

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

(22) Data de pedido: <b>2004.12.29</b>	(73) Titular(es): <b>GILEAD SCIENCES, INC.</b> <b>333 LAKESIDE DRIVE FOSTER CITY,</b> <b>CALIFORNIA 94404</b>	<b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2003.12.30 US 533745 P</b> <b>2004.07.26 US 590987 P</b> <b>2004.09.01 US 606595 P</b>	(72) Inventor(es): CHOUNG U. KIM JOHN C. ROHLOFF WILLIAM A. LEE JIANYING WANG XIAQIN CHENG	<b>US</b> <b>US</b> <b>US</b> <b>US</b> <b>US</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2006.11.02</b>	(74) Mandatário: <b>MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA</b> <b>AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA</b>	<b>PT</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2010.08.18</b> <b>227/2010</b>		

(54) Epígrafe: **FOSFONATOS, MONOFOSFONAMIDATOS, BISFOSFONAMIDATOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS VIRAIS**

(57) Resumo:  
SÃO DESCRITOS COMPOSTOS E COMPOSIÇÕES DA FÓRMULA (I) ÚTEIS COMO AGENTES ANTIPROLIFERATIVOS E PARTICULARMENTE ANTI-HPV.

**RESUMO****"FOSFONATOS, MONOFOSFONAMIDATOS, BISFOSFONAMIDATOS PARA O  
TRATAMENTO DE DOENÇAS VIRAIS"**

São descritos compostos e composições da fórmula (I) úteis como agentes antiproliferativos e particularmente anti-HPV.

## DESCRIÇÃO

### **"FOSFONATOS, MONOFOSFONAMIDATOS, BISFOSFONAMIDATOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS VIRAIS"**

#### Antecedentes da Invenção

#### Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a compostos e composições dos mesmos, úteis para tratar infecções virais, em particular o papilomavírus humano.

#### Antecedentes

O papilomavírus humano (HPV) é uma das infecções sexualmente transmitidas mais predominantes no mundo. Existem mais do que 100 diferentes tipos de HPV, sendo a sua maioria inofensiva. No entanto, existem cerca de 30 tipos que são disseminados através do contacto sexual. Alguns tipos de HPV causam verrugas genitais, que surgem como um único ou múltiplos inchaços nas áreas genitais dos homens e mulheres incluindo a vagina, colo do útero, vulva (área externa da vagina), pénis, e recto. No entanto, existem muitas pessoas infectadas com HPV e que não apresentam qualquer sintoma.

Enquanto a maioria dos subtipos de HPV resulta em lesões benignas, certos subtipos podem induzir a lesões mais sérias. Infecções ano-genitais provenientes do HPV-16 e HPV-18, embora menos comuns do que o HPV-6 e HPV-11, são mais frequentemente associadas a lesões pré-cancerosas em tecidos cervicais e anais, as quais são denominadas displasias. Os doentes com displasias são frequentemente assintomáticos e podem apenas descobrir as lesões após um exame de rastreio. As displasias de grau elevado, se não

forem devidamente tratadas, podem transformar-se em tecidos cancerosos. As lesões de baixo-grau podem regredir espontaneamente, enquanto outras podem progredir para lesões de grau elevado. O HPV-16 e HPV-18 são mais frequentemente associados a displasias, embora diversos outros subtipos de HPV transformantes sejam também associados a displasias. Estudos recentes indicam que até 89% de homens homossexuais HIV positivos podem ser infectados com estes subtipos de risco elevado de HPV. Os doentes HIV positivos têm igualmente maior probabilidade de ser infectados com múltiplos subtipos de HPV ao mesmo tempo, facto que é associado a um risco mais elevado de progressão de displasia.

As verrugas genitais são a doença sexualmente transmitida mais comum no mundo e são mais predominantes em indivíduos com idades compreendidas entre 17-33 anos de idade. O HPV-6 e o HPV-11 são responsáveis por quase 90% de todas as verrugas genitais, porém estas são raramente associadas a crescimentos neoplásicos. De acordo com a American Social Health Association, pelo menos 20 milhões de pessoas nos Estados Unidos encontram-se actualmente infectadas com HPV, com 5,5 milhões de novos casos de infecções de HPV sexualmente transmitidas que ocorrem anualmente. As verrugas genitais produzem normalmente inchaços indolores que provocam comichão e que se encontram localizados na ou próximo da zona genital, as quais, no entanto, sem tratamento, podem progredir para crescimentos tipo couve-flor mais pronunciados. Aproximadamente dois terços de pessoas que têm contacto sexual com uma pessoa infectada com verrugas genitais irão desenvolver verrugas dentro de um período de contacto de três meses. A regressão espontânea de verrugas genitais ocorre em 10 a 20% de casos

de verruga genital. No entanto, mesmo que a lesão regrida, a recorrência de verrugas genitais é comum em 50% após um ano. Como resultado das lesões disformes, é comum o tratamento de verrugas genitais.

A evidência durante as últimas duas décadas deu lugar a uma ampla aceitação de que a infecção de HPV é necessária, todavia não suficiente, para o desenvolvimento de cancro cervical. Estima-se que a presença de HPV cancro cervical é de 99,7%. Pensa-se que o cancro anal tem uma associação similar entre a infecção de HPV e o desenvolvimento de displasia anal e cancro anal, como é o caso do cancro cervical. Num estudo em doentes HIV negativos com cancro anal, foi encontrada infecção por HPV em 88% de cancros anais. Nos Estados Unidos, em 2003, são previstos 12.200 novos casos de cancro cervical e 4.100 mortes por cancro cervical juntamente com 4.000 novos casos de cancro anal e 500 mortes por cancro anal. À medida que a incidência de cancro cervical tem vindo a diminuir nas últimas quatro décadas devido à existência de um rastreio mais alargado e abrangente, a incidência de cancro anal tem vindo a crescer. O aumento da incidência do cancro anal pode ser atribuída em parte à infecção de HIV, uma vez que doentes HIV positivos têm uma maior predisposição ao cancro anal comparativamente à população geral. Enquanto o cancro anal tem uma incidência de 0,9 casos por 100,000 na população geral, o cancro anal tem uma incidência de 35 casos por 100,000 na população masculina homossexual e 70 a 100 casos por 100,000 na população masculina homossexual HIV positiva. De facto, devido à prevalência elevada de displasia anal entre doentes infectados com HIV e uma tendência crescente de cancros anais, as Normas de USPHA / IDSA 2003 para o Tratamento de Infecções Oportunistas em

Doentes com HIV Positivo irão incluir linhas de orientação de tratamento para doentes diagnosticados com displasia anal.

Não existe nenhuma cura conhecida para HPV. Existem tratamentos para verrugas genitais, embora estas desapareçam frequentemente, mesmo sem tratamento. O método de tratamento depende de factores, tais como o tamanho e localização das verrugas genitais. Entre os tratamentos utilizados é possível encontrar, creme Imiquimod, solução antimicótica de podofilina a 20 por cento, a solução de podofilox a 0,5 por cento, creme de 5-fluorouracila a 5 por cento, e ácido tricloroacético. O uso de podofilina ou podofilox não é recomendado em mulheres grávidas, uma vez que estas substâncias são absorvidas pela pele e podem causar defeitos congénitos. O uso de creme de 5-fluorouracila não é também recomendado em mulheres grávidas. Pequenas verrugas genitais podem ser fisicamente removidas por tratamento por congelamento (criocirurgia), electrocauterização ou laser. As grandes verrugas que não responderam a outro tratamento podem ter que ser removidas por cirurgia. Sabe-se que as verrugas genitais reapareceram após remoção física das mesmas e, nestes casos, tem sido utilizado  $\alpha$ -interferão por injeção directa nas verrugas. Entretanto,  $\alpha$ -interferão é dispendioso, e a sua utilização não reduz a taxa de reaparecimento das verrugas genitais.

R. Snoeck, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 3356-3361, avaliaram uma série de nucleosídeos acíclicos derivados do fosfonato considerando a sua capacidade para inibir o crescimento do vírus vaccinia nas monocamadas da célula epitelial e foram testados os derivados mais potentes nas culturas organotípicas. K.A Keith et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 2193.2198

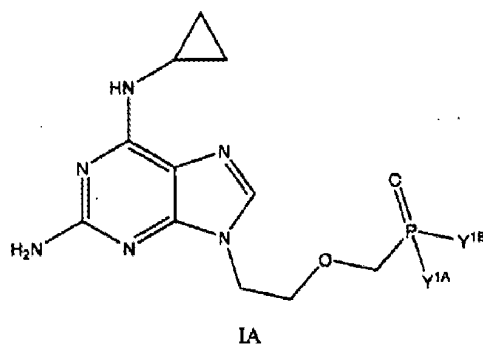
avaliaram uma série de fosfanatos nucleosídeos (análogos para cidofovir, adefovir e tenofovir) relativamente à sua capacidade para inibir a replicação de vírus vaccinia ou vírus da varíola bovina em cultura de células no tecido.

Christensen et al. *Antiviral Research* 48 (2000), 131-142, testou uma série de análogos nucleosídeos para a actividade do vírus anti-papiloma *in vivo* e descobriu que muitos desses análogos possuem uma actividade forte.

A patente norte-americana 2003/0072814 divulga uma composição farmacêutica tópica para o tratamento de verrugas que contém fosfonatos nucleosídeos e outros análogos nucleosídeos como compostos activos. Como tal, existe uma necessidade inadequada de tratamento eficaz de HPV . Foram surpreendentemente descobertos compostos que satisfazem esta necessidade, e que oferecem igualmente outros benefícios também.

### Sumário da Invenção

A invenção refere-se a um composto da fórmula IA,



em que:

$Y^{1A}$  e  $Y^{1B}$  são  $NH(R^X)$ ;;

$R^{X1}$  é independentemente  $R^2$ ;

$R^2$  é

etilo substituído por  $C(=O)OR^4$ , em que  $R^4$  é metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, i-butilo, s-butilo, t-butilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metilo, -2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2, 3-dimetil-2-butilo, vinilo, alilo, ciclopentenilo, 5-hexenilo, etinilo ou propargilo;

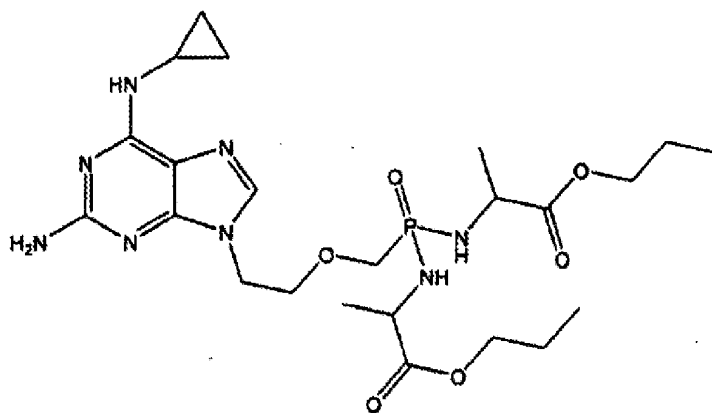
propilo substituído por  $C(=O)OR^4$  em que  $R^4$  é um alquilo de 1 a 18 átomos de carbono, alcenilo de 2 a 18 átomos de carbono ou alcinilo de 2 a 18 átomos de carbono; ou

metilo substituído por dois  $R^3$  em que um  $R^3$  é  $-R^5W^3$  e o outro  $R^3$  é  $C(=O)OR^4$  é um alcinilo de 1 a 18 átomos de carbono, alcenilo de 2 a 18 átomos de carbono, ou alcinilo de 2 a 18 átomos de carbono;  $R^5$  é metileno;  $W^3$  é fenilo.

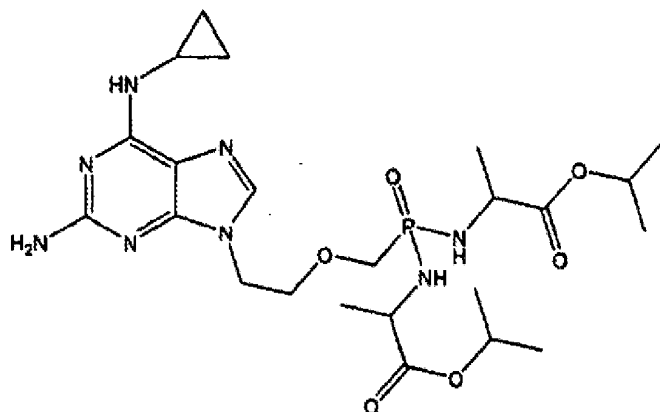
ou um sal dos mesmos farmacologicamente aceitável.

#### Descrição Detalhada da Invenção

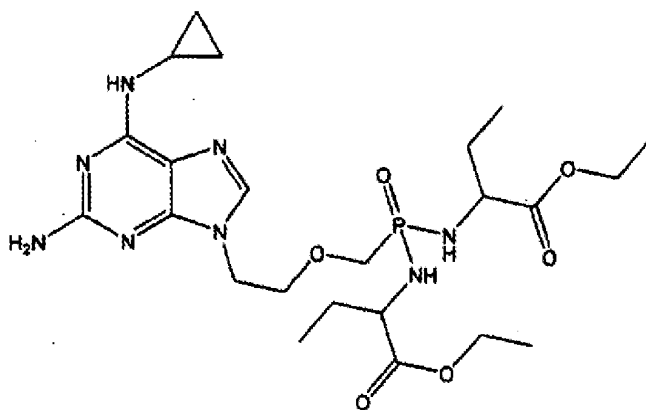
Uma realização da presente invenção apresenta um composto da fórmula,



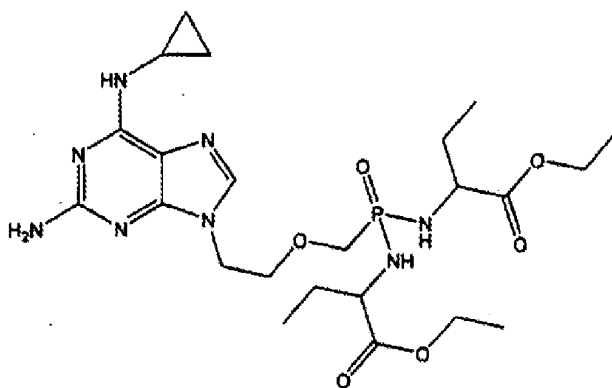
Uma realização da presente invenção apresenta um composto da fórmula,



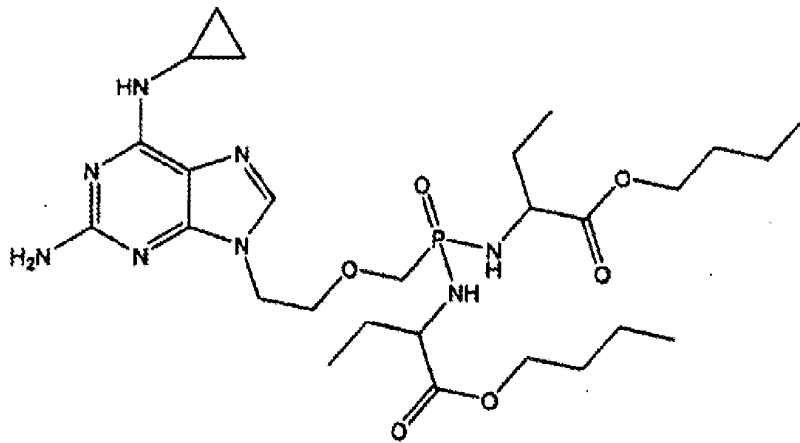
Uma realização da presente invenção apresenta um composto da fórmula,



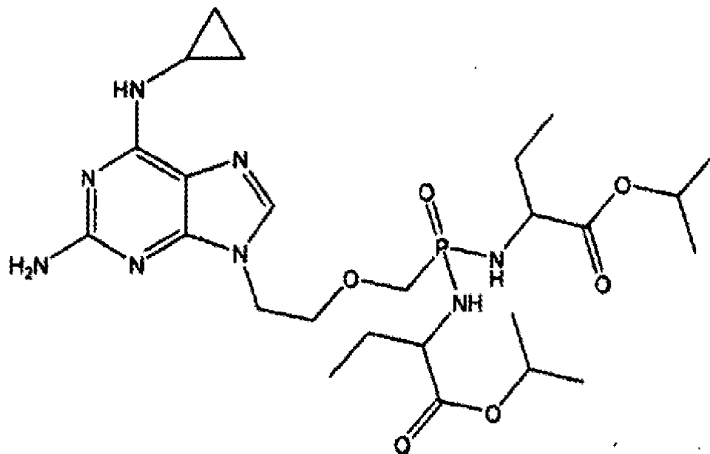
Uma realização da presente invenção apresenta um composto da fórmula,



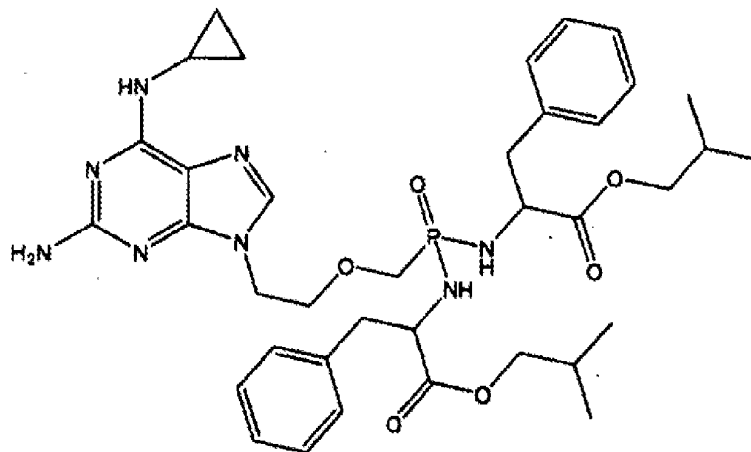
Uma realização da presente invenção apresenta um composto da fórmula,



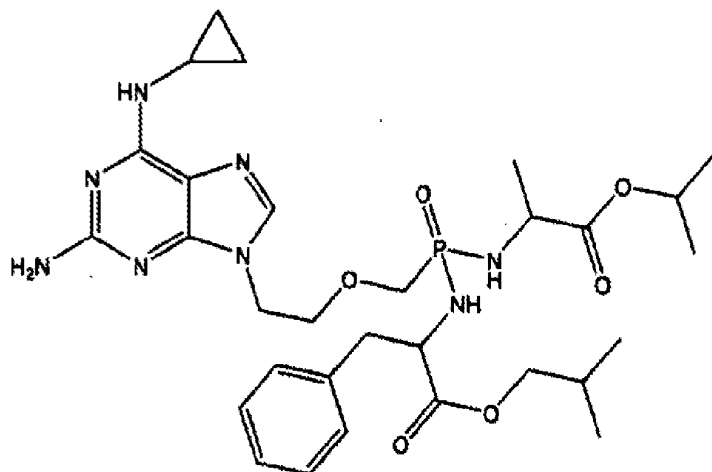
Uma realização da presente invenção apresenta um composto da fórmula,



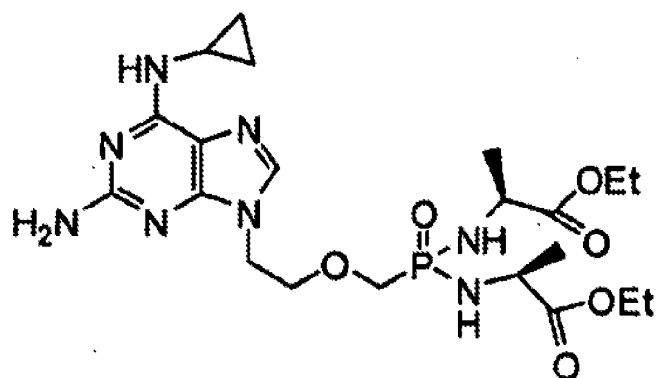
Uma realização da presente invenção apresenta um composto da fórmula,



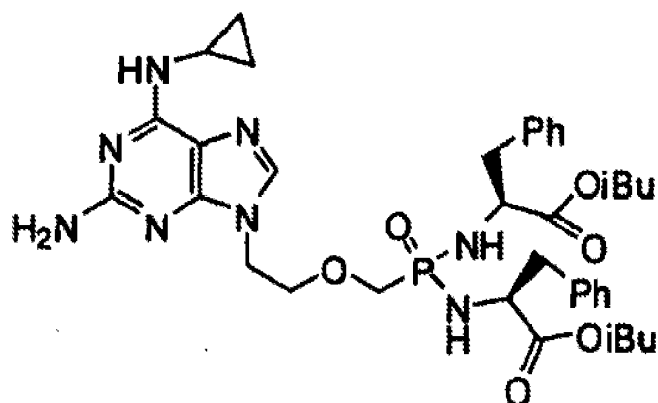
Uma realização da presente invenção apresenta um composto da fórmula,



Uma realização da presente invenção apresenta um composto da fórmula,



Uma realização da presente invenção apresenta um composto da fórmula,



Uma realização da presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula I ou um sal do mesmo farmacêuticamente aceitável, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Um aspecto da presente realização apresenta uma composição farmacêutica, onde a composição é uma composição em gel.

Outro aspecto da presente realização apresenta uma composição farmacêutica, onde a composição é uma composição de pomada.

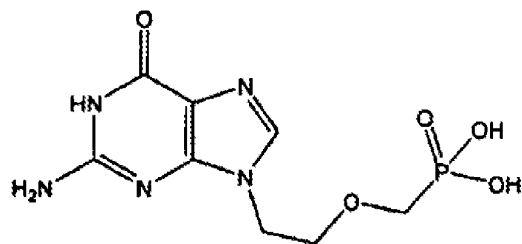
Uma realização da presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula I ou um sal do mesmo farmacêuticamente aceitável, e uma quantidade eficaz de, pelo menos, um agente antiviral, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Um aspecto da presente realização apresenta uma composição farmacêutica, onde a composição é uma composição em gel.

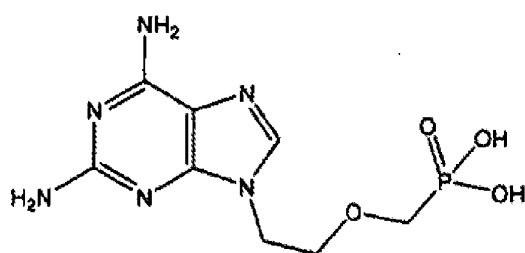
Outro aspecto da presente realização apresenta uma composição farmacêutica, onde a composição é uma composição de pomada.

#### Definições

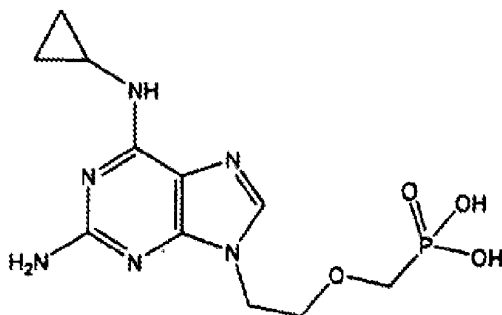
O termo "PMEG" refere-se ao composto 9-(2-fosfonilmetoxietil) guanina,



O termo "PMEDAP" refere-se ao composto 9-(2-fosfonilmetoxietil)-2,6-diaminopurina,



O termo "cprPMEDAP" refere-se ao composto 9-(2-fosfonilmetoxietil)-2-amino-6-(ciclopropil)purina,



A "biodisponibilidade" é o grau no qual o agente farmacologicamente activo se torna disponível para o tecido alvo após a introdução do agente no corpo. A intensificação da biodisponibilidade de um agente farmacologicamente activo pode proporcionar um tratamento eficaz e mais eficiente para os doentes, uma vez que para uma determinada dose, parte do agente farmacologicamente activo estará mais disponível nos sítios do tecido alvo.

