 269,0 (sh) nm, Análise (C₂₅H₂₈FN₅O₃Si) C, H, F, N. **18** (R_f = 0,12, 0,96 g, 16 %), um sólido microcristalino, UV (metanol) λ_{máx} 261,0, 269,0 (sh) nm. Análise (C₂₅H₂₈FN₅O₃Si) C, H, F, N.

(-)-(2R,4R)-2-Amino-6-cloro-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]purina (15).

Uma solução de **15** (0,46 g, 0,91 mmol) em THF (20 mL) foi tratada com n-Bu₄NF/THF 1 M (1,1 mL, 1,1 mmol), tendo-se obtido o composto **21** (R_f = 0,50, 0,21 g, 84 %) sob a forma de um sólido cristalino, que foi recristalizado a partir de MeOH: UV (H₂O) λ_{máx} 307,0 nm (ε8.370) (pH7), 307,5 (ε8.590) (pH 2), 307,0 (ε8.800) (pH 11), Análise (C₉H₁₀ClN₅O₃) C, H, Cl, N.

(-)-(2R,4R)-2-Fluoro-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]-adenina (28).

Uma solução de **16** (0,56 g, 1,12 mmol) em THF (20 mL) foi



tratada com n-Bu₄NF/THF 1 M (1,35 mL, 1,35 mmol), tendo-se obtido o composto **22** (0,24 g, 85 %) sob a forma de um sólido cristalino branco, que foi recristalizado a partir de MeOH: UV (H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ 260,8 nm (ϵ 17.010), 268,5 (sh) nm (ϵ 13.510) (pH 7), 261,0 (ϵ 16.390), 268,5 (sh) (ϵ 13.300) (pH2), 260,8 (ϵ 16.700), 268,5 (sh) (ϵ 13, 200) (pH 11). Análise (C₉H₁₀FN₅O₃) C, H, F, N.

(-)-(2R,4R)-9-[(2-Hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]guanina (25).

Uma mistura de **15** (0,29 g, 0,57 mmol), HSCH₂CH₂OH (0,51 mL) e NaOMe/MeOH 1,0 M (11,5 mL) em MeOH (20 mL) foi submetida a refluxo durante 3 horas. A mistura reaccional foi arrefecida e neutralizada com ácido acético glacial. A solução foi evaporada à secura e em seguida o resíduo foi triturado com CHCl₃ e filtrado e o filtrado foi levado à secura, tendo-se obtido o composto **19** bruto (0,21 g, 75 %), o qual sem qualquer purificação adicional foi submetido a dessililação de acordo com o mesmo procedimento descrito para o composto **23**, tendo-se obtido o composto **25** (0,07 g, 61 %) sob a forma de um sólido microcristalino, o qual foi recristalizado a partir de MeOH: UV (H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ 252,0 (ϵ 8.730) (pH 7), 254,4 (ϵ 12.130), 277,5 (sh) (ϵ 8.070) (pH 2), 264,3 (ϵ 10.800) (pH11), Análise (C₉H₁₁N₅O₄) C, H, N.

(-)-(2R,4R)-2-Amino-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]-adenina (26).

Carregou-se uma bomba de aço com o composto **15** (0,28 g, 0,55 mmol) e etanol anidro (20 mL) saturado com NH₃ e aqueceu-se a 90 °C durante 6 horas. Após arrefecimento, obteve-se o composto **20** (0,26 g, 95 %) por evaporação do solvente sob vácuo, tendo-se em seguida dessililado de acordo com o mesmo procedimento descrito para a preparação do composto **23**, tendo-se obtido o composto **26** (0,10 g, 75 %) sob a forma de agulhas microcristalinas brancas, recristalizado a partir de MeOH: UV (H₂O) $\lambda_{\text{máx}}$ 279,0 nm (ϵ 8.040) (pH 7), 290,0 (ϵ 7.070) (pH2), 278,8 (ϵ 7.580) (pH11), Análise (C₉H₁₂N₆O₃) C, H, N.



