



**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 9912896-9 B1**

**(22) Data do Depósito:** 10/08/1999

**(45) Data de Concessão:** 09/08/2016



---

**(54) Título:** SS-L-2' -DESOXINUCLEOSÍDEOS PARA TRATAMENTO DE HEPATITE B

**(51) Int.Cl.:** C07H 19/06; C07H 19/10; C07H 19/16; C07H 19/20; A61K 31/70; A61P 31/12

**(30) Prioridade Unionista:** 10/08/1998 US 60/096,110, 28/04/1999 US 60/131,352

**(73) Titular(es):** CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. L'UNIVERSITE MONTPELLIER II. NOVARTIS AG

**(72) Inventor(es):** GILLES GOSSELIN, MARTIN L. BRYANT, JEAN-LOUIS IMBACH

**β-L-2'-DESOXINUCLEOSÍDEOS PARA TRATAMENTO DE HEPATITE B**HISTÓRICO DA INVENÇÃO

Esta invenção se refere aos processos para tratamento do vírus da hepatite B (também referido como "HBV") que inclui administração ao hospedeiro que necessite do mesmo, tanto sozinho quanto em combinação, de uma quantidade eficaz de um ou mais compostos ativos revelados aqui ou um pro-medicação farmacologicamente aceitável ou sal de um destes compostos.

10 HBV é o segundo após o tabaco como causa de câncer humano. O mecanismo pelo qual HBV induz o câncer é desconhecido e é postulado que ele pode disparar diretamente o desenvolvimento do tumor ou disparar indiretamente o desenvolvimento do tumor através de inflamação crônica, cirrose e regeneração de célula associada a esta infecção.

O vírus da hepatite B alcançou níveis epidêmicos mundiais. Após um período de dois a seis meses de incubação, no qual o hospedeiro desconhece a infecção, a infecção por HBV pode levar à hepatite aguda e dano ao fígado, o que causa dor abdominal, icterícia, e níveis elevados de determinadas substâncias no sangue. HBV pode causar hepatite fulminante, uma forma freqüentemente fatal e que progride rapidamente da doença, na qual as seções massivas do fígado são destruídas.

Pacientes tipicamente tornam-se recorrentes de hepatite aguda. Em alguns pacientes, contudo, níveis altos de antígeno virótico persistem no sangue por um período extenso, indefinido, causando uma infecção crônica. As infecções crônicas podem levar à hepatite crônica

persistente. Os pacientes infectados com HBV persistente crônica são mais comuns em países em desenvolvimento. Em meados de 1991, haviam aproximadamente 225 milhões de veículos crônicos de HBV na Ásia somente, e mundialmente, quase 300 milhões de veículos. A hepatite crônica persistente pode causar faringite, cirrose do fígado e carcinoma hepatocelular, um câncer primário do fígado.

Em países industrializados do ocidente, grupos de alto risco quanto a infecção por HBV incluem aqueles em contato com veículos de HBV ou suas amostras de sangue. A epidemiologia do HBV é muito semelhante àquela da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), o que explica porque a infecção por HBV é comum entre pacientes com AIDS ou complexo relacionado à AIDS. Contudo, HBV é mais contagioso do que HIV.

Contudo, mais recentemente, vacinas também foram produzidas através de engenharia genética e são usadas correntemente e de forma ampla. Infelizmente, as vacinas não podem ajudar aqueles já infectados por HBV. Os tratamentos diários com  $\alpha$ -interferon, uma proteína transformada geneticamente, também se mostraram promissores, porém esta terapia tem sucesso apenas em um terço dos pacientes tratados. Adicionalmente, o interferon não pode ser dado oralmente.

Vários nucleosídeos sintéticos foram identificados, os quais exibem atividade contra HBV. O (-)-enantiômero de BCH-189, conhecido como 3TC, reivindicado na Patente US 5.539.116 para Liotta e outros, foi aprovada pelo U.S. Food and Drug Administration para tratamento da hepatite B. Vide também EPA 0 494 119 A<sup>1</sup> depositada pela BioChem Pharma,

Inc.

Cis-2-hidroximetil-5-(5-fluorcitosin-1-il)-1,3-oxatiolano ("FTC") exibe atividade contra HBV. Vide WO 92/15308; Furman, e outros, "The Anti-Hepatitis B Virus Activities, Cytotoxicities, and Anabolic Profiles of the (-) and (+) Enantiomers of cis-5-Fluoro-1-[2-(Hydroxymetil)-1,3-oxathiolane-5-yl]-Cytosine" Antimicrobial Agents and Chemotherapy, December 1992, page 2686-2692; e Cheng, e outros, Journal of Biological Chemistry, Volume 267(20), 13938-13942 (1992).

von Janta-Lipinski e outros revela o uso de L-enantiômeros de  $\beta$ -2'-deoxiribonucleosídeo 5'-trifosfatos modificados por 3'-flúor para inibição de polimerases da hepatite B (J. Med. Chem., 1998, 41, 2040-2046). Especificamente, os 5'-trifosfatos de 3'-deóxi-3'-flúor- $\beta$ -L-timidina ( $\beta$ -L-FTTP), 2',3'-dideóxi-3'-flúor- $\beta$ -L-citidina ( $\beta$ -L-FdCTP), e 2',3'-dideóxi-3'-flúor- $\beta$ -L-5-metilcitidina ( $\beta$ -L-FMethCTP) foram revelados como inibidores eficazes de polimerases de DNA de HBV.

WO 96/13512 para Genencor International, Inc. e Lipitek, Inc. revela que determinados nucleosídeos de L-ribofuranosila podem ser úteis para o tratamento de câncer e viroses. É especificamente revelado o uso desta classe de compostos para o tratamento do câncer e HIV.

As patentes US números 5.565.438, 5.567.688 e 5.587.362 (Chu, e outros) revelam o uso de 2'-flúor-5-metil- $\beta$ -L-arabinofuranoliluridina (L-FMAU) para o tratamento de hepatite B e vírus Epstein Barr.

A Yale University e a University of Georgia

Research Foundation, Inc. revelam o uso de L-FddC ( $\beta$ -L-5-flúor-2',3'-dideoxicitidina) para o tratamento do vírus da hepatite B no WO 92/18517.

Os nucleosídeos sintéticos  $\beta$ -L-2'-deoxicitidina  
5 ( $\beta$ -L-2'-dC),  $\beta$ -L-2'-deoxitimidina ( $\beta$ -L-dT) e  
 $\beta$ -L-2'-deoxiadenosina ( $\beta$ -L-2'-dA), são conhecidos na  
técnica. Antonin Holy revelou primeiro  $\beta$ -L-dC e  $\beta$ -L-dT em  
1972, "Nucleic Acid Components and Their Analogs. CLIII.  
*Preparation of 2'-deoxy-L-Ribonucleosides of the Pyrimidine*  
10 *Series,*" *Collect. Czech. Chem. Commun.* (1972), 37(12),  
4072-87. Morris S. Zedeck e outros revelou primeiro  $\beta$ -L-dA  
para a inibição da síntese de enzimas induzidas em  
*Pseudomonas testosteroni*, *Mol. Phys.* (1967), 3(4), 386-95.  
Determinados 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeos  
15 são conhecidos por ter antineoplástico e atividades  
antiviróticas selecionadas. Verri e outros revelam o uso de  
2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeos como agentes  
antineoplásticos e como agentes anti-herpéticos (*Mol.*  
*Pharmacol.* (1997), 51(1), 132-138 e *Biochem. J* (1997),  
20 328(1), 317-20). Saneyoshi e outros demonstram o uso de  
2'-deóxi-L-ribonucleosídeos como inibidores de  
transcriptase inversa (I) para o controle de retrovirose e  
para o tratamento de AIDS, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*  
JP06293645(1994).

25 Giovanni e outros testaram  
2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeos contra vírus  
parcialmente pseudorábicos (PRV), *Biochem. J* (1993), 294(2),  
381-5.

Usos quimioterapêuticos de 2'-deóxi- $\beta$   
30 -L-eritro-pentofuranonucleosídeos foram estudados por

Tyrsted e outros (*Biochim. Biophys. Acta* (1968), 155(2), 619-22) e Bloch, e outros (*J. Med Chem.* (1967), 10(5), 908-12).

$\beta$ -L-2'-deoxitimidina ( $\beta$ -L-dT) é conhecido na técnica por inibir quinase timidina (TK) do vírus da herpes simples tipo 1 (HSV-1). Iotti e outros, WO 92/08727, ensinam que  $\beta$ -L-dT inibe seletivamente a fosforilação de D-timidina por HSV-1 TK, porém não por TK. Spaldari e outros reportaram que L-timidina é fosforilada por quinase timidina do vírus da herpes simples do tipo 1 e inibe o desenvolvimento virótico, *J. Med Chem.* (1992), 35(22), 4214-20.

Em vista do fato de que o vírus da hepatite B alcançou níveis epidêmicos mundiais, e possui efeitos graves e freqüentemente trágicos no paciente infectado, permanece uma forte necessidade de prover novos agentes farmacêuticos eficazes para tratar seres humanos infectados com o vírus que tem baixa toxicidade ao hospedeiro.

Portanto, é um objetivo da presente invenção prover novos processos e composições para o tratamento de pacientes humanos e outros hospedeiros infectados com o vírus da hepatite B.

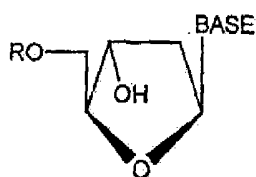
#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É revelado um processo para tratamento de infecção por hepatite B em humanos e outros animais hospedeiros que incluem administração de uma quantidade eficaz de um 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo (referido alternativamente aqui como  $\beta$ -L-d-nucleosídeo ou um  $\beta$ -L-2'-d-nucleosídeo) ou um sal farmacêuticamente aceitável ou pro-medicação do mesmo, administrado tanto sozinho quanto

em combinação, opcionalmente em um veículo farmacologicamente aceitável. O termo 2'-deóxi, conforme usado nesta descrição, se refere a um nucleosídeo que não possui substituto na posição 2'.

5 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo revelado ou pro-medicamentos farmacologicamente aceitável ou formulações farmacologicamente aceitáveis contendo estes compostos são úteis na prevenção e tratamento de infecções por hepatite B e outras condições correlatas, tais como, anticorpo anti-HBV positivo e condições HBV-positivo, inflamação crônica do fígado causada por HBV, cirrose, hepatite aguda, hepatite fulminante, hepatite persistente crônica e fadiga. Estes compostos ou formulações podem também ser usados profilaticamente para impedir ou retardar a progressão de doenças clínicas em indivíduos que são positivos para anticorpo anti-HBV ou antígeno-HBV ou que foram expostos ao HBV.

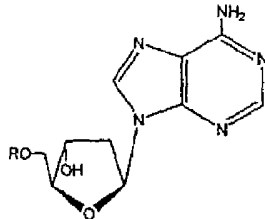
Em uma concretização da presente invenção, o derivado de 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo é um composto da fórmula:



25 onde R é selecionado do grupo consistindo de H, alquila de cadeia linear, ramificada ou cíclica, CO-alquila, CO-arila, CO-alcoxilalquila, CO-ariloxilalquila, arila substituída com CO, alquilssulfonila, arilssulfonila, aralquilssulfonila, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato ou um derivado de fosfato e BASE é uma base de purina ou

pirimidina que pode opcionalmente ser substituída.

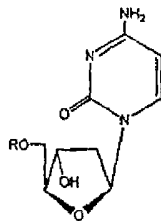
Em outra concretização, o derivado de 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo é  $\beta$ -L-2'-deoxiadenosina ou um sal farmacologicamente aceitável ou pro-medicação do mesmo, da fórmula:



10

onde R é H, mono, di ou trifosfato, acila ou alquila ou um derivado de fosfato estabilizado (para formar um promedicação de nucleotídeo estabilizado).

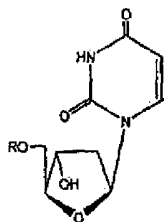
Em outra concretização o derivado de 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo é  $\beta$ -L-2'-deoxicitidina ou sal farmacologicamente aceitável ou ro-medicação do mesmo da fórmula:



20

onde R é H, mono, di ou trifosfato, acila ou alquila ou um derivado de fosfato estabilizado (para formar um pro-medicação de nucleotídeo estabilizado).

Em outra concretização, o derivado de 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo é  $\beta$ -L-2'-deoxiuridina ou sal farmacologicamente aceitável ou pro-medicação do mesmo da fórmula:



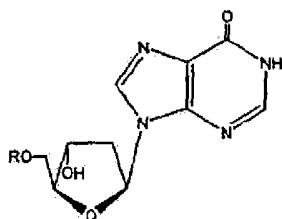
5 onde R é H, mono, di ou trifosfato, acila ou alquila ou um derivado de fosfato estabilizado (para formar um pro-medicamento de nucleotídeo estabilizado).

Em outra concretização, o derivado de 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo é  $\beta$ -L-2'-deoxiguanosina ou  
10 sal farmacêuticamente aceitável ou pro-medicamento do mesmo da fórmula:

onde R é H, mono, di ou trifosfato, acila ou alquila ou um derivado de fosfato estabilizado (para formar um pro-medicamento de nucleotídeo estabilizado).

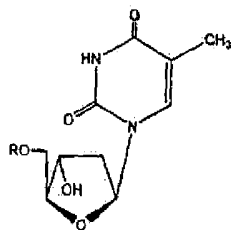
15 Em outra concretização, o derivado de 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo é  $\beta$ -L-2'-deoxinosina ou sal farmacêuticamente aceitável ou pro-medicamento do mesmo da fórmula:

20



onde R é H, mono, di ou trifosfato, acila ou alquila ou um  
25 derivado de fosfato estabilizado (para formar um pro-medicamento de nucleotídeo estabilizado).

Em outra concretização, o derivado de 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo é  $\beta$ -L-timidina ou sal farmacêuticamente aceitável ou pro-medicamento do mesmo da  
30 fórmula:



5

onde R é H, mono, di ou trifosfato, acila ou alquila ou um derivado de fosfato estabilizado (para formar um pro-medicamento de nucleotídeo estabilizado).

Em outra concretização, o derivado de 2'-deóxi-β-L-eritro-pentofuranonucleosídeo é administrado  
 10 eritro-pentofuranonucleosídeo é administrado alternativamente ou em combinação com um ou mais de 2'-deóxi-β-L-eritro-pentofuranonucleosídeo ou um ou mais outros compostos que exibem atividade contra vírus da hepatite B. Em geral, durante a terapia de alternância, uma  
 15 dosagem eficaz de cada agente é administrada em série, considerando que na terapia de combinação, uma dosagem eficaz de dois ou mais agentes que são administrados em conjunto. As dosagens dependerão das taxas de absorção, inativação e excreção do medicamento, bem como de outros  
 20 fatores conhecidos dos versados na técnica. Deve ser observado que os valores de dosagem também variarão com a gravidade da condição a ser aliviada. Deve ser entendido que para qualquer indivíduo específico, os regimens de dosagem específicos e programações serão ajustados com o  
 25 tempo, de acordo com a necessidade individual e do julgamento profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições.