Os termos "fosfonato" e "grupo de fosfonato" incluem fracções ou grupos funcionais dentro de uma molécula que compreende um fósforo que é 1) ligado por ligação simples a um carbono, 2) ligado por ligação dupla a um heteroátomo, 3) ligado por ligação simples a um heteroátomo, e 4) ligado por ligação simples a outro heteroátomo, em que cada heteroátomo pode ser igual ou diferente. Os termos "fosfonato" e "grupo de fosfonato" incluem também fracções ou grupos funcionais que compreendem um fósforo no mesmo estado de oxidação, tal como o fósforo acima descrito, assim como fracções ou grupos funcionais que compreendem uma fracção de pro-fármaco que pode ser separada de um composto de modo a que este possa reter um fósforo com as características acima descritas. Por exemplo, os termos "fosfonato" e "grupo de fosfonato" incluem ácido fosfónico, monoéster fosfónico, diéster fosfónico e fosfonamidoato e grupos funcionais de fosfontioato. Numa realização específica da invenção, os termos "fosfonato" e "grupo de fosfonato" incluem fracções ou grupos funcionais dentro de uma molécula que compreende um fósforo que é 1) ligado por ligação simples a um carbono, 2) ligado por ligação dupla a um oxigénio, 3) ligado por ligação simples a um oxigénio, e 4) ligado por ligação simples a outro oxigénio, assim como fracções ou grupos funcionais que compreendem uma fracção de um pró-fármaco que pode separar-se de um composto de modo a que este possa reter um fósforo com tais características. Numa outra realização específica da invenção, os termos "fosfonato" e "grupo de fosfonato" incluem fracções ou grupos funcionais dentro de uma molécula que compreende um fósforo que é 1) ligado por ligação simples a um carbono, 2) ligado por ligação dupla a um oxigénio, 3) ligado por ligação simples a um oxigénio ou azoto, e 4) ligado por ligação simples a outro oxigénio ou

azoto, assim como fracções ou grupos funcionais que compreendem uma fracção de um pró-fármaco que pode separar-se de um composto de modo a que o mesmo possa reter um fósforo com tais características.

São conhecidos métodos e receitas para determinar a estabilidade de compostos em secreções gastrointestinais substitutas. Os compostos são presentemente definidos como estáveis no tracto gastrointestinal onde menos do que cerca de 50% mol dos grupos protegidos são desprotegidos no suco gástrico ou intestinal substituto na incubação durante 1 hora a 37 °C. Estes compostos são adequados para a utilização nesta realização. De salientar que o facto destes compostos serem simplesmente estáveis para o tracto gastrointestinal não significa que os mesmos não possam ser hidrolisados *in vivo*. Os pró-fármacos serão tipicamente estáveis no sistema digestivo, mas são substancialmente hidrolisados para o fármaco parental no lúmen digestivo, fígado ou outro órgão metabólico, ou dentro das células em geral.

Em determinados casos, os compostos da invenção podem também existir como isómeros tautoméricos. Por exemplo, os tautómeros eno-amino podem existir para sistemas de imidazol, guanidina, amidina, e tetrazol e todas as suas possíveis formas tautoméricas estão incluídas no âmbito da invenção.

O termo "pró-fármaco", tal como presentemente utilizado, refere-se a qualquer composto que quando administrado a um sistema biológico gera a substância do fármaco, isto é, ingrediente activo, como um resultado de reacção(ões) química(s) espontânea(s); reacção(ões) química(s) catalisada(s) por enzima, fotólise, e/ou reacção(ões) química(s) metabólica(s). Um pró-fármaco é,

deste modo, uma forma latente ou análoga covalentemente modificada de um composto terapeuticamente activo.

"Fracção de pro-fármaco" refere-se a um grupo funcional lábil que se separa do composto inibitório activo durante o metabolismo, sistemicamente, dentro de uma célula, por hidrólise, clivagem enzimática, ou por algum outro processo (Bundgaard, Hans, "Design and Application of Prodrugs" em *A Textbook of Drug Design and Development* (1991), P. Krosggaard-Larsen e H. Bundgaard, Eds. Harwood Academic Publishers, pp. 113-191). As enzimas que têm capacidade para um mecanismo de activação enzimático com os compostos de pró-fármaco de fosfonato da invenção incluem, não se limitando, no entanto, a, amidases, esterases, enzimas microbianas, fosfolipases, colinesterases, e fosfases. As fracções de pro-fármacos podem servir para intensificar a solubilidade, a absorção e a lipofilicidade de forma a otimizar a libertação, a biodisponibilidade e a eficácia do fármaco. A fracção do pró-fármaco pode incluir um metabólito activo ou o próprio fármaco.

As fracções de pró-fármaco exemplificativas incluem  $-CH_2OC(=O)R$  de ésteres de aciloximetilo lábil ou hidroliticamente sensível e  $-CH_2OC(=O)OR$  de carbonatos de aciloximetilo onde, neste caso, R é alquilo- $C_1-C_6$ , alquilo- $C_1-C_6$  substituído, arilo- $C_6-C_{20}$  ou arilo- $C_6-C_{20}$  substituído. O éster de aciloxialquilo foi primeiro utilizado como uma estratégia de pró-fármaco para ácidos carboxílicos e em seguida aplicado a fosfatos e fosfonatos por Farquhar et al. (1983) *J. Pharm. Sci.* 72: 324; assim como nas patentes norte-americanas. n<sup>os</sup> 4816570, 4968788, 5663159 e 5792756. Subsequentemente, o éster de aciloxialquilo foi utilizado para transportar os ácidos fosfónicos através das membranas celulares e para

intensificar a biodisponibilidade oral. Uma variante próxima do éster de aciloxialquilo, do éster de alcóxicarboniloxialquilo (carbonato), pode também intensificar a biodisponibilidade oral como uma fracção do pró-fármaco nos compostos das combinações da invenção. Um éster de aciloximetilo exemplar é isopropilcarboniloximetoxi,  $-\text{OCH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_2$ . Uma fracção do pró-fármaco de carbonato de aciloximetilo exemplar é o carbonato de isopropilcarboniloximetilo,  $\text{HO}(\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_2)$ .

O grupo de fosfonato pode ser uma fracção do pró-fármaco de fosfonato. A fracção do pró-fármaco pode ser sensível a hidrólise, tal como, embora não se limitando a, um grupo de carbonato de isopropilcarbonil-oximetoxi ou isopropilcarboniloximetilo. Alternativamente, a fracção do pró-fármaco pode ser sensível a clivagem potencializada enzimática, tal como um éster de lactato ou um grupo de éster de fosfonamido.

Ésteres de arilo de grupos de fósforo, principalmente ésteres de fenilo, são apresentados para intensificar a biodisponibilidade oral (De Lombaert e outros (1994) *J. Med. Chem.* 37:498). Foram também descritos ésteres de fenilo que contêm um orto éster carboxílico para o fosfato (Khamnei and Torrence, (1996) *J. Med. Chem.* 39:4109-4115). Os ésteres de benzilo são apresentados para gerar o ácido fosfónico parental. Em alguns casos, os substituintes na posição *orto* ou *para* podem acelerar a hidrólise. Os análogos de benzilo com um fenol acilado ou um fenol alquilado podem gerar o composto fenólico através da acção de enzimas, por exemplo, esterases, oxidases, etc., a qual, por sua vez, é submetida a clivagem na ligação C-O benzílico para gerar o ácido fosfórico e o intermediário de

meteto de quinona. Os exemplos desta classe de pro-fármacos são descritos por Mitchell e outros (1992) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 2345; Glazier WO 91/19721. Foram ainda descritos outros pro-fármacos benzílicos que incluem um grupo que contém éster carboxílico ligado ao metileno benzílico. (Glazier WO 91/19721). Os pro-fármacos que contêm Tio são apresentados como úteis para o transporte intracelular de fármacos de fosfonato. Estes proésteres contêm um grupo de etiltio no qual o grupo de tiol é esterificado com um grupo de acilo ou combinado com outro grupo de tiol para formar um dissulfeto. A de-esterificação ou redução do dissulfeto gera o intermediário de tio livre que subsequentemente se desfazem em ácido fosfórico e epissulfeto (Puech e outros (1993) *Antiviral Res.*, 22: 155-174; Benzaria e outros (1996) *J. Med. Chem.* 39: 4958). Os ésteres cíclicos de fosfonato têm sido igualmente descritos como pro-fármacos de compostos que contêm fósforo (Erion e outros, patente norte-americana. nº 6312662).

"Grupo de protecção" refere-se a uma fracção de um composto que mascara ou altera as características de um grupo funcional ou as características do composto como um todo. As estratégias e grupos de protecção químicos para protecção/desprotecção são bem conhecidos na técnica. Vide por exemplo, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Theodora W. Greene, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991. Os grupos de protecção são frequentemente utilizados para mascarar a reactividade de certos grupos funcionais, para ajudar na eficácia de reacções químicas desejadas, por exemplo, preparar e quebrar ligações químicas num modelo ordenado e planeado. A protecção de grupos funcionais de um composto altera outras características físicas para além da reactividade do grupo funcional protegido, tal como a

polaridade, lipofilicidade (hidrofobicidade), e outras características que podem ser medidas por instrumentos analíticos comuns. Os intermediários quimicamente protegidos podem ser inactivos ou biologicamente activos.

Os compostos protegidos podem também exibir características alteradas e, em alguns casos, optimizadas, *in vitro* e *in vivo*, tais como, a passagem através de membranas celulares e resistência a degradação enzimática ou sequestro. Neste caso, os compostos protegidos com efeitos terapêuticos intencionais podem ser referidos como pro-fármacos.

Outra função de um grupo de protecção é converter o fármaco parental num pró-fármaco, através da qual o fármaco parental é libertado na conversão do pró-fármaco *in vivo*. Considerando que os pro-fármacos activos podem ser absorvidos de modo mais eficaz comparativamente ao fármaco parental, os pro-fármacos podem possuir maior potência *in vivo* do que o fármaco parental. Os grupos de protecção são removidos *in vitro*, no exemplo de intermediários químicos, ou *in vivo*, no caso de pro-fármacos. No caso dos intermediários químicos, não é particularmente importante que os produtos resultantes após a desprotecção, por exemplo, os álcoois, sejam fisiologicamente aceitáveis, embora normalmente seja mais desejável que os produtos sejam farmacologicamente inócuos.

Qualquer referência a qualquer dos compostos da invenção inclui também uma referência a um sal fisiologicamente aceitável dos mesmos. Exemplos de sais fisiologicamente aceitáveis dos compostos da invenção incluem sais derivados de uma base apropriada, tais como um metal alcalino (por exemplo, sódio), um alcalino terroso (por exemplo, magnésio), amónio e  $NX_4^+$  (em que X é alquilo-

C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>). Os sais fisiologicamente aceitáveis de um átomo de hidrogênio ou um grupo de amino incluem sais de ácidos carboxílicos orgânicos, tais como ácidos acéticos, benzóicos, lácticos, fumáricos, tartáricos, maleícos, malónicos, málicos, isetiônicos, lactobiônicos e sucínicos; ácidos sulfônicos orgânicos, tais como ácidos metanossulfônicos, etanossulfônicos, benzenossulfônicos e p-toluenossulfônicos; e ácidos inorgânicos, tais como ácidos hidrocloreiros, sulfúricos, fosfóricos e sulfâmicos. Os sais fisiologicamente aceitáveis de um composto de um grupo de hidróxi incluem o anião do referido composto em combinação com um catião adequado tal como Na<sup>+</sup> e NX<sub>4</sub><sup>+</sup> (em que X é independentemente selecionado de H ou de um grupo alquilo-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>).

Tal como presentemente utilizado, o termo "gel" refere-se a sistemas semi-sólidos que consiste em suspensões preparadas com partículas inorgânicas pequenas ou moléculas orgânicas grandes delimitadas e interpenetradas por um líquido. Onde a massa de gel consiste em flocos de pequenas partículas, o gel é classificado como um sistema de duas fases e é algumas vezes denominado de magma. *Aluminum Hydroxide Gel* and *Bentonite Magma* são exemplos de sistemas de duas fases. Os géis de fase única consistem em macro moléculas orgânicas uniformemente distribuídas através de um líquido de modo a que não se verifique qualquer limite aparente entre as macro moléculas dispersas e o líquido. Os exemplos de tais géis são Carboximetilcelulose Sódica e Tragacanto. Embora os géis sejam comumente aquosos, álcoois e óleos podem também ser utilizados como uma fase contínua.

Tal como presentemente utilizado, o termo "pomada" refere-se a uma preparação semi-sólida para aplicação

externa de uma tal consistência que pode ser facilmente aplicada na pele por inunção. Estas preparações deve ter uma tal composição que possa amolecer e não necessariamente derreter quando aplicada ao corpo. Esta preparação serve como veículo para aplicação tópica de substâncias medicinais e funciona igualmente como protectores e emolientes para a pele.

Em termos de utilização terapêutica, os sais dos ingredientes activos dos compostos da invenção serão fisiologicamente aceitáveis, isto é, serão sais derivados de uma base ou de um ácido fisiologicamente aceitáveis. No entanto, os sais de ácidos ou bases que não são fisiologicamente aceitáveis podem também ter a sua utilização, por exemplo, na preparação ou purificação de um composto fisiologicamente aceitável.

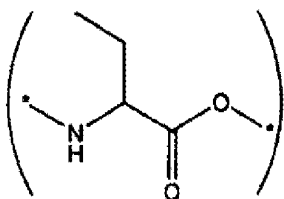
"Alquilo" é um hidrocarboneto-C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> que contém átomos de carbono normais, secundários ou terciários. Como exemplos, há que referir o metilo (Me, -CH<sub>3</sub>), etilo (Et, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1-pentilo (n-pentilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-pentilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-2-butilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-metil-2-butilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-metil-1-butilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-1-butilo (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-hexilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>), 2-hexilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-hexilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 2-metil-2-pentilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4-metil-2-pentilo

$(-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)$ , 3-metil-3-pentilo  $(-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$ , 2-metil-3-pentilo  
 $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2)$ , 2,3-dimetil-2-butilo  $(-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)$ , 3,3-dimetil-2-butilo  
 $(-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3)$ .

"Alcenilo" é um hidrocarboneto-C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> que contém átomos de carbono normais, secundários ou terciários com, pelo menos, um local de insaturação, isto é, uma ligação dupla carbono-carbono,  $sp^2$ . Exemplos deste incluem, embora não se limitem a, etileno ou vinilo  $(-\text{CH}=\text{CH}_2)$ , alilo  $(-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)$ , ciclopentenilo  $(-\text{C}_5\text{H}_7)$ , e 5-hexenilo  $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)$ .

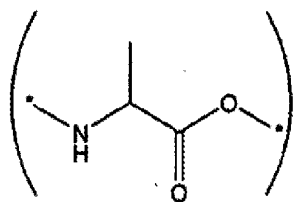
"Alcinilo" é hidrocarboneto-C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> que contém átomos de carbono normais, secundários ou terciários com, pelo menos, um local de insaturação, isto é, uma ligação tripla carbono-carbono,  $sp$ . Exemplos deste incluem, embora não se limitem a, acetileno  $(-\text{C}\equiv\text{CH})$  e propargilo  $(-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH})$ ,

Tal como presentemente utilizado, o termo "Aba" refere-se a uma fracção divalente de ácido 2-aminobutanóico,



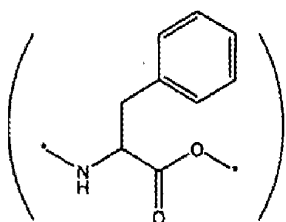
onde os pontos de ligação são designados por " \* ".

Tal como presentemente utilizado, o termo "Ala" refere-se a uma fracção divalente de alanina,



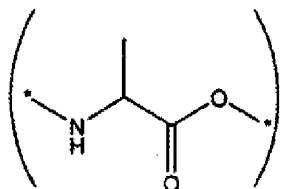
onde os pontos de ligação são designados por " \* ".

Tal como presentemente utilizado, o termo "Fe" refere-se a uma fracção divalente de alanina,



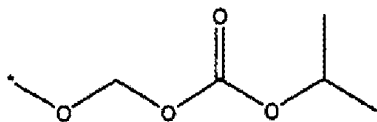
onde os pontos de ligação são designados pelo " \* ".

Tal como presentemente utilizado, o termo "Ala" refere-se a uma porção divalente de alanina,



onde os pontos de ligação são designados por " \* ".

Tal como presentemente utilizado, o termo "POC" refere-se à fracção divalente de carbonato de isopropilo de hidroximetilo,

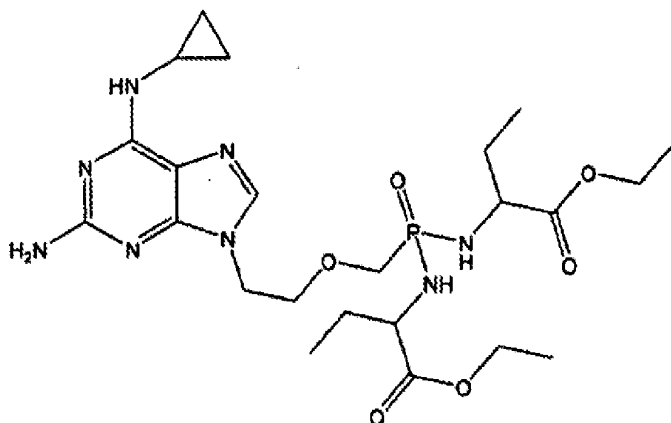


onde o ponto de ligação é designado por " \* ".

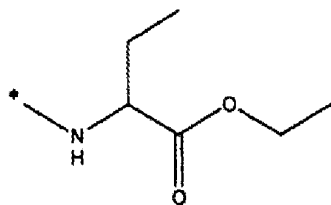
Os grupos substituintes  $Y^{1A}$  e  $Y^{1B}$  podem ser descritos utilizando-se a nomenclatura que incorpora as fracções de

aminoácido divalente acima mencionadas e as porções de alquilo, tal como indicado na Tabela 80-3.

Por exemplo, o composto da fórmula,

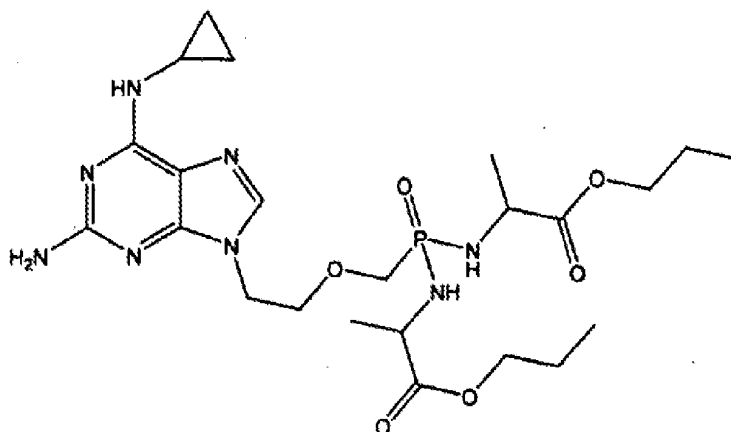


pode ser descrito utilizando-se a nomenclatura da Fórmula I, onde  $Y^{1A}$  e  $Y^{1B}$  são  $-N(R^X)$ , onde  $R^X$  é  $R^2$ , onde  $R^2$  é  $R^4$  substituído por  $R^{3d}$ , onde  $R^4$  é etilo substituído por  $R^{3d}$  e também onde  $R^{3d}$  é  $-C(R^{3b})OW^3$ , onde  $R^{3b}$  é  $=O$ , onde  $W^3$  é  $W^5$ , onde  $W^5$  é um carboxilo, onde  $R^4$  é propilo substituído por  $R^{3d}$ , onde  $R^{3d}$  é  $-C(R^{3b})OR^4$ , onde  $R^{3b}$  é  $=O$ , e onde  $R^4$  é etilo. Alternativamente, o referido composto pode ser descrito, como na Tabela 80-3, como Fórmula I, onde  $Y^{1A}$  e  $Y^{1B}$  são "Aba-Et", que descreve a fracção (onde " \* " indica o ponto de ligação),

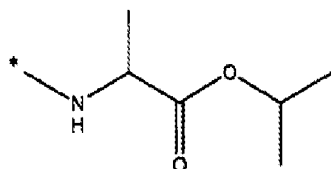


o qual é "Aba" ligado a "Et" (etilo).

Por exemplo, o composto da fórmula,



pode ser descrito utilizando-se a nomenclatura da Fórmula I, onde  $Y^{1A}$  e  $Y^{1B}$  são  $-N(R^X)$ , onde  $R^X$  é  $R^2$ , onde  $R^2$  é  $R^4$  substituído por  $R^{3d}$ , onde  $R^4$  é etilo substituído por  $R^{3d}$ , onde  $R^{3d}$  é  $-C(R^{3b})OR^4$ , onde  $R^{3b}$  é  $=O$ , e onde  $R^4$  é n-propilo. Alternativamente, o referido composto pode ser descrito, como na Tabela 80-3, como Fórmula I, onde  $Y^{1A}$  e  $Y^{1B}$  são "Ala-nPr", que descreve a fracção (onde " \* " indica o ponto de ligação),



que é "Ala" ligado a "nPr" (n-propilo).

O termo "quiral" refere-se a moléculas que têm a característica da não sobreposição da imagem de parceiro em espelho, ao mesmo tempo que o termo "aquiral" se refere a moléculas que podem ser sobrepostas em parceiros simétricos.

O termo "estereoisómeros" refere-se a compostos que possuem uma constituição química idêntica, mas que diferem no que se refere à disposição dos átomos ou grupos no espaço.

"Diaestereómero" refere-se a um estereoisómero com dois ou mais centros de quiralidade e cujas moléculas não são imagens de espelho uma da outra. Diaestereómeros têm características físicas diferentes, *por exemplo*, pontos de fusão, pontos de ebulição, características espectrais, e reactividades. As misturas de diaestereómeros podem separar-se sob procedimentos analíticos de alta resolução tais como electroforese e cromatografia.

Os "enantiómeros" referem-se a dois estereoisómeros de um composto que são imagens de espelho não sobrepostas uma da outra.

O termo "tratamento" ou "tratando", no âmbito a que o mesmo se refere, a uma doença ou condição, inclui a prevenção da ocorrência da doença ou condição, inibição da doença ou condição, eliminação da doença ou condição, e/ou alívio de um ou mais sintomas da doença ou condição.

O termo "antiproliferativo" refere-se a actividades utilizadas para, ou que tendem a inibir o crescimento celular, tal como efeitos *antiproliferativos* sobre células tumorais, ou efeitos antiproliferativos sobre células viralmente infectadas.

O termo "apoptose" refere-se a um dos principais tipos de morte celular programada. Como tal, é um processo suicida deliberado por uma célula indesejada num organismo multicelular. Ao contrário da necrose, que é uma forma de morte celular que resulta da lesão de tecido aguda, a apoptose é realizada num processo ordenado que geralmente confere vantagens durante um ciclo de vida dum organismo. A apoptose é um tipo de morte celular em que a célula emprega um mecanismo celular especializado para se matar a si própria; um mecanismo suicida da célula que permite que os metazoários controlem o número de células e eliminem

células que ameacem a sobrevivência do animal. A apoptose pode ocorrer, por exemplo, quando uma célula é danificada e conseqüentemente irreparável, ou infectada com um vírus. Os estímulos para a apoptose podem vir da própria célula, do seu tecido circundante ou de uma célula que é parte do sistema imune, a qual pode ser química, biológica ou física. O termo "apoptídico" refere-se ao processo de apoptose.

Definições estereoquímicas e convenções presentemente utilizadas seguem geralmente S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; e Eliel, E. e Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Muitos compostos orgânicos existem em formas opticamente activas, isto é, com capacidade de rodar o plano de luz polarizada no plano. Na descrição de um composto opticamente activo, os prefixos D e L ou R e S são utilizados para denotar a configuração absoluta da molécula à volta do(s) seu(s) centro(s) quiral. Os prefixos d e l ou (+) e (-) são utilizados para designar o sinal de rotação da luz polarizada no plano pelo composto, com (-) ou l significando que o composto é levógiro. Um composto préfixo com (+) ou d é dextrógiro. Para uma determinada estrutura química, esses estereoisómeros são idênticos excepto os que são imagens de espelho um do outro. Um estereoisómero específico pode também ser referido como um enantiómero, e uma mistura de tais isómeros é frequentemente denominada de mistura enantiomérica. Uma mistura de 50:50 de enantiómeros é referida como uma mistura racémica ou um racemato, que pode ocorrer onde não existe nenhuma estereo-selecção ou estereo-especificidade num processo ou reacção química. Os termos "mistura

racémica" e "racemato" referem-se a uma mistura equimolar de duas espécies enantioméricas, desprovidas de actividade óptica.

#### Grupos de Protecção

No âmbito da presente invenção, os grupos de protecção incluem fracções de pró-fármaco e grupos de protecção químicos.