A (-)-(2R,4R)-2-amino-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]purina pode ser preparada por redução do composto **21** utilizando vários redutores, incluindo paládio sobre carvão e hidrogénio gasoso ou hidreto de tributilestanho e azabisobutironitrilo.

II. Actividade anti-HIV de nucleósidos de dioxolano

Os nucleósidos de β -D-dioxolano podem ser utilizados como ferramentas de investigação para inibir o crescimento do HIV in vitro ou podem ser administrados como fármacos a seres humanos a fim de inibir o crescimento do HIV in vivo.

A capacidade dos nucleósidos de β -D-dioxolano para inibir o HIV pode ser medida por várias técnicas experimentais. A técnica utilizada na presente invenção e descrita em pormenor mais adiante mede a inibição da replicação viral em células mononucleares de sangue periférico humano (PBM) infectadas com HIV-1 (estirpe (LAV) estimuladas com fito-hemaglutinina (PHA). A quantidade de enzima produzida á comparada com um controlo de HIV. O método é descrito em pormenor mais adiante.

Análise antiviral e citotóxica em células mononucleares de sangue periférico humano

A. Infectaram-se com HIV-1 (estirpe LAV) células PBM estimuladas com fito-hemaglutinina com três dias de idade (10^6 células/ml) de dadores com vírus de hepatite B e saudáveis seronegativos para HIV-1 a uma concentração de cerca de 100 vezes a dose infecciosa a 50 % de cultura de tecidos (TICD₅₀) por ml e cultivou-se na presença e na ausência de várias concentrações de compostos antivirais.

B. Aproximadamente 45 minutos após a infecção, adicionou-se aos balões (5 ml; volume final 10 ml) o meio com o composto a ser ensaiado (duas vezes a concentração final no meio) ou sem composto. Utilizou-se AZT como controlo positivo.

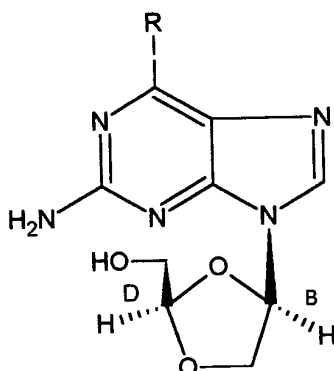


C. As células foram expostas ao vírus (cerca de 2×10^5 dpm/ml, conforme determinado por análise de transcriptase inversa) e em seguida foram colocadas num incubador de CO₂. O HIV-1 (estirpe LAV) foi obtido do Center for Disease Control, Atlanta, Georgia. Os métodos utilizados para a cultura das células PBM, a colheita do vírus e a determinação da actividade da transcriptase inversa foram os descritos por McDougal et al. (J. Immun. Meth. 76, 171-183, 1985) e Spira et al. (J. Clin. Meth. 25, 97-99, 1987), excepto em que não se incluiu fungizona no meio (cfr. Schinazi, et al., Antimicrob. Agents Chemother. 32, 1784-1787 (1988)). A actividade da transcriptase inversa no controlo infectado com vírus foi de cerca de 2×10^5 dpm por ml. Os valores do branco e do controlo de células não infectadas foram cerca de 300 e 1.000 dpm, respectivamente. Foram obtidos resultados semelhantes quando a fase C é efectuada antes da fase B.

D. No sexto dia, transferiram-se as células e o sobrenadante para um tubo de 15 ml e centrifugou-se a cerca de 900 g durante 10 minutos. Removeram-se 5 ml de sobrenadante e concentrou-se o vírus por centrifugação a cerca de 40.000 rpm durante 30 minutos (rotor Beckman 70.1 Ti). O aglomerado de vírus solubilizado foi processado para determinação dos níveis de transcriptase inversa. Os resultados estão expressos em dpm/ml de amostra de sobrenadante.