Em outra administração, a invenção inclui um processo para tratamento de seres humanos infectados por  
 30 HBV que inclui administração de uma quantidade de

tratamento de HBV de um pro-medicamento dos derivados de 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo revelados. Um pro-medicamento, conforme usado aqui, se refere a um composto que é convertido em nucleosídeo por administração in vivo. Exemplos não limitantes incluem sal farmacologicamente aceitável (alternativamente referido como "sais fisiologicamente aceitáveis"), os derivados acilados ou alquilados de 5' e N<sup>4</sup> (citidina) ou N<sup>6</sup> (adenosina) do composto ativo ou os 5'-fosfolipídeo ou 5'-éter lipídeos do composto ativo.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 ilustra o processo geral para obtenção de  $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeos ( $\beta$ -L-dN) usando L-ribose ou L-xilose como material de partida.

A figura 2 é um gráfico que ilustra o metabolismo de L-dA, L-dC e L-dT nas células Hep G2 humanas em termos de acúmulo e queda. As células foram incubadas com 10  $\mu$ M de composto.

A figura 3 é um gráfico que ilustra o efeito antivirótico de  $\beta$ -L-dA,  $\beta$ -L-dT e  $\beta$ -L-dC no modelo de hepatite crônica de marmota.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Conforme usado aqui, o termo "substancialmente na forma de um isômero simples" ou "em uma forma isolada" se refere a um 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo, isto é, pelo menos aproximadamente 95% na configuração estéreo designada. Em uma concretização preferida, o composto ativo é administrado pelo menos neste nível de pureza ao hospedeiro que necessite da terapia.

Conforme usado aqui, o termo hepatite B e condições

correlatas se referem à hepatite B e condições correlatas, tais como, condições anticorpo anti-HBV positivo e HBV-positivo, inflamação crônica do fígado causada por HBV, cirrose, hepatite aguda, hepatite fulminante, hepatite  
5 crônica persistente e fadiga. O processo da presente invenção inclui o uso de derivados 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritropentofuranonucleosídeo profilaticamente para prevenir ou retardar a progressão de doenças clínicas em indivíduos que são anticorpo anti-HBV positivo ou HBV-antígeno positivo ou  
10 que foram expostos ao HBV.

Conforme usado aqui, o termo alquila, a menos que de outra forma especificado, se refere a um hidrocarbono de cadeia linear saturada, ramificada, cíclica, primário, secundário ou terciário, tipicamente de  $C_1$  a  $C_{18}$ ,  
15 preferivelmente  $C_1$  a  $C_6$  e especificamente inclui, porém não está limitado a metila, etila, propila, butila, pentila, hexila, isopropila, isobutila, sec-butila, t-butila, isopentila, amila, t-pentila, ciclopentila e ciclohexila.

Conforme usado aqui, o termo acila se refere a uma  
20 porção da fórmula  $-C(O)R'$ , onde  $R'$  é alquila; arila, alcarila, aralquila, heteroaromático, alcoxialquila incluindo metoximetila; arilalquila incluindo benzilo; ariloxialquila, tal como, fenoximetila; arila incluindo fenila opcionalmente substituída por halogênio, alquila  $C_1$   
25 a  $C_4$ , ou alcóxi  $C_1$  a  $C_4$ , ou o resíduo de um aminoácido. O termo acila especificamente inclui, porém não está limitado a acetila, propionila, butirila, pentanoila, 3-metilbutirila, succinato de hidrogênio, 3-clorobenzoato, benzoila, acetila, pivaloila, mesilato, proionila,  
30 valerila, caprótico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico,

palmítico, esteárico e oleico.

Conforme usado aqui, o termo purina e base pirimidina inclui, porém não está limitado a 6-alquilpurina e N<sup>6</sup>-alquilpurinas, N<sup>6</sup>-acilpurinas, N<sup>6</sup>-benzilpurina, 6-  
 5 halopurina, N<sup>6</sup>-vinilpurina, purina N<sup>6</sup>-acetilênica, purina N<sup>6</sup>-acila, purina N<sup>6</sup>-hidroxialquila, purina N<sup>6</sup>-tioalquila, N<sup>2</sup>-alquilpurinas, N<sup>4</sup>-alquilpirimidinas, N<sup>4</sup>-acilpirimidinas, 4-benzilpirimidina, N<sup>4</sup>-halopirimidinas, pirimidinas N<sup>4</sup>-  
 10 acetilênicas, 4-acil e pirimidinas N<sup>4</sup>-acila, pirimidinas 4-hidroxialquila, pirimidinas 4-tioalquila, timina, citosina, 6-azapirimidina incluindo 6-azacitosina, 2- e/ou 4-  
 mercaptopirimidina, uracila, alquilpirimidina-C<sup>5</sup>, benzilpirimidinas, halopirimidinas-C<sup>5</sup>, vinilpirimidina C<sup>5</sup>-  
 pirimidina acetilênica-C<sup>5</sup>, pirimidina acila-C<sup>5</sup>, purina  
 15 hidroxialquila-C<sup>5</sup>, amidopirimidina-C<sup>5</sup>, cianopirimidina-C<sup>5</sup>, nitropirimidina-C<sup>5</sup>, aminopirimidina-C<sup>5</sup>, alquilpurinas-N<sup>2</sup>, alquil-N<sup>2</sup>-6-tiopurinas, 5-azacitidinila, 5-azauracilila, triazolopiridinila, imidazolopiridinila, pirrolopirimidinila e pirazolopirimidinila. Grupos de  
 20 oxigênio e nitrogênio funcionais na base podem ser protegidos conforme necessário ou desejado. Grupos de proteção apropriados são bem conhecidos dos versados na técnica e incluem trimetilsilila, dimetilhexilsilila, t-butildimetilsilila e t-butildifenilsilila, tritila, grupos  
 25 alquila, grupos acila, tais como, acetila e propionila, metanossulfonila e p-toluenossulfonila.

O termo nucleotídeo biologicamente ativo, conforme usado aqui, se refere a um nucleotídeo que exibe uma EC<sub>50</sub> de 15 micromolar ou menos quando testado em 2.2.15 células  
 30 transfectadas com o vírus da hepatite.

Bases preferidas incluem citosina, 5-fluorcitosina, 5-bromocitosina, 5-iodocitosina, uracila, 5-fluoruracila, 5-bromouracila, 5-iodouracila, 5-metiluracila, timina, adenina, guanina, inosina, xantina, 2,6-diaminopurina, 5 6-aminopurina, 6-cloropurina e 2,6-dicloropurina, 6-bromopurina, 2,6-dibromopurina, 6-iodopurina, 2,6-di-iodopurina, 5-bromovinilcitosina, 5-bromoviniluracila, 5-bromoetenilcitosina, 5-bromoeteniluracila, 5-trifluorometilcitosina, 10 5-trifluorometiluracila.

O 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo pode ser provido como um 5' fosfolipídeo ou um 5'-éter lipídeo, conforme revelado nas seguintes referências: Kucera, L.S., N. Lyer, E. Leake, A. Raben, Modest E.J., D.L.W. e C. 15 Piantadosi. 1990. Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation. AIDS Res Hum Retroviruses. 6:491-501; Piantadosi, C., J. Marasco C.J., S.L. morris-Natschke, K.L. Meyer, F. Gumus, J.R. Surles, K.S. 20 Ishaq, L.S. Kucera, N. Lyer, C.A. Wallen, S. Piantadosi e E.J. Modest. 1991-Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV activity. J. Med. Chem. 34:1408-1414; Hostetler, K.Y., D.D. Richman, D.A. Carson, L.M. Stuhmiller, G.M. T. van Wijk e H. van den 25 Bosch. 1992. Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type I replication in CEM and HT4-6C cells by 31-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 31-deoxythymidine. Antimicrob Agents Chemother. 36:2025-2029; Hostetler, K.Y., L.M. Stuhmiller, 30 H.B. Lenting, H. van den Bosch e D.D. Richman. 1990,

Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides. J. Biol. Chem. **265**:6112-7.

O 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo pode ser convertido em um éster farmacologicamente aceitável por reação com um agente de esterificação apropriado, por exemplo, um haleto ou anidrido de ácido. O nucleosídeo ou seu pro-medicação farmacologicamente aceitável pode ser convertido em um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em uma maneira convencional, por exemplo, por tratamento com uma base ou ácido apropriado. O éster ou sal pode ser convertido em um nucleosídeo de origem, por exemplo, por hidrólise.

Conforme usado aqui, o termo sais farmacologicamente aceitáveis ou complexos se referem aos sais ou complexos de 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo que retém a atividade biológica desejada do composto de origem e exibem mínimos, se algum, efeitos toxicológicos. Exemplos não limitantes de tais sais são (a) sais de adição de ácido formados com ácidos inorgânicos (por exemplo, ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico e semelhantes) e sais formados com ácidos orgânicos, tais como, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido ascórbico, ácido benzóico, ácido tânico, ácido palmóico, ácido algínico, ácido poliglutâmico, ácidos naftalenossulfônicos, ácidos naftalenodissulfônicos e ácido poligalacturônico; (b) sais de adição de base formados com cátions, tais como, sódio, potássio, zinco, cálcio, bismuto, bário, magnésio, alumínio, cobre, cobalto, níquel,

cádmio, sódio, potássio e semelhantes ou com um cátion orgânico formado de N,N-dibenziletileno-diamina, amônio ou etilenodiamina; ou (c) combinações de (a) e 9b); por exemplo, um sal de tanato de zinco ou semelhante.

5 O termo pro-medimento, conforme usado aqui, se refere a um composto que é convertido no nucleosídeo quando da administração in vivo. Exemplos não limitantes são sais farmacologicamente aceitáveis (alternativamente referidos como "sais fisiologicamente aceitáveis"), os derivados  
10 acilados ou alquilados 5' e N<sup>4</sup> ou N<sup>6</sup> do composto ativo e os derivados de 5'-éter lipídeo do composto ativo.

Modificações dos compostos ativos, especificamente nas posições N<sup>4</sup>, N<sup>6</sup> e 5'-O podem afetar a biodisponibilidade e razão do metabolismo das espécies  
15 ativas, provendo assim controle com relação a liberação das espécies ativas.

Uma concretização preferida da presente invenção é um processo para o tratamento de infecções por HBV em humanos ou outros animais hospedeiros, que inclui  
20 administração de uma quantidade eficaz de um ou mais de um derivado de 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo selecionado do grupo consistindo de  $\beta$ -L-2'-deoxiadenosina,  $\beta$ -L-2'-deoxicitidina,  $\beta$ -L-2'-deoxiuridina,  $\beta$ -L-2'-guanosina,  $\beta$ -L-2'-deoxiinosina e  $\beta$ -L-2'-deoxitimidina  
25 ou um pro-medimento fisiologicamente aceitável do mesmo, incluindo um fosfato, derivado 5' ou N<sup>6</sup> alquilado ou acilado ou um sal fisiologicamente aceitável do mesmo, opcionalmente em um veículo farmacologicamente aceitável. Os compostos desta invenção tanto possuem atividade anti-HBV  
30 quanto são metabolizados em um composto ou compostos que

exibem atividade anti-HBV. Em uma concretização preferida, o 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo é administrado substancialmente na forma de um isômero simples, isto é, pelo menos aproximadamente 95% na configuração estereo designada.

#### Pro-medicamentos de Nucleotídeo

Quaisquer dos nucleosídeos descritos aqui pode ser administrado como um pro-medicamento de nucleotídeo estabilizado para aumentar a atividade, biodisponibilidade, estabilidade ou de outra forma alterar as propriedades do nucleosídeo. Vários ligandos de pro-medicamento de nucleotídeo são conhecidos. Em geral, a alquilação, acilação ou outra modificação lipofílica do mono, di ou trifosfato de nucleosídeo aumentará a estabilidade do nucleosídeo. Exemplos de grupos de substituição que podem substituir um ou mais hidrogênios na porção fosfato são alquila, arila, esteróides, carboidratos incluindo açúcares, 1,2-diacilglicerol e álcoois. Muitos são descritos em R. Jones e N. Bischofberger, *Antiviral Research*, **27** (1995) 1-17. Quaisquer um destes pode se usado em combinação com os nucleosídeos revelados para obter um efeito desejado.

Em uma concretização, o 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo é provido como pro-medicamento 5'-hidroxil lipofílico. Exemplos não limitantes das patentes US que revelam substitutos lipofílicos apropriados que podem ser covalentemente incorporados ao nucleosídeo, preferivelmente na posição 5'-OH do nucleosídeo ou preparações lipofílicas, incluem as Patentes US números 5.149.794 (22 de setembro de 1992, Yatvin e outros);

5.194.654 (16 de março de 1993, Hostetler e outros,  
5.223.263 (29 de junho de 1993, Hostetler e outros);  
5.256.641 (26 de outubro de 1993, Yatvin e outros);  
5.411.947 (2 de maio de 1995, Hostetler e outros);  
5 5.463.092 (31 de outubro de 1995, Hostetler e outros);  
5.543.389 (6 de agosto de 1996, Yatvin e outros); 5.543.390  
(6 de agosto de 1996, Yatvin e outros); 5.543.391 (6 de  
agosto de 1996, Yatvin e outros); e 5.554.728 (10 de  
setembro de 1996; Basava e outros).

10 Pedidos de patente estrangeiros que revelam  
substitutos lipofílicos que podem ser anexados ao derivado  
de 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo da presente  
invenção ou preparações lipofílicas incluem WO 89/02733, WO  
90/00555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO  
15 94/26273, WO 96/15132, EP 0 350 287, EP 93917054.4 e WO  
91/19721.