Os grupos de protecção encontram-se disponíveis e são comumente conhecidos e utilizados assim como são opcionalmente utilizados para prevenir reacções colaterais com o grupo protegido durante procedimentos sintéticos, isto é vias ou métodos para preparar os compostos da invenção. Em geral, a decisão de qual o grupo a proteger, o momento de tomar tal decisão, e a natureza do grupo de protecção química "PG" dependerá da química da reacção a ser protegida contra (*por exemplo*, condições acídicas, básicas, oxidativas, redutivas ou outras) e a direcção pretendida da síntese. Os grupos PG não necessitam ser, e geralmente não são, os mesmos se o composto for substituído com PG múltiplo. Em geral, PG será utilizado para proteger grupos funcionais, tais como grupos de carboxilo, hidroxilo, tio, ou amino para deste modo prevenir reacções colaterais ou para de outra maneira facilitar a eficácia sintética. A ordem de desprotecção para produzir grupos desprotegidos livres depende da direcção pretendida da síntese e das condições de reacção a serem encontradas, e pode ocorrer em qualquer ordem como determinado pelo técnico.

Podem ser protegidos vários grupos funcionais dos compostos da invenção. Por exemplo, grupos de protecção para grupos de -OH (se hidroxilo, ácido carboxílico, ácido fosfónico, ou outras funções) incluem "grupos formadores de

éter ou éster". Grupos formadores de éter ou éster são capazes de funcionar como grupos de protecção química nos esquemas sintéticos aqui mencionados. No entanto, alguns grupos de protecção de tio e hidroxilo não são grupos formadores de éter nem de éster, como será entendido pelos especialistas na técnica, e são incluídos com amidos, tal como abaixo discutido.

Um número muito grande de grupos de protecção de hidroxilo e grupos formadores de amido e reacções de clivagem química correspondentes são descritos em *Protective Groups in Organic Synthesis*, Theodora W. Greene (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991, ISBN 0-471-62301-6) ("Greene"). Ver também Kocienski, Philip J.; *Protecting Groups* (Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1994), que é aqui incorporado por referência na sua totalidade. Em particular Capítulo 1, *Protecting Groups: An Overview*, páginas 1-20, Capítulo 2, *Hydroxyl Protecting Groups*, páginas 21-94, Capítulo 3, *Diol Protecting Groups*, páginas 95-117, Capítulo 4, *Carboxyl Protecting Groups*, páginas 118-154, Capítulo 5, *Carbonyl Protecting Groups*, páginas 155-184. Para grupos de protecção para ácido carboxílico, ácido fosfónico, fosfonato, ácido sulfónico e outros grupos de protecção para ácidos, ver Greene como mencionado abaixo. Estes grupos incluem, a título de exemplo e não de limitação, ésteres, amidos, hidrazidos, e outros.

#### Grupos de protecção formadores de éter e éster

Grupos formadores de éster incluem: (1) grupos formadores de éster de fosfonato, tais como ésteres de fosfonamidato, ésteres de fosforotioato, ésteres de fosfonato, e fosfon-bis-amidatos; (2) grupos formadores de éster de carboxilo, e (3) grupos formadores de éster de enxofre, tais como sulfonato, sulfato, e sulfinato.

As fracções de fosfonato dos compostos da invenção podem ou não ser fracções do pró-fármaco, isto é, podem ou não ser susceptíveis de modificação ou clivagem hidrolítica ou enzimática. Certas fracções de fosfonato são estáveis sob a maior parte ou quase todas as condições metabólicas. Por exemplo, um dialquilfosfonato, onde os grupos de alquilo têm dois ou mais carbonos, podem ter estabilidade apreciável *in vivo* devido a uma baixa taxa de hidrólise.

#### Sais e Hidratos

As composições desta invenção compreendem opcionalmente sais dos compostos aqui presentes, especialmente sais não tóxicos farmacologicamente aceitáveis que contêm, por exemplo,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ . Estes sais podem incluir os sais derivados por combinação de catiões apropriados, tais como iões de metal alcalino terroso e álcali ou iões de amino quaternário e amónio com uma fracção de anião de ácido. Os sais monovalentes são os preferidos se um sal solúvel em água for desejado.

Sais de metal são tipicamente preparados por reacção de um composto desta invenção com um hidróxido de metal. Os exemplos de sais de metal que são preparados desta maneira são os sais que contêm  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , e  $\text{K}^+$ . Um sal de metal menos solúvel pode ser precipitado da solução de um sal mais solúvel por adição do composto de metal adequado.

Além disso, os sais podem ser formados pela adição de ácido de certos ácidos orgânicos e inorgânicos, por exemplo,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HBr}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , ou ácidos sulfónicos orgânicos, a centros básicos, ou a grupos acídicos. Finalmente, deve entender-se que as composições aqui incluídas compreendem compostos da invenção na sua forma não ionizada, bem como

híbrida, e combinações com quantidades estequiométricas de água como em hidratos.

Os sais dos compostos parentais com um ou mais aminoácidos estão igualmente incluídos no âmbito desta invenção.. Quaisquer dos aminoácidos acima descritos são adequados, especialmente os aminoácidos de ocorrência natural encontrados como componentes de proteína, embora o aminoácido seja tipicamente um suporte de cadeia simples com um grupo básico ou ácido, por exemplo, lisina, arginina ou ácido glutâmico, ou um grupo neutro, tal como glicina, serina, treonina, alanina, isoleucina, ou leucina.

#### Métodos de Inibição de HPV

Outro aspecto da invenção refere-se aos compostos da invenção para utilização em métodos para inibir a actividade de HPV incluindo a fase de tratamento de uma amostra suspeita de conter HPV com um composto da invenção.

As composições da invenção actuam como inibidores de HPV, como intermediários de tais inibidores ou têm outras utilidades como abaixo descrito.

A fase de tratamento da invenção compreende a adição da composição da invenção à amostra ou compreende a adição de um precursor da composição à amostra. A fase de adição compreende qualquer método de administração como acima descrito.

Se desejado, a actividade de HPV após aplicação da composição pode ser observada por qualquer método incluindo métodos directos e indirectos de detecção da actividade de HPV. Métodos quantitativos, qualitativos, e semiquantitativos de determinação da actividade de HPV são todos contemplados. Um dos métodos de avaliação descritos acima é tipicamente aplicado. No entanto, é também

aplicável qualquer outro método, tal como observação das propriedades fisiológicas de um organismo vivo.

#### Rastreo para Inibidores de HPV

Os compostos e composições da invenção são avaliados quanto à utilidade terapêutica por meio de avaliação do  $EC_{50}$ , que é a concentração do composto que obtém 50% de inibição de crescimento celular. A relação de  $EC_{50}$  em células infectadas e não infectadas por HPV apresenta uma medida da selectividade do composto para as células infectadas pelo vírus. Os protocolos utilizados para obter essas medidas são apresentados nos Exemplos.

#### Formulações Farmacêuticas e Vias de Administração

Os compostos desta invenção são formulados com excipientes e veículos convencionais, que serão seleccionados de acordo com a prática usual. Os comprimidos conterão excipientes, deslizantes, cargas, aglutinantes e similares. As formulações aquosas são preparadas em forma estéril, e quando destinadas a libertação por administração excepto oral, serão geralmente isotónicas. Todas as formulações conterão opcionalmente excipientes, tais como aqueles mencionados no "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (1986). Os excipientes incluem ácido ascórbico e outros antioxidantes, agentes quelantes, tal como EDTA, hidratos de carbono, tais como dextrina, hidroxialquilcelulose, hidroxialquilmetilcelulose, ácido esteárico e outros. O pH das formulações varia de cerca de 3 a cerca de 11, sendo normalmente cerca de 7 a 10.

Um ou mais compostos da invenção (aqui referidos neste contexto como os ingredientes activos) são administrados por qualquer via apropriada à condição a ser tratada. As vias de administração adequadas incluem oral, rectal,

nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), vaginal e parentérica (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal e epidural), e similares. Será apreciado que a rotina preferida possa variar com a condição do recipiente. Uma vantagem dos compostos desta invenção é que estes encontram-se oralmente biodisponíveis e podem ser doseados oralmente.

Ao mesmo tempo que é possível para os ingredientes activos serem administrados sozinhos, pode ser preferível apresentá-los como formulações farmacêuticas. As formulações, ambas para uso veterinário e humano, da invenção compreendem pelo menos um ingrediente activo, como definido acima, juntamente com um ou mais veículos aceitáveis e opcionalmente outros ingredientes terapêuticos. Os portadore(s) devem ser "aceitáveis" no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes da formulação e fisiologicamente inócuos ao receptor dos mesmos.

As formulações incluem as adequadas para as vias de administração anteriormente referidas. As formulações podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer dos métodos bem conhecidos na técnica de farmácia. Técnicas e formulações são geralmente encontradas em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Estes métodos incluem a fase de associar o ingrediente activo com o veículo que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral as formulações são preparadas uniforme e intimamente associando o ingrediente activo a veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos, e então, se necessário, modelam o produto.

As formulações da invenção adequadas para administração oral são preparadas como unidades discretas, tais como cápsulas ou comprimidos, sendo que cada um destes contém uma quantidade pré-determinada do ingrediente activo; como um pó ou grânulos; como solução ou uma suspensão num líquido aquoso ou líquido não aquoso; ou como uma emulsão líquida oleosa em água ou uma emulsão líquida aquosa em óleo. O ingrediente activo pode também ser apresentado como um bólus, eletuário ou pasta.

Um comprimido é preparado por compressão ou moldagem, opcionalmente com um ou mais ingredientes acessórios. Os comprimidos prensados podem ser preparados por compressão, numa máquina adequada, do ingrediente activo em uma forma de fluxo livre, tal como um pó ou grânulos, opcionalmente misturados com um aglutinante, lubrificante, diluente inerte, conservante, agente tenso-activo ou agente de dispersão. Os comprimidos moldados podem ser preparados por moldagem, numa máquina adequada, de uma mistura do ingrediente activo em pó humedecido com um diluente líquido inerte. Os comprimidos podem ser opcionalmente revestidos ou com ranhura e opcionalmente formulados a fim de facultar uma libertação lenta ou controlada do ingrediente activo do mesmo.

Para infecções oculares ou outros tecidos externos, por exemplo boca e pele, as formulações são preferivelmente aplicadas como uma pomada ou creme tópico contendo o(s) ingrediente(s) activo(s) numa quantidade de, por exemplo, 0,075 a 20% peso/peso (incluindo ingrediente(s) activo(s) numa ordem entre 0,1% e 20% em incrementos de 0,1% peso/peso, tal como 0,6% peso/peso, 0,7% peso/peso, etc), preferivelmente 0,2 a 15% peso/peso e mais preferivelmente 0,5 a 10% peso/peso. Quando formulados em forma de pomada,

os ingredientes activos podem ser utilizados com uma base de pomada miscível em água ou parafina. Alternativamente, os ingredientes activos podem ser formulados em forma de creme com uma base de creme oleoso em água. Se desejado, a fase aquosa da base de creme pode incluir, por exemplo, pelo menos 30% peso/peso de um álcool poli hídrico, isto é um álcool que contém dois ou mais grupos de hidroxilo, tal como propileno glicol, butano 1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol e glicol de polietileno (incluindo PEG 400) e misturas dos mesmos. As formulações tópicas podem incluir desejavelmente um composto que intensifique a absorção ou penetração do ingrediente activo através da pele ou outras áreas afectadas. Exemplos de tais intensificadores de penetração dérmica incluem o sulfóxido de dimetila e análogos relacionados.

A fase oleosa das emulsões desta invenção pode ser constituída por ingredientes conhecidos de uma maneira conhecida. Enquanto esta fase pode compreender simplesmente um emulsificante (também conhecido como um emulgente), pode também desejavelmente compreender uma mistura de, pelo menos, um emulsificante com uma gordura ou um óleo ou com ambos, uma gordura e um óleo. Preferivelmente, um emulsificante hidrofílico é incluído juntamente com um emulsificante lipofílico que actua como um estabilizador. É também preferido incluir ambos, um óleo e uma gordura. Juntos, o(s) emulsificante(s) com ou sem estabilizadores(s) constituem a assim chamada cera emulsificante, e a cera juntamente com o óleo e gordura constituem a assim chamada base de pomada emulsificante que forma a fase oleosamente dispersa das formulações de creme.

Os emulgentes e estabilizadores de emulsão adequados para utilização na formulação da invenção incluem Tween®

60, Span® 80, álcool cetoestearílico, álcool benzílico, álcool miristílico, monoestearato de glicerila e sulfato de laurilo de sódio.

A escolha de óleos ou gorduras adequada para a formulação é baseada na obtenção das propriedades cosméticas desejadas. O creme deve preferivelmente ser um produto não gorduroso, não manchável e lavável com consistência adequada para evitar fugas nos tubos ou noutros recipientes. Cadeia linear ou ramificada, ésteres de alquilo mono- ou dibásico, tal como di-isoadipato, estearato de isocetilo, diéster de glicol de propileno de ácidos gordurosos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilexilo ou uma mistura de ésteres de cadeia ramificada conhecidos como Crodamol CAP pode ser utilizada, sendo os três últimos ésteres os preferidos. Esses podem ser utilizados sozinhos ou em combinação, dependendo das propriedades requeridas. Alternativamente, lipídios de ponto de fusão elevado, tal como parafina macia branca e/ou parafina líquida ou outros óleos minerais são empregados.

As formulações adequadas para administração tópica para o olho também incluem colírios em que o ingrediente activo é dissolvido ou suspenso num veículo adequado, especialmente num solvente aquoso para o ingrediente activo. O ingrediente activo está preferivelmente presente em tais formulações numa concentração de 0,5 a 20%, vantajosamente 0,5 a 10% particularmente cerca de 1,5% peso/peso.

As formulações adequadas para administração tópica na boca incluem losangos compreendendo o ingrediente activo numa base aromatizada, usualmente sacarose e acácia ou

tragacanto; pastilhas compreendendo o ingrediente activo numa base inerte, tal como gelatina e glicerina, ou sacarose e acácia; e anti-sépticos bucais compreendendo o ingrediente activo num veículo líquido adequado.

As formulações para administração rectal podem ser apresentadas como um supositório com uma base adequada compreendendo, por exemplo manteiga de cacau ou um salicilato.

As formulações adequadas para administração intrapulmonar ou nasal têm um tamanho de partícula, por exemplo, na ordem de 0,1 a 500 micrones (incluindo tamanhos de partícula, numa ordem entre 0,1 e 500 micrones em incrementos microns, tais como 0,5, 1, 30 micrones, 35 microns, etc.), que são administradas por inalação rápida através da passagem nasal ou por inalação através da boca a fim de alcançar os sacos alveolares. As formulações adequadas incluem soluções aquosas ou oleosas do ingrediente activo. As formulações adequadas para administração por aerossol ou pó seco podem ser preparadas de acordo com métodos convencionais e podem ser libertadas com outros agentes terapêuticos, tais como compostos até agora utilizados no tratamento ou profilaxia de infecções por influenza A ou B como descrito abaixo.

As formulações adequadas para administração vaginal podem ser apresentadas como formulações de pessários, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou spray, que, para além do ingrediente activo, contêm estes veículos que na técnica são conhecidos como apropriados para o efeito.

As formulações adequadas para administração parentérica incluem soluções de injeção estéril aquosa e não aquosa que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostatos e solutos que tornam a formulação isotónica com o sangue do

receptor pretendido; e suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes.

As formulações são apresentadas em recipientes de dose única ou múltiplas doses, por exemplo, frascos e ampolas seladas, e podem ser armazenadas numa condição seca por congelamento (liofilizadas) que requerem apenas a adição do veículo líquido estéril, por exemplo água para injeção, imediatamente antes de utilização. Suspensões e soluções de injeção improvisadas são preparadas de pós estéreis, grânulos e comprimidos do tipo previamente descrito. As formulações de dosagem única preferidas são aquelas que contêm uma dose diária ou subdose diária única, como acima mencionado, ou uma fracção apropriada da mesma, do ingrediente activo.

Deve entender-se que além dos ingredientes particularmente acima mencionados, as formulações desta invenção podem incluir outros agentes convencionais na técnica relacionados com o tipo de formulação em questão, por exemplo os agentes adequados para administração oral podem incluir agentes de aromatização.

A invenção apresenta também composições veterinárias compreendendo pelo menos um ingrediente activo como acima definido juntamente com um veículo veterinário.

Os veículos veterinários são materiais úteis para efeitos de administração da composição e podem ser materiais sólidos, líquidos ou gasosos que são de outro modo inertes ou aceitáveis na técnica veterinária e que são compatíveis com o ingrediente activo. Essas composições veterinárias podem ser administradas oralmente, parentéricamente ou por qualquer outra via desejada.

Os compostos da invenção são utilizados para fornecer formulações farmacêuticas de libertação controlada contendo como ingrediente activo um ou mais compostos da invenção ("formulações de libertação controlada") em que a libertação do ingrediente activo é controlada e regulada de modo a permitir uma dosagem de menor frequência ou para melhorar o perfil de toxicidade ou farmacocinético de um determinado ingrediente activo.

A dose eficaz de ingrediente activo depende, pelo menos, da natureza da condição a ser tratada, toxicidade, em que medida o composto está a ser utilizado profilaticamente (doses menores) ou contra uma infecção por influenza activa, o método de libertação e a formulação farmacêutica, e será determinado pelo clínico utilizando estudos de escala de dose convencional. Pode estimar-se que esta formulação seja de cerca de 0,0001 a cerca de 100 mg/kg de peso corporal por dia; tipicamente, de cerca de 0,01 a cerca de 10 mg/kg de peso corporal por dia; mais tipicamente, de cerca de 0,01 a cerca de 5 mg/kg de peso corporal por dia; mais tipicamente, de cerca de 0,05 a cerca de 0,5 mg/kg de peso corporal por dia. Por exemplo, para inalação a dose candidata diária para um ser humano adulto de aproximadamente 70 kg de peso corporal irá variar entre 1 mg e 1000 mg, preferivelmente entre 5 mg e 500 mg, e pode tomar a forma de doses únicas ou múltiplas.

Os ingredientes activos da invenção são também utilizados em combinação com outros ingredientes activos. Tais combinações são seleccionadas com base na condição a ser tratada, reactividades cruzadas de ingredientes e fármaco-propriedades da combinação. Por exemplo, quando se tratam infecções virais do sistema respiratório, em particular infecção por influenza, as composições da

invenção são combinadas com antivirais (tais como amantidina, rimantadina e ribavirina), mucolíticos, expectorantes, broncodilatadores, antibióticos, antipiréticos, ou analgésicos. Ordinariamente, antibióticos, antipiréticos, e analgésicos são administrados juntamente com os compostos desta invenção.

#### Metabólitos dos Compostos da Invenção

Os produtos metabólicos *in vivo* dos compostos aqui descritos podem resultar por exemplo da oxidação, redução, hidrólise, amidação, esterificação e similares do composto administrado, primariamente devido ao processo enzimático. Estes produtos são tipicamente identificados por preparação de um composto marcado radioactivamente (por exemplo C<sup>14</sup> ou H<sup>3</sup>), da sua administração parentérica numa dose detectável (por exemplo maior do que cerca de 0,5 mg/kg) a um animal, tal como rato, ratinho, porquinho-da-índia, macaco, ou ao ser humano, deixando tempo suficiente para que o metabolismo ocorra (tipicamente cerca de 30 segundos a 30 horas) e isolando os seus produtos de conversão a partir da urina, sangue ou outras amostras biológicas. Esses produtos são facilmente isolados visto que são marcados (outros são isolados pelo uso de anticorpos capazes de ligar epítomos sobreviventes no metabólito). As estruturas metabólicas são determinadas de modo convencional, por exemplo por análise de MS ou RMN. Em geral, a análise de metabólitos é realizada da mesma forma que os estudos de metabolismo de fármaco convencionais bem conhecidos pelos especialistas na técnica. Os produtos de conversão, desde que encontrados *in vivo*, são úteis em ensaios diagnósticos para a dosagem terapêutica dos compostos da invenção mesmo que não possuam nenhuma actividade inibidora de neuraminidase deles próprios.

### Utilizações Adicionais para os Compostos desta Invenção

Os compostos desta invenção, ou as substâncias biologicamente activas produzidas a partir destes compostos por hidrólise ou metabolismo *in vivo*, são utilizados como imunogénicos ou para conjugação para proteínas, onde servem como componentes de composições imunogénicas para preparar anticorpos capazes de se ligarem especificamente às proteínas, aos compostos ou aos seus produtos metabólicos que retêm epítomos imunologicamente reconhecidos (locais de ligação de anticorpo). As composições imunogénicas são, portanto, úteis como intermediários na preparação de anticorpos para utilização em métodos de diagnóstico, de controlo de qualidade, ou outros, ou em ensaios para os compostos ou seus novos produtos metabólicos. Os compostos são úteis para o aumento dos anticorpos contra polipeptídeos que não imunogénicos, em que os compostos funcionam como locais hapténicos que estimulam uma resposta imune, a qual interage com a proteína conjugada não modificada.

Os produtos de hidrólise de interesse incluem produtos da hidrólise dos grupos acídicos e básicos protegidos acima descritos. Como observado acima, os amidos acídicos ou básicos que compreendem polipeptídeos imunogénicos, tais como albumina ou hemocianina de *Megathura* são geralmente úteis como imunogénicos. Os produtos metabólicos acima descritos podem reter um grau substancial de reactividade cruzada imunológica com os compostos da invenção. Desse modo, os anticorpos desta invenção serão capazes de se ligar aos compostos não protegidos da invenção sem se ligarem aos compostos protegidos; alternativamente os produtos metabólicos, serão capazes de se ligar aos compostos protegidos e/ou aos produtos metabólicos sem se

ligarem aos compostos protegidos da invenção, ou serão capazes de se ligar especificamente a qualquer um ou todos os três. Os anticorpos desejáveis não irão interagir substancialmente com materiais de ocorrência natural. A interactividade substancial é a reactividade sob condições de ensaio específicas para analisados específicos suficientes para interferir com os resultados do ensaio.

Os imunogénicos desta invenção contêm o composto desta invenção apresentando o epítopo desejado em associação com uma substância imunogénica. Dentro do contexto da invenção, esta associação significa uma ligação covalente para formar um conjugado imunogénico (quando aplicável) ou uma mistura de materiais não covalentemente ligados, ou uma combinação dos acima indicados. As substâncias imunogénicas incluem adjuvantes, tais como adjuvante de Freund, proteínas imunogénicas, tal como polipeptídeos virais, bacterianos, de levedura, planta e animal, em particular hemocianina de Megathura, albumina de soro, tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja, e polissacarídeos imunogénicos. Tipicamente, o composto que possui a estrutura do epítopo desejado é covalentemente conjugado a um polipeptídeo imunogénico ou polissacarídeo por meio da utilização de um agente de reticulação polifuncional (usualmente bifuncional). Os métodos para a produção de imunogénicos de hapteno são, eles próprios, convencionais, e quaisquer dos métodos utilizados até agora, para conjugação de haptenos com polipeptídeos imunogénicos ou similares são adequadamente utilizados aqui também, tendo em consideração os grupos funcionais dos produtos hidrolíticos ou precursores que se encontram disponíveis para reticulação assim como a probabilidade de produção de anticorpos

específicos para o epítopo em questão como opostos à substância imunogénica.

Tipicamente o polipeptídeo é conjugado para um local no composto da invenção distante do epítopo a ser reconhecido.

Os conjugados são preparados num modelo convencional. Por exemplo, os agentes de reticulação N-hidroxissucinimida, anidreto succínico ou  $\text{alqN=C=Nalq}$  são úteis na preparação dos conjugados desta invenção. Os conjugados compreendem um composto da invenção ligado por uma ligação ou um grupo de ligação de 1-100, tipicamente, 1-25, mais tipicamente 1-10 átomos de carbono à substância imunogénica. Os conjugados são separados de materiais de partida e por produtos utilizando a cromatografia ou método similar, e em seguida são filtrados estéreis e colocados em frascos para armazenagem.

Os animais são tipicamente imunizados contra os derivados ou conjugados imunogénicos e contra anticorpos anti-soro ou monoclonais preparados em modelo convencional.

Os compostos desta invenção são úteis como ligantes ou espaçadores na preparação de matrizes de absorção de afinidade, enzimas imobilizadas para o controlo do processo, ou reagentes de imunoensaio. Os compostos presentemente incluídos contêm uma multiplicidade de grupos funcionais que são adequados como sítios para reticulação das substâncias desejadas. Por exemplo, é convencional ligar reagentes de afinidade tais como hormonas, peptídeos, anticorpos, fármacos, e similares a substratos insolúveis. Estes reagentes insolúveis são utilizados em modelos conhecidos para absorver parceiros de ligação para os reagentes de afinidade de preparações produzidas, amostras diagnósticas e outras misturas impuras. Similarmente, as enzimas imobilizadas são utilizadas para executar

conversões catalíticas com recuperação fácil da enzima. Os compostos bifuncionais são comumente utilizados para ligar analitos a grupos detectáveis na preparação de reagentes diagnósticos.