Utilizando este ensaio, verificou-se que um pequeno número de nucleósidos de purina de β -D-dioxolanilo são potentes agentes anti-HIV. Especificamente, conforme se indica no Quadro 1, os compostos 21, 25 e 26 apresentam uma reduzida concentração média eficaz, entre os limites de 0,027 e 0,69 μ M.

Quadro 1



R	Anómero	EC ₅₀ *
Cl	β-D	0,9
Cl	β-L	13,4
NH ₂	β-D	0,7
OH	β-D	0,03

* Média de pelo menos duas análises utilizando células de dadores diferentes. O erro padrão estimado é de mais ou menos 10 %.

Ao contrário do anteriormente relatado de que a β-D-(±)-dioxolano-timina tinha uma baixa eficácia contra o HIV em células ATH8, a forma β sob a forma de enantiómero puro **11** apresentou uma potente actividade anti-HIV (EC₅₀ = 0,3 μM). Foi surpreendente descobrir que a β-D-(-)-dioxolano-T sob a forma de enantiómero puro tinha uma actividade anti-HIV superior à da mistura racémica do composto. Esta diferença pode ser explicada com base na velocidade de fosforilação do composto **11** nestes sistemas. Conforme se esperava, o isómero α **12** não apresenta qualquer actividade anti-HIV significativa. A EC₅₀ da (-)-1-[(2β,4β)-2-(hidroximetil)-4-dioxolanil]timina em células PBM foi medida a 0,2 μM.

III. Toxicidade dos nucleósidos de dioxolano

As toxicidades dos compostos **21**, **25** e **26** foram avaliadas



em células humanas de PBM não infectadas, células CEM (linha de células linfoblastóides T obtida de ATCC; Rockville, MD) e células Vero (rim de símio verde africano). Os três compostos não eram tóxicos em qualquer das linhas de células a uma concentração de 100 μM .

IV. Preparação de composições farmacêuticas

Podem tratar-se seres humanos afectados por infecção por HIV por administração ao doente de uma quantidade eficaz de (-)-1-[(2R,4R)-2-amino-6-cloro-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]purina; (-)-1-[(2R,4R)-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]guanina; (-)-1-[(2R,4R)-2-amino-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]adenina ou (-)-1-[(2R,4R)-2-amino-9-[(2-hidroximetil)-1,3-dioxolanil-4]purina ou um seu derivado ou sal farmacêuticamente aceitável, opcionalmente num veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável. Os materiais activos podem ser administrados por qualquer via apropriada, por exemplo, por via oral, parentérica, intravenosa, intradérmica, subcutânea ou tópica sob forma líquida ou sólida.

O composto activo é incluído no veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável numa quantidade suficiente para proporcionar ao doente uma quantidade terapêuticamente eficaz sem causar efeitos tóxicos graves no doente tratado.

Uma dose preferida do composto activo para todas as condições anteriormente mencionadas situar-se-á entre os limites de desde cerca de 1 a 60 mg/kg, de preferência de 1 a 20 mg/kg, do peso corporal por dia, mais em geral de 0,1 até cerca de 100 mg por quilograma de peso corporal do sujeito por dia. Os limites de dosagem eficaz dos derivados farmacêuticamente aceitáveis podem ser calculados com base no peso do nucleósido original a administrar. Se o derivado apresenta actividade própria, a dosagem eficaz pode ser estimada como referido utilizando o peso do derivado ou por outros meios conhecidos dos especialistas neste domínio.



O composto é administrado de forma conveniente em unidades de qualquer forma de dosagem adequada, incluindo, mas não se limitando a esta, uma forma que contenha 7 a 3000 mg, de preferência 70 a 1400 mg do ingrediente activo por forma de dosagem unitária. É normalmente conveniente uma dosagem oral de 50 a 1000 mg.