Exemplos não limitantes adicionais de 2'-deóxi- $\beta$ -L-  
eritro-pentofuranonucleosídeos são aqueles que contêm  
substitutos conforme descrito nas publicações que se  
20 seguem. Estes 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeos  
derivatizados podem ser usados para as indicações descritas  
no texto ou, de outra forma, como agentes antiviróticos,  
incluindo como agentes anti-*HBV*. Ho, D.H.W. (1973)  
*Distribution of kinase and deaminase of 1*  
25  *$\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and mouse.*  
*Cancer Res.* 33, 2816-2820; Holy, A. (1993) *Isopolar*  
*phosphorous-modified nucleotide analogues.* In: De Clercq  
(Ed.), *Advances in Antiviral Drug Design*, Vol. 1, JAI  
Press, pp. 179-231; Hong, C.I., Nechaev, A. e West, C.R.  
30 (1979a) *Synthesis and antitumor activity of 1*

*β*-D-arabinofuranosylcytosine conjugates of cortisol and cortisone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **88**, 1223-1229; Hong, C.I., Nechaev, A., Kirisits, A.J. Buchheit, D.J. e West, C.R. (1980) Nucleoside conjugates as potential antitumor agents. 3. Synthesis and antitumor activity of 1-(*β*-D-arabinofuranosyl)cytosine conjugates of corticosteroids and selected lipophilic alcohols. *J Med. Chem.* **28**, 171-177; Hostetler, K.Y., Stuhmiller, L.M., Lenting, H.B.M. van den Bosch, H. e Richman, D.D. (1990) Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides. *J. Biol. Chem.* **265**, 6112-6117; Hostetler, K.Y., Carson, D.A. e Richman, D.D. (1991); Phosphatidylazidothymidine: mechanism of antiretroviral action in CEM cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 11714-11717; Hostetler, K.Y., Korba, B. Sridhar, C., Gardener, M. (1994a) Antiviral activity of phosphatidyl-dideoxycytidine in hepatitis B-infected cells and enhanced hepatic uptake in mice. *Antiviral Res.* **24**, 59-67; Hostetler, K.Y., Richman, D.D., Sridhar, C.N. Felgner, P.L, Felgner, J., Ricci, J., Gardener, M.F. Selleseeth, D.W. e Ellis, M.N. (1994b) Phosphatidylazidothymidine and phosphatidyl-ddC: Assessment of uptake in mouse lymphoid tissues and antiviral activities in human immunodeficiency virus-infected cells and in rauscher leukemia virus-infected mice. *Antimicrobial Agents Chemother.* **38**, 2792-2797; Hunston, R.N., Jones, A.A. McGuigan, C., Walker, R.T., Balzarini, J. e De Clercq, E. (1984) Synthesis and biological properties of some cyclic phosphotriesters derived from 2'-deoxy-5-fluorouridine. *J. Med. Chem.* **27**, 440-444; Ji, Y.H., Moog, C., Schmitt, G.,

- Bischoff, P. e Luu, B. (1990); *Monophosphoric acid diesters of 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and of pyrimidine nucleosides as potential antitumor agents: synthesis and preliminary evaluation of antitumor activity.* *J. Med. Chem.* **33**, 2264-2270; Jones, A.S., McGuigan, C., Walker, R.T., Balzarini, J. e DeClercq, E. (1984) *Synthesis, properties, and biological activity of some nucleoside cyclic phosphoramidates.* *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1471-1474; Juodka, B.A. e Smart, J. (1974) *Synthesis of ditribonucleoside a(P $\rightarrow$ N) amino acid derivatives.* *Coll. Czech. Chem. Comm.* **39**, 363-968; Kataoka, S., Imai, J., Yamaji, N., Kato, M., Saito, M., Kawada, T. e Imai, S. (1989) *Alkylated cAMP derivatives; selective synthesis and biological activities.* *Nucleic Acids Res. Sym. Ser.*, **21**, 1-2; Kataoka, S., Uchida, R. e Yamaji, N. (1991) *A convenient synthesis of adenosine 3',5' cyclic phosphate (cAMP) benzyl and methyl triesters.* *Heterocycles* **32**, 1351-1356; Kinchington, D., Harvey, J.J., O'Connor, T.J., Jones, B.C.N.M., Devine, K.G., Taylor-Robinson, D., Jeffries, D.J. e McGuigan, C. (1992) *Comparison of antiviral effects of zidovudine phosphoramidate and phosphorodiamidate derivatives against HIV and MuLV in vitro.* *Antiviral Chem. Chemoth.* **3**, 107-112; Kodama, K., Morozumi, M., Saitoh, K.I., Kuninaka, H., Yoshino, H. e Saneyoshi, M. (1989) *Antitumor activity and pharmacology of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine-5'-stearylphosphate; an orally active derivative of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine.* *Jpn. J. Cancer Res.* **80**, 679-685; Korty, M. e Engels, J. (1979) *The effects of adenosine- and guanosine 3',5'-phosphoric and acid benzyl esters on guinea-pig*

ventricular myocardium. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 310, 103-111; Kumar, A., Goe, P.L., Jones, A.S. Walker, R.T. Balzarini, J. e De Clercq, E. (1990) *Synthesis and biological evaluation of some cyclic phosphoramidate nucleoside derivatives*. *J. Med Chem.* 33, 2368-2375; LeBec, C. e Huynh-Dinh, T. (1991) *Synthesis of lipophilic phosphate triester derivatives of 5-fluorouridine and arabinocytidine as anticancer prodrugs*. *Tetrahedron Lett.* 32, 6553-6556; Lichtenstein, J., Bamer, H.D. e Cohen, S.S. (1960) *The metabolism of exogenously supplied nucleotides by Escherichia coli.*, *J. Biol. Chem.* 235, 457-465; Luchty, J., Von Daeniken, A., Friederich, J. Manthey, B., Zweifel, J., Schlatter, C. e Benn, M.H. (1981) *Synthesis and toxicological properties of three naturally occurring cyanoepithioalkanes*. *Mitt. Geg. Lebensmittelunters. Hyg.* 72, 131-133 (Chem. Abstr. 95, 127093); McGuigan, C. Tollerfield, S.M. e Riley, P.A. (1989) *Synthesis and biological evaluation of some phosphate triester derivatives of the anti-viral drug Ara*. *Nucleic Acids Res.* 17, 6065-6075; McGuigan, C., Devine, K.G., O'Connor, T.J., Galpin, S.A., Jeffries, D.J. e Kinchington, D. (1990a) *Synthesis and evaluation of some novel phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) as anti-HIV compounds*. *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 107-113; McGuigan, C., O'Connor, T.J., Nicholls, S.R. Nickson, C. e Kinchington, D. (1990b) *Synthesis and anti-HIV activity of some novel substituted dialkyl phosphate derivatives of AZT and ddCyd*. *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 355-360; McGuigan, C., Nicholls, S.R., O'Connor, T.J., and Kinchington, D. (1990c) *Synthesis of some novel dialkyl phosphate*

derivative of 3'-modified nucleosides as potential anti-AIDS drugs. *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 25-33; McGuigan, C., Devine, K.G., O'Connor, T.J. e Kinchington, D. (1991) *Synthesis and anti-HIV activity of some haloalkyl phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT); potent activity of the trichloroethyl methoxyalaninyl compound.* *Antiviral Res.* 15, 255-263; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Mahmood, N., Devine, K.G. e Hay, A.J. (1992) *Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV-1 in cell lines which are resistant to the action of AZT.* *Antiviral Res.* 17, 311-321; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Choi, S.M., Kinchington, D. and O'Connor, T.J. (1993a) *Phosphoramidate derivatives of AZT as inhibitors of HIV; studies on the carboxyl terminus.* *Antiviral Chem. Chemother.* 4, 97-101; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Balzarini, J. and De Clercq, E. (1993 b) *Intracellular delivery, of bioactive AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT.* *J Med. Chem.* 36, 1048-1052.

20           The question of chair-twist equilibria for the phosphate rings of nucleoside cyclic 3',5'-monophosphates. <sup>1</sup>HNMR and x-ray crystallographic study of the diastereomers of thymidine phenyl cyclic 3',5'-monophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 4058-4064; Nerbonne, J.M., Richard, S., Nargeot, J. e Lester, H.A. (1984) *New photoactivatable cyclic nucleotides produce intracellular jumps in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations.* *Nature* 301, 74-76; Neumann, J.M., Hervé, M., Debouzy, J.C., Guerra, F.I., Gouyette, C., Dupraz, B. e Huynh-Dinh, T. (1989) *Synthesis and transmembrane transport studies by NMR of a glucosyl*

30

- phospholipid of thymidine. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 4270-4277; Ohno, R., Tatsumi, N., Hirano, M., Imai, K. Mizoguchi, H., Nakamura, T., Kosaka, M., Takatuski, K., Yamaya, T., Toyama, K., Yoshida, T., Masaoka, T.,
- 5 Hashimoto, S., Ohshima, T., Kimura, L, Yamada, K. e Kimura, J. (1991) Treatment of myelodysplastic syndromes with orally administered 1- $\beta$ -D-rabinofuranosylcytosine -5'-stearylphosphate. *Oncology* 48, 451-455.
- Palomino, E., Kessle, D. e Horwitz, J.P. (1989) A
- 10 dihydropyridine carrier system for sustained delivery of 2',3'-dideoxynucleosides to the brain. *J. Med Chem.* 32, 622-625; Perkins, R.M., Barney, S., Wittrock, R., Clark, P.H., Levin, R. Lambert, D.M., Petteway, S.R-, Serafinowska, H.T., Bailey, S.M., Jackson, S., Harnden,
- 15 M.R. Ashton, R., Sutton, D., Harvey, J.J. e Brown, A.G. (1993) Activity of BRL47923 and its oral prodrug, SB203657A against a rauscher murine leukemia virus infection in mice. *Antiviral Res.* 20 (Suppl. 1). 84; Piantadosi, C., Marasco, C.J., Jr., Morris-Natschke, S.L., Meyer, K.L., Gumus, F.,
- 20 Surles, J.R., Ishaq, K.S., Kucera, L.S. Iyer, N., Wallen, C.A., Piantadosi, S. e Modest, E.J. (1991) Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV-1 activity. *J. Med Chem.* 34,1408-1414; Pompon, A., Lefebvre, I., Imbach, J.L., Kahn, S. e Farquhar, D. (1994)
- 25 Decomposition pathways of the mono- and bis(pivaloyloxymethyl) esters of azidothyrnidine-5'-monophosphate in cell extract and in tissue culture medium; an application of the 'on-line ISRP-cleaning' HPLC technique. *Antiviral Chem. Chemother.*
- 30 5, 91-98; Postemark, T. (1974) Cyclic AMP and cyclic GMP.

Annu. Rev. Pharmacol. 14, 23-33; Prisbe, E.J., Martin, J.C.M., McGee, D.P.C., Barker, M.F., Smee, D.F. Duke, A.E., Matthews, T.R. e Verheyden, J.P.J. (1986) Synthesis and antiherpes virus activity of phosphate and phosphonate derivatives of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl] guanine. J. Med. Chem. 29, 671-675; Puech, F., Gosselin, G., Lefebvre, I., Pompon, A., Aubertin, A.M. Dim, A. e Imbach, J.L. (1993) Intracellular delivery of nucleoside monophosphate through a reductase-mediated activation process. Antiviral Res. 22, 155-174; Pugaeva, V.P., Klochkeva, S.I., Mashbits, F.D. and Eizengart, R.S. (1969). Robins, R.K. (1984) The potential of nucleotide analogs as inhibitors of retroviruses and tumors. Pharm. Res. 11 - 18; Rosowsky, A., Kim. S.H., Ross e J. Wick, M.M. (1982) Lipophilic 5'-(alkylphosphate) esters of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine and its N<sup>4</sup>-acyl and 2.2'-anhydro-3'-O-acyl derivatives as potential prodrugs. J. Med. Chem. 25, 171-178; Ross, W. (1961) Increased sensitivity of the walker turnout towards aromatic nitrogen mustards carrying basic side chains following glucose pretreatment. Biochem. Pharm. 8, 235-240; Ryu, E.K., Ross, R.J. Matsushita, T., MacCoss, M., Hong, C.I. e West, C.R. (1982). Phospholipid-nucleoside conjugates. 3. Synthesis and preliminary biological evaluation of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine 5'diphosphate[-], 2-diacylglycerols. J. Med Chem. 25, 1322-1329; Saffhill, R. e Hume, W.J. (1986) The degradation of 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine by serum from different sources and its consequences for the use of these compounds for incorporation into DNA. Chem. Biol. Interact. 57, 347-355;

Saneyoshi, M., Morozumi, M., Kodama, K., Machida, J.,  
Kuninaka, A. and Yoshino, H. (1980) *Synthetic nucleosides  
and nucleotides. XVI. Synthesis and biological evaluations  
of a series of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine 5'-alkyl or*  
5 *arylphosphates. Chem. Pharm. Bull. 28, 2915-2923; Sastry,*  
*J.K., Nehete, P.N., Khan, S., Nowak, B.J., Plunkett, W.,*  
*Arlinghaus, R.B. e Farquhar, D. (1992) Membrane-permeable*  
*dideoxyuridine 5'-monophosphate analogue inhibits human*  
*immunodeficiency virus infection. Mol. Pharmacol. 41,*  
10 *441-445; Shaw, J.P., Jones, R.J. Arimilli, M.N., Louie,*  
*M.S., Lee, W.A. e Cundy, K.C. (1994) Oral bioavailability*  
*of PMEA from PMEA prodrugs in male Sprague-Dawley rats. 9th*  
*Annual AAPS Meeting. San Diego, CA (Abstract). Shuto, S.,*  
*Ueda, S., Imamura, S., Fukukawa, K. Matsuda, A. e Ueda, T.*  
15 *(1987) A facile one-step synthesis of*  
*5'-phosphatidyl nucleosides by an enzymatic two-phase*  
*reaction. Tetrahedron Lett. 28, 199-202; Shuto, S., Itoh,*  
*H., Ueda, S., Imamura, S., Kukukawa, K., Tsujino, M.,*  
*Matsuda, A. e Ueda, T. (1988) A facile enzymatic synthesis*  
20 *of 5'-(3-sn-phosphatidyl)nucleosides and their antileukemic*  
*activities. Chem. Pharm. Bull 36, 209-217. One preferred*  
*phosphate prodrug group is the S-acyl-2-thioethyl group,*  
*also referred to as "SATE."*

#### **Terapia de Combinação ou Alternação**

25 Foi reconhecido que as variantes resistentes ao  
medicamento de HBV podem emergir após tratamento prolongado  
com um agente antivirótico. A resistência ao medicamento  
tipicamente ocorre por mutação de um gene que codifica uma  
enzima usada no ciclo de vida virótico e, mais tipicamente,  
30 no caso de HBV, DNA e polimerase. Recentemente, foi

demonstrado que a eficácia de um medicamento contra infecção por HBV pode ser prolongada, aumentada ou restaurada por administração do composto em combinação ou alternadamente com um segundo e talvez terceiro, composto  
5 antivirótico que induz uma mutação diferente daquela causada pelo medicamento de princípio. Alternativamente, a farmacocinética, biodistribuição ou outro parâmetro do medicamento pode ser alterado por tal terapia de combinação ou alternância. Em geral, a terapia de combinação é  
10 tipicamente preferida ao invés da terapia de alteração, porque ela induz à tensões múltiplas simultâneas sobre o vírus.

A atividade do antivírus da hepatite B de  $\beta$ -L-2'-dA,  $\beta$ -L-2'-dC,  $\beta$ -L-2'-dU,  $\beta$ -L-2'-dG,  $\beta$ -L-2'-dT,  
15  $\beta$ -L-dI, ou outros  $\beta$ -L-2'-nucleosídeos provida aqui, ou pro-medicamentos, fosfatos ou sais destes compostos, pode ser melhorada por administração de dois ou mais destes nucleosídeos em combinação ou alternadamente. Alternativamente, por exemplo, um ou mais de  $\beta$ -L-2'-dA,  
20  $\beta$ -L-2'-dC,  $\beta$ -L-2'-dU,  $\beta$ -L-2'-dG,  $\beta$ -L-2'-dT,  $\beta$ -L-dI, ou outros  $\beta$ -L-2'-nucleosídeos providos aqui podem ser administrados em combinação ou alternadamente com 3TC, FTC, L-FMAU, DAPD, famciclovir, penciclovir, BMS-200475, bis pom PMEA (adefovir, dipivoxil); lobucavir, fanciclovir ou  
25 ribavarina.