Os ensaios de rastreio utilizam preferivelmente células de determinados tecidos susceptíveis a infecção por HPV. Os ensaios conhecidos na técnica são adequados para determinar a biodisponibilidade *in vivo* incluindo ensaios de estabilidade de lúmen intestinal, permeação celular, estabilidade de fígado homogeneizado e ensaios de estabilidade de plasma. No entanto, mesmo se o éster, amido ou outros derivados protegidos não forem convertidos *in vivo* para os grupos de carboxilo livre, amino ou hidroxilo, a sua utilidade como intermediários químicos mantém-se.

A utilidade para a presente invenção foi explicada por meio de ensaios anti-proliferação. Os ensaios antiproliferação avaliam o efeito de compostos sobre a proliferação de células cultivadas. As células são cultivadas durante 7 dias na presença de várias concentrações de compostos. Ao 7º dia, as células são coradas com tinta, e intensidade da coloração (proporcional ao número de célula) é avaliada por espectrofotómetro. Os dados são registados em função das concentrações de composto, ajustados à curva de resposta de dose sigmóide, da qual a concentração de composto que reduz a taxa de proliferação celular por 50% (50% de concentração eficaz ou EC<sub>50</sub>) é determinada. Os compostos activos em ensaios antiproliferação podem ser citostáticos (inibem a divisão celular) e/ou citocidas (mata células). Ao se realizarem os ensaios antiproliferação em células de cancro HPV positivas e células normais, identificamos compostos que inibem a

proliferação de células de cancro HPV positivas de modo mais eficaz do que células de tecidos humanos normais.

Métodos Exemplificativos de Preparação dos Compostos da Invenção.

A invenção refere igualmente métodos de preparação das composições da invenção. As composições são preparadas por quaisquer das técnicas aplicáveis de síntese orgânica. Muitas destas técnicas são bem conhecidas na técnica. No entanto, muitas das técnicas conhecidas são elaboradas em "Compendium of Organic Synthetic Methods" (John Wiley & Sons, New York), Vol. 1, Ian T. Harrison e Shuyen Harrison, 1971; Vol. 2, Ian T. Harrison e Shuyen Harrison, 1974; Vol. 3, Louis S. Hegedus e Leroy Wade, 1977; Vol. 4, Leroy G. Wade, jr., 1980; Vol. 5, Leroy G. Wade, Jr., 1984; e Vol. 6, Michael B. Smith; bem como March, J., "Advanced Organic Chemistry, Terceira Edição", (John Wiley & Sons, New York, 1985), "Comprehensive Organic Synthesis. Selectivity, Strategy & Efficiency em Modern Organic Chemistry. Em 9 Volumes", Barry M. Trost, Editor-in-Chief (Pergamon Press, Nova Iorque, impressão em 1993).

Abaixo indicado encontra-se um número de métodos exemplares para a preparação das composições da invenção. Estes métodos destinam-se a ilustrar a natureza destas preparações e não se destinam a limitar o âmbito dos métodos aplicáveis.

Geralmente, as condições de reacção, tais como temperatura, tempo de reacção, solventes, procedimentos de preparação, e similares, serão aquelas comuns na técnica para a reacção específica ser realizada. O material de referência citado, juntamente com o material presentemente citado, contém descrições detalhadas destas condições. Normalmente as temperaturas serão  $-100^{\circ}\text{C}$  a  $200^{\circ}\text{C}$ , os

solventes serão apróticos ou próticos, e os tempos de reacção serão 10 segundos a 10 dias. A preparação consiste tipicamente em atenuar quaisquer reagentes não reagidos seguindo-se a divisão entre um sistema de camada orgânica/água (extracção) e a separação da camada que contém o produto.

As Reacções de redução e de oxidação são tipicamente realizadas em temperaturas próximas da temperatura ambiente (cerca de 20°C), embora no que se refere às reduções de hidreto de metal a temperatura seja frequentemente reduzida para 0°C a -100°C, e os solventes são tipicamente apróticos para reduções e podem ser próticos ou apróticos para oxidações. Os tempos de reacção são ajustados para se obterem conversões desejadas.

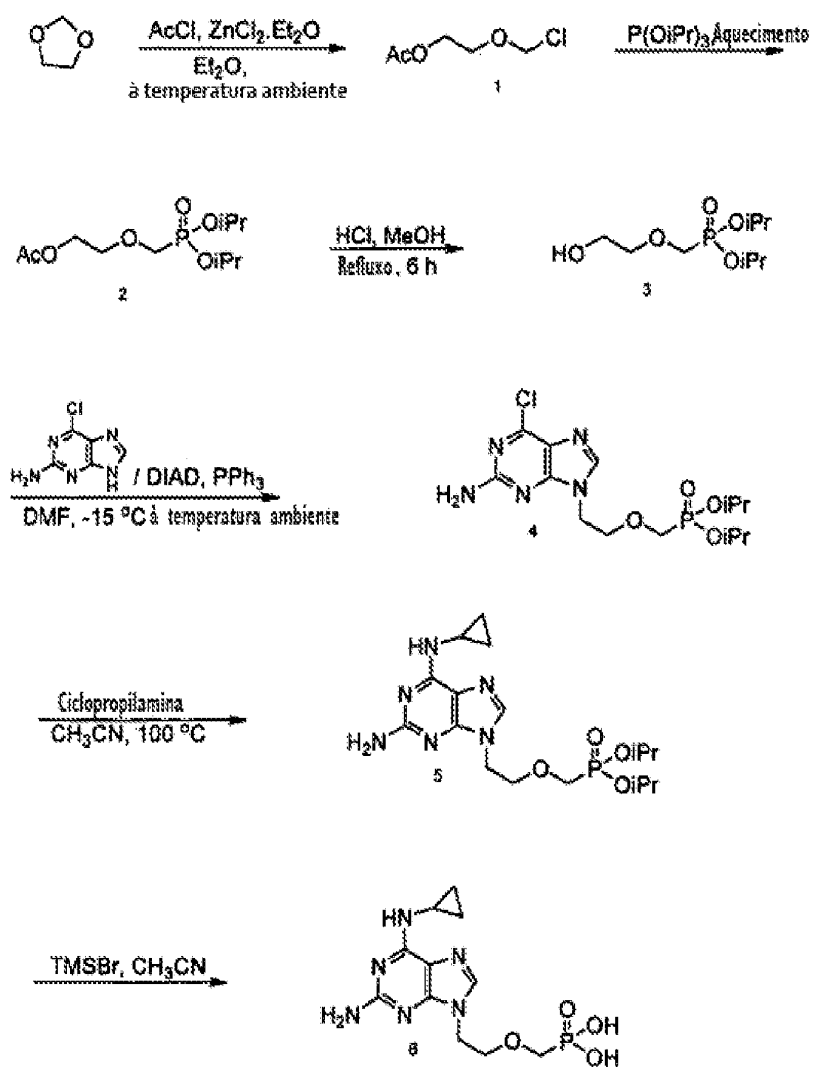
As reacções de condensação são tipicamente realizadas em temperaturas próximas da temperatura ambiente, embora sejam também comuns para temperaturas reduzidas de condensações cineticamente controladas não equilibradas (0°C a -100°C). Os solventes podem ser próticos (comuns em reacções equilibradas) ou apróticos (comuns em reacções cineticamente controladas).

As técnicas sintéticas padrão, tais como remoção azeotrópica de subprodutos de reacção e utilização de condições de reacção anidrosa (por exemplo, ambientes de gás inerte) são comuns na técnica e serão utilizadas quando aplicáveis.

Os métodos exemplares de preparação dos compostos da invenção são apresentados nos esquemas abaixo. As descrições detalhadas dos métodos são encontradas na secção experimental abaixo, e são referenciadas aos esquemas específicos.

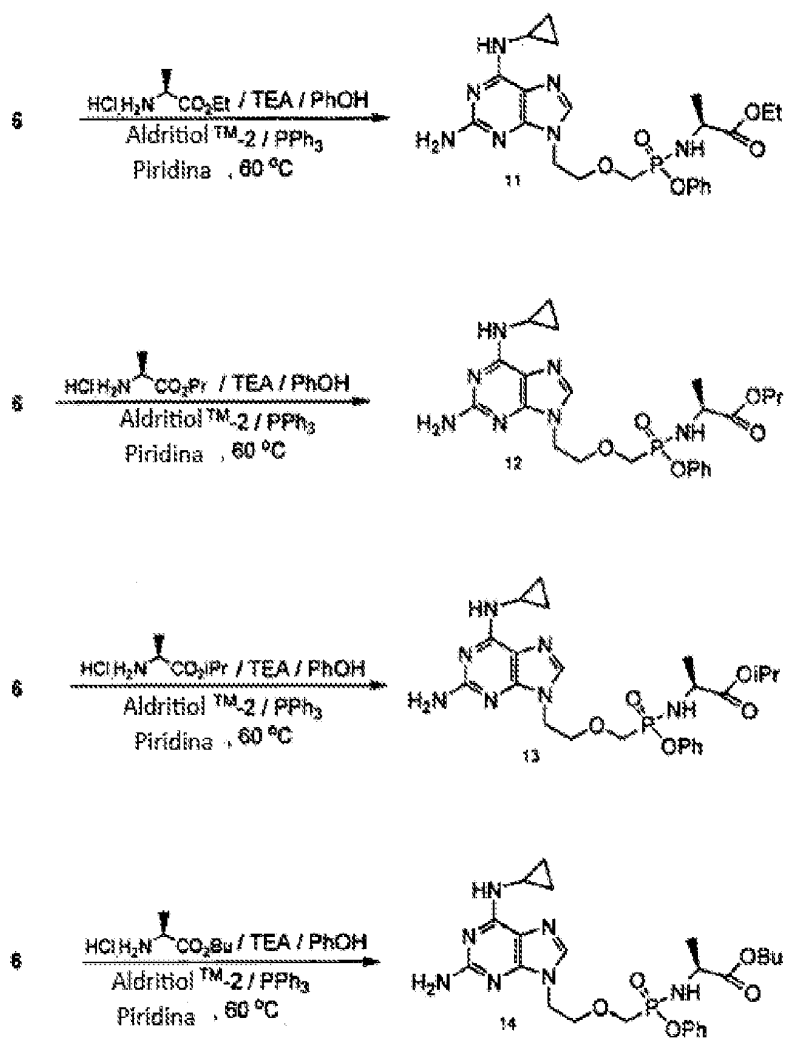
## Esquemas

## Esquema 1

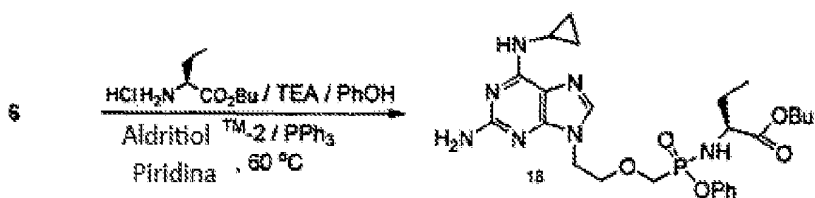
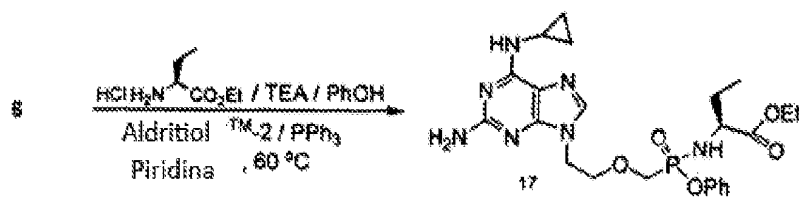
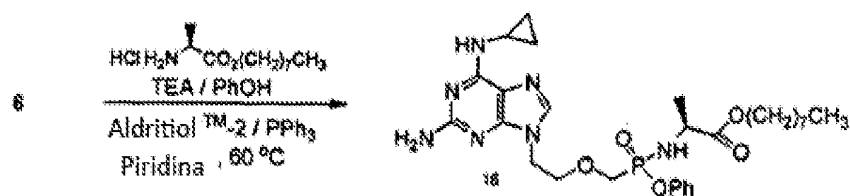
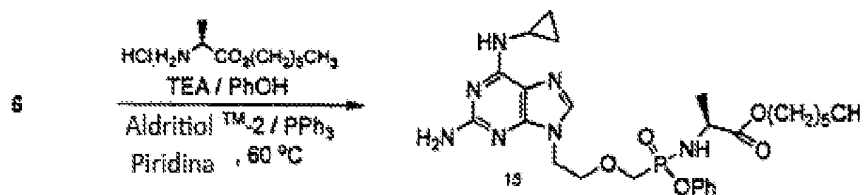




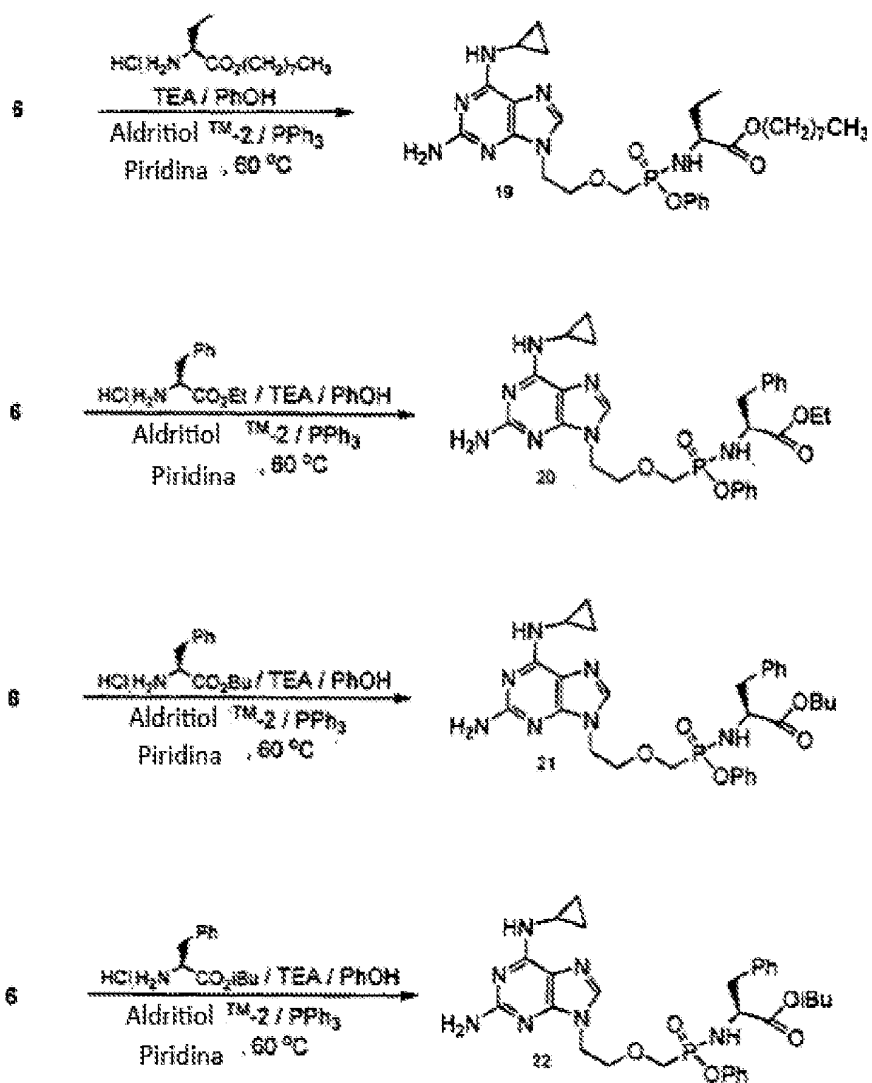
Esquema 3



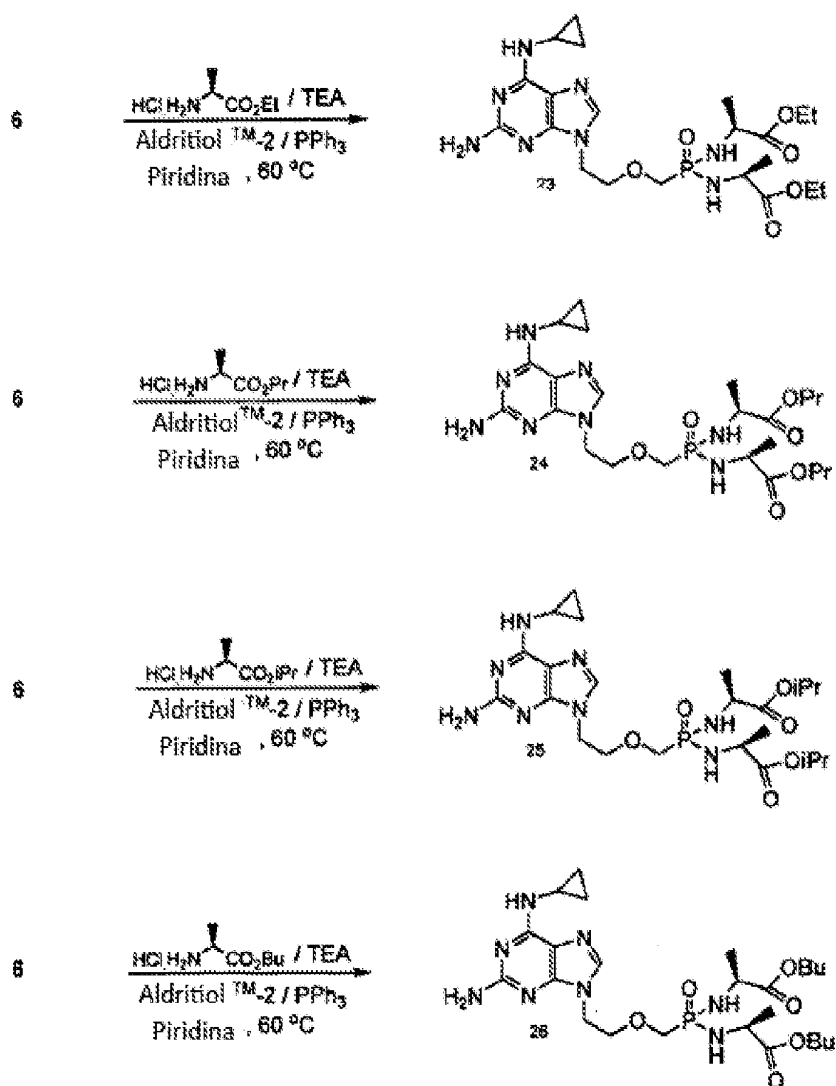
Esquema 4



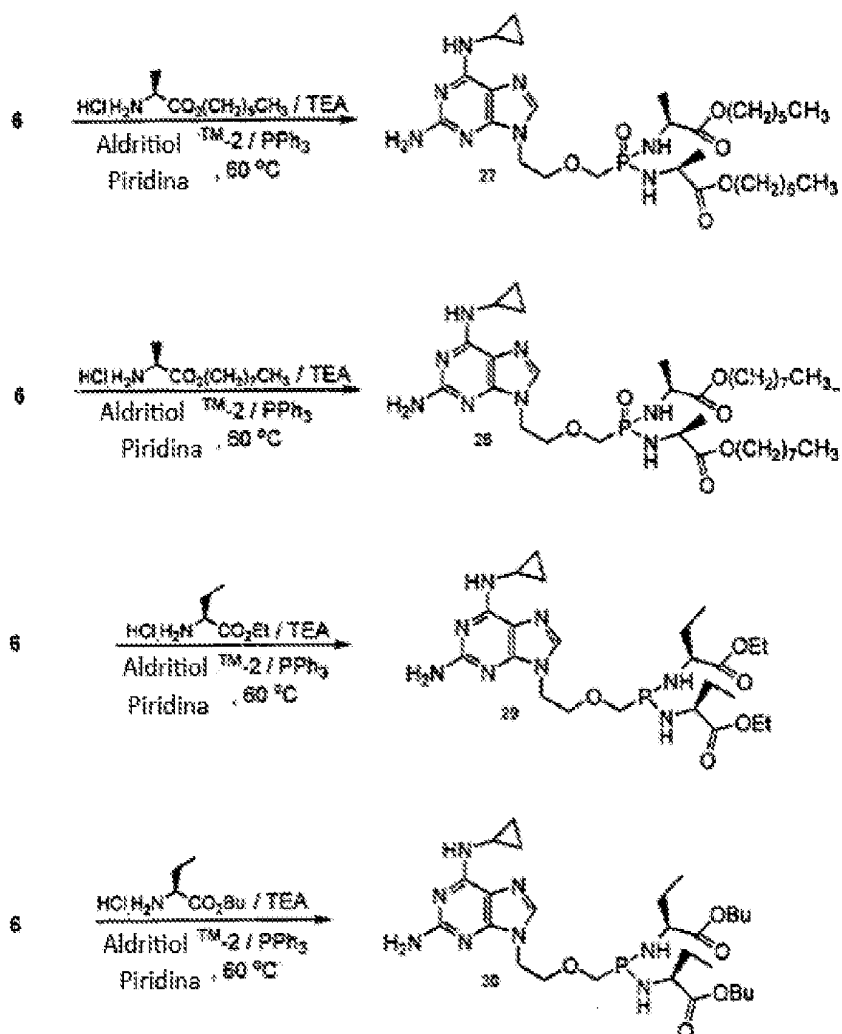
Esquema 5



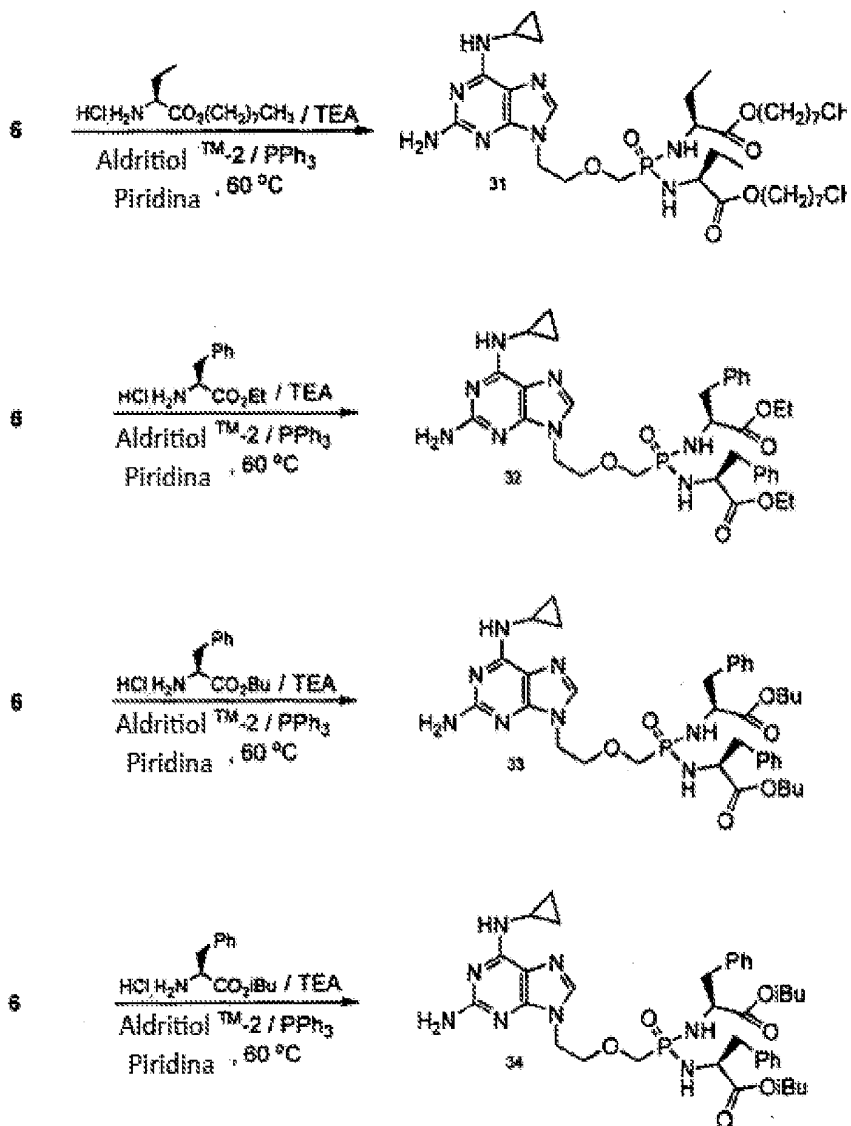
Esquema 6



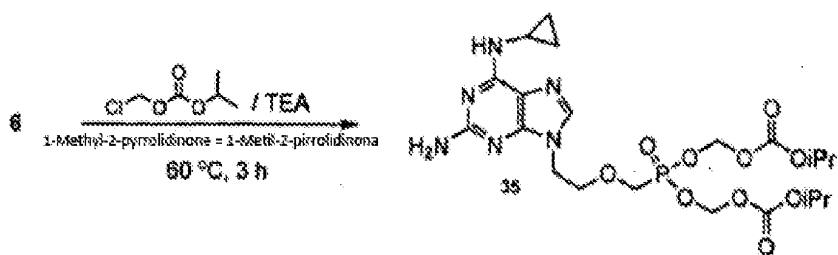
Esquema 7



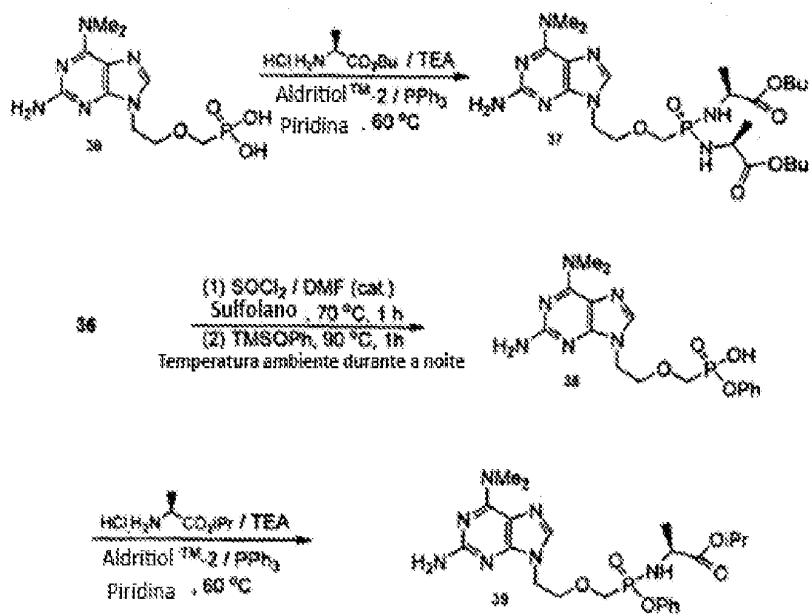
Esquema 8



Esquema 9



Esquema 10



Cada dos produtos dos seguintes processos é opcionalmente separado, isolado, e/ou purificado antes da respectiva utilização em processos subsequentes.