Idealmente o ingrediente activo pode ser administrado a fim de alcançar picos de concentrações no plasma do composto activo desde cerca de 0,2 a 70 μM , de preferência desde cerca de 1,0 a 10 μM . Estas concentrações podem ser alcançadas, por exemplo, por injeção intravenosa de uma solução de 0,1 a 5 % do ingrediente activo, opcionalmente em salina, ou por administração de uma pastilha do ingrediente activo.

A concentração do composto activo na composição farmacêutica dependerá das velocidades de absorção, de inactivação e de excreção do fármaco bem como de outros factores conhecidos dos especialistas na matéria. Deverá notar-se que os valores de dosagem devem variar também com a gravidade da situação que se pretende aliviar. Deverá ainda compreender-se que para qualquer sujeito em particular os regimes específicos de dosagem devem ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade individual e o julgamento profissional de que administra ou supervisa a administração das composições e que os limites de concentração mencionados anteriormente são dados a título exemplificativo e não pretendem limitar o âmbito ou a prática da composição reivindicada. O ingrediente activo pode ser administrado numa única vez ou pode ser dividido em várias doses menores a serem administradas a intervalos de tempo variáveis.

Uma via preferida de administração do composto activo é a via oral. As composições orais incluem em geral um diluente inerte ou um veículo edível. Estas pode ser incorporadas em cápsulas de gelatina ou pode ser submetidas a compressão para formar comprimidos. Para o objectivo de administração



terapêutica oral, o composto activo pode ser incorporado com excipientes e utilizado sob a forma de comprimidos, trociscos ou cápsulas. Podem ser incluídos como parte da composição agentes aglomerantes e/ou adjuvantes farmacologicamente compatíveis.

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

O composto activo ou o seu sal ou derivado farmacologicamente aceitável pode ser administrado como um componente de um elixir, uma suspensão, um xarope, uma hóstia, uma goma de mascar ou uma forma semelhante. Um xarope pode conter, para além dos compostos activos, sacarose como edulcorante e determinados conservantes, corantes e pigmentos e aromas.

O composto activo ou o seu derivado ou sal farmacologicamente aceitável pode também ser misturado com outros materiais activos que não prejudiquem a acção pretendida ou com materiais que suplementem a acção pretendida, tais como antibióticos, antifúngicos, anti-inflamatórios ou outros antivirais, incluindo outros compostos nucleósidos anti-HIV.



As soluções ou suspensões utilizadas para aplicação parentérica, intradérmica, subcutânea ou tópica podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como álcool benzílico ou parabens metílicos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; quelantes tais como ácido etilenodiamina-tetra-acético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste da tonicidade tais como cloreto de sódio ou dextrose. O preparado parenteral pode ser contido em ampolas, seringas descartáveis ou em frascos de doses múltiplas feitos de vidro ou de plástico.

Se a via de administração é a intravenosa, os veículos preferidos são salina fisiológica ou salina tamponizada com fosfato (PBS).

Numa forma de concretização preferida, os compostos activos são preparados com veículos que protegem o composto contra a rápida eliminação do corpo, tais como uma formulação de libertação controlada, incluindo implantes e sistemas de libertação por microencapsulação. Podem ser utilizados polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, tais como acetato de etilenovinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres e ácido poliláctico. Os métodos para a preparação destas formulações serão evidentes para os especialistas na matéria. Os materiais podem também ser obtidos no comércio a partir de Alza Corporation e de Nova Pharmaceuticals, Inc..

São também preferidas como veículos farmacêuticamente aceitáveis as suspensões de lipossomas (incluindo os lipossomas que são dirigidos a células infectadas com anticorpos monoclonais contra antigénios virais). Estas podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos dos especialistas na matéria, por exemplo, conforme descrito na Patente n.º US 4 522 811 (que



se dá como aqui integralmente reproduzida por referência). Por exemplo, as formulações de lipossomas podem ser preparadas por dissolução do lípido apropriado (ou dos lípidos apropriados) (tais como estearoíl-fosfatidil-etanolamina, estearoíl-fosfatidil-colina, aracadoíl-fosfatidil-colina e colesterol) num solvente inorgânico que é em seguida evaporado, deixando um resíduo de uma fina película de lípido seco sobre a superfície do recipiente. Uma solução aquosa do composto activo ou os seus derivados monofosfato, difosfato e/ou trifosfato são em seguida introduzidas no recipiente. Faz-se em seguida girar manualmente o recipiente de modo a induzir remoinhos no líquido a fim de libertar o material lipídico das paredes do recipiente e de dispersar os agregados lipídicos, formando deste modo a suspensão de lipossomas.