Em qualquer uma das concretizações descritas aqui, se o  $\beta$ -L-2'-nucleosídeo da presente invenção for administrado em combinação ou alternativamente com um segundo nucleosídeo ou inibidor de transcriptase inversa de  
30 não nucleosídeo que é fosforilado para uma forma ativa, é

preferido que um segundo composto seja fosforilado por uma enzima que é diferente daquela que fosforila o  $\beta$ -L-2'-nucleosídeo selecionado da presente invenção *in vivo*. Exemplos de enzimas quinase timidina, quinase citosina, 5 quinase guanosina, quinase adenosina, quinase deoxiciditina, 5'-nucleotidase e quinase deoxiguanosina.

#### Preparação dos Compostos Ativos

Os derivados de 2'-deóxi- $\beta$ -L-eritropentofuranonucleosídeo da presente invenção são mostrados 10 na técnica e podem ser preparados de acordo com o processo revelado por Holy, *Collect. Czech. Chem. Commun.* (1972), 37(12), 4072-87 e *Mol. Phys.* (1967), 3(4), 386-95.

Um processo geral para obtenção de  $\beta$ -L-eritropentafuranonucleosídeos ( $\beta$ -L-dN) é mostrado na figura 1, 15 usando L-ribose ou L-xilose como um material de partida.

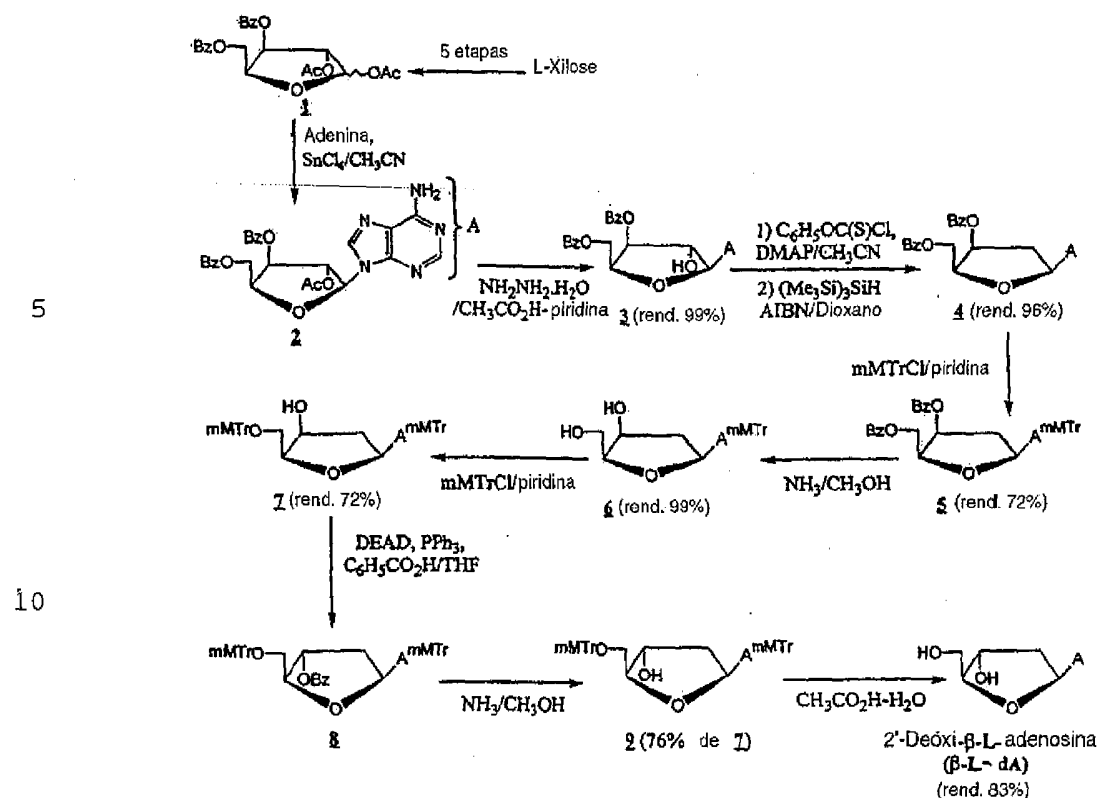
Derivados de mono, di e trifosfato dos nucleosídeos ativos podem ser preparados conforme descrito de acordo com os processos publicados. O monofosfato pode ser preparado de acordo com o procedimento de Imai e outros, *J. Org. Chem.* 20 34(6), 1547-1150 (junho 1969). O difosfato pode ser preparado de acordo com o procedimento de Davisson e outros, *J. Org. Chem.*, 52(9), 1794-1801 (1987). O trifosfato pode ser preparado de acordo com o procedimento de Hoard e outros, *J. Am. Chem. Soc.*, 87(8), 1785-1788 25 (1965).

#### Protocolos Experimentais

Pontos de fusão foram determinados nos tubos capilares abertos em um aparelho Gallenkamp MFB-595-010 M e não são corrigidos. Os espectros de absorção de UV foram 30 registrados em um espectrofotômetro Uvikon 931 (KONTRON) em

etanol. Os espectros de  $^1\text{H-NMR}$  foram operados em temperatura ambiente em  $\text{DMSO-d}_6$  com um Bruker AC 250 ou 400 espectrômetro. Giros químicos são dados em ppm,  $\text{DMSO-d}_6$  sendo ajustado para 2,49 ppm como referência. A troca de deutério, experimentos de desacoplamento ou 2D-COSY foram realizados a fim de confirmar as avaliações de próton. Multiplicidades de sinal são representadas por um s (simples), d (duplo), dd (duplo de duplo), t (triplo), q (quádruplo), br (amplo), m (múltiplo). Todos os valores  $J$  são em Hz. Os espectros de massa FAB foram registrados em modo de íon positivo-(FAB>0) ou negativo-(FAB<0) em um espectrômetro de massa JEOL DX300. A mistura era de álcool 3-nitrobenzilo (NBA) ou uma mistura de (50:50, v/v) de glicerol e tioglicerol (GT). Rotação específicas foram medidas em um espectropolarímetro Perkin-Elmer 241 (comprimento de passagem 1 cm) e são dados em unidades de  $10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ g}^{-1}$ . Análises elementares foram realizadas por "Service de Microanalyses du CNRS, Division de Vernaison" (França). As análises indicadas pelos símbolos dos elementos ou funções estavam dentro de  $\pm 0,4\%$  dos valores teóricos. Cromatografia de camada fina foi realizada nas folhas de alumínio pré-revestidas de Sílica Gel 60  $\text{F}_{254}$  (Merck, Art. 5554), visualização dos produtos foi realizada por absorvência de UV seguido por queima com ácido sulfúrico etanólico a 10% e aquecimento. Cromatografia de coluna foi realizada sobre Sílica Gel 60 (Merck, Art. 9385) em pressão atmosférica.

**Exemplo 1 - Síntese Estéreo-específica de 2'-Deóxi- $\beta$ -L-Adenosina**



### 9-(3,5-Di-O-benzoyl- $\beta$ -L-xilofuranosil)adenina (3)

Uma solução de 9-(2-O-acetil-3,5-di-O-benzoyl- $\beta$ -L-xilofuranosil)adenina **2** [Ref.: Gosselin, G.; Bergogne, M.-C.; Imbach, J.-L., "Synthesis and antiviral Evaluation of  $\beta$ -L Xylofuranosyl Nucleosides of the Five Naturally Occuring Nucleic Acid Bases", *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1993, 30 (Oct.-Nov.), 1229-1233] (8,30 g, 16,05 mmol) e hidrato de hidrazina 98% (234 mL, 48,5 mmol) em uma mistura de piridina / ácido acético glacial (4/1, v/v, 170 mL) foi agitada a temperatura ambiente por 22 horas. A reação foi saturada por adição de acetona (40 mL) e agitação continuou por uma hora a mais. A mistura de reação foi reduzida a metade de seu volume, diluída com água (250 mL) e extraída com clorofórmio (2 x 150 mL). A camada orgânica foi lavada sucessivamente com uma solução saturada aquosa de  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 100 mL) e água (3 x 100 mL), seca,

filtrada, concentrada e co-evaporada com tolueno e metanol..  
 O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna sobre  
 sílica gel (0-3% MeOH em diclorometano) para obter **3** (5,2  
 g, 68%) precipitado de éter diisopropílico:  $^1\text{H}$  NMR  
 5 (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  4,5-4,9 (m, 4H, H-2', H-4', H-5' e H-5''), 5,64  
 (t, 1H, H-3',  $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 3,5$  Hz), 6,3 (br s, 1H,  
 OH-2'), 6,45 (d, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 4,6$  Hz), 7,3 (br s, 2H,  
 NH<sub>2</sub>-6), 7,4-7,9 (m, 10H, 2 benzoilas), 8,07 e 8,34 (2s, 2H,  
 H-2 e H-8); ms: matriz G/T, (FAB<sup>+</sup>) m/z 476 [M+H]<sup>+</sup>, 136  
 10 [BH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, (FAB<sup>-</sup>) m/z 474 [M-M]<sup>-</sup>, 134 [B]<sup>-</sup>; UV (95% etanol):  $\lambda_{\text{max}}$   
 257 nm ( $\epsilon$  16400), 230 nm ( $\epsilon$  29300),  $\lambda_{\text{min}}$  246 nm ( $\epsilon$  14800);  
 $[\alpha]_D^{20} = -64$  (c 1,07, CHCl<sub>3</sub>). Análise calculada para  
 C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (M = 475,45): C, 60,43; H, 4,45; N, 14,73,  
 Encontrado: C, 60,41; H, 4,68; N, 14,27.

15 **9-(3,5-Di-O-benzoil-2-deóxi- $\beta$ -L-treo-pentofuranosil  
 )adenina (**4**).**

A uma solução do composto **3** (1,00 g, 2,11 mmol) em  
 acetonitrila seca (65 mL) foram adicionados  
 4-(dimetilamino)piridina (0,77 g, 6,32 mmol) e cloreto de  
 20 fenoxitiocarbonil (0,44 mL, 3,16 mmol). A mistura foi  
 agitada a temperatura ambiente por 2 horas. Após  
 concentração, o resíduo foi dissolvido em diclorometano (50  
 mL) e lavado sucessivamente com água (2 x 30 mL), solução  
 aquosa de ácido clorídrico 0,5 N (30 mL) e água (3 x 30  
 25 mL). A camada orgânica foi seca, filtrada e concentrada a  
 secura. O intermediário tiocarbonilado bruto foi  
 diretamente tratado com hidreto de tris-  
 (trimetilsilil)silano (0,78 mL, 5,23 mmol) e  $\alpha,\alpha'$ -  
 azoisobutironitrila (AIBN, 0,112 g, 0,69 mmol) em dioxano  
 30 seco (17 mL) em refluxo por 2 horas. O solvente foi

removido sob vácuo e o resíduo foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica gel (0-5% MeOH em diclorometano) para obter o 4 puro (0,93 g, 96%) como uma espuma:  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  2,9-3,1 (m, 2H, H-2' e H-2''), 4,6 - 4,7 (m, 3H, H-4', H-5' e H-5''), 5,8 (br s, 1H, H-3'), 6,43 (dd, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 3,1$  Hz,  $J_{1',2''} = 7,6$  Hz), 7,3 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ -6), 7,4-7,9 (m, 10H, 2 benzoilas), 8,05 e 8,33 (2s, 2H, H-2 e H-8); ms: matriz G/T, ( $\text{FAB}^+$ ) m/z 460  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 325  $[\text{S}]^+$ , 136  $[\text{BH}_2]^+$ , ( $\text{FAB}^-$ ) m/z 458  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 134  $[\text{B}]^-$ ; UV (95% etanol) :  $\lambda_{\text{max}}$  261 nm ( $\epsilon$  14400), 231 nm ( $\epsilon$  26300),  $\lambda_{\text{min}}$  249 nm ( $\epsilon$  12000);  $[\alpha]_D^{20} = -38$  (c 1,04, DMSO).

**6-N-(4-Monometoxitritil)-9-(3,5-di-O-benzoil-2-deóxi- $\beta$ -L-treo-pento-furanosil)adenina (5).**

A uma solução do composto 4 (0,88 g, 1,92 mmol) em piridina seca (40 mL) foi adicionado cloreto de 4-monometoxitritila (1,18 g, 3,84 mmol). A mistura foi agitada a 60°C por 24 horas. Após adição de metanol (5 mL), a solução foi concentrada a securo, o resíduo foi dissolvido em diclorometano (50 mL) e lavado sucessivamente com água (30 mL),  $\text{NaHCO}_3$  aquoso saturado (30 mL) e água (30 mL). A camada orgânica foi seca, filtrada, concentrada e co-evaporada com tolueno para obter 5 puro (1,01 g, 72%) como uma espuma :  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,9-3,0 (m, 2H, H-2' e H-2''), 3,62 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4,6-4,8 (m, 3H, H-4', H-5' e H-5''), 5,85 (pt, 1H, H-3'), 6,44 (dd, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 3,1$  Hz,  $J_{1',2''} = 7,3$  Hz), 6,9 (br s, 1H,  $\text{NH}$ -6), 6,7-6,8 e 7,2-7,4 (2m, 24H, 2 benzoilas e MMTr), 7,97 e 8,13 (2s, 2H, H-2 e H-8); ms: matriz G/T, ( $\text{FAB}^+$ ) m/z 732  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ( $\text{FAB}^-$ ) m/z 730  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , UV (95% etanol) :  $\lambda_{\text{max}}$  274 nm ( $\epsilon$  12100), 225 nm ( $\epsilon$  24200),  $\lambda_{\text{min}}$  250 nm ( $\epsilon$  5900);  $[\alpha]_D^{20} = -16$  (c 1,12, DMSO).