Os termos "tratado", "tratando", "tratamento", e similares, quando utilizados no contexto de um processo químico, protocolo, ou preparação significam contactar, misturar, reagir, permitir reagir, colocar em contato, e outros termos comuns na técnica para indicar que uma ou mais entidades químicas é tratada de modo a converter a mesma em uma ou mais outras entidades químicas. Isto significa que "tratar o composto um com o composto dois" é sinónimo de "deixar o composto um reagir com o composto dois", "contactar o composto um com o composto dois", "reagir o composto um com o composto dois", e outras expressões comuns na técnica de síntese orgânica para razoavelmente indicar que o composto um foi "tratado", "feito reagir", "deixado reagir", etc., com o composto dois.

No contexto de um processo químico, protocolo, ou preparação, "tratando" indica a maneira razoável e usual em que produtos químicos orgânicos são feitos reagir. Salvo indicação contrária, pretendem-se concentrações normais (0,01M a 10M, tipicamente 0,1M a 1M), temperaturas (-100°C a 250°C, tipicamente -78°C a 150°C, mais tipicamente -78°C a 100°C, ainda mais tipicamente 0°C a 100°C), vasos de reacção (tipicamente vidro, plástico, metal), solventes, pressões, atmosferas (tipicamente ar para reacções insensíveis a água e oxigénio ou azoto ou argónio para reacções sensíveis a água e oxigénio) etc. O conhecimento de reacções similares conhecidas na técnica de síntese orgânica é utilizado na selecção de condições e aparelhos para "tratamento" num determinado processo. Em particular,

um especialista na técnica de síntese orgânica selecciona condições e aparelhos razoavelmente preparados para o sucesso na realização das reacções químicas dos processos descritos com base no conhecimento da técnica.

As modificações de cada um dos esquemas acima indicados originam vários análogos dos materiais exemplares específicos produzidos acima. As citações acima mencionadas que descrevem os métodos adequados de síntese orgânica são aplicáveis a tais modificações.

Em cada um dos esquemas exemplares acima referidos, pode ser vantajoso separar os produtos de reacção um outro e/ou dos materiais de partida. Os produtos desejados de cada fase ou séries de fases são separados e/ou purificados (doravante separados) para se obter o grau desejado de homogeneidade pelas técnicas comuns na técnica. Tipicamente estas separações envolvem uma extracção de fases múltiplas, cristalização de um solvente ou mistura de solvente, destilação, sublimação, ou cromatografia. Cromatografia pode envolver qualquer número de métodos incluindo, por exemplo, exclusão por tamanho ou cromatografia de permuta iónica, cromatografia líquida de pressão elevada, média, ou baixa, escala pequena e cromatografia preparativa de camada fina ou grossa, bem como técnicas de camada fina de escala pequena e cromatografia instantânea.

Outra classe de métodos de separação envolve tratamento de uma mistura com um reagente seleccionado para se ligar a ou tornar de outro modo separável um produto desejado, material de partida não reagido, reacção por produto, ou similares. Estes reagentes incluem adsorventes ou absorventes, tais como carbono activado, peneiras moleculares, veículo de permuta iónica, ou similares. Alternativamente, os reagentes podem ser ácidos no caso de

um material básico, bases no caso de um material ácido, reagentes de ligação, tais como anticorpos, proteínas de ligação, quelantes selectivos, tais como éteres coroa, reagentes de extracção iónica líquida/líquida (LIX), ou similares.

A selecção de métodos apropriados de separação depende da natureza dos materiais envolvidos, por exemplo, ponto de ebulição, e peso molecular em destilação e sublimação, presença ou ausência de grupos funcionais polares em cromatografia, estabilidade de materiais em veículos ácidos e básicos em extracção de fases múltiplas, e similares. Um especialista na técnica aplicará técnicas com maior probabilidade para se obter a separação desejada.

A invenção foi descrita em detalhes suficientes para permitir que um especialista na pudesse produzir e utilizar a matéria objecto das reivindicações seguintes.

Os seguintes exemplos são apresentados para exemplificar a presente invenção, e de modo algum podem ser construídos no sentido de limitar a presente invenção.

### Exemplos

#### Geraiis

Alguns exemplos foram realizados inúmeras vezes. Em exemplos repetidos, as condições de reacção, tais como tempo, temperatura, concentração e similares, e produções encontravam-se dentro dos trâmites experimentais normais. Em exemplos repetidos onde se registaram modificações significativas, estas foram observadas nos casos em que os resultados apresentavam uma variação significativa comparativamente aos descritos. Em exemplos onde diferentes materiais de partida foram utilizados, estes foram observados. Quando os exemplos repetidos se referem a um

análogo "correspondente" de um composto, tal como um "éster de etilo correspondente", isto pressupõe que um grupo de outro modo presente, tipicamente neste caso um éster de metilo, é considerado ser o mesmo grupo modificado tal como indicado.

Exemplos 1 a 35 referem-se aos Esquemas 1 a 9 acima.

#### Exemplo 1

Acetoxietiloximetilcloreto 1: Um balão de três gargalos de 5 L foi equipado com misturador mecânico, termómetro, funil adicional de 500 mL e purgado com argónio. Foi adicionado 1,3-Dioxalano (140 mL, 2,00 moles) em Et<sub>2</sub>O anidroso (800 mL) e 1,0 M de ZnCl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O (7,5 mL, 0,007 mol). Foi adicionada uma solução de cloreto de acetilo (157 mL, 2,20 moles) em Et<sub>2</sub>O (200 mL) em gotas através de um funil adicional durante 20 minutos. Foi utilizado um banho de água fria para manter a temperatura entre 19 - 27 °C. Agitação contínua sem arrefecimento externo durante 4 horas, auto aquecimento da reacção em 20 - 25 °C durante cerca de 1 hora. Uma solução incolor transparente mantida sob argónio durante a noite. Em repouso durante 3 dias formou uma solução laranja. Separar o Et<sub>2</sub>O em rotavap (aspirador de água) até não destilar mais em banho a 35°C. Foi obtida uma produção quantitativa do produto 318 g (rendimento teórico 306 g).

#### Exemplo 2

Fosfanato de di-isopropilo 2: Um frasco de três gargalos de 500 mL foi carregado com o clorometiléter 1 bruto (317 g, 2,00 moles). Foi adicionado triisopropilfosfite (494 mL) em gotas através de um funil adicional ao mesmo tempo que era aquecido num banho de óleo a 125 °C e agitado vigorosamente. Recolha de 2-cloropropano

destilado por meio um caminho curto terminava num recipiente arrefecido por gelo seco, manta de argónio, recolheu-se 140 g de destilado (157 g teóricas). Reacção de fosfito aclarou para amarelo, continuou a aquecer durante mais 2 horas em banho de óleo a 125 °C, e foi depois preparada para destilação a vácuo utilizando-se uma bomba a vácuo. Destilado um corte frontal amarelo (140 g, cabeça a 135°C, pé a 190°C), em seguida trocado para um recipiente limpo. A fracção principal foi recolhida a temperatura de cabeça de 178 - 187°C (principalmente 185 - 187°C) sob vácuo desconhecido e temperatura de banho de 222 - 228°C. 258 g do produto 2 foram fornecidas (47% de produção de 1,3-dioxolano).

#### Exemplo 3

Álcool 3: Uma solução de 2 (125 g, 0,443 mol) em MeOH absoluto (440 mL) foi tratada com HCl concentrado (11,2 mL, 0,112 mol) e aquecida até se obter refluxo durante 6 horas sob argónio. Separar MeOH em *rotavap* (aspirador de água) a 55°C deixando 115 g de um óleo claro que foi co-evaporado com tolueno (2 x 200 mL). O produto bruto foi seco em vácuo para se obter um óleo (102 g, 96%).

#### Exemplo 4

Fosfanato de di-isopropilo 4: Uma solução de trifetilfosfina (25,57 g, 97,5 mmoles) e álcool 3 (18 g, 75 mmoles) em DMF (120 mL) foi tratada com 6-cloropurina (12,72 g, 75 mmoles) e arrefecida para -15°C. Uma solução de azodicarboxilato de di-isopropilo (16,68 g, 82,5 mmoles) em DMF (50 mL) foi adicionada em gotas através de um funil adicional durante 80 minutos. A mistura da reacção foi mantida a -15°C durante 2 horas e em seguida aquecida para temperatura ambiente e agitada durante mais 2 horas. Uma mistura de reacção turva acabou por se tornar numa solução

amarela-brilhante. O solvente da reacção foi evaporado sob pressão reduzida, co-evaporado com tolueno (3 x), e seco sob vácuo durante a noite antes da purificação. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna em sílica-gel (5% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o fosfanato de diisopropilo (18,52 g, 63%) como um sólido branco:

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,95 (s, 1H), 4,70 (m, 2H), 4,31 (m, 2H), 3,93 (m, 2H), 3,73 (m, 2H), 1,29 (m, 12H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 18,42.

#### Exemplo 5

Fosfanato de Diisopropilo 5: Uma mistura de 4 (11,00 g, 28,08 mmoles) e ciclopropilamina (4,86 g, 85,16 mmoles) em CH<sub>3</sub>CN (80 mL) foi colocada em uma bomba de reacção e aquecida a 100 °C durante 4 h. A mistura da reacção foi arrefecida à temperatura ambiente e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi dividido ao meio 15% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x) e salmoura, seco com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrado, e concentrado. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (5% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter 5 (10,42 g, 90%) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,59 (s, 1H), 5,83 (amplo, s, 1H), 4,88 (amplo, s, 2H), 4,70 (m, 2H), 4,21 (m, 2H), 3,88 (m, 2H), 3,72 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 3,03 (amplo, s, 1H), 1,28 (m, 12H), 0,84 (m, 2H), 0,60 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 18,63.

#### Exemplo 6

cPrPMEDAP 6: Uma solução de 5 (11,00 g, 26,67 mmoles) em CH<sub>3</sub>CN anidroso (120 mL) foi tratada com bromotrimetilsilano (21,1 mL, 160,02 mmoles). A reacção foi protegida da luz envolvendo o frasco com folha de alumínio. A mistura da reacção foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. Os voláteis foram evaporados sob

pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em H<sub>2</sub>O (250 mL) e pH foi ajustado para 9 com hidróxido de amónio. A mistura da reacção foi concentrada e obteve-se um sólido amarelo. O sólido foi dissolvido em H<sub>2</sub>O (30 mL) e pH foi ajustado para 2 com 10% HCl. Um sólido fino foi recolhido e seco em vácuo para se obter 6 (7,88 g, 90%) como um sólido branco.

#### Exemplo 7

Cloridrato de Ácido Monofosfónico 7: Uma mistura de ácido 6 (3,00 g, 9,15 mmoles) e DMF (0,1 mL) em sulfolano (9,2 mL) foi aquecida a 70 °C. Foi adicionado tionilcloreto (1,66 mL, 22,76 mmoles) em gotas durante um período de 1 h. A temperatura foi aumentada para 90 °C e TMSOPh (1,74 mL, 9,61 mmoles) foi adicionado e agitado durante 1 h. A mistura da reacção foi arrefecida à temperatura ambiente durante a noite. A mistura da reacção foi adicionada em gotas a uma acetona gelada bem agitada (100 mL). O produto foi evaporado. O sólido foi filtrado sob Ar, lavado com acetona gelada (100 mL), seco em vácuo para se obter o Cloridrato de Ácido Monofosfónico (3,70 g, 92%) como um sólido.

#### Exemplo 8

Monofosfonamidato 8: Uma mistura de ácido monofosfónico 7 (0,22 g, 0,50 mmol), Cloridrato de éster de metilo de L-alanina (0,14 g, 1,00 mmol), e trietilamina (0,21 mL, 1,50 mmol) em piridina (3 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritiol amarela-brilhante recentemente preparada (0,39 g, 1,75 mmol) e trifenilfosfina (0,46 g, 1,75 mmol) em piridina (2 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com

salmoura, seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (7% de  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para se obter o monofosfonamidato (97 mg, 39% e 1:1 da mistura diastereomérica) como uma espuma esbranquiçada.

#### Exemplo 9

Monofosfonamidato 9: Uma mistura de ácido monofosfônico 7 (0,88 g, 2,00 mmoles), cloridrato de éster de metilo de D-alanina (0,84 g, 6,00 mmoles), e trietilamina (0,84 mL, 6,00 mmoles) em piridina (8 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (1,56 g, 7,00 mmoles) e trifetilfosfina (1,84 g, 7,00 mmoles) em piridina (8 mL) foi adicionada à mistura da reação acima. A reação foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio  $\text{EtOAc}$  e  $\text{NaHCO}_3$  saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (7% de  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para se obter o monofosfonamidato (0,40 g, 41% e 1:1 da mistura diastereomérica) como uma espuma branca.

#### Exemplo 10

Monofosfonamidato 10: Uma mistura de ácido monofosfônico 7 (0,88 g, 2,00 mmoles), Cloridrato de éster de terc-butilo de L-alanina (1,31 g, 6,00 mmoles), e trietilamina (0,84 mL, 6,00 mmoles) em piridina (8 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (1,54 g, 7,00 mmoles) e trifetilfosfina (1,84 g, 7,00 mmoles) em piridina (8 mL) foi adicionada à mistura da reação acima. A reação foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à

temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (7% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o monofosfonamidato (0,38 g, 36% e 1:1 da mistura diastereomérica) como uma espuma laranja clara.

#### Exemplo 11

Monofosfonamidato 11: Uma mistura de ácido fosfônico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), Cloridrato de éster de etilo de L-alanina (94 mg, 0,60 mmol), fenol (0,14 g, 1,52 mmol) e trietilamina (0,51 mL, 3,60 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,47 g, 2,13 mmoles) e trifetilfosfina (0,56 g, 2,13 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura da reação acima. A reação foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (7% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o monofosfonamidato (74 mg, 48% e 1:1 da mistura diastereomérica) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,61 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 7,26 - 7,08 (m, 5H), 4,23 (m, 2H), 4,13 (m, 2H), 4,09 (m, 1H), 3,92 - 3,85 (m, 4H), 3,03 (amplo, s, 1H), 1,30 - 1,26 (m, 3H), 1,24 (m, 3H), 0,88 (m, 2H), 0,63 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,94, 20,68.

#### Exemplo 12

Monofosfonamidato 12: Uma mistura de ácido fosfônico 6 (1,50 g, 4,56 mmoles), Cloridrato de éster de n-propilo de

L-alanina (1,59 g, 9,49 mmoles), fenol (2,25 g, 22,80 mmoles) e trietilamina (10,50 mL, 54,72 mmoles) em piridina (8,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (6,54 g, 31,92 mmoles) e trifenilfosfina (7,32 g, 31,92 mmoles) em piridina (8,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (7% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o monofosfonamidato (0,43 g, 18%, Composto E, 1:1 mistura diastereomérica) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,61 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,27 - 7,09 (m, 5H), 4,27 - 4,20 (m, 2H), 4,16 - 4,00 (m, 3H), 3,93 - 3,82 (m, 4H), 3,04 (amplo, s, 1H), 1,63 (m, 2H), 1,30 (dd, 3H), 0,92 (m, 3H), 0,89 (m, 2H), 0,63 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,89, 20,66.

#### Exemplo 13

Monofosfonamidato 13: Uma mistura de ácido fosfónico (0,10 g, 0,30 mmol), Cloridrato de éster de isopropilo de L-alanina (0,10 g, 0,60 mmol), fenol (0,14 g, 1,52 mmol) e trietilamina (0,51 mL, 3,60 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,47 g, 2,13 mmoles) e trifenilfosfina (0,56 g, 2,13 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (7% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o monofosfonamidato (87 mg, 55% e 1:1 da mistura diastereomérica) como uma espuma amarela: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,60 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,26 - 7,09 (m, 5H), 4,98 (m, 1H), 4,23 (m, 2H), 4,06 (m, 1H), 3,91 - 3,83 (m, 4H), 3,04 (amplo, s, 1H), 1,29 - 1,21 (m, 9H), 0,89 (m, 2H), 0,63 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,85, 20,68.

#### Exemplo 14

Monofosfonamidato 14: Uma mistura de ácido fosfônico6 (0,10 g, 0,30 mmol), Cloridrato de éster de n-butilo de L-alanina (0,11 g, 0,60 mmol), fenol (0,14 g, 1,52 mmol) e trietilamina (0,51 mL, 3,60 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,47 g, 2,13 mmoles) e trifetilfosfina (0,56 g, 2,13 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura de reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (7% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o monofosfonamidato (80 mg, 50% e 1:1 da mistura diastereomérica) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,61 (d, J = 4,20 Hz, 1H), 7,27 - 7,08 (m, 5H); 5,93 (amplo, s, 1H), 4,97 (amplo, s, 2H), 4,23 (m, 2H), 4,10 - 4,08 (m, 3H), 3,91 - 3,84 (m, 4H), 3,03 (amplo, s, 1H), 1,58 (m, 2H), 1,34 - 1,27 (m, 5H), 0,92 - 0,89 (m, 5H), 0,63 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,94, 20,68.

## Exemplo 15

Monofosfonamidato 15: Uma mistura de ácido fosfónico6 (0,10 g, 0,30 mmol), Cloridrato de éster de n-hexilo de L-alanina (0,13 g, 0,60 mmol), fenol (0,14 g, 1,52 mmol) e trietilamina (0,51 mL, 3,60 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,47 g, 2,13 mmoles) e trifetilfosfina (0,56 g, 2,13 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia na ISCO (2-propanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o monofosfonamidato (0,10 g, 59% e 1:1 da mistura diastereomérica) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,59 (d, J = 4,20 Hz, 1H), 7,26 - 7,08 (m, 5H), 4,22 (m, 2H), 4,11 (m, 1H), 4,06 (m, 2H), 3,91 - 3,84 (m, 4H), 3,01 (amplo, s, 1H), 1,59 (m, 2H), 1,31 - 1,27 (m, 9H), 0,89 (m, 3H), 0,86 (m, 2H), 0,62 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,94, 20,68.

## Exemplo 16

Monofosfonamidato 16: Uma mistura de ácido fosfónico6 (0,10 g, 0,30 mmol), Cloridrato de éster de n-octanilo de L-alanina (0,15 g, 0,60 mmol), fenol (0,14 g, 1,52 mmol) e trietilamina (0,51 mL, 3,60 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,47 g, 2,13 mmoles) e trifetilfosfina (0,56 g, 2,13 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite,

arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia na ISCO (2-propanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o monofosfonamidato (0,13 g, 73% e 1:1 da mistura diastereomérica) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,59 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 7,25 - 7,07 (m, 5H), 4,22 (m, 2H), 4,10 (m, 1H), 4,07 (m, 2H), 3,90 - 3,84 (m, 4H), 3,02 (amplo, s, 1H), 1,59 (m, 2H), 1,29 - 1,26 (m, 13H), 0,88 (m, 3H), 0,85 (m, 2H), 0,60 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,96, 20,69.

#### Exemplo 17

Monofosfonamidato 17: Uma mistura de ácido fosfónico 6 (70 mg, 0,21 mmol), Cloridrato de éster de etilo de ácido L-2-aminobutírico (72 mg, 0,42 mmol), fenol (0,10 g, 1,05 mmol) e trietilamina (0,36 mL, 2,52 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritiol amarela-brilhante recentemente preparada (0,33 g, 1,47 mmol) e trifetilfosfina (0,39 g, 1,47 mmol) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (7% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o monofosfonamidato (66 mg, 60% e 1:1 da mistura diastereomérica) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,61 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,26 - 7,08 (m, 5H), 5,91 (amplo, s, 1H), 4,97 (amplo, s, 2H), 4,22 - 4,12 (m, 4H), 4,01 - 3,81 (m, 5H), 3,03 (amplo,

s, 1H), 1,71 - 1,60 (m, 2H), 1,24 (m, 3H), 0,89 (m, 2H), 0,84 - 0,76 (m, 3H), 0,63 (m, 2H);  $^{31}\text{P}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22,15, 20,93.

#### Exemplo 18

Monofosfonamidato 18: Uma mistura de ácido fosfónico6 (1,00 g, 3,05 mmoles), Cloridrato de éster de n-butilo de ácido L-2-aminobutírico (1,19 g, 6,09 mmoles), fenol (1,43 g, 15,23 mmoles) e trietilamina (5,10 mL, 36,60 mmoles) em piridina (5,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (4,70 g, 21,32 mmoles) e trifetilfosfina (5,59 g, 21,32 mmoles) em piridina (5,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e  $\text{NaHCO}_3$  saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (5% de MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para se obter o monofosfonamidato (0,7 g, 42%, Composto G, 1:1 mistura diastereomérica) como uma espuma branca:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,60 (d, J = 6,60 Hz, 1H), 7,27 - 7,04 (m, 5H), 5,89 (amplo, s, 1H), 4,94 (amplo, s, 2H), 4,22 (m, 2H), 4,07 - 3,99 (m, 3H), 3,91 - 3,84 (m, 4H), 3,03 (amplo, s, 1H), 1,70 - 1,57 (m, 4H), 1,35 (m, 2H), 0,92 - 0,75 (m, 8H), 0,63 (m, 2H);  $^{31}\text{P}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22,21, 20,95.

#### Exemplo 19

Monofosfonamidato 19: Uma mistura de ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), Cloridrato de éster de n-octanilo de ácido L-2-aminobutírico (0,15 g, 0,60 mmol), fenol (0,14 g, 1,52 mmol) e trietilamina (0,51 mL, 3,60 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma

solução de aldritiol amarela-brilhante recentemente preparada (0,47 g, 2,13 mmoles) e trifenilfosfina (0,56 g, 2,13 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura de reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia na ISCO (2-propanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o monofosfonamidato (0,12 g, 64% e 1:1 da mistura diastereomérica) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,62 (d, J = 6,60 Hz, 1H), 7,25 - 7,08 (m, 5H), 4,24 - 4,21 (m 2H), 4,09 - 4,04 (m, 2H), 4,00 (m, 1H), 3,91 - 3,83 (m, 4H), 3,01 (amplo, s, 1H), 1,70 - 1,58 (m, 4H), 1,27 (m, 10H), 0,89 - 0,76 (m, 8H), 0,62 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 22,22, 20,92.