V. Preparação de derivados fosfatados de β -D-dioxolano-nucleósidos

Os derivados mono, di e trifosfatos de β -D-dioxolano-nucleósidos podem ser preparados conforme descrito adiante.

O monofosfato pode ser preparado de acordo com o procedimento de Imai et al., J. Org. Chem., 34(6), 1547-1550 (junho de 1969). Por exemplo, fazem-se reagir cerca de 100 mg de β -D-dioxolano-nucleósido e cerca de 280 μ l de cloreto de fosforilo sob agitação em cerca de 8 ml de acetato de etilo seco a cerca de 0 °C durante cerca de quatro horas. Faz-se parar a reacção com gelo. A fase aquosa é purificada numa coluna de carvão activado, eluindo com hidróxido de amónio a 5 % numa mistura 1:1 de álcool e água. Por evaporação do eluente obtém-se (β -D-dioxolano-nucleósido)-5'-monofosfato de amónio.

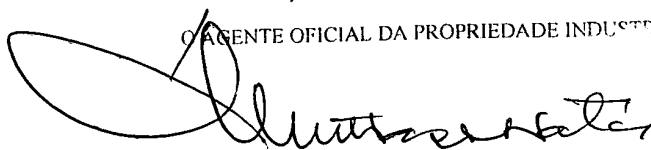
O difosfato pode ser preparado de acordo com o procedimento de Davisson et al., J. Org. Chem., 52(9), 1794-1801 (1987). Os β -D-dioxolano-nucleósidos podem ser preparados a partir do correspondente tosilato, que pode ser preparado, por exemplo, por reacção do nucleósido com cloreto de tosilo em

piridina à temperatura ambiente durante cerca de 24 horas, processando o produto do modo habitual (p. ex. por lavagem, secagem e cristalização).

O trifosfato pode ser preparado de acordo com o procedimento de Hoard et al., J. Am. Chem. Soc., 87(8), 1785-1788 (1965). Por exemplo, o β -D-dioxolano-nucleósido é activado (por preparação de uma imidazolida, de acordo com métodos conhecidos dos especialistas na matéria) e tratado com fosfonato de tributílamónio em DMF. A reacção dá principalmente o trifosfato do nucleósido, com algum monofosfato por reagir e algum difosfato. A purificação por cromatografia de permuta aniónica de uma coluna de DEAE é seguida de isolamento do trifosfato, p. ex., sob a forma do sal de tetrassódio.