**6-N-(4-Monometoxitritil)-9-(2-deóxi- $\beta$ -L-treo-pentofuranosil)-adenina (6)**

O composto 5 (0,95 g, 1,30 mmol) foi tratado com uma solução (saturado a  $-10^{\circ}\text{C}$ ) de amônia metanólica (40 mL), a temperatura ambiente por toda a noite. Após concentração, o resíduo foi dissolvido em diclorometano (60 mL) e lavado com água (30 mL). A camada aquosa foi extraída duas vezes com diclorometano (10 mL). A camada orgânica combinada foi seca, filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica gel (0-5% MeOH em diclorometano) para obter 6 puro (0,67 g, 98%) como uma espuma  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,6-2,9 (m, 2H, H-2' e H-2''), 3,5 (br s, 1H, OH-5'), 3,55 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,9-4,0 (m, 3H, H-4', H-5' e H-5''), 4,5-4,6 (m, 1H, H-3'), 6,03 (dd, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 4,0$  Hz,  $J_{1',2''} = 8,8$  Hz), 7,0 (br s, 1H, NH-6), 6,7-6,8 e 7,1-7,4 (2m, 14H, MMTr), 7,40 (d,  $^1\text{H}$ , OH-3',  $J_{\text{H,OH}} = 10,6$  Hz), 7,80 e 7,99 (2s, 2H, H-2 e H-8); ms: matriz G/T, (FAB<sup>+</sup>) m/z 524  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 408  $[\text{BH}_2]^+$ , (FAB<sup>-</sup>) m/z 1045  $[\text{2M}-\text{H}]^-$ , 522  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 406  $[\text{B}]^-$ ; UV (95% etanol) :  $\lambda_{\text{max}}$  275 nm ( $\epsilon$  12300),  $\lambda_{\text{min}}$  247 nm ( $\epsilon$  3600);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 28$  (c 0,94, DMSO).

**6-N-(4-Monometoxitritil)-9-(2-deóxi-5-O-(4-monometoxitritil)- $\beta$ -L-treo-pentofuranosil)adenina (7).**

O composto 6 (0,62 g, 1,24 mmol) em piridina seca (25 mL) foi tratado com cloreto de 4 monometoxitritila (0,46 g, 1,49 mmol) a temperatura ambiente por 16 horas. Após adição de metanol (5 mL), a mistura foi concentrada a secura. O resíduo foi dissolvido em diclorometano (60 mL) e lavado sucessivamente com água (40 mL), uma solução aquosa

saturada de NaHCO<sub>3</sub> (40 mL) e água (3 x 40 mL). A camada orgânica foi seca, filtrada, concentrada e co-evaporada com tolueno e metanol. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica gel (0-10% MeOH em diclorometano) para obter **7** (0,71 g, 72%) como uma espuma :  
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,21 (d, 1H, H-2' J<sub>2',2''</sub> = 14,3 Hz), 2,6-2,7 (m, 1H, H-2''), 3,1-3,3 (2m, 2H, H-5' e H-5''), 3,64 e 3,65 (2s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>) 4,1-4,2 (m, 1H, H-4'), 4,2-4,3 (m, 1H, H-3'), 5,68 (d, 1H, OH-3', J<sub>H,OH</sub> = 5,2 Hz), 6,24 (d, 1H, H-1', J<sub>1',2''</sub> = 7,0 Hz), 6,7-6,8 e 7,1-7,3 (2m, 29H, 2 MMTr e NH-6), 7,83 e 8,21 (2s, 2H, H-2 e H-8); ms: matriz G/T, (FAB<sup>+</sup>) m/z 796 [M+H]<sup>+</sup>, 408 [BH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, (FAB<sup>-</sup>) m/z 794 [M-H]<sup>-</sup>, 406 [B]<sup>-</sup>; UV (95% etanol): λ<sub>max</sub> 275 nm (ε 30900), λ<sub>min</sub> 246 nm (ε 12800); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +14 (c 1,03, DMSO).

15 **6-N-(4-Monometoxitritil)-9-(3-O-benzoil-2-deóxi-5-O-(4-mono-metoxitritil)-β-L-eritro-pentofuranosil)adenina (8).**

Uma solução de dietilazodicarboxilato (0,38 mL, 2,49 mmol) em tetrahidrofurano seco (20 mL) foi adicionada gota a gota a uma solução resfriada (0°C) de nucleosídeo **7** (0,66 g, 0,83 mmol), trifenilfosfina (0,66 g, 2,49 mmol) e ácido benzóico (0,30 g, 2,49 mmol) em THF seco (20 mL). A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 18 horas e metanol (1 mL) foi adicionado. O solventes foram 25 removidos sob pressão reduzida e o material bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica gel (0-5% acetato de etila em diclorometano) para obter composto **8** ligeiramente contaminado por óxido de trifenilfosfina.

30 **6-N-(4-Monometoxitritil)-9-(2-deóxi-5-O-(4-monometoxitritil)-β-L-eritro-pentofuranosil)adenina**

(9).

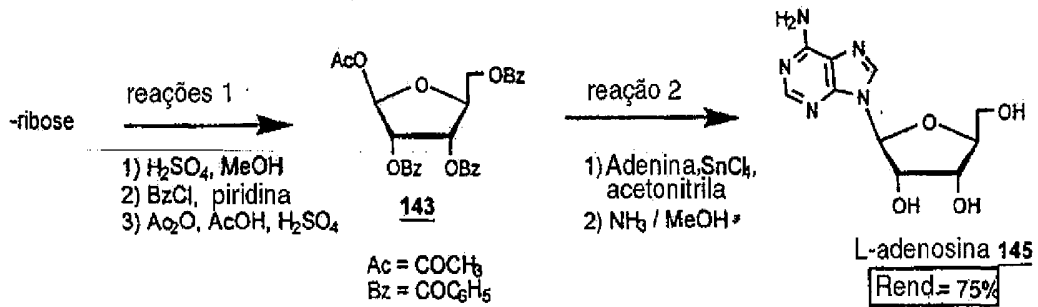
O composto **8** foi tratado por uma solução (saturada a  $-10^{\circ}\text{C}$ ) de amônia metanólica (20 mL), a temperatura ambiente por 24 horas, então a mistura de reação foi concentrada à secura. O resíduo foi dissolvido em diclorometano (30 mL) e lavada com água (20 mL). A camada aquosa foi extraída por diclorometano (2 x 20 mL) e a fase orgânica combinada foi seca, filtrada e concentrada. O composto puro **9** (0,50 g, 76% de **7**) foi obtido como uma espuma após purificação por cromatografia de coluna sobre sílica gel (0-2% MeOH em diclorometano):  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,2-2,3 (m, 1H, H-2'), 2,8-2,9 (m, 1H, H-2''), 3,1-3,2 (m, 2H, H-5' e H-5''), 3,64 e 3,65 (2s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>) 3,97 (pq, 1H, H-4'), 4,4-4,5 (m, 1H, H-3'), 5,36 (d, 1H, OH-3',  $J_{\text{H,OH}} = 4,5$  Hz), 6,34 (t, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = J_{1',2''} = 6,4$  Hz), 6,8-6,9 e 7,1-7,4 (2m, 29H, 2 MMTr e NH-6), 7,81 e 8,32 (2s, 2H, H-2 e H-8); ms: matriz G/T, (FAB<sup>+</sup>) m/z 796 [M+H]<sup>+</sup>, 408 [BH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, (FAB<sup>-</sup>) m/z 794 [M-H]<sup>-</sup>, 406 [B]<sup>-</sup>; UV (95% etanol):  $\lambda_{\text{max}}$  276 nm ( $\epsilon$  42600),  $\lambda_{\text{min}}$  248 nm ( $\epsilon$  23300);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 29$  (c 1,05, DMSO).

#### 2'-Deóxi- $\beta$ -L-adenosina ( $\beta$ -L-dA)

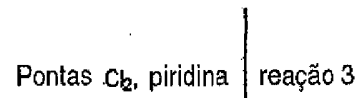
O composto **9** (0,44 g, 0,56 mmol) foi tratado com uma solução aquosa de ácido acético 80% (17 mL) a temperatura ambiente por 5 horas. A mistura foi concentrada à secura, o resíduo foi dissolvido em água (20 mL) e lavado com éter dietila (2 x 15 mL). A camada aquosa foi concentrada e co-evaporada com tolueno e metanol. A 2'-deóxi- $\beta$ -L-adenosina ( $\beta$ -L-dA) desejada (0,12 g, 83%) foi obtida após purificação por cromatografia de coluna sobre sílica gel (0-12% MeOH em diclorometano) e filtração

através de uma unidade Millex HV-4 (0,45  $\mu$ , Millipore) ponto de fusão 193-194°C (cristalizada da água) (Lit. 184-185°C para L-enantiômero [Ref: Robins, M. J.; Khwaja, T. A.; Robins, R. K. *J. Org. Chem.* 1970, 35, 636-639] e 5 187-189°C para D-enantiômero [Ref: Ness, R. K. em *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry*; Zorbach, W.W., Tipson, R. S., Eds.; J. Wiley and sons: New York, 1968; Vol 1, pp 183-187];  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,2-2,3 e 2,6-2,7 (2m, 2H, H-2' e H2''), 3,4-3,6 (2m, 2H, H-5' e H-5''), 3,86 (pq, 10 1H, H-4'), 4,3-4,4 (m, 1H, H-3'), 5,24 (t, 1H, OH-5',  $J_{\text{H,OH}} = 5,8$  Hz), 5,30 (d, 1H, OH-3',  $J_{\text{H,OH}} = 4,0$  Hz), 6,32 (dd, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 6,2$  Hz,  $J_{1',2'} = 7,8$  Hz), 7,3 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ -6), 8,11 e 8,32 (2s, 2H, H-2 e H-8); ms : matriz G/T, (FAB+) m/z 252  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 136  $[\text{BH}_2]^+$ , (FAB-) m/z 250  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 134 15  $[\text{B}]^-$ ; UV (95% etanol) :  $\lambda_{\text{max}}$  258 nm ( $\epsilon$  14300),  $\lambda_{\text{min}}$  226 nm ( $\epsilon$  2100);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 25$  (c 1,03,  $\text{H}_2\text{O}$ ), (Lit.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 23$  (c 1,0,  $\text{H}_2\text{O}$ ) para L-enantiômero [Ref: Robins, M. J.; Khwaja, T. A.; Robins, R. K. *J. Org. Chem.* 1970, 35, 636-639] e  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = - 25$  (c 0,47,  $\text{H}_2\text{O}$ ) para D-enantiômero [Ref.: Ness, R. 20 K. em *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry*; Zorbach, W.W., Tipson, R. S., Eds.; J. Wiley and sons : New York, 1968; Vol 1, pp 183-187]). Análise calculada para  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3 + 1,5 \text{H}_2\text{O}$  (M = 278,28): C, 43,16; H, 5,80; N, 25,17, Encontrado: C, 43,63; H, 5,45; N, 25,33.

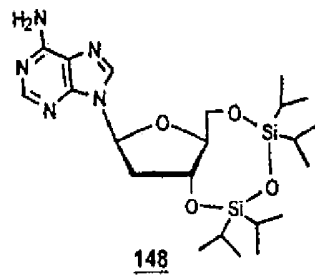
25 Exemplo 2: Síntese estereoseletiva de 2'-Deóxi- $\beta$ -L-Adenosina ( $\beta$ -L-dA)



5



10

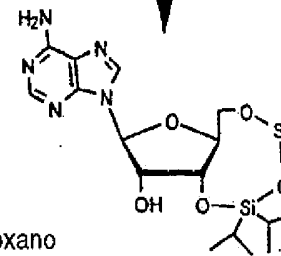


1 cromatografia de coluna

**Rend. = 70%**

espuma

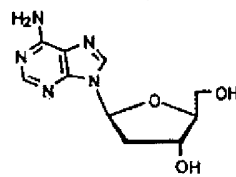
15



**Rend. = 90%**

cristais

20



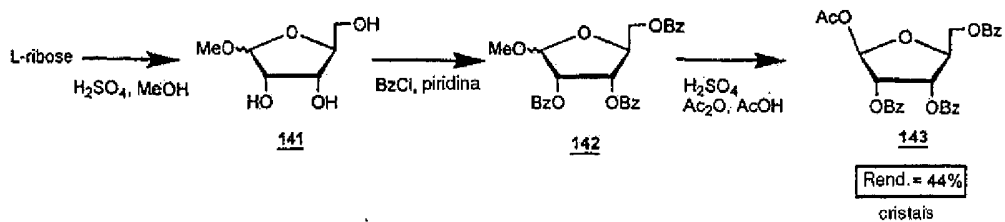
1 cromatografia de coluna

**Rend. = 75%**

cristais

25

**Reação 1:**



**Precursor:** L-ribose (Cultor Science Food, CAS [24259-59-4], batelada RIB9711013),

**Reagentes:** Ácido sulfúrico 95-97% (Merck; ref. 1.00731.1000); cloreto de benzoila (Fluka, ref. 12930);  
5 sulfato de sódio (Prolabo; ref. 28111.365)

**Solventes:** Metanol P.A. (Prolabo; ref. 20847,295); Piridina 99% (Acros; ref. 131780025); Diclorometano P.A. (Merck; ref. 1.06050.6025); Ácido acético P.A. (carlo erba; 20104298); Anidrido acético (Fluka; ref. 45830); Etanol 95  
10 (Prolabo, ref. 20823.293)

**Referências:** Recondo, E. F., e Rinderknecht, H., Eine neue, Einfache Synthese des 1-O-Acetil-2,3,5-Tri-O- $\beta$ -D-Ribofuranosídeos. *Helv. Chim. Acta*, 1171-1173 (1959).

Uma solução de L-ribose 140 (150 g, 1 mol) em  
15 metanol (2 litros) foi tratada com ácido sulfúrico (12 ml) e deixada a +4°C por 12 horas, e então neutralizada com piridina (180 ml). A evaporação forneceu uma mistura  $\alpha,\beta$  de metil ribofuranosídeos 141 como um xarope. Uma solução desta mistura anomérica em piridina (1,3 litros) foi  
20 tratada com cloreto de benzoila (580 ml, 5 mol) com resfriamento e agitação mecânica. A solução foi deixada a temperatura ambiente por 12 horas e então derramada em gelo (cerca de 10 litros) com agitação contínua. A mistura (um óleo em água) foi filtrada em um leito de Celite. O óleo  
25 resultante no leito de celite foi lavado com água (3x3 litros) e então dissolvido com acetato de etila (3 litros). A fase orgânica foi lavada com uma solução a 5% de NaHCO<sub>3</sub> (2 litros) e água (2 litros), seca sobre sulfato de sódio, filtrada e evaporada para dar 1-O-metil-2,3,5-tri-O-  
30 benzoil- $\alpha/\beta$ -L-ribofuranose 142 como um xarope espesso. O

óleo foi dissolvido em anidrido acético (560 ml) e ácido acético (240 ml). A solução foi, após adição gota a gota de ácido sulfúrico concentrado (80 ml) mantida no frio (+ 4°C) sob agitação mecânica por 10 horas. A solução foi então  
 5 derramada em gelo (cerca de 10 litros) sob agitação contínua. A mistura (composto oleoso em água) foi filtrada no leito de Celite. O sólido gomoso resultante sobre o leito de celite foi lavado com água (3x3 litros) e então dissolvido em diclorometano (2,5 litros). A fase orgânica  
 10 foi lavada com NaHCO<sub>3</sub> a 5% (1 litro) e água (2 x 2 litros), seca sobre sulfato de sódio, filtrada e evaporada para fornecer o sólido gomoso 143, que foi cristalizado de etanol 95 (rendimento 225 g, 44%).