#### Exemplo 20

Monofosfonamidato 20: Uma mistura de ácido fosfónico 6 (1,5 g, 4,57 mmoles), Cloridrato de éster de etilo de L-fenilalanina (2,10 g, 9,14 mmoles), fenol (2,15 g, 22,85 mmoles) e trietilamina (7,64 mL, 54,84 mmoles) em piridina (8,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritiol amarela-brilhante recentemente preparada (7,05 g, 31,99 mmoles) e trifenilfosfina (8,39 g, 31,99 mmoles) em piridina (7,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (5% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter um sólido amarelo-claro

1,32 g contendo aproximadamente 10% de impureza. O sólido amarelo (1,32 g, 2,28 mmoles) foi dissolvido em iPrOH (10 mL) e transferido a um iPrOH quente (30 mL) solução de ácido fumárico (0,27 g, 2,28 mmoles) e agitado a 80 °C por 30 min. A mistura de reacção foi gradualmente arrefecida à temperatura ambiente e o sal de fumarato foi recolhido a 0 °C. O sal de fumarato resultante foi neutralizado pela divisão de NaHCO<sub>3</sub> (2 x) e EtOAc. A fase orgânica foi lavada com salmoura, H<sub>2</sub>O, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrado, e concentrado. O produto foi seco sob vácuo para se obter o monofosfonamidato (0,70 g, 26%, Composto A, 1:1 mistura diastereomérica) como uma espuma branca: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,54 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,27 - 6,98 (m, 10H), 4,35 (m, 1H), 4,16 (m, 2H), 4,08 (m, 2H), 3,84 - 3,61 (m, 3H), 3,33 (m, 1H), 3,02 (amplo, s, 1H), 2,95 - 2,87 (m, 2H), 1,17 (m, 3H), 0,87 (m, 2H), 0,61 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,88, 21,07.

#### Exemplo 21

Monofosfonamidato 21: Uma mistura de ácido fosfónico 6 (70 mg, 0,21 mmol), Cloridrato de éster de n-butilo de L-fenilalanina (0,11 g, 0,42 mmol), fenol (0,10 g, 1,05 mmol) e trietilamina (0,36 mL, 2,52 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,33 g, 1,47 mmol) e trifetilfosfina (0,39 g, 1,47 mmol) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel

(7% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o monofosfonamidato (30 mg, 23% e 1:1 da mistura diastereomérica) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,55 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 7,25 - 6,98 (m, 10H), 4,36 (m, 1H), 4,17 (m, 2H), 4,02 (m, 2H), 3,83 - 3,35 (m, 4H), 3,02 (amplo, s, 1H), 2,94 - 2,86 (m, 2H), 1,52 (m, 2H), 1,29 (m, 2H), 0,90 (m, 3H), 0,88 (m, 2H), 0,62 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,85, 21,05.

#### Exemplo 22

Monofosfonamidato 22: Uma mistura de ácido fosfónico 6 (70 mg, 0,21 mmol), Cloridrato de éster de isobutilo de L-fenilalanina (0,11 g, 0,42 mmol), fenol (0,10 g, 1,05 mmol) e trietilamina (0,36 mL, 2,52 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,33 g, 1,47 mmol) e trifenilfosfina (0,39 g, 1,47 mmol) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (7% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o monofosfonamidato (65 mg, 50% e 1:1 da mistura diastereomérica) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,56 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 7,26 - 6,98 (m, 10H), 4,40 (m, 1H), 4,17 (m, 2H), 3,82 (m, 2H), 3,75 - 3,62 (m, 3H), 3,35 (m, 1H), 3,04 (amplo, s, 1H), 2,96 - 2,87 (m, 2H), 1,83 (m, 1H), 0,90 (m, 2H), 0,86 (m, 6H), 0,63 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,82, 21,03.

#### Exemplo 23

Bisfosfonamidato 23: Uma mistura de ácido fosfónico 6 (0,10 g, 0,30 mmol), Cloridrato de éster de etilo de L-

alanina (0,28 g, 1,80 mmol), e trietilamina (0,51 mL, 3,60 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,47 g, 2,10 mmoles) e trifenílfosfina (0,56 g, 2,10 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (10% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o bisfosfonamidato (80 mg, 50%,) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,63 (s, 1H), 5,88 (amplo, s, 1H), 4,96 (amplo, s, 2H), 4,24 - 4,16 (m, 6H), 4,00 (m, 2H), 3,86 (m, 2H), 3,72 (m, 2H), 3,01 (amplo, s, 1H), 1,36 (m, 6H), 1,26 (m, 6H), 0,86 (m, 2H), 0,61 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 20,63.

#### Exemplo 24

Bisfosfonamidato 24: Uma mistura de ácido fosfónico6 (1,00 g, 3,05 mmoles), Cloridrato de éster de n-propilo de L-alanina (3,06 g, 18,30 mmoles), e trietilamina (5,10 mL, 36,50 mmoles) em piridina (5,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (4,70 g, 21,32 mmoles) e trifenílfosfina (5,59 g, 21,32 mmoles) em piridina (5,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por

cromatografia de coluna de sílica-gel (10% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o bisfosfonamidato (1,13 g, 71%, Composto F) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,65 (s, 1H), 5,92 (amplo, s, 1H), 5,03 (amplo, s, 2H), 4,24 (m, 2H), 4,10 - 4,02 (m, 6H), 3,87 (m, 2H), 3,73 (m, 2H), 3,03 (amplo, s, 1H), 1,65 (m, 4H), 1,37 (m, 6H), 0,93 (m, 6H), 0,88 (m, 2H), 0,63 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 20,61.

#### Exemplo 25

Bisfosfonamidato 25: Uma mistura de ácido fosfónico6 (0,60 g, 1,83 mmol), Cloridrato de éster de isopropilo de L-alanina (1,84 g, 10,98 mmoles), e trietilamina (3,06 mL, 21,96 mmoles) em piridina (3,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (2,82 g, 12,80 mmoles) e trifenilfosfina (3,36 g, 12,80 mmoles) em piridina (3,0 mL) foi adicionada à mistura de reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (10% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o bisfosfonamidato (0,53 g, 52%, Composto B) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,65 (s, 1H), 5,00 (m, 2H), 4,24 (m, 2H), 3,97 (m, 2H), 3,87 (m, 2H), 3,71 (m, 2H), 3,01 (amplo, s, 1H), 1,34 (m, 6H), 1,23 (m, 12H), 0,86 (m, 2H), 0,62 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 20,59.

#### Exemplo 26

Bisfosfonamidato 26: Uma mistura de ácido fosfónico6 (0,10 g, 0,30 mmol), Cloridrato de éster de n-butilo de L-alanina (0,33 g, 1,82 mmol), e trietilamina (0,51 mL, 3,60

mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,47 g, 2,10 mmoles) e trifenilfosfina (0,56 g, 2,10 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura de reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (10% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o bisfosfonamidato (97 mg, 55%) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,63 (s, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,09 (m, 4H), 4,01 (m, 2H), 3,86 (m, 2H), 3,72 (m, 2H), 3,01 (amplo, s, 1H), 1,61 (m, 4H), 1,37 (m, 10H), 0,93 (m, 6H), 0,88 (m, 2H), 0,61 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 20,59.

#### Exemplo 27

Bisfosfonamidato 27: Uma mistura de ácido fosfónico (0,10 g, 0,30 mmol), Cloridrato de éster de n-hexilo de L-alanina (0,38 g, 1,80 mmol), e trietilamina (0,51 mL, 3,60 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,47 g, 2,10 mmoles) e trifenilfosfina (0,56 g, 2,10 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura de reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia na ISCO (2-propanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o

bisfosfonamidato (0,13 g, 65%) como uma espuma amarela-clara:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,62 (s, 1H), 4,23 (m, 2H), 4,09 (m, 4H), 4,01 (m, 2H), 3,86 (m, 2H), 3,72 (m, 2H), 2,99 (amplo, s, 1H), 1,61 (m, 4H), 1,36 - 1,29 (m, 18H), 0,88 (m, 6H), 0,84 (m, 2H), 0,60 (m, 2H);  $^{31}\text{P}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20,61.

#### Exemplo 28

Bisfosfonamidato 28: Uma mistura de ácido fosfónico6 (0,10 g, 0,30 mmol), Cloridrato de éster de n-octanilo de L-alanina (0,43 g, 1,80 mmol), e trietilamina (0,51 mL, 3,60 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,47 g, 2,10 mmoles) e trifenilfosfina (0,56 g, 2,10 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura de reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e  $\text{NaHCO}_3$  saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia na ISCO (2-propanol/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para se obter o bisfosfonamidato (0,13 g, 61%) como uma espuma amarela-clara:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,61 (s, 1H), 4,21 (m, 2H), 4,07 - 4,00 (m, 6H), 3,84 - 3,70 (m, 4H), 2,98 (amplo, s, 1H), 1,60 (m, 4H), 1,34 (m, 6H), 1,27 (m, 20H), 0,87 (m, 6H), 0,83 (m, 2H), 0,58 (m, 2H);  $^{31}\text{P}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20,63.

#### Exemplo 29

Bisfosfonamidato 29: Uma mistura de ácido fosfónico6 (0,70 g, 2,13 mmoles), Cloridrato de éster de etilo de ácido L-2-aminobutírico (2,15 g, 12,80 mmoles), e trietilamina (3,57 mL, 25,56 mmoles) em piridina (3,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de

aldritiol amarela-brilhante recentemente preparada (3,29 g, 14,91 mmoles) e trifenilfosfina (3,92 g, 14,91 mmoles) em piridina (3,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (10% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o bisfosfonamidato (0,71 g, 60%, Composto D) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,64 (s, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,16 (m, 4H), 3,89 - 3,87 (m, 4H), 3,72 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 3,01 (amplo, s, 1H), 1,78 - 1,64 (m, 4H), 1,26 (m, 6H), 0,91 (m, 6H), 0,87 (m, 2H), 0,61 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,23.

#### Exemplo 30

Bisfosfonamidato 30: Uma mistura de ácido fosfónico6 (0,70 g, 21,32 mmoles), Cloridrato de éster de n-butilo de ácido L-2-aminobutírico (2,50 g, 12,80 mmoles), e trietilamina (3,57 mL, 25,56 mmoles) em piridina (3,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (3,29 g, 14,91 mmoles) e trifenilfosfina (3,92 g, 14,91 mmoles) em piridina (3,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (10% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o bisfosfonamidato (0,40 g, 31%, Composto C) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN

(CDCl<sub>3</sub>) δ 7,64 (s, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,11 (m, 4H), 3,91 (m, 2H), 3,87 (m, 2H), 3,71 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 3,03 (amplo, s, 1H), 1,79 - 1,64 (m, 4H), 1,60 (m, 4H), 1,37 (m, 4H), 0,94 (m, 6H), 0,90 (m, 6H), 0,86 (m, 2H), 0,62 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,25.

#### Exemplo 31

Bisfosfonamidato 31: Uma mistura de ácido fosfónico6 (0,10 g, 0,30 mmol), Cloridrato de éster de n-octanilo de ácido L-2-aminobutírico (0,33 g, 1,82 mmol), e trietilamina (0,51 mL, 3,60 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,47 g, 2,10 mmoles) e trifenilfosfina (0,56 g, 2,10 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia na ISCO (2-propanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o bisfosfonamidato (0,12 g, 55%) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,64 (s, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,13 - 4,05 (m, 4H), 3,91 (m, 2H), 3,87 - 3,72 (m, 4H), 3,01 (amplo, s, 1H), 1,78 - 1,65 (m, 4H), 1,61 - 1,29 (m, 24H), 0,91 (m, 6H), 0,89 (m, 6H), 0,86 (m, 2H), 0,62 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 21,20.

#### Exemplo 32

Bisfosfonamidato 32: Uma mistura de ácido fosfónico6 (0,60 g, 1,82 mmol), Cloridrato de éster de etilo de L-fenilalanina (2,51 g, 10,96 mmoles), e trietilamina (3,06 mL, 21,84 mmoles) em piridina (3,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante

recentemente preparada (2,82 g, 12,74 mmoles) e trifenilfosfina (3,36 g, 12,74 mmoles) em piridina (3,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia na ISCO (2-propanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o bisfosfonamidato (0,53 g, 43%) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,48 (s, 1H), 7,22 - 7,06 (m, 10H), 4,20 (m, 1H), 4,12 (m, 4H), 4,09 (m, 2H), 4,04 (m, 1H), 3,63 (m, 2H), 3,33 - 3,21 (m, 2H), 3,04 - 2,78 (m, 5H), 1,20 (m, 6H), 0,83 (m, 2H), 0,58 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 20,38.

#### Exemplo 33

Bisfosfonamidato 33: Uma mistura de ácido fosfónico6 (70 mg, 0,21 mmol), Cloridrato de éster de n-butilo de L-fenilalanina (0,33 g, 1,26 mmol), e trietilamina (0,36 mL, 2,52 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,33 g, 1,47 mmol) e trifenilfosfina (0,39 g, 1,47 mmol) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (10% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o bisfosfonamidato (0,11 g, 70%) como uma espuma amarela-clara: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,51 (s, 1H), 7,23 -

7,06 (m, 10H), 4,23 (m, 1H), 4,11 - 4,05 (m, 7H), 3,65 (m, 2H), 3,35 - 3,23 (m, 2H), 3,01 (m, 1H), 3,04 - 2,78 (m, 4H), 1,57 (m, 4H), 1,33 (m, 4H), 0,92 (m, 6H), 0,86 (m, 2H), 0,61 (m, 2H);  $^{31}\text{P}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20,35.

#### Exemplo 34

Bisfosfonamidato 34: Uma mistura de ácido fosfónico 6 (70 mg, 0.21 mmol), Cloridrato de éster de isobutilo de L-fenilalanina (0,33 g, 1,26 mmol), e trietilamina (0,36 mL, 2,52 mmoles) em piridina (1,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 5 min. Uma solução de aldritol amarela-brilhante recentemente preparada (0,33 g, 1,47 mmol) e trifenilfosfina (0,39 g, 1,47 mmol) em piridina (1,0 mL) foi adicionada à mistura da reacção acima. A reacção foi agitada a 60 °C durante a noite, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto foi dividido ao meio EtOAc e  $\text{NaHCO}_3$  saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica-gel (10% de MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para se obter o bisfosfonamidato (78 mg, 50%) como uma espuma amarela-clara:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,52 (s, 1H), 7,24 - 7,07 (m, 10H), 4,26 (m, 1H), 4,11 (m, 2H), 4,01 (m, 1H), 3,85 (m, 4H), 3,66 (m, 2H), 3,35 - 3,25 (m, 2H), 3,07 - 2,85 (m, 3H), 2,97 - 2,79 (m, 2H), 1,89 (m, 2H), 0,90 (m, 12H), 0,89 (m, 2H), 0,62 (m, 2H);  $^{31}\text{P}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20,31.

#### Exemplo 35

BisPOC de cPrPMEDAP 35: Uma mistura de ácido fosfónico 6 (0,20 g, 0,61 mmol) e trietilamina (0,42 mL, 3,01 mmoles) em 1-metil-2-pirrolidinona (2,0 mL) foi aquecida a 60 °C durante 30 min. POCCL (0,45 g, 2,92 mmoles) foi adicionado. A mistura de reacção foi agitada a 60 °C durante 3 h, arrefecida à temperatura ambiente, e concentrada. O produto

foi dividido ao meio EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia na ISCO (2-propanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para se obter o bisPOC de cPrPMEDAP (0,13 g, 39%) como um sólido: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,58 (s, 1H), 5,66 (m, 4H), 4,92 (m, 2H), 4,22 (m, 2H), 3,90 - 3,88 (m, 4H), 3,01 (amplo, s, 1H), 1,81 (m, 12H), 0,86 (m, 2H), 0,62 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>) b 20,93.

Exemplos 36 a 38 referentes ao esquema 10.

#### Exemplo 36

Este exemplo explica ensaios utilizados para demonstrar a actividade de antiproliferação. Tipos de células utilizados para ensaios anti-proliferação

As linhas celulares cancerígenas humanas utilizadas em ensaios antiproliferação incluíram seis linhas celulares de carcinoma cervical com três tipos de HPV (HPV-16, HPV-18, HPV-39), uma linha celular de carcinoma cervical de HPV negativo, e dois carcinomas tipo ceratinócito de língua. As células humanas normais testadas incluíram ceratinócitos de pele, ceratinócitos cervicais, e fibroblastos de pulmão. Os ceratinócitos de pele e ceratinócitos cervicais foram obtidos de Cambrex (East Rutherford, NJ) e todas as outras células foram obtidas de American Type Culture Collection (Manassas, VA).

Tabela 79-1 sumariza características de cada tipo celular e condições de cultura.

#### Procedimento de ensaio antiproliferação

##### 1. Cultura celular

As células foram separadas em frascos de cultura utilizando tripsina, medidas e colocadas em placas para cultura de células de 96 poços (250 - 1000 células por poço, dependendo do tipo celular). No dia seguinte (definido como o dia 0), após as células se ligarem à base das placas, foram adicionadas, em duplicado, diluições em séries de 5 vezes dos compostos. Não foi adicionado nenhum composto e 10  $\mu$ M colquicina (inibidor de divisão celular) às cavidades de controlo, que representariam 100% de proliferação e 0% de proliferação, respectivamente.

## 2. A coloração de células com Sulforodamina B

Sete dias após a adição de compostos, as placas de cultura foram tratadas com 10% de ácido tricloroacético a 4°C durante 1 hora, e posteriormente lavadas com água. Este procedimento permite que as proteínas derivadas da célula se liguem à superfície de base das placas. As proteínas foram coloridas com 0,4% de Sulforodamina B em 1% de ácido acético durante 10 minutos, seguindo-se uma lavagem exaustiva com 1% de ácido acético. A tinta que permaneceu ligada à base das placas foi dissolvida em 10 mM de base Trizma, o que deu lugar a uma cor púrpura que foi quantificada ao se medir a absorção a 510 nm de comprimento de onda utilizando-se um espectrofotómetro.

## 3. Análise de Dados

Dos dados experimentais, a curva de resposta de dose sigmoidal foi gerada e calculou-se 50% de concentração eficaz ( $EC_{50}$ ) utilizando-se GraphPad Prism versão 4.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA).

Tabela 36-1. Tipos de célula utilizados em ensaios antiproliferação

Nome	Estado do HPV	Origem	Meio de Cultura *
Linhas celulares de carcinoma HPV positivo			
SiHa	HPV-16 (1-2 cópias por célula)	Carcinoma de célula escamosa no colo do útero	A1, A2
Ca Ski	HPV-16 (600 cópias por célula)	Carcinoma epidermóide, metastatizado para o intestino pequeno de cérvix	A1, A2
MS751	HPV-18 (também contém um genoma de HPV-45 parcial)	Carcinoma epidermóide, metastatizado para gânglio linfático do colo do útero	A1, A2
HeLa	HPV-18	Carcinoma epitelial em cérvix	A1, A2
C-4 I	HPV-18	Carcinoma em cérvix	A1, A2
ME-180	HPV-39	Carcinoma epidermóide, metastatizado para omento do colo do útero	A1, A2

Linhas celulares de carcinoma HPV negativo			
HT-3	Nenhum	Carcinoma, metastatizado para gânglio linfático do colo do útero	A1, A2
SCC-4	Nenhum	Carcinoma de célula escamosa na língua	A1, A2
SCC-9	Nenhum	Carcinoma de célula escamosa na língua	A1, A2
Células de tecidos humanos normais			
HEL299	Nenhum	Fibroblastos em pulmão embriónico	A1, A2
PHK (ceratinócitos de pele)	Nenhum	Ceratinócitos em prepúcio no adulto	B1, B2
CK (ceratinócitos cervicais)	Nenhum	Ceratinócitos em cérvix no adulto	B1, B2

\* Meios de cultura

As células foram mantidas em incubadoras humidificadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, nos seguintes meios de cultura.

A1: Meios para manutenção de cultura: Eagle MEM com Earle's BSS (Cambrex, East Rutherford, NJ), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina, e 100 µg/mL estreptomicina.

A2: Meio para ensaios antiproliferação: Eagle MEM com Earle's BSS, suplementado com 5% de soro bovino fetal, 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina.

B1: Meio para manutenção de cultura: Ceratinócito-SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado com 0,01 de mg/mL de extracto de pituitária bovina, 0,001 de µg/mL de factor de crescimento epidérmico recombinante, 100 unidades/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina.

B2: Meio para ensaios antiproliferação: 4:1 de mistura de B1 e A2.

## Resultados

1. Actividade antiproliferação selectiva dos pro-fármacos de amidato em células SiHa HPV positivo em comparação com fibroblastos normais.

O objectivo era descobrir um composto que inibisse o crescimento de lesão transformada por HPV sem afectar as células normais na epiderme e derme (tal como, ceratinócitos e fibroblastos). Os ensaios antiproliferação *in vitro* foram estabelecidos utilizando células SiHa e células HEL, que moldam a lesão transformada por HPV e fibroblastos normais, respectivamente. As células SiHa derivam do carcinoma de célula escamosa em cérvix causado por infecção de HPV-16 e os fibroblastos HEL derivam de pulmão embriónico humano normal (Tabela 36-1). Como demonstrado na Tabela 36-2, 50% de concentração eficaz ( $EC_{50}$ ) dos sete pro-fármacos de amidato em células SiHa apresentavam uma variação de 0,13 - 3,2 mM, enquanto  $EC_{50}$  em células HEL a variação era de 12 - 727 nM, indicando que estes compostos inibiam a proliferação de células SiHa de modo mais eficaz comparativamente às células HEL. O índice

de selectividade de HEL/SiHa ( $EC_{50}^{HEL}$  dividido por  $EC_{50}^{SiHa}$ ) apresentou uma variação de 72 - 559 (Tabela 36-2).

Todos os sete pro-fármacos de amidato produzem o mesmo metabólito, cprPMEDAP. cprPMEDAP é também metabolizado para PMEG [Compton e outros, 1999; Haste e outros, 1999]. O  $EC_{50}$  antiproliferação destes compostos em células SiHa foi muito maior do que aqueles dos pro-fármacos (Tabela 79-2), indicando que a ligação de fracções de amidato melhorou a potência. Além disso, os índices de selectividade de HEL/SiHa de cprPMEDAP e PMEG foram de 17 e 4,1, respectivamente (Tabela 79-2), indicando que as pro-fármacos apresentam maior selectividade do que cprPMEDAP e cprPMEDAP uma maior selectividade do que PMEG.

PMEG é conhecido ser fosforilado para PMEGpp que actua como um inibidor de terminação de cadeia de polimerase de ADN celular [Compton e outros, 1999; Haste e outros, 1999]. Quatro inibidores de ADN polimerase conhecidos (Cidofovir, Ara C, doxifluridina, e Afidicolina) e outros fármacos anticancro com diferentes mecanismos de acção, incluindo inibidores de ADN topoisomerase (Dacarbazina, Ellipticine), alquilantes de ADN (Doxorubicina, Mitoxantrona, Bleomicina, Mecloretanmina), e inibidores de tubulina (Vincristina, Vinblastina, Etoposida, e Indanocina) foram testados em células SiHa e HEL (Tabela 36-2). O  $EC_{50}$  antiproliferação destes compostos em células SiHa apresentou uma variação, e alguns foram igualmente ou mais potentes do que os sete pro-fármacos de amidato. Não obstante, todos eles exibiram índices de selectividade fraca de HEL/SiHa (0,01 - 3,98), em comparação com os sete pro-fármacos de amidato.

Tomado em conjunto, foi explicado um único grupo de compostos, que mostra nM de  $EC_{50}$  antiproliferação sub-baixo em células de carcinoma SiHa HPV-16 positivas e mais do que

50 vezes a selectividade comparativamente aos fibroblastos de HEL.

2. A actividade antiproliferação selectiva dos pro-fármacos de amidato em células SiHa HPV positivo em comparação com ceratinócitos normais.

A fim de testar o efeito dos compostos em células normais de epiderme, foram realizados ensaios antiproliferação utilizando ceratinócitos humanos primários, isolados da pele (PHK) e cérvix (CK). Os valores  $EC_{50}$  antiproliferação obtidos com os sete pro-fármacos em PHK e CK foram menores do que aqueles em HEL, indicando que os ceratinócitos são mais susceptíveis do que os fibroblastos (Tabela 79-2 e 79-3). Não obstante, os índices de selectividade de PHK/SiHa e CK/SiHa destes pro-fármacos e cprPMEDAP foram ainda melhores do que os compostos de controlo PMEG e um inibidor de ADN polimerase AraC (Tabela 79-3). Deste modo, os pro-fármacos inibiram preferencialmente a proliferação de células SiHa HPV-16 positivo, em comparação com os ceratinócitos de pele e cérvix.