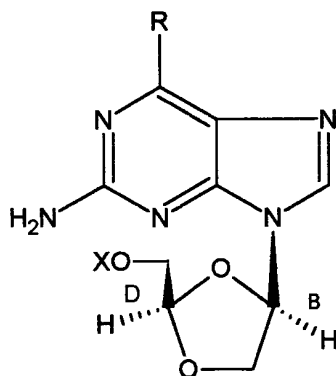
Lisboa, 6 de Junho de 2001

AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



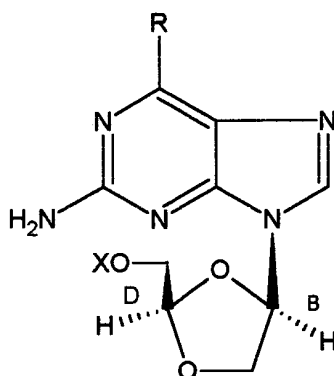
REIVINDICAÇÕES

1. Nucleósido de β -D-dioxolanilo sob a forma de enantiómero puro da estrutura:



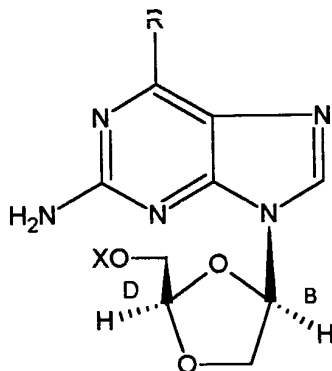
em que R é NH_2 , H ou Cl e X é seleccionado do grupo constituído por hidrogénio, acilo, monofosfato, difosfato e trifosfato e em que o composto se encontra em pelo menos 97 % isento do correspondente enantiómero β -L.

2. Composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de um nucleósido de β -D-dioxolanilo sob a forma de enantiómero puro da estrutura:



em que R é NH_2 , H ou Cl e X é seleccionado do grupo constituído por hidrogénio, acilo, monofosfato, difosfato e trifosfato ou o seu sal farmacêuticamente aceitável, e em que o composto se encontra em pelo menos 97 % isento do correspondente enantiómero β -L, num veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

3. Nucleósido de β -D-dioxolanilo sob a forma de enantiómero puro da estrutura:



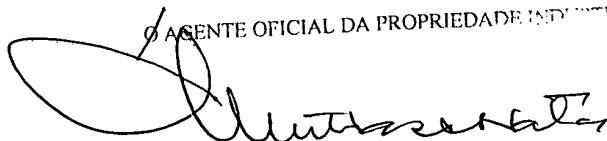
em que R é NH_2 , H ou Cl e X é seleccionado do grupo constituído por hidrogénio, acilo, monofosfato, difosfato e trifosfato ou o seu sal farmacêuticamente aceitável, e em que o composto se encontra em pelo menos 97 % isento do correspondente enantiómero β -L, para utilização como um medicamento.

4. Utilização de um nucleósido de β -D-dioxolanilo sob a forma de enantiómero puro de acordo com qualquer das reivindicações anteriores para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma infecção por HIV num doente.
5. Nucleósido de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 3, em que R é NH_2 .
6. Composição de acordo com a reivindicação 2, em que R é NH_2 .
7. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que R é NH_2 .
8. Nucleósido de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 3, em que R é H.
9. Composição de acordo com a reivindicação 2, em que R é H.
10. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que R é H.

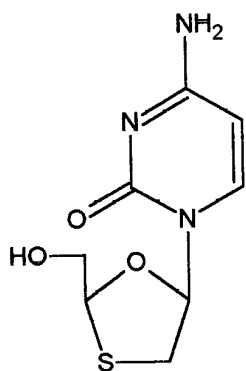
11. Nucleósido de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 3, em que R é Cl..
12. Composição de acordo com a reivindicação 2, em que R é Cl.
13. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que R é Cl.
14. Nucleósido de acordo com a reivindicação 5, a reivindicação 8 ou a reivindicação 11, em que X é H.
15. Composição de acordo com a reivindicação 6, a reivindicação 9 ou a reivindicação 12, em que X é H.
16. Utilização de acordo com a reivindicação 7, a reivindicação 10 ou a reivindicação 13, em que X é H.