**Análises para 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-β-L-ribofuranose 143:**

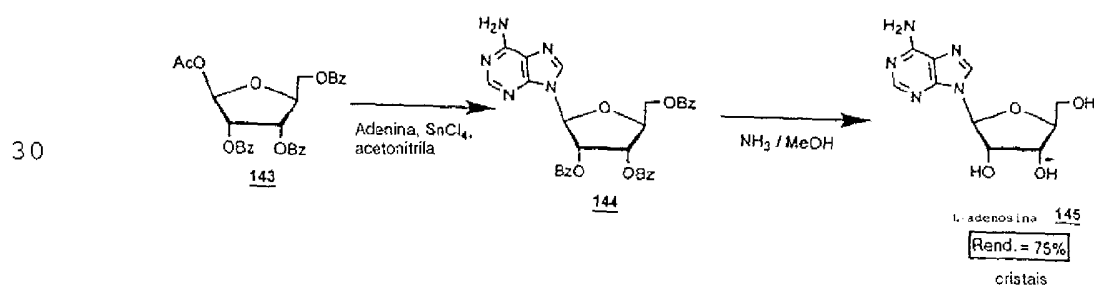
Ponto de fusão 129-130°C (EtOH 95) (lit.(1) ponto de fusão, 130-131°C)

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,09-7,87 (m, 6H, H<sub>AROM</sub>), 7,62-7,31 (m, 9H, H<sub>AROM</sub>) 6,43 (s, 1H, H<sub>1</sub>), 5,91 (dd, 1H, H<sub>3</sub>, J<sub>3,4</sub> 6,7 Hz; J<sub>3,2</sub> 4,9 Hz), 5,79 (pd, 1H, H<sub>2</sub>, J<sub>2,3</sub> 4,9 Hz; J<sub>1,2</sub> <1), 4,78 (m, 2H, H<sub>4</sub> e H<sub>5</sub>), 4,51 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5,5'</sub> 13,1 Hz, J<sub>5',4</sub> 5,5 Hz), 2,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); (idêntico a 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranose comercial).

Análise de massa (FAB<sup>+</sup>, GT) m/z 445 (M-OAc) +

25 Análise elementar C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub> Calculado C 66,66 H 4,79; encontrado C H.

**Reação 2:**



**Precursor:** Adenina (Pharma-Waldhof, ref. 400134.001 lote 45276800)

**Reagentes:** Fumigação de cloreto estânico (Fluka; ref. 96558); NH<sub>3</sub>/Metanol (metanol saturado com NH<sub>3</sub>; vide 5 folha 5); Sulfato de sódio (Prolabo; ref. 28111.365)

**Solventes:** Acetonitrila (Riedel-de Hean; ref. 33019; destilado sobre CaH<sub>2</sub>); Clorofórmio Pur (Acros; ref. 22706463); Acetato de etila Pur (Carlo erba; ref. 528299)

**Referências:** Saneyoshi, M., e Satoh, E., *Synthetic*  
10 *Nucleosides, and Nucleotides. XIII. Stannic Chloride Catalyzed Ribosilation of Several 6-Substituted Purines.* Chem; Pharm. Bull, 27, 2518-2521 (1979).; Nakayama, C., e Saneyoshi, M., *Synthetic Nucleosides and Nucleotides. XX. Synthesis of Various 1-β-Xilofuranosil-5-Alkyluracils and*  
15 *Related Nucleosides. Nucleosides, Nucleotides, 1, 139-146* (1982).

Adenina (19,6 g, 144 mmol) foi suspenso em acetoneitrila (400 ml) com 1-O-acetil 2,3,5-tri-O-benzoil-β-L-ribofuranose 143 (60 g, 119 mmol).  
20 A esta suspensão foi adicionado fumigação de cloreto estânico (22 ml, 187 mmol). Após 12 horas, a reação foi concentrada a um volume pequeno (cerca de 100 ml) e hidrogenocarbonato de sódio (110 g) e água (120 ml) foram adicionados. O sólido branco resultante (sais de estanho)  
25 foi extraído com clorofórmio quente (5 x 200 ml). Os extratos combinados foram filtrados sobre um leito de celite. A fase orgânica foi lavada com uma solução de NaHCO<sub>3</sub> a 5% e água, seca sobre sulfato de sódio, filtrada e evaporada para obter composto 144 (60 g, espuma incolor). A  
30 espuma foi tratada com metanol saturado com amônia (220 ml)

em recipiente vedado a temperatura ambiente sob agitação por 4 dias. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o pó resultante foi suspenso em acetato de etila (400 ml) ao refluxo por 1 hora. Após filtração, o pó foi  
 5 recristalizado de água (220 ml) para obter L-adenosina 145 (24 g, cristais, 75%).

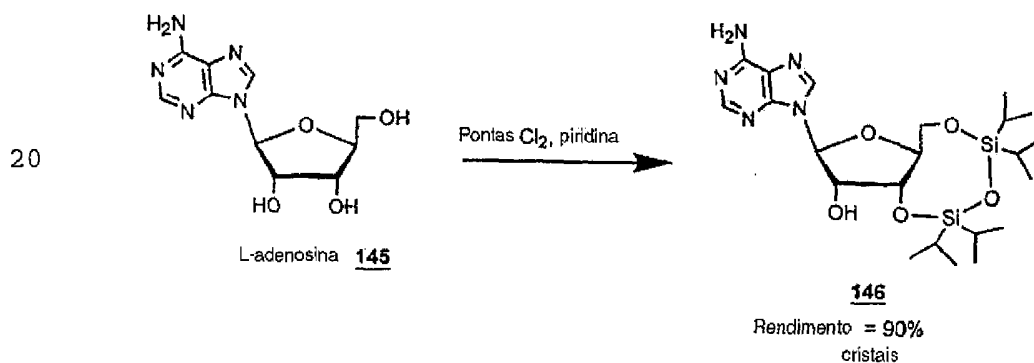
**Análises para  $\beta$ -L-adenosina:**

Ponto de fusão 233-234°C (água) (lit.(4) ponto de fusão 235-238°C)

10  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  8,34 e 8,12 (2s, 2H, H<sub>2</sub> e H8), 7,37 (1s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,86 (d, 1H, H1,, J<sub>1',2'</sub> 6,2 Hz), 5,43 (m, 2H, OH<sub>2</sub>, e OH<sub>5'</sub>), 5,19 (d, 1H, OH<sub>3'</sub>, J 3,7 Hz), 4,60 (m, H<sub>2'</sub>), 4,13 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 3,94 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 3,69-3,49 (in, 2H, H<sub>5'a</sub> e H<sub>5'b</sub>), (idêntico a D-adenosina  
 15 comercial).

Análise de massa (FAB<sup>+</sup>, GT) m/z 268 (M+H)<sup>+</sup>, 136 (BH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>

**Reação 3:**



**Reagentes:**

25 1,3-Dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildissiloxano (Fluka; ref. 36520); Sulfato de sódio (Prolabo; ref. 28111,365)

**Solventes:** Piridina 99% (Acros; ref. 131780025); Acetato de etila Pur (Carlo erba; ref. 528299);

Acetonitrila (Riedel-de Haen; ref. 33019)

Referência : Robins, M.J., e outros, *Nucleic Acid Related Compounds*. 42, A General Procedure for the Efficient Deoxygenation of Secondary Alcohols. Regiospecific and Stereoselective Conversion of Ribonucleosides to 2'-Deoxynucleosides. *J Am. Chem. Soc.* 105, 4059-4065 (1983).

A L-adenosina 145 (47,2 g, 177 mmol) suspensa em piridina (320 ml) foi adicionado 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildissiloxano (63 ml, 201 mmol), e a mistura foi agitada a temperatura ambiente por 12 horas. Piridina foi evaporada e o resíduo foi dividido com acetato de etila (1 litro) e uma solução de NaHCO<sub>3</sub> a 5% (600 ml). A fase orgânica foi lavada com uma solução de HCl 0,5N (2x500 ml) e água (500 ml), seca sobre sulfato de sódio, filtrada e evaporada a secura. O sólido resultante foi cristalizado de acetonitrila para obter composto 146 (81 g, 90%).

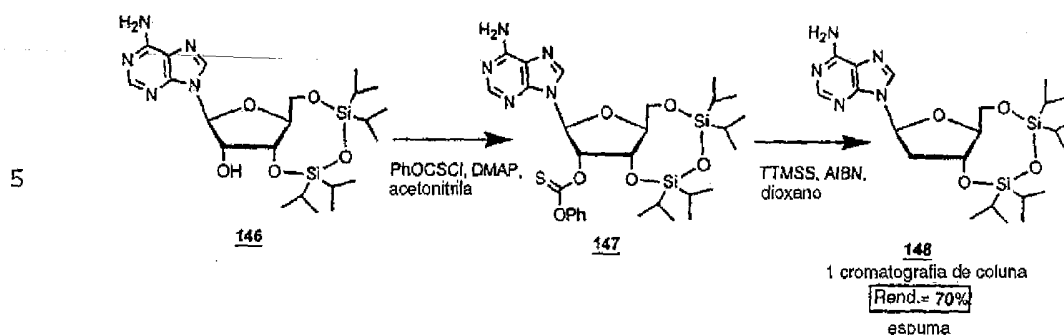
**Análises** para  
3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropil-1,3-disiloxanil)-β-L-adenosina 146:

Ponto de fusão 97-98°C (acetonitrila) (lit. (5)  
ponto de fusão do D enantiômero 98°C)

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,28 e 7,95 (2s, 2H, H<sub>2</sub> e H<sub>8</sub>), 5,96 (d, 1H, J<sub>1',2'</sub> 1,1 Hz), 5,63 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,10 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, J<sub>3',4'</sub> 7,6 Hz, J<sub>3',2'</sub> 5,5 Hz), 4,57 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, J<sub>2',1'</sub> 1,2 Hz, J<sub>2',3'</sub> 7,6 Hz), 4,15-3,99 (m, 3H, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'a</sub>, e H<sub>5'b</sub>), 3,31 (sl, 1H, OH<sub>2'</sub>), 1,06 (m, 28H, prótons de isopropila)

Análise de massa (FAB-, GT) m/z 508 (M-H)<sup>-</sup>, 134 (B)<sup>-</sup>; (FAB+, GT) m/z 510 (m+H)<sup>+</sup>, 136 (BH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>

## Reação 4:



**Reagentes:** Dimetilaminopiridina 99% (Acros; ref. 1482702050); fenilclorotionocarbonato 99% (Acros; ref. 215490050); Tris(trimetilsilil)silano "TTMSS" (Fluka; ref. 93411);  $\alpha, \alpha'$ -Azoisobutironitrila "AIBN" (Fluka, ref. 11630); Sulfato de sódio (Prolabo; ref. 28111,365)

**Solventes:** Acetonitrila (Riedel-de Haen; ref. 33019); Acetato de etila Pur (Carlo Erba; ref. 528299); Dioxan P.A. (Merck; ref. 1.09671.000); Diclorometano (Merck; ref. 1.06050.6025); Metanol (Carlo Erba; ref. 309002);

**Referência:** Robins, M. J., Wilson, J. S., e Hansske, F., Nucleic Acid Related Compounds. 42, A General Procedure for the Efficient Deoxygenation of Secondary Alcohols. Regiospecific and Stereoselective Conversion of Ribonucleosides to 2'-Deoxynucleosides. *J. Am. Chem. Soc.*, 105,4059-4065 (1983).

25 Ao composto 146 (34 g, 67 mmol) foram adicionados acetonitrila (280 ml), DMAP (16,5 g, 13 5 mmol) e clorotionocarbonato de fenila (10,2 ml, 73 mmol). A solução foi agitada a temperatura ambiente por 12 horas. Solvente foi evaporado e o resíduo foi dividido entre acetato de 30 etila (400 ml) e uma solução de HCl 0,5N (400 ml). A camada

orgânica foi lavada com uma solução de HCl 0,5N (400 ml) e água (2x400 ml), seca sobre sulfato de sódio, filtrada e evaporada a secura para obter o intermediário como um sólido amarelo pálido. O 147 bruto foi dissolvido em 5 dioxano (ml) e AIBN (3,3 g, 20 mmol) e TTMS (33 ml, 107 mmol) foram adicionados. A solução foi progressivamente aquecida até o refluxo e agitada por 2 horas. A reação foi concentrada em um óleo amarelo que foi cromatografado (eluente diclorometano/metanol 95/5) para obter o composto 10 148 (23 g, espuma incolor, 70%). Uma alíquota foi cristalizada de etanol/éter de petróleo.

#### Análises

para

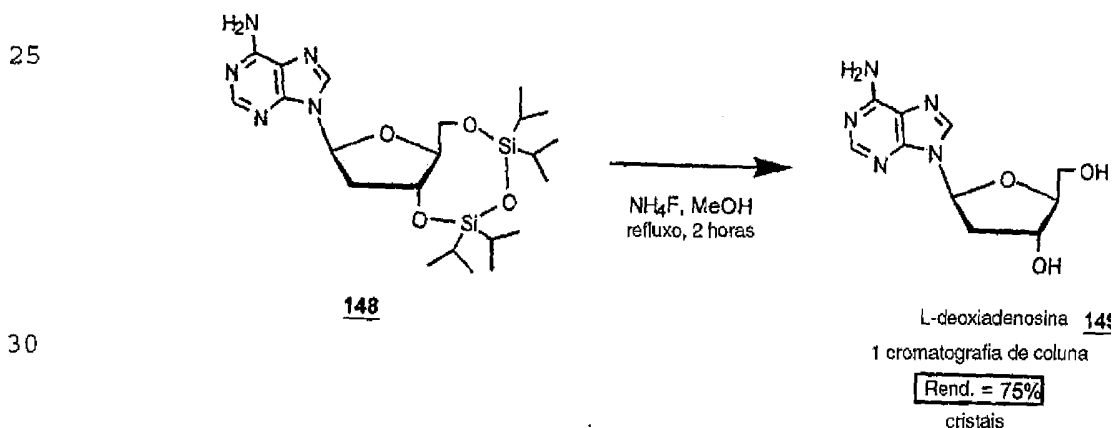
3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropil-1,3-dissiloxanil)-2'-deóxi-β-L-adenosina 148:

15 Ponto de fusão 110-111°C (EtOH/éter de petróleo)  
(Lit. (5) ponto de fusão 113-114°C (EtOH))

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,33 e 8,03 (2s, 2H, H<sub>2</sub> e H<sub>8</sub>), 6,30 (dd, 1H, H<sub>1</sub>, J 2,85 Hz, J 7,06 Hz), 5,63 (sl, 2H, NH<sub>2</sub>), 4,96 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 4,50 (m, 2H, H<sub>5'a</sub> e H<sub>5'b</sub>), 2,68 (m, 20 2H, H<sub>2'a</sub> e H<sub>2'b</sub>), 1,08 (m, 28H, prótons de isopropila).