3. Actividades antiproliferação em outras células HPV positivo.

Os sete pro-fármacos foram então testados em cinco linhas celulares adicionais derivadas de carcinoma cervical induzido por HPV (listados na Tabela 36-1) em ensaios antiproliferação e os dados são apresentados na Tabela 4 juntamente com os dados de SiHa. Em células SiHa, C-4I, e MS751, todos os compostos excepto o Composto C apresentou nM de  $EC_{50}$  antiproliferação subbaixo. No entanto, em CaSki, HeLa, e ME-180, todos os compostos foram significativamente menos potentes, com o  $EC_{50}$  variando de 7,8 a 410 nM. Parece não existir qualquer correlação entre a resistência e o

tipo de HPV (16, 18 ou 39), ou resistência e metástase (CaSki, MS751, e ME180 são derivados de local metastatizado). Composto de controlo AraC (inibidor de DNA polimerase) inibiu uniformemente todas as linhas celulares com valores de EC<sub>50</sub> variando de 94 a 257 nM.

4. Actividades antiproliferação em células de carcinoma de HPV negativo.

Para investigar o efeito dos compostos sobre linhas celulares de carcinoma HPV negativo, foram testadas três linhas celulares (HT-3, SCC4, SCC9, Tabela 79-1) em ensaios antiproliferação. Como demonstrado na Tabela 79-4, todos os sete pro-fármacos foram igualmente ou mais potentes do que o composto de controlo AraC.

Tabela 36-2. Inibição selectiva de células SiHa HPV16+ em comparação com fibroblastos de HEL.

Composto ID.	Nota	Selectividade (HEL/SiHa)	Antiproliferação EC <sub>50</sub> (nM)	
			Carcinoma cervical de SiHa (HPV16)	Fibroblasto de pulmão de HEL
A		72	0,6	43
B		559	1,3	727
C		115	0,20	23
D		135	3,2	431
E		164	0,50	82
F		210	2,5	526

G		92	0,13	12
Controles				
cprPMEDAP	Metabólito	17	284	4821
PMEG	Metabólito	4.1	207	861
AraC	inib. ADN pol	0.113	257	29
Cidofovir	inib. ADN pol	0.3	84013	27952
Doxifluridina	inib. ADN pol	0.449	8755	3927
Afidicolina (+)	inib. ADN pol	0.40	856	324
Dacarbazina	Inib. topo ADN	3.98	7402	29481
Elipticina	Inib. topo ADN	1.02	478	486
Doxorubicina	Alquilante de ADN	0.43	9,76	4,20
Mitoxantrona	Alquilador de ADN	<0.37	8,67	<3,2
Cloridrato de Mecloretamina	Alquilador de ADN	1.02	21863	22203
Bleomicina	Alquilador de ADN	0.01	3138	20.28

Vincristina	Inib. de Tublina	1.55	1,24	1,92
Vinblastina	Inib. de Tublina	0.39	0,68	0,27
Etoposida	Inib. de Tublina	0.31	469	144
Indanosina	Inib. de Tublina	0.27	588	159

Tabela 36-3. Inibição Selectiva de células SiHa de HPV16+ em comparação com ceratinócitos primários.

Comp ID.	Nota	Selectividade (PHK/SiHa)	Selectividade (CK/SiHa)	Antiproliferação EC50 (nM)		
				SiHa cervical carcinoma (HPV16)	PHK ceratinócitos de pele	CK cervical ceratinócitos
A		58	11	0,6	35	7
B		75	42	1,3	98	54
C		4	7	0,20	0,8	1,4
D		12	7	3,2	39	22
E		10	11	0,50	5,2	5,4
F		31	3	2,5	78	7,1
G		22	15	0,13	2,9	1,9
Con-trolos						

cprP MEDA P	Metabó -lito	13	2,4	284	3698	694
PMEG	Metabó -lito	0,48	2,4	207	101	501
AraC	inib. DNA pol	0,57	0,4	257	147	107

Tabela 36-4. Atividades antiproliferação em outras células de carcinoma de HPV positivo e negativo.

Comp ID.	EC50 (nM) antiproliferação em células de carcinoma de HPV positivo						EC50 (nM) antiproliferação em células de carcinoma de HPV negativo		
	SiHa HPV16	CaSki HPV16	HeLa HPV18	MS-751 HPV18	C-4I HPV18	ME-180 HPV39	HT-3 cérvix	SCC-4 língua	SCC-9 língua
A	0,6	29	16	1,7	6,5	27	14	17	40
B	1,3	246	410	18	27	254	104	53	150
C	0,2 0	3,8 7	6,6	0,54	1,0	7,8	9,5	2,1	2,5
D	3,2	301	398	16	24	288	127	44	147
E	0,5 0	38	19	2,40	3,1	27	17	8	13
F	2,5	124	127	4,2	6,0	41	24	10	28
G	0,1	28	12	0,9	3,1	8,2	6,0	2,1	7,9

	3								
Contro- les									
AraC	257	94	174	144	123	101	214	74	68

## Exemplo 80

## Ensaio antiproliferação

Ensaio antiproliferação medem o efeito de compostos sobre a proliferação de células cultivadas. Compostos activos em ensaios antiproliferação podem ser citostáticos (inibem a divisão celular) e/ou citocidas (células mortas). Ao se realizarem ensaios antiproliferação utilizando células de carcinoma HPV positivo e células normais, é possível identificar compostos que inibem selectivamente a proliferação de células de carcinoma de HPV positivo em comparação com células de tecidos humanos normais. A Tabela 37-1 sumariza as características de cada tipo celular, incluindo seis linhas celulares de carcinoma transformadas por HPV, ceratinócitos de pele de humanos normais (PHK), e fibroblastos de pulmão normal (HEL). Ceratinócitos de pele foram obtidos pela Cambrex (East Rutherford, NJ). Todas as outras células foram obtidas pela American Type Culture Collection (Manassas, VA).

As células foram separadas em frascos de cultura utilizando tripsina, calculadas e colocadas em placas de cultura para células de 96 poços (250 - 100 células por cavidade, dependendo do tipo celular). No dia seguinte (definido como o dia 0), foram adicionadas em duplicado diluições em séries de 5 vezes de compostos. Sete dias após a adição de compostos, as placas de cultura foram tratadas com 10% de ácido tricloroacético a 4°C durante 1 hora e

lavadas com água. Este procedimento permite que as proteínas celulares se liguem à superfície de base das placas. As proteínas foram coloridas com 0,4% de Sulforodamina B em 1% de ácido acético durante 10 minutos, seguindo-se uma lavagem exaustiva com 1% de ácido acético. A tinta restante ligada à base das placas foi solubilizada em 10 mM de base Trizma, dando lugar a uma cor púrpura. A intensidade da cor (proporcional ao número de células) foi quantificada medindo-se a absorção a 510 nm de comprimento de onda, utilizando um espectrofotómetro. Células sem tratamento com fármaco (=100% de proliferação) e células tratadas com 10 µM de colquicina (inibidor de divisão celular) (= 0% de proliferação) foram utilizadas como controlo, para determinar o percentual de inibição. Os valores de % de inibição foram registados em função das concentrações de compostos, adaptadas a uma curva de resposta de dose sigmoideal, da qual a concentração de composto que reduziu a taxa de proliferação celular em 50% (= EC<sub>50</sub>) foi determinada. GraphPad Prism versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA) foi utilizado para adaptar a curva e cálculo de EC<sub>50</sub>.

#### Ensaio de Apoptose (método de indução de caspase 3)

Indução de caspases é um dos eventos precoces associados à apoptose ou morte celular programada. A actividade de caspase pode ser quantitativamente detectada utilizando substrato fluorescente. Os compostos que actuam directamente sobre a via apoptótica podem induzir a caspase num período de incubação relativamente curto (< 24 horas). Os compostos que perturbam outra fisiologia celular, que eventualmente causa a apoptose, podem requerer um período de incubação mais longo (> 48 horas) para indução de caspase.

Foram semeadas 10.000 células em placas de cultura de 96 poços e incubadas com diluições em séries de 5 vezes de compostos durante 24, 48, e 72 horas. As células foram lisadas e a actividade de caspase em lisados celulares foi medida utilizando-se substrato fluorescente, de acordo com a instrução do fabricante (Kit de ensaio de caspases, Roche, Indianápolis, IN).

#### Ensaio de Apoptose (Método de coloração com Anexina V)

A translocação de fosfatidilserina do interior da membrana celular para o exterior é a dos eventos precoce / intermediários associados com apoptose ou morte celular programada. A fosfatidilserina translocada pode ser detectada ao se incubarem as células com Anexina V marcada com FITC, que é uma proteína de ligação a fosfolipídeo dependente de  $Ca^{++}$ . Quando as células são coloridas com Anexina-FITC e iodeto de propídio (que colora as células mortas), as células vivas são negativas para ambas as tintas, as células mortas são positivas para ambas, enquanto as células apoptóticas são positivas apenas para Anexina-FITC.

As células SiHa de HPV-16 foram cultivadas com três diferentes concentrações de compostos durante 3 ou 7 dias e simultaneamente coloridas com Anexina-FITC e iodeto de propídio. A coloração de cada célula individual foi examinada por citometria de fluxo.

#### Resultados

##### Actividade antiproliferação selectiva

O propósito para este procedimento implicava identificar os compostos que inibem o crescimento de lesão transformada por HPV sem afectar as células normais na epiderme e derme (tal como, ceratinócitos e fibroblastos).

Portanto, os compostos foram testados em células SiHa, PHK, e HEL, que moldam as células transformadas por HPV, ceratinócitos normais, e fibroblastos normais, respectivamente.

Os compostos representativos da presente invenção apresentavam níveis detectáveis de actividade antiproliferação em células SiHa, com 50% de concentração eficaz ( $EC_{50}$ ) menor do que 25.000 nM. Os compostos activos foram também testados em células HEL. Em todos os casos,  $EC_{50}$  em células HEL foi maior do que o  $EC_{50}$  em células SiHa, indicando que os compostos activos inibiram a proliferação de células SiHa, de modo mais eficaz do que as células HEL. Outros análogos de nucleótido/nucleosídeo, tais como PMEG (guanina de 2-fosfonometoxietilo), Ara-C (citarabina, CAS# 147-94-4), e gemcitabina (CAS# 95058-81-4) não apresentaram tal selectividade. Podofilox (CAS# 518-28-5), o ingrediente activo do fármaco anti-verruga Condylox, também não apresentou qualquer selectividade.

Os compostos de pró-fármaco representativos da presente invenção, tais como aqueles indicados na Tabela 37-3 apresentam actividades. Na maioria dos casos, os pró-fármacos foram mais potentes e em alguns casos, mais selectivos do que seus respectivos compostos de origem. A maioria dos pró-fármacos de fosfoamidato foi mais activa e selectiva do que o podofilox.

Tomados em conjunto, os compostos foram identificados como tendo sub nM de  $EC_{50}$  antiproliferação em células SiHa HPV-16 positivo e mais do que 50 vezes a selectividade quando comparados com os ceratinócitos de PHK ou com fibroblastos de HEL.

Actividade antiproliferação em outras linhas celulares HPV+

Os compostos seleccionados foram também testados em cinco linhas celulares adicionais derivadas de carcinoma cervical induzido por HPV (veja o Exemplo 36 e Tabela 37-3). Cada composto apresentou diferentes níveis de actividades nas seis linhas celulares HPV+, independentemente do tipo de HPV presente. Em geral, os compostos foram mais potentes em células SiHa (HPV-16), C-4I (HPV-18), e MS751 (HPV-18) do que em células CaSki (HPV-16), HeLa (HPV-18), e ME-180 (HPV-39).

#### Indução de apoptose (método de indução de caspase 3)

Um composto representativo da presente invenção foi testado quanto à indução de apoptose em células SiHa. Quando as células foram incubadas durante 72 horas (barras sólidas), foi observada a indução responsiva de dosagem caspase significativa, indicando que o composto induziu à apoptose (Figura 80-1). Indução de caspase foi menos óbvia com 48 horas de incubação (barras sombreadas) e não foi observada com 24 horas de incubação (dados não apresentados).

#### Indução de apoptose (Método de coloração por Anexina V)

PMEG, N6-ciclopropil PMEDAP, e um composto representativo da presente invenção foram testados em três diferentes concentrações, quanto à indução de apoptose em células SiHa, utilizando-se o método de coloração dupla por Anexina V-Propídio. Com todos os três compostos, foi observada uma percentagem maior de células apoptóticas ao dia 7 do que ao dia 3. Composto representativo anteriormente mencionado da presente invenção foi o mais activo na indução de apoptose; ao dia 7, 63,8% de células na cultura tratadas com 0,2 µg/m deste composto foram apoptóticas. por contraste, as culturas tratadas com 0,2 µg/mL de PMEG e 0,5 µg/mL de N6-ciclopropila PMEDAP apenas,

apresentaram 1,2 % e 15,9 % de células apoptóticas, respectivamente.

Tabela 37-1. Tipos celulares utilizados em ensaios antiproliferação

Nome	estado de HPV *	Origem	Meios de cultura **
Linhas celulares de carcinoma HPV positivo			
SiHa	HPV-16	Carcinoma de célula escamosa em cérvix	A1, A2
Ca Ski	HPV-16	Carcinoma epidermóide, metastatizado para o intestino delgado de cérvix	A1, A2
MS751	HPV-18 (também contém um genoma de HPV-45 parcial )	Carcinoma epidermóide, metastatizado para gânglio linfático do colo do útero	A1, A2
HeLa	HPV-18	Carcinoma epitelial em cérvix	A1, A2
C-4 I	HPV-18	Carcinoma em cérvix	A1, A2
ME-180	HPV-39	Carcinoma epidermóide, metastatizado para omento do colo do útero	A1, A2

Células de tecidos humanos normais			
HEL299	nenhum	Fibroblastos em pulmão embriónico	A1, A2
PHK (ceratinócitos de pele)	nenhum	Ceratinócitos em prepúcio de adulto	B1, B2

\* O subtipo ADN de HPV integrado no ADN celular.

\*\* Meios de cultura

As células foram mantidas em incubadoras humidificadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, nos seguintes meios de cultura.

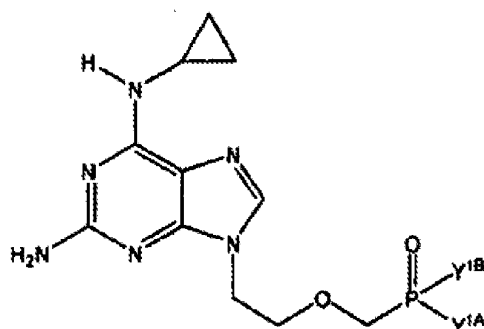
A1: Meio para manutenção de cultura: Eagle MEM com Earle's BSS (Cambrex, East Rutherford, NJ), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL penicilina, e 100 µg/mL estreptomicina.

A2: Meio para ensaios antiproliferação: Eagle MEM com Earle's BSS, suplementado com 5% de soro bovino fetal, 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina.

B1: Meio para manutenção de cultura: Ceratinócito-SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado com 0,01 mg/mL de extracto de pituitária bovina, 0,001 µg/mL de factor de crescimento epidérmico recombinante, 100 unidades/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina.

B2: Meio para ensaios antiproliferação: 4:1 mistura de B1 e A2.

Tabela 37-3. Actividade antiproliferação de pro-fármacos de fosfoamidato de PMEDAP N6-substituído em células SiHa de HPV16+, ceratinócitos PHK, e em fibroblastos HEL.



onde  $R^{X1}$  e  $R^{X2}$  são substituídos como representado na fórmula, e  $Y^{1A}$  e  $Y^{1B}$  são substituídos como indicado,

$Y^{1A}$	$Y^{1B}$
OH	OH
POC	POC
Hipo	O-iPr
Ala-Et	Ala-Et
Ala-Pr	Ala-Pr
Ala-iPr	Ala-iPr
Ala-Bu	Ala-Bu
Ala-cBu	Ala-cBu
Ala-cPen	Ala-cPentilo
Ala-Hexilo	Ala-Hexilo

Ala-Octilo	Ala-Octilo
Aba-Et	Aba-Et
Aba-Bu	Aba-Bu
Aba-Octilo	Aba-Octilo
Phe-Et	Phe-Et
Phe-Bu	Phe-Bu
Phe-iBu	Phe-iBu
Phe-cBu	Phe-cBu
OPh	Ala-Me
OPh	Ala-Et
OPh	Ala-Pr
OPh	Ala-iPr
OPh	Ala-Bu
OPh	Ala-tBu
OPh	Ala-Hexilo
OPh	Ala-Octilo
OPh	Aba-Et
OPh	Aba-Bu
OPh	Aba-cBu
OPh	Aba-Octilo

OPh	Phe-Et
OPh	Phe-Bu
OPh	Phe-iBu
OPh	D-Ala-Me

Tabela 37-3. Actividades antiproliferação de PMEDAP de N6-cicloprolila e suas pro-fármacos de fosfoamidato em seis diferentes células de HPV positivo.

Compos to ID.	EC50 (nM) Antiproliferação em células de carcinoma de HPV positivo.					
	SiHa HPV16	CaSki HPV16	HeLa HPV18	MS-751 HPV18	C-4I HPV18	ME-180 HPV39
A	0,6	29	16	1,7	6,5	27
B	1,3	246	410	18	27	254
C	0,2	3,9	6,6	0,5	1,0	7,8
D	3.2	301	398	16	24	288
E	0.5	38	19	2.4	3,1	27
F	2.5	124	127	4.2	6,0	41
G	0.13	28	12	0.9	3,1	8,2
H	0.03	2,0	0,7	0,04	0,44	1,8
(cprPM EDAP)	284	14149	6926	3313	1332	8315

## Exemplo 38

Estudo de Irritação de Pele de Coelho de Compostos A e B.

Foi conduzido um estudo para avaliar o potencial de dois compostos da presente invenção para produzir irritação quando administrados por meio de aplicação dérmica a coelhos macho durante sete dias consecutivos. Um total de seis machos foi designado para o estudo como apresentado na Tabela abaixo.

<b>Designações de Grupo</b>		
Grupo Número	Artigo de Teste <sup>a</sup>	Número de Animais (machos)
1	Composto B <sup>b</sup>	3
2	Composto A <sup>c</sup>	3

<sup>a</sup>Cada animal recebeu tratamentos dérmicos de veículo (gel de placebo), um artigo de controlo positivo, e três concentrações do artigo de teste apropriado. Cada animal recebeu um artigo de teste em concentrações de 0,01, 0,03, e 0,1%.

<sup>b</sup>O artigo de controlo positivo utilizado foi de 0,1% de guanina de 9-(2-fosfonilmetoxietila) (PMEG).

<sup>c</sup>O artigo de controlo positivo empregado foi de 1% de Cidofovir®.

O veículo, artigos de controlo positivo, e artigos de teste foram administrados dermicamente uma vez ao dia durante sete dias durante o estudo. Os artigos de teste foram administrados em concentrações de 0,01, 0,03, e 0,1%. Os artigos de controlo positivo foram administrados em

concentrações de 0,1% (PMEG) ou 1% de (Cidofovir®). O volume de dose para todas as formulações foi um volume fixo de 100 µL.

Os locais de teste para cada animal foram desbastados antes da administração inicial e quando necessário durante o estudo. Dois locais foram desbastados sobre o lado dorsal esquerdo, e três foram desbastados sobre o local dorsal direito. O contorno de cada dosagem (aproximadamente 2,54 cm<sup>2</sup> (1" quadrada) cada) foi marcado com tinta indelével. A área total desbastada compreendeu não menos do que 10% da superfície corporal total de cada animal.

O veículo e controlo positivo apropriado e artigo de teste foram administrados a cada animal dentro do local de dosagem de aproximadamente 2,54 cm<sup>2</sup> (1" quadrada). O veículo foi administrado sobre o local rostral esquerdo (Local de Dosagem 1), e o artigo de controlo positivo apropriado foi administrado no local caudal esquerdo (Local de Dosagem 2). O artigo de teste apropriado foi administrado como segue: 0,01% para o local rostral direito (Local de Dosagem 3), 0,03% para o local médio direito (Local de Dosagem 4), e 0,1% para o local caudal direito (Local de Dosagem 5). Colares foram colocados nos animais imediatamente após a dosagem durante 1 a 2 horas.

Os locais foram avaliados quanto ao eritema e edema antes da dosagem no Dia 1 e posteriormente diariamente, aproximadamente 24 horas após cada dose e antes da dose seguinte. A cada local foi atribuída uma classificação de irritação com base na escala Draize para classificar a irritação da pele (Draize JH, Woodard G, Calvery HO, *Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes*. J Pharmacol Exp Ther 1944;82:377-90).

As observações relativamente à mortalidade, morbidade e disponibilidade de alimento e água foram conduzidas duas vezes ao dia para todos os animais. Os exames clínicos detalhados foram conduzidos antes da randomização, antes da dosagem ao Dia 1, e posteriormente conduzidos diariamente. Os pesos corporais foram medidos e registados no dia após a chegada, antes da randomização, e antes da dosagem aos Dias 1, 3, e 7.

A eutanásia foi realizada por dose excessiva de anestesia intravenosa com solução de eutanásia com base pentobarbital de sódio e sangramento cortando os vasos femorais. Os animais foram examinados cuidadosamente quanto às anormalidades externas incluindo massas. A pele foi reflectida a partir de uma incisão mediana ventral e quaisquer anormalidades foram identificadas e correlacionadas com descobertas antes da morte. As cavidades abdominal, torácica, e craniana foram examinadas quanto às anormalidades e os órgãos removidos, foram examinados, e, onde requerido, colocados em formalina tamponada neutra. Os locais de dosagem, rins, e quaisquer lesões volumosas de cada animal foram recolhidos e preservados. Foi realizado um exame microscópico de hematoxilina fixada e secções de parafina coloridas por eosina para cada local de dosagem para todos os animais. Os diapositivos foram examinados por um patologista veterinário. Foi utilizado um sistema de classificação de quatro fases para definir lesões graduáveis para comparação entre os grupos de dosagem.

#### Conclusões

Os dois artigos de teste não produziram descobertas clínicas notáveis, irritação dérmica, mudanças no peso corporal ou observações macroscópicas e microscópicas em

quaisquer concentrações de dosagem. Um dos controlos positivos foi associado a descobertas clínicas e observações macroscópicas e microscopias leves e moderadas.

### Exemplo 39

Estudo de Irritação de Pele de Coelho de Compostos B e H

Foi conduzido um estudo para avaliar o potencial de dois compostos da presente invenção de modo a produzir irritação quando administrado por meio de aplicação dérmica a coelhos macho durante sete dias consecutivos. Um total de 24 machos foi designado para o estudo.

Projecto de Estudo para o Composto B						
Local de Dosagem	Grupo 1 (n=6) <sup>a</sup>	Grupo 1 Concentração		Grupo 2 (n=6) <sup>a</sup>	Grupo 2 Concentração	
		%	(mg/mL)		%	(mg/mL)
1	Veículo de controlo	0,0	0,0	PMEG (controlo positivo)	0,1%	1,0
2	Dose Baixa	0,03	0,3	Dose Baixa	0,03	0,3
3	Dose Média	0,1	1,0	Dose Média	0,1	1,0
4	Dose Elevada	0,3	3,0	Dose Elevada	0,3	3,0

<sup>a</sup>Cada grupo consistiu em seis coelhos virgens.

<sup>b</sup>O veículo para o Local de Dosagem 1, Grupo 1, e Local de Dosagem Local de Dosagem 1, Grupo 2 (PMEG) era o gel de veículo. O Veículo dos locais tratados de Grupo 1 foi o gel de veículo, e o veículo para os locais tratados de Grupo 2 foi a pomada de veículo.