Lisboa, 6 de Junho de 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

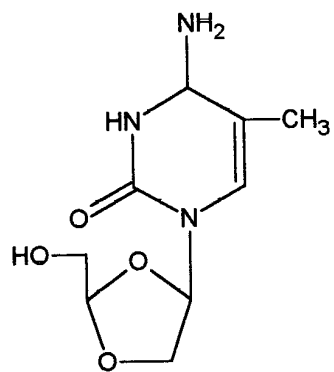


Handwritten signature



(±)-BCH - 189

Fig. 1a



(±)-Dioxolano - T

Fig. 1b

Handwritten signature

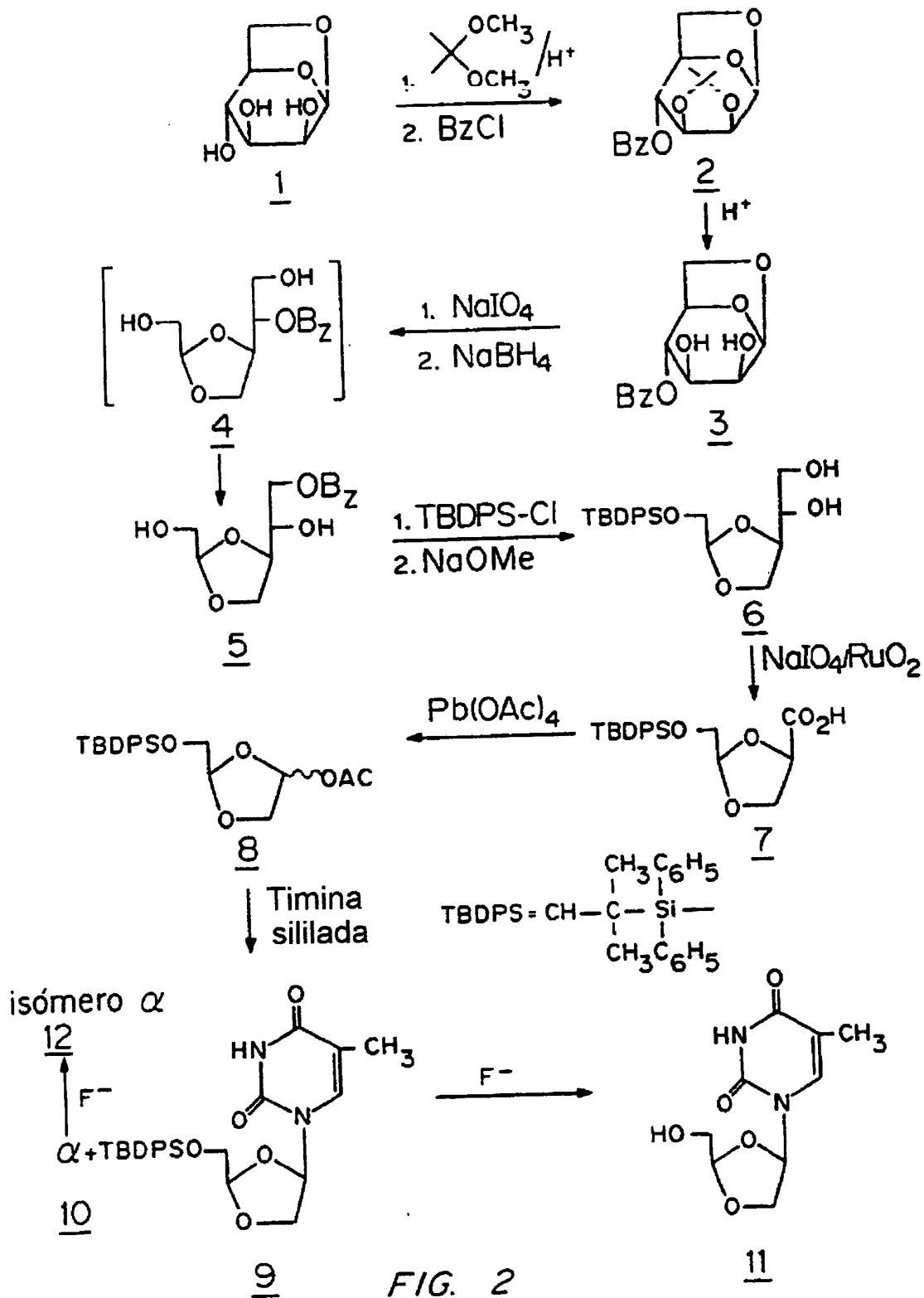


FIG. 2

Handwritten signature

FIG. 3