Análise de massa (FAB+, GT) m/z 494 (M+H)<sup>+</sup>, 136 (BH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>

#### Reação 5:



**Reagentes:** Fluoreto de amônio (Fluka; ref. 09742);  
 Sílica gel (Merck; ref. 1.07734.2500)

**Solventes :** Metanol P.A. (Prolabo; ref. 20847.295);  
 Diclorometano P.A. (Merck; ref. 1.06050.6025); Etanol 95  
 5 (Prolabo; ref. 20823,293)

**Referência:** Zhang, W., e Robins, M. J., *Removal of Silyl Protecting Groups from Hydroxyl Functions with Ammonium Fluoride in Metanol. Tetrahedron Lett.*, **33**, 1177-1180(192).

10 Uma solução de  
 3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropil-1,3-dissiloxanil)-2'-deóxi-  
 L-adenosina **148** (32 g, 65 mmol) e fluoreto de amônio (32 g,  
 mmol) em metanol foi agitada ao refluxo por 2 horas. Sílica  
 gel foi adicionado e a mistura foi cuidadosamente  
 15 evaporada para obter a pó branco. Este pó foi adicionado no  
 topo de uma coluna de sílica, que foi eluída com  
 diclorometano/metanol 9/1. As frações apropriadas foram  
 combinadas e evaporadas para fornecer um pó branco, que foi  
 cristalizado de etanol 95 (12,1 g, 75%).

20 **Análises para 2'-deóxi- $\beta$ -L-adenosina 149:**

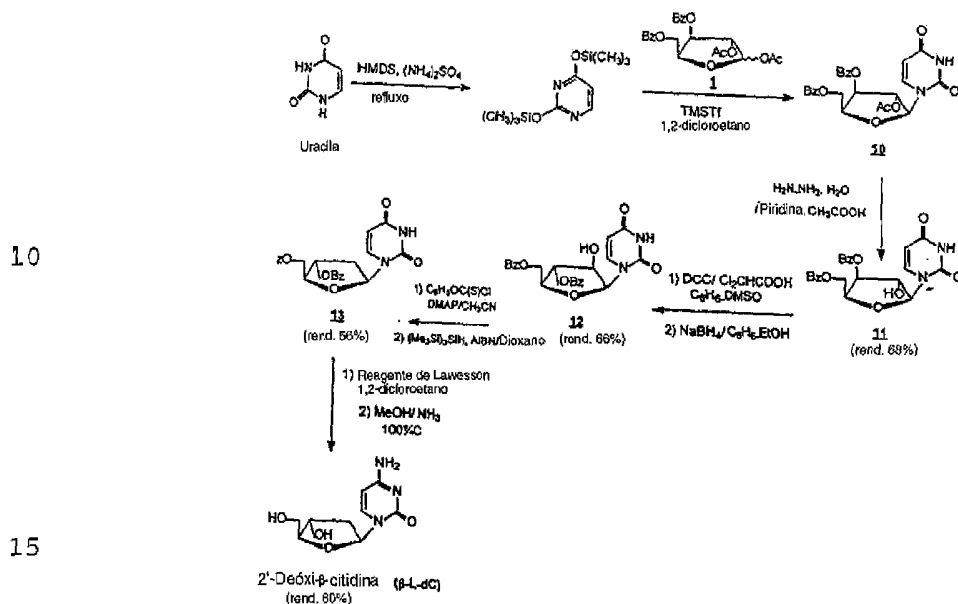
Ponto de fusão, 189-190°C (EtOH 95) (idêntico a 2'-  
 deóxi-D-adenosina comercial)

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  8,35 e 8,14 (2s, 2H,  $\text{H}_2$   
 e  $\text{H}_8$ ), 7,34 (sl, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6,35 (dd, 1H,  $\text{H}_{1'}$ , J 6,1 Hz, J  
 25 7,85 Hz), 5,33 (d, 1H,  $\text{OH}_{2'}$ , J 4,0 Hz), 5,28 (dd, 1H,  $\text{H}_{3'}$ , J  
 4,95 Hz; J 6,6 Hz), 4,42 (m, 1H,  $\text{OH}_{5'}$ ), 3,88 (m, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ),  
 3,63-3,52 (m, 2H,  $\text{H}_{5'a}$  e  $\text{H}_{5'b}$ ), 2,71 (m, 1H,  $\text{H}_{2'a}$ ), 2,28 (m,  
 1H,  $\text{H}_{2'b}$ ). (idêntico a 2'-deóxi-D-adenosina comercial)  $\alpha_D$   
 +26° (c 0,5 água) (2'-deóxi-D-adenosina comercial -25' (c  
 30 0,5 água)).

UV  $\lambda_{\max}$  260 nm ( $\epsilon$  14100) ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

Análise de massa (FAB+, GT)  $m/z$  252 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 136 ( $\text{BH}_2$ )<sup>+</sup>

Exemplo 3 - Síntese estereoespecífica de 2'-Deóxi-  
5  $\beta$ -L-Citidina



1-(3,5-Di-O-benzoil- $\beta$ -L-xilofuranosil)uracil (11)

Hidrato de hidrazina (1,4 mL, 28,7 mmol) foi adicionado a uma solução de 1-(2-O-acetil-3,5-di-O-benzoil- $\beta$ -L-xilofuranosil)uracil 10 [Ref.: Gosselin, G.; Bergogne, M.-C.; Imbach, J.L., "Synthesis e antiviral Evaluation of  $\beta$ -L-Xilofuranosil Nucleosides of the Five Naturally Occuring Nucleic Acid Bases", Journal of Heterocyclic Chemistry, 1993, 30 (Oct.Nov.), 1229-1233] (4,79 g, 9,68 mmol) em piridina (60 mL) e ácido acético (15 ml). A solução foi agitada por toda a noite a temperatura ambiente. Acetona foi adicionada (35 mL) e a mistura foi agitada por 30 minutos. A mistura de reação foi evaporada sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica gel [eluente:

20

25

30



Após ser agitada por 1H, a solução foi diluída com acetato de etila (400 mL), então filtrada. O filtrado foi lavado com uma solução de NaCl saturado (400 mL) e água (400 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, então evaporada sob pressão reduzida. O material bruto resultante foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica gel [eluyente: gradiente escalonado de metanol (0-3%) em diclorometano para obter 12 (5,3 g, 66%) que foi cristalizado de acetonitrila: ponto de fusão = 182-183°C;

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11,35 (br s, 1H, NH), 8,0-7,5 (m, 11H, 2 C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO, H-6), 6,23 (br s, 1H, OH-2'), 6,15 (d, 1H, H-1', J<sub>1',-2'</sub> = 4 Hz), 5,54 (d, 1H, H-5, J<sub>5-6</sub> = 8,1 Hz), 5,37 (t, 1H, H-3', J<sub>3',-2'</sub> = J<sub>3',-4'</sub> = 2,6 Hz), 4,7-4,6 (m, 2H, H-5' e H-5''), 4,5 (m, 1H, H4'), 4,4 (m, 1H, H-2'); MS: FAB>O (matriz GT) m/z 453 (M+H)<sup>+</sup>, 341 (S)<sup>+</sup>, 113 (BH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 105 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO)<sup>+</sup>; FAB<O (matriz GT) m/z 451 (M-H)<sup>-</sup>, 121 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO<sub>2</sub>)<sup>-</sup>, 111 (B)<sup>-</sup>; Análise calculada para C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: C, 61,06; H,4,46; N, 6,19, Encontrado: C, 60,83; H,4,34;N, 6,25.

1-(3,5-Di-O-benzoil-2-deóxi-β  
-L-eritro-pentofuranosil)uracil (13)

A uma solução de 1-(3,5-di-O-benzoil-β-L-arabinofuranosil)uracil 12 (5,2 g, 11,4 mmol) em 1,2-dicloroetano anidro (120 mL) foram adicionados cloreto de fenoxitiocarbonil (4,7 mL, 34,3 mmol) e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 12,5 g, 102,6 mmol). A solução resultante foi agitada a temperatura ambiente sob atmosfera de argônio por 1 hora e então evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em diclorometano (300 mL) e a solução orgânica foi lavada sucessivamente com solução de ácido clorídrico 0,2N resfriada em gelo (3x 200

mL) e água (2 x 200 mL), seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> então evaporada sob pressão reduzida. O material bruto foi co-evaporado várias vezes com dioxano anidro e dissolvido neste solvente (110 ml). Para solução resultante foram adicionados sob argônio hidreto de tris(trimetilsilila)silano (4,2 mL, 13,7 mmol) e α,α'-azoisobutironitrila (AIBN, 0,6 g 3,76 mmol). A mistura de reação foi aquecida e agitada a 100°C por 1 hora sob argônio, então resfriada para temperatura ambiente e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica gel [eluente: gradiente escalonado de metanol (0-5%)] para obter **13** (2,78 g, 56%) que foi cristalizado de EtOH: ponto de fusão = 223-225°C; H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11,4 (br s, 1H, NH), 8,0-7,5 (m, 11H, 2 C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO, H-6), 6,28 (t, 1H, H-1', J = 7 Hz), 5,5 (m, 2H, H-1' e H-5), 4,6-4,4 (m, 3H, H-4', H-5' e H-5''), 2,6 (m, 2H, H-2' e H-2''); MS: FAB>0 (matriz GT) m/z 437 (M+H)<sup>+</sup>, 3325 (S)<sup>+</sup>; FAB<0 (matriz GT) m/z 435 (M-H)<sup>-</sup>, 111 (B)<sup>-</sup>; Análise calculada para C<sub>23</sub>H<sub>2</sub>ON<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: C, 63,30; H, 4,62; N, 6,42, Encontrado: C, 62,98 ; H, 4,79 N, 6,40.

20           **2'-Deóxi-β-L-citidina (β-L-dC)**

Reagente de Lawesson (1,72 g, 4,26 mmol) foi adicionado sob argônio a uma solução de 1-(3,5-di-O-benzoil-2-deóxi-β-L-eritro-pentofuranosil)uracil **13** (2,66 g, 6,1 mmol) em 1,2 dicloroetano anidro (120 mL) e a mistura de reação foi agitada sob refluxo por 2 horas. O solvente foi então evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica gel [eluente: gradiente escalonado de acetato de etila (0-8% em diclorometano] para obter o 4-tio intermediário como uma

espuma amarela. Uma solução deste tiointermediário (1,5 g, 3,31 mmol) em amônia metanólica (previamente saturada a -10°C e parada) (50 mL) foi aquecida a 100°C em uma bomba de aço inoxidável por 3 horas e então resfriada a 0°C. A

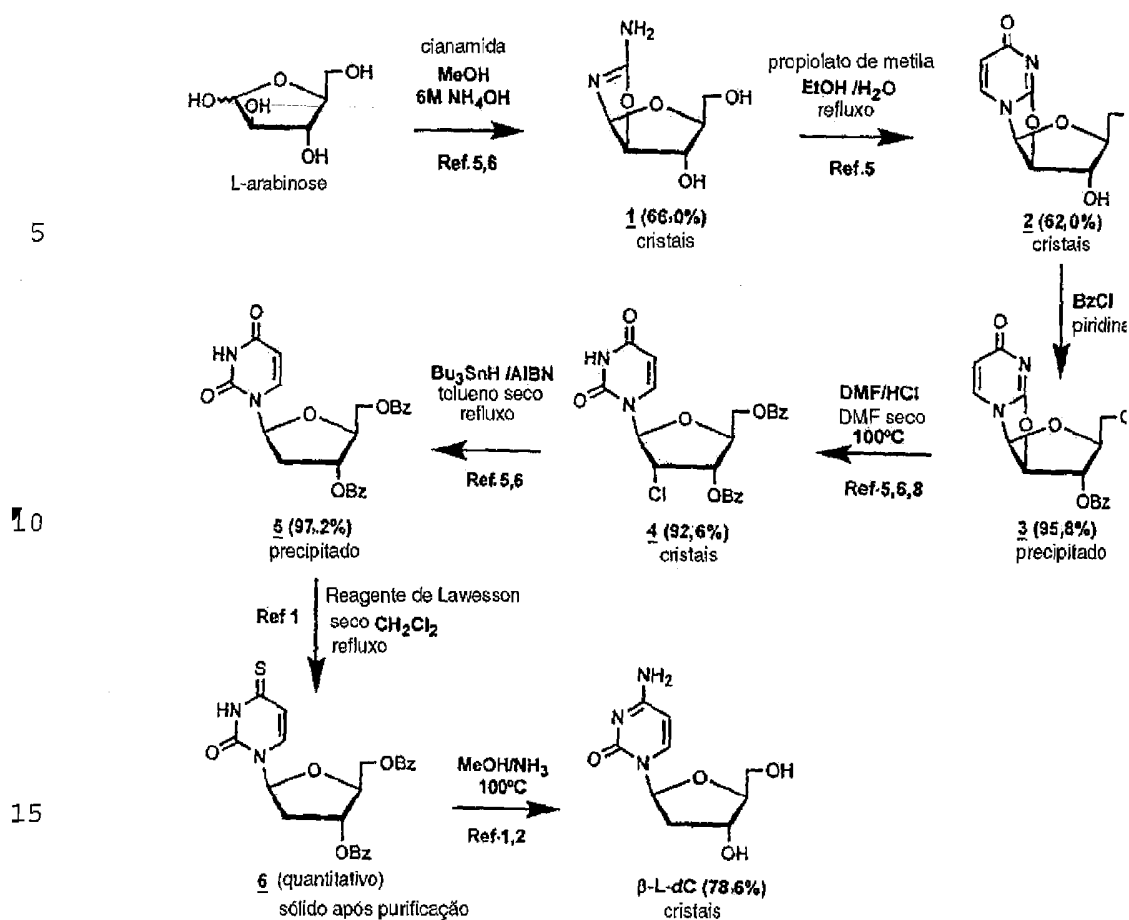
5 solução foi evaporada sob pressão reduzida. O material bruto resultante foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica gel [eluente: gradiente escalonado de metanol(020%) em diclorometano]. Finalmente, as frações apropriadas foram agrupadas, filtradas através de uma

10 unidade Millex HV-4 (0,45 gm, Millipore) e evaporada sob pressão reduzida para prover a 2'-deóxi-β-L-citidina (β-L-dC) como uma espuma (0,6 g, 80%) que foi cristalizada de EtOH absoluto: ponto de fusão = 198-199°C; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7,77 (d, 1H, H-6, J<sub>6-5</sub> = 7,4 Hz), 7,10 (br d, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,13 (t, 1H, H-1', J = 6,7 Hz), 5,69 (d, 1H, H-5, J<sub>5-6</sub> = 7,4 Hz), 5,19 (d, 1H, OH-3', J<sub>OH-3'</sub> 4,1 Hz), 4,96 (t, 1H, OH-5', J<sub>OH-5'</sub> = J<sub>OH-5''</sub> = 5,2 Hz), 4,1 (m, 1H, H-3'), 3,75 (m, 1H, H-4'), 3,5 (m, 2H, H-5' e H-5''), 2,0 (m, 1H, H-2'), 1,9 (m, 1H, H-2'');

15 MS: FAB>0 (matriz GT) m/z 228 (M+H)<sup>+</sup>, 112 (BH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>; FAB<0 (matriz GT) m/z 226 (M-H)<sup>-</sup>; [α]<sup>20</sup><sub>D</sub> = - 69 (c 0,52, DMSO) [[α]<sup>20</sup><sub>D</sub> = + 76 (c 0,55, DMSO) para um sal de cloreto comercialmente disponível de D-enantiômero].