Projecto de Estudo para o Composto H						
	Grupo 3	Grupo 3 Concentração <sup>b</sup>		Grupo 4	Grupo 4 Concentração <sup>b</sup>	
Local de Dosagem	(n=6) <sup>a</sup>	%	(mg/mL)	(n=6) <sup>a</sup>	%	(mg/mL)
1	Veículo de controlo	0,0	0,0	PMEG (controlo positivo)	1,0%	10,0
2	Dose Baixa	0,03	0,3	Dose Baixa	0,03	0,3
3	Dose Média	0,1	1,0	Dose Média	0,1	1,0
4	Dose Elevada	0,3	3,0	Dose Elevada	0,3	3,0
<p><sup>a</sup> Cada grupo consistiu em seis coelhos virgens.</p> <p><sup>b</sup> O veículo para o Local de Dosagem Local de Dosagem 1, Grupo 3 foi a pomada de veículo, e o veículo para o Local de Dosagem 1, Grupo 4 (cPrPMEDAP) foi o gel de veículo. O Veículo para os sítios tratados com o Grupo 3 foi o gel de veículo, e o veículo para os sítios tratados com o Grupo 4 foi a pomada de veículo.</p>						

O teste e artigos de controlo foram administrados dermicamente uma vez por dia durante 7 dias consecutivos durante o estudo. Os níveis de dose para o Composto B foram 0,03, 0,1, e 0,3%. Os níveis de dosagem para o Composto H foram 0,03, 0,1, e 0,3%. O nível de dosagem para PMEG (controlo positivo) foi de 0,1%. O nível de dosagem para cPrPMEDAP (controlo positivo) foi de 1,0%. O nível de dosagem para o controlo de veículo foi de 0,0% (este foi doseado como ambas as formulações de gel e pomada). O volume de dosagem para todos os locais foi uma constante 100µL. Menos do que 24 horas antes da primeira

administração, o pelo das costas do animal foi rapado. Esta área rapada compreendia não menos do que 10% da área de superfície corporal total. Foram tomados os devidos cuidados para evitar esfolar a pele.

Os artigos de teste, controlo positivo, e controlo de veículo foram administrados dentro de um local de dosagem de aproximadamente 1" x 1". Dois locais de dosagem foram colocados ao longo da superfície dorsal esquerda. O artigo de veículo ou controlo positivo foi administrado ao local rostral, e a dose baixa do artigo teste foi administrada ao local caudal. Dois locais de dosagem foram colocados ao longo da superfície dorsal direita. A dose média do artigo teste foi administrada no local rostral, e a dose elevada do artigo de teste foi administrada no local caudal site. Foram colocados colares nos animais durante aproximadamente duas horas imediatamente após a dosagem. A duração de permanência do calor foi documentada nos dados brutos.

As observações quanto à mortalidade, morbidade, e a disponibilidade de alimento e água foram conduzidas duas vezes diariamente para todos os animais. Os locais de teste foram avaliados quanto a eritema e edema antes da primeira administração e em aproximadamente 24 horas após cada administração (antes da seguinte dosagem determinada) e diariamente durante o período de recuperação de 7 dias. As observações quanto aos sinais clínicos foram conduzidas diariamente durante o estudo simultaneamente com observações dérmicas. Os pesos corporais foram medidos e registados no dia após administração, antes da randomização, antes da administração do artigo de teste ao Dia 1, e aos Dias 7 e 14, e em necropsia (Dias 8 e 15). Os pesos corporais avaliados à chegada e antes da randomização não são referidos. No entanto, são mantidos no arquivo de

estudo. As colheitas de amostras de sangue (4-6 mL) serão efectuadas em 6 animais/grupo em estado terminal e 3 animais/grupo em recuperação através da jugular ou outra veia adequada para avaliação de parâmetros de patologia clínica.

As amostras de sangue adicionais (aproximadamente 1 mL) foram recolhidas de todos os animais pela jugular ou outra veia adequada para a determinação das concentrações de plasma do artigo teste em aproximadamente 2 horas após a dose ao Dia 7. As amostras foram colocadas em tubos contendo EDTA de potássio e armazenadas num bloco de gelo até serem centrifugadas. Os animais não se encontravam em jejum antes da colheita de sangue. As amostras foram armazenadas a  $-70^{\circ}$  até o exame.

Os exames de necropsia completa foram realizados sob procedimentos aprovados por um patologista veterinário em todos os animais. A eutanásia foi realizada por dose excessiva de anestesia com solução de eutanásia com base em pentobarbital de sódio por meio da veia/artéria da orelha ou outra veia adequada e sangramento por corte dos vasos femorais. Os animais foram cuidadosamente examinados quanto às anormalidades externas incluindo massas. A pele foi reflectida a partir de uma incisão mediana ventral e quaisquer anormalidades foram identificadas e correlacionadas com descobertas antes da morte. As cavidades abdominal, torácica, e craniana foram examinadas quanto a anormalidades e os órgãos removidos, examinados, e, onde requerido, colocados em formalina tamponada neutra. O exame microscópico de hematoxilina fixa e secções de parafina coloridas com eosina foi realizado em secções de tecidos nos locais de dosagem (4 por animal), rins, e quaisquer lesões volumosas.

No momento da necropsia, os quatro locais de dosagem por animal foram identificados: ao Dia 8, para os animais principais do estudo e ao Dia 15 para animais em convalescença. Aproximadamente metade de cada local de dosagem foi excisado e em seguida recolhido e preservado como mencionado acima para processamento histológico. Enquanto a outra metade próxima de cada local de dosagem, no animal, ficou também intacta, os seguintes procedimentos são realizados. Os locais de dosagem foram esfregados com três gazes de etanol (95%) e deixados secar completamente. Fita (3M® fita de empacotamento ou equivalente) foi aplicada a cada local de dosagem dez vezes. Foi utilizado um pedaço limpo de fita para realizar a aplicação. As restantes fracções dos locais de dosagem foram então excisadas com tesouras. As tesouras foram lavadas entre cada local de dosagem e o animal com acetona ou etanol. A ordem de remoção do local de dosagem foi veículo ou local de controlo positivo, local de dosagem baixo, local de dosagem suave, e local de dosagem elevado. Um tecido de 1 cm<sup>2</sup> foi rapado em cada local de dosagem. A amostra de tecido foi pesada e registada. As punções da pele foram picadas com tesouras limpas e colocadas em frascos de cintilação de tamanhos apropriados individuais. Foi adicionada salina tamponada por fosfato frio (5 mL) ao frasco de cintilação. O tecido foi então homogeneizado em intervalos de 20 segundos utilizando um homogeneizador mecânico. Os homogenados foram rapidamente congelados em aproximadamente -20°C.

#### Conclusões

Com base nas classificações de irritação dérmica e descobertas microscópicas, um dos artigos de teste era não irritante no gel de veículo, porém era suave a

moderadamente irritante na pomada de veículo. O segundo artigo de teste era bastante ligeiramente irritante no gel de veículo e suavemente irritante quando formulado na pomada de veículo.

#### Exemplo 40

#### Preparação de Composição Farmacêutica Tópica de Gel

Este Exemplo ilustra a Preparação de uma composição tópica de gel representativa contendo um composto activo de Fórmula I.

Uma composição tópica de gel é preparada tendo a seguinte composição:

Componentes	% peso/peso
Composto activo	X*
Tampão de pH 4,5 ou 7	25
Propileno Glicol , USP	25
Hidroxietilcelulose, NF	1,25
Propilparabeno, NF	0,01
Metilparabeno, NF	0,09
Edetato de Dissódio, USP	0,025
Glicerina, USP	10,00
Ácido Cítrico, USP	0,50
Água Estéril para Injecção, USP	38,125

\*X = Composto variando de 0,01% a 1,0%

Outros compostos de Fórmula I, tal como aqueles preparados de acordo com a presente especificação podem ser utilizados como o composto activo na preparação das formulações de gel deste exemplo.

Os seguintes ingredientes foram também avaliados quanto à adequabilidade durante o desenvolvimento desta formulação:

Miristato de isopropilo (solvente/cossolvente/realçador de penetração),

Polietileno glicóis, Triacetina (solventes),

Álcool cetílico e Álcool estearílico (Agentes de endurecimento),

Carbómero (Realçador de viscosidade), e

Tweens, Spans (emulsificantes).

Exemplo 41

Preparação de Composição Farmacêutica Tópica de Pomada

Este Exemplo ilustra a preparação de uma composição tópica de pomada representativa contendo um composto activo de Fórmula I.

Uma composição de pomada tópica é preparada tendo a seguinte composição:

Componentes	% w/w
Composto activo	X*
Petrolato, USP	94,0
Sesquioleato de Sorbitano, NF	0,5

Propileno Glicol , USP	4,5
------------------------	-----

\*X = Composto variando de 0,01% a 1,0%

Outros compostos de Fórmula I, tal como aqueles preparados de acordo com a presente Especificação podem ser utilizados como o composto activo em uma Preparação das formulações de pomada deste exemplo.

Os seguintes ingredientes foram também avaliados para adequabilidade durante o desenvolvimento desta formulação:

Miristato de isopropilo (solvente/cossolvente/realçador de penetração),

Polietileno glicóis, Triacetina (solventes),

Álcool cetílico e Álcool estearílico (Agentes de endurecimento),

Carbômero (Realçador de viscosidade), e

Tweens, Spans (emulsificantes).

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora muito cuidado tenha sido tomado na compilação das referências, erros e omissões não podem ser excluídos e o IEP não assume qualquer responsabilidade neste sentido.*

**Patentes de invenção citadas na descrição**

- US 20030072814 A [0009]
- US 4816570 A [0039]
- US 4968788 A [0039]
- US 5663159 A [0039]
- US 5792756 A [0039]
- WO 9119721 A, Glazier [0041]
- US 6312662 B, Erion [0041]

**Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção**

- **K.A. Keith et al.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 2193-2198 [0007]
- **N. D. Christensen et al.** *Antiviral Research*, 2000, vol. 48, 131-142 [0008]
- Design and Application of Prodrugs. **Bundgaard ; Hans.** A Textbook of Drug Design and Development. Academic Publishers, 1991, 113-191 [0038]
- **Farquhar et al.** *J. Pharm. Sci.*, 1983, vol. 72, 324 [0039]
- **De Lombaert et al.** *J. Med. Chem.*, 1994, vol. 37, 498 [0041]
- **Khamnei ; Torrence.** *J. Med. Chem.*, 1996, vol. 39, 4109-4115 [0041]

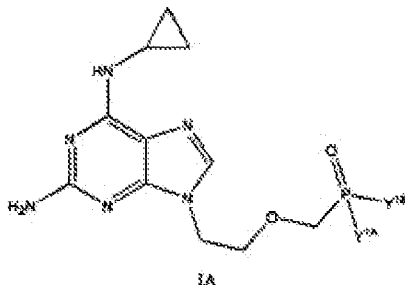
- **Mitchell et al.** *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1992, 2345 [0041]
- **Puech et al.** *Antiviral Res.*, 1993, vol. 22, 155-174 [0041]
- **Benzaria et al.** *J. Med. Chem.*, 1996, vol. 39, 4958 [0041]
- **Theodora W. Greene.** *Protective Groups in Organic Chemistry.* John Wiley & Sons, Inc, 1991 [0042]
- McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms. McGraw-Hill Book Company, 1984 [0067]
- **Eliel, E. ; Wilen, S.** *Stereochemistry of Organic Compounds.* John Wiley & Sons, Inc, 1994 [0067]
- **Theodora W. Greene.** *Protective Groups in Organic Synthesis.* John Wiley & Sons, Inc, 1991 [0071]
- **Kocienski, Philip J.** *Protecting Groups.* Georg Thieme Verlag, 1994 [0071]
- Handbook of Pharmaceutical Excipients. 1986 [0083]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, [0086]
- **Ian T. Harrison ; Shuyen Harrison.** *Compendium of Organic Synthetic Methods.* John Wiley & Sons, 1971, vol. 1 [0117]
- **Ian T. Harrison ; Shuyen Harrison.** *COMPENDIUM OF ORGANIC SYNTHETIC METHODS.* 1974, vol. 2 [0117]
- **Louis S. Hegedus ; Leroy Wade.** *COMPENDIUM OF ORGANIC SYNTHETIC METHODS.* 1977, vol. 3 [0117]
- **Leroy G. Wade, jr.** *COMPENDIUM OF ORGANIC SYNTHETIC METHODS.* 1980, vol. 4 [0117]
- **Leroy G. Wade, Jr.** *COMPENDIUM OF ORGANIC SYNTHETIC METHODS.* 1984, vol. 5 [0117]
- **Michael B. Smith.** *COMPENDIUM OF ORGANIC SYNTHETIC METHODS.* vol. 6 [0117]
- **March, J.** *Advanced Organic Chemistry.* John Wiley & Sons, 1985 [0117]

- Comprehensive Organic Synthesis. Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry. Pergamon Press, 1993, vol. 9 [0117]
- **Draize JH ; Woodard G ; Calvery HO.** Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1944, vol. 82, 377-90 [0199]

Lisboa, 17/11/2010

**REIVINDICAÇÕES**

1. Composto da Fórmula IA,



em que:

$Y^{1A}$  e  $Y^{1B}$  são  $-NH(R^X)$ ;

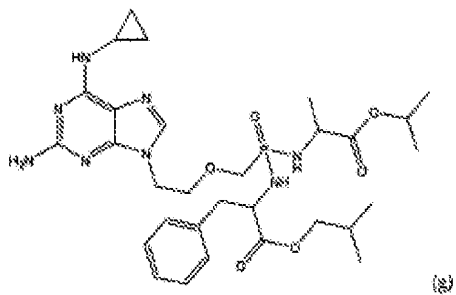
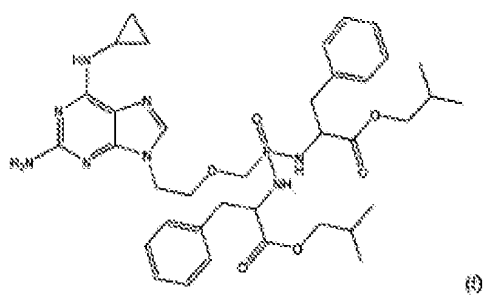
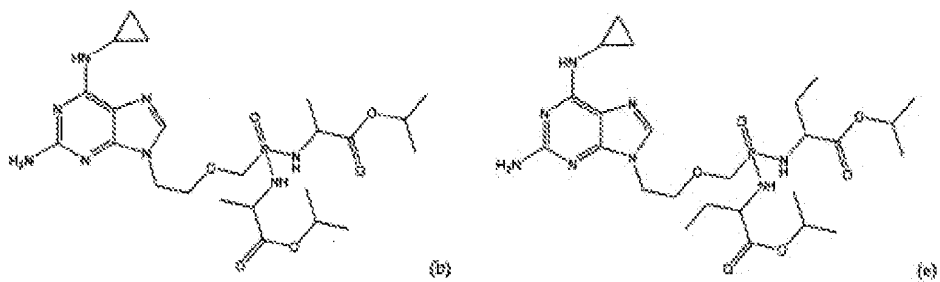
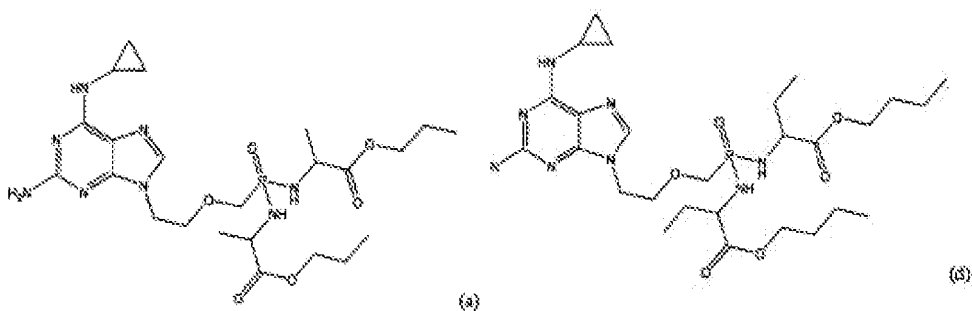
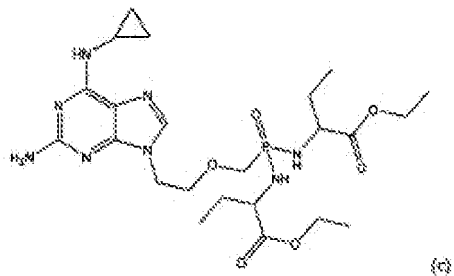
$R^X$  é independentemente  $R^2$ ;

$R^2$  é

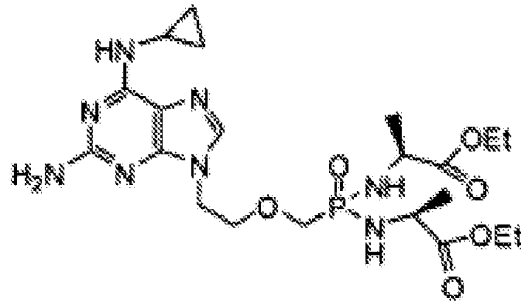
- a) etilo substituído por  $C(=O)OR^4$ , em que  $R^4$  é metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, i-butilo, s-butilo, t-butilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-fenilo, 2,3-dimetil-2-butilo, 3,3-dimetil-2-butilo, vinilo, alilo, ciclopentenilo, 5-hexenilo, etinilo ou propargilo;
- b) propilo substituído por  $C(=O)OR^4$  em que  $R^4$  é um alquilo de 1 a 18 átomos de carbono, alcenilo de 2 a 18 átomos de carbono ou alcinilo de 2 a 18 átomos de carbono; ou
- c) metilo substituído por dois  $R^3$  em que um  $R^3$  é  $-R^5W^3$  e o outro  $R^3$  é  $C(-O)OR^4$ ;  $R^4$  é um alquilo de 1 a 18 átomos de carbono, alcenilo de 2 a 18 átomos de carbono, ou alcinilo de 2 a 18 átomos de carbono;  $R^5$  é metileno;  $W^3$  é fenilo.

ou um sal dos mesmos farmacologicamente aceitável.

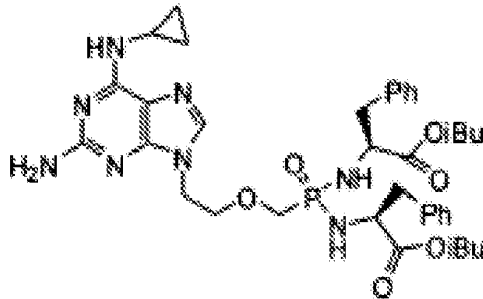
2. Composto de acordo com a reivindicação 1 sendo seleccionado de:



3. Composto de acordo com a reivindicação 1 com a fórmula



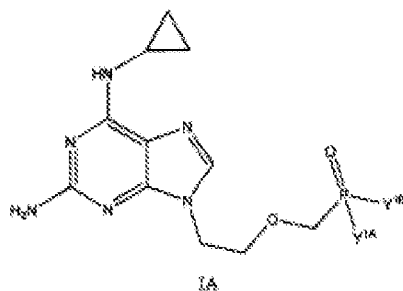
4. Composto de acordo com a reivindicação 1 com a fórmula



5. Composição farmacêutica compreendendo um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

6. A composição da reivindicação 5, a qual inclui uma quantidade eficaz de um composto de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, uma quantidade eficaz de, pelo menos, outro agente antiviral e um veículo farmacêuticamente aceitável.

7. Utilização de um composto de fórmula IA ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo na preparação de um medicamento para o tratamento de tumores



em que:

$Y^{1A}$  e  $Y^{1B}$  são  $-NH(R^X)$ ;

$R^X$  é independentemente  $R^2$ ;

$R^1$  é

a) etilo substituído por  $C(=O)OR^4$ ,

b) propilo substituído por  $C(=O)OR^4$ ; ou

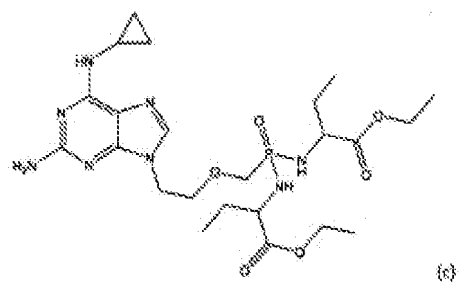
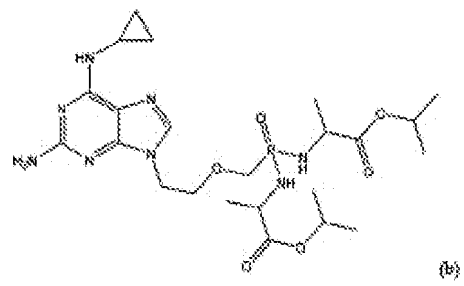
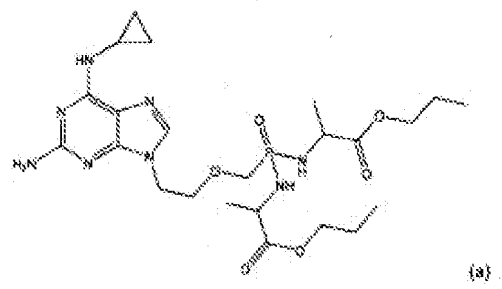
c) metilo substituído por dois  $R^3$  em que um  $R^3$  é  $-R^5W^3$  e o outro  $R^3$  é  $C(=O)OR^4$ ;

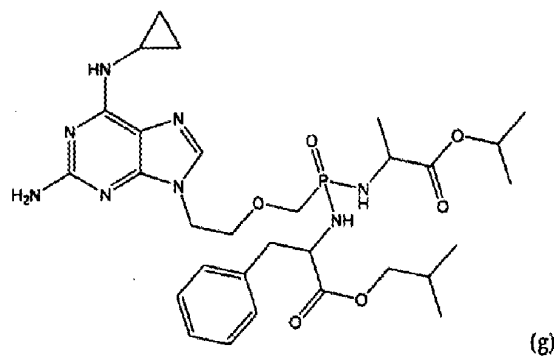
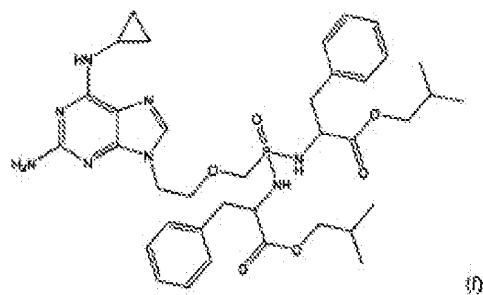
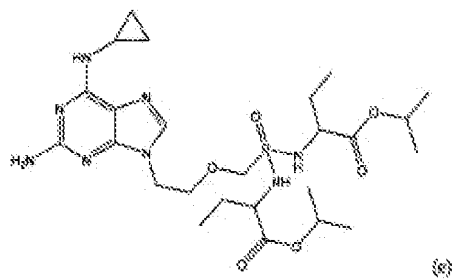
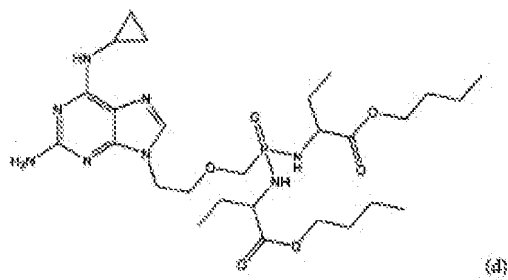
$R^4$  é um alquilo de 1 a 18 átomos de carbono, alcenilo de 2 a 18 átomos de carbono ou alcinilo de 2 a 18 átomos de carbono;

$R^5$  é metileno;

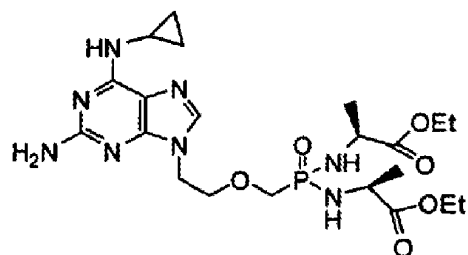
$W^3$  é fenilo.

8. Utilização, de acordo com a reivindicação 7, em que o composto de fórmula IA é seleccionado de:

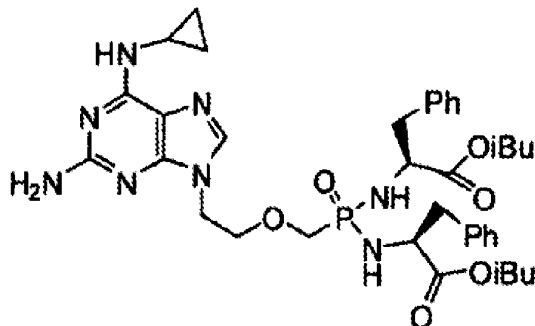




9. Utilização, de acordo com a reivindicação 7, em que o composto da fórmula I é seleccionado de:



10. Utilização, de acordo com a reivindicação 7, em que o composto de fórmula I é seleccionada de:



11. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 10, em que o medicamento inclui uma quantidade eficaz de um composto de fórmula IA ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, uma quantidade eficaz de, pelo menos, um agente antiviral e um veículo farmacologicamente eficaz.
12. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 11 em que o medicamento referido é uma composição em gel ou uma composição em pomada.
13. Composto, de acordo com o definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 7 a 12 para utilização num método para tratamento de tumores.

Lisboa, 17/11/2010