20 Análise calculada para C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 47,57; H, 5,77; N, 18,49, Encontrado: C, 47,35 - H, 5,68 ; N, 18,29.

25 **Exemplo 4 - Síntese estereoseletiva de 2'-deóxi-β-L-Citidina (β-L-dC)**



### 2-Amino- $\beta$ -L-arabinofurano [1',2':4,5] oxazolina (1)

20 Uma mistura de L-arabinose (170 g, 1,13 mol),  
 cianamida (100 g, 2,38 mol), metanol (300 ml) e 6M-NH<sub>4</sub>OH  
 (50 ml) foi agitada a temperatura ambiente por 3 dias e  
 então mantida a -10°C por toda a noite. O produto foi  
 coletado com sucção, lavado sucessivamente com metanol e  
 25 éter, e seco em vácuo. Rendimento, 130 g (66,0%) do  
 composto analiticamente puro 1, ponto de fusão 170-172°C;  
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 6,35 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,15 (d, 1H,  
 H-1, J= 5,6 Hz), 5,45 (br s, 1H, OH-3), 4,70 (br s, 1H, H-1,  
 OH-5), 4,55 (d, 1H, H-2, J = 5,6 Hz), 4,00 (br s, 1H, H-3),  
 30 3,65 (m, 1H, H-4), 3,25 (m, 2H, H-5, H-5').

**Reagentes:****L-arabinose: Fluka, >99,5%, ref. 10839****Cianamida: Fluka, >98%, ref. 28330** **$O^{2,2'}$ -anidro- $\beta$ -L-uridina (2)**

5 Uma solução do composto **1** (98,8 g, 0,57 mol) e propiolato de metila (98 ml) em etanol aquoso a 50% (740 ml) foi refluxada por 5 horas, então refluxada por 5 horas, então resfriada e concentrada sob pressão diminuída para metade do volume original. Após precipitação com acetona  
10 (600 ml), o produto foi coletado com sucção, lavado com etanol e éter, e seco. O licor principal foi parcialmente concentrado, o concentrado precipitado com acetona (1000 ml), o sólido coletado com sucção e lavado com acetona e éter para fornecer a outra colheita do produto. O  
15 rendimento total, 80 g (62%) do composto **2**, ponto de fusão 236-240°C;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,87 (d, 1H, H-6, J = 7,4 Hz), 6,35 (d, 1H, H-1', J = 5,7 Hz), 5,95 (d, 1H, H-5, J = 7,4 Hz), 5,90 (d, 1H, OH-3'), 5,20 (d, 1H, H-2', J = 5,7 Hz), 5,00 (m, 1H, OH-3'), 4,44 (br s, 1H, H-3'), 4,05 (m,  
20 1H, H-4'), 3,25 (m, 2H, H-5, H-5').

**Reagente:****Propiolato de metila: Fluka, >97%, ref. 81863****3,5'-Di-O-benzoil- $O^{2,2'}$ -anidro- $\beta$ -L-uridina (3)**

A uma solução do composto **2** (71,1 g, 0,31 mol) em  
25 piridina anidra (1200 ml) foi adicionado cloreto de benzoila (80,4 ml) a 0°C e sob argônio. A mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente por 5 horas sob exclusão de umidade atmosférica e parada por adição de etanol. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida e o resíduo  
30 resultante foi co-evaporado com tolueno e etanol absoluto.

A mistura bruta foi então diluída com etanol e o precipitado coletado com sucção, lavado sucessivamente com etanol e éter, e seco. Rendimento, 129 g (95,8%) do composto 3, ponto de fusão 254°C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm

5 8,1-7,4 (m, 11H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO, H-6), 6,50 (d, 1H, H-1', J = 5,7 Hz), 5,90 (d, 1H, H-5, J = 7,5 Hz), 5,80 (d, 1H, H-2', J = 5,8 Hz), 5,70 (d, 1H, H-3') 4,90 (m, 1H, H-4'), 4,35 (m, 2H, H-5, H-5').

**Reagente :**

10 **Cloreto de benzoila: Fluka, p.a., ref. 12930**  
**3',5'-Di-O-benzoil-2'-cloro-2'-deóxi-β,L-uridina**  
**(4)**

A uma solução do composto 3 (60,3 g, 0,139 mol) em dimetilformamida (460 ml) foi adicionada a 0°C uma solução

15 de 3,2 N-HCl/DMF (208 ml, preparada no local por adição de 47,2 ml de cloreto de acetila a 0°C, a uma solução de 27,3 ml de metanol e 133,5 ml de dimetilformamida). A mistura de reação foi agitada a 100°C por 1 hora sob exclusão de umidade atmosférica, resfriada e derramada em água (4000

20 ml). O precipitado do composto 4 foi coletado com sucção, lavado com água e recristalizado de etanol. Os cristais foram coletados, lavados com etanol e éter resfriados e secos sob pressão diminuída. Rendimento, 60,6 g (92,6%) do composto 4, ponto de fusão 164-165°C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm

25 8,7 (br s, 1H, NH), 8,1-7,3 (m, 11H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO, H-6), 6,15 (d, 1H, H-1', J = 4,8 Hz), 5,5 (m, 2H, H-5, H-2'), 4,65 (m, 4H, H-3', H-4', H-5', H-5").

**Reagente:**

**Cloreto de acetila: Fluka, p.a., ref. 00990**

30 **3',5'-Di-O-benzoil-2'-deóxi-β,L-uridina (5)**

Uma mistura do composto 4 (60,28 g, 0,128 mol), hidreto de tri-n-butilestanho (95 ml) e azabisisobutironitrila (0,568 g) em tolueno (720 ml) foi refluxada sob agitação por 5 horas e resfriada. O sólido  
5 foi coletado com sucção e lavado com tolueno frio e éter petróleo. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e diluído com éter petróleo para depositar uma colheita adicional do composto 5. Rendimento, 54,28 g (97,2%) do composto 5; ponto de fusão 220-221°C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm  
10 8,91 (br s, 1H, NH), 8,1-7,5 (m, 11H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO e H-6), 6,43 (q, 1H, H-1', J<sub>1',2'</sub> = 5,7 Hz e J<sub>1',2''</sub> = 8,3 Hz), 5,7-5,6 (m, 2H, H-3' e H-5), 4,8-4,6 (m, 3H, H-5', H-5'' e H-4'), 2,8-2,7 (m, 1H, H-2'), 2,4-2,3 (m, 1H, H-2'').

**Reagentes:**

15 **Hidreto de tri-n-butilestanho: Fluka, >98%, ref. 90915**

**Azabisisobutironitrila: Fluka, >98%, ref. 11630**

**3',5'-Di-O-benzoil-2'-deóxi-β-L-4-tio-uridina (6)**

Uma solução do composto 5 (69 g, 0,158 mol) e  
20 reagente de Lawesson (74 g) em cloreto de metileno anidro (3900 ml) foi refluxado sob argônio por toda a noite. Após evaporação do solvente, o resíduo bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica gel [Eluente: gradiente de metanol (0-2%) em cloreto de metileno] para fornecer o  
25 composto puro 6 (73 g) em rendimento quantitativo; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 9,5 (br s, 1H, NH), 8,1-7,4 (m, 10H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO), 7,32 (d, 1H, H-6, J = 7,7 Hz), 6,30 (dd, 1H, H-1', J = 5,6 Hz e J = 8,2 Hz), 6,22 (d, 1H, H-5, J = 7,7 Hz), 5,6 (m, 1H, H-3'), 4,7 (m, 2H, H-5', H-5''), 4,5 (m, 1H, H-4'), 2,8  
30 (m, 1H, H-2'), 2,3 (m, 1H, H-2'').

**Reagente:**

Reagente de Lawesson: Fluka, >98%, ref. 61750

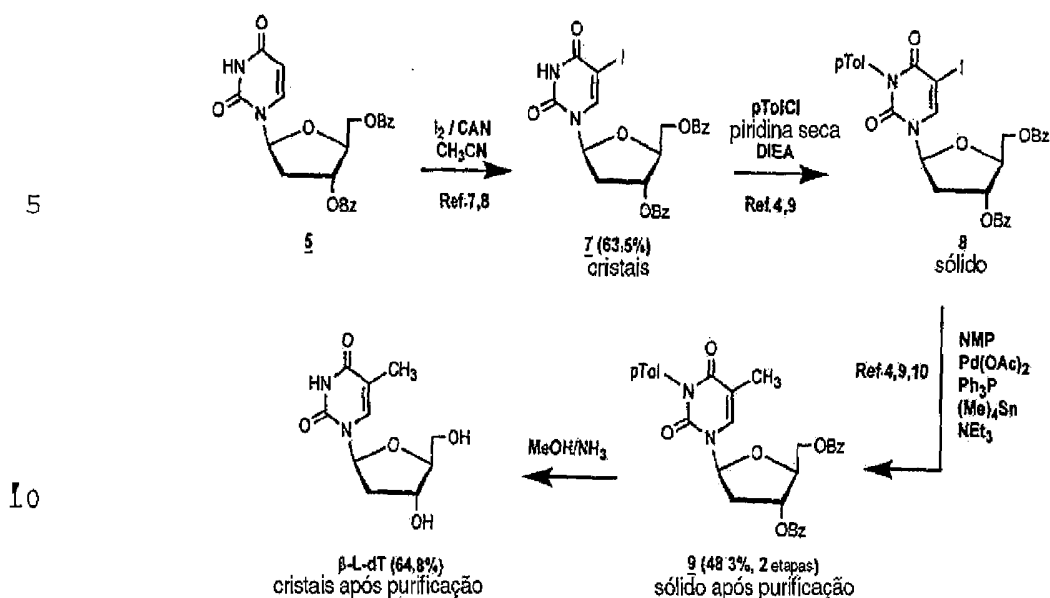
**2'-Deóxi- $\beta$ -L-citosina**

Uma solução do composto 6 (7,3 g, 0,016 mol) em  
 5 metanol saturado com amônia (73 ml) foi aquecida a 100°C em  
 um cilindro de aço inoxidável por 3 horas. Após  
 resfriamento cuidadoso o solvente foi evaporado sob pressão  
 reduzida. Uma solução aquosa do resíduo foi lavada com  
 acetato de etila e evaporada a secura. Tal procedimento foi  
 10 realizado em nove outras amostradas (cada uma com 7,3 g) do  
 composto 6 (quantidade total de 6 = 73 g). Os dez resíduos  
 foram combinados, diluídos com etanol absoluto e resfriados  
 para dar 7 como cristais. Traços de benzamida foram  
 eliminados dos cristais de 6 por um procedimento de  
 15 extração de sólido-líquido (em refluxo em acetato de etila  
 por 1 hora). Rendimento, 28,75 g (78,6%) do composto 6;  
 ponto de fusão 141-145°C;  $^1\text{H NMR}$  (DMSO)  $\delta$  ppm 8,22 e 8,00  
 (2 br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7,98 (d, 1H, H-6,  $J = 7,59$  Hz), 6,12 (t,  
 1H, H-1',  $J = 6,5$  Hz e  $J = 7,6$  Hz), 5,89 (d, 1H, H-5,  $J =$   
 20 7,59 Hz), 5,3 (br s, 1H, OH-3'), 5,1 (br s, 1H, OH-5'), 4,2  
 (m, 1H, H-3'), 3,80 (q, 1H, H-4',  $J = 3,6$  Hz e  $J = 6,9$  Hz),  
 3,6-3,5 (m, 2H, H-5', H-5''), 2,2-2,0 (m, 2H, H-2', H-2'');  
 FAB<0, (GT) m/e 226 (M-H) $^-$ , 110 (B) $^-$ ; FAB>0 (GT) 228 (M+H) $^+$ ,  
 112 (B+2H) $^+$ ;  $[\alpha]_D^{20}$  -56,48 ( $c = 1,08$  em DMSO); UV (pH 7)  $\lambda_{\text{max}}$   
 25 = 270 nm ( $\epsilon = 10000$ ).

**Reagente:**

Amônia metanólica: previamente saturada e -5°C,  
 parada, e mantida em um congelador.

Exemplo 5 Síntese estereoseletiva de 2'-deóxi-  
 30  $\beta$ -L-Timidina ( $\beta$ -L-dT)



### 3',5'-Di-O-benzoil-2'-deóxi-5-iodo- $\beta$ -L-uridina (7)

Uma mistura do composto **5** (105,8 g, 0,242 mol),  
 15 iodo (76,8 g), CAN (66,4 g) e acetonitrila (2550 ml) foi  
 agitada a 80°C por 3 horas, então a mistura de reação foi  
 resfriada a temperatura ambiente conduzindo à cristalização  
 do composto **7** (86,6 g, 63,5%); ponto de fusão 192-194-°C;  
<sup>1</sup>H NMR (DMSO)  $\delta$  ppm. 8,34 (s, 1H, NH), 8,2-7,2 (m, 11H, 2  
 20 C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO, H-6), 6,31 (q, 1H, H-1', J = 5,5 Hz e J = 8,7 Hz),  
 5,5 (m, 1H, H-3'), 4,7 2H, H-5', H-5''), 4,5 (m, 1H,  
 H-4'), 2,7 (m, 1H, H-2'), 2,3 (m, 1H, H-2''); FAB<0, (GT)  
 m/e 561 (M-H)<sup>-</sup>, 237 (B)<sup>-</sup>; FAB>0 (GT) 563 (M+H)<sup>+</sup>;  $[\alpha]_D^{20}$   
 39,05 (c = 1,05 em DMSO); UV (EtOH 95)  $\nu_{max}$ , = 281 nm ( $\epsilon$  =  
 25 9000),  $\nu_{min}$  = 254 nm ( $\epsilon$  = 4000),  $\nu_{max}$  = 229 nm ( $\epsilon$  = 31000);  
 Análise calculada para C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: C, 49,13 H, 3,41 N, 4,98  
 1, 22,57, Encontrado: C, 49,31 H, 3,53 N, 5,05 1, 22,36.

### Reagentes:

Iodo: Fluka, 99,8%, ref. 57650

Nitrato de cério amônio (CAN): Aldrich, >98,5%,  
ref. 21.547-3

3',5'-Di-O-benzoil-2'-deóxi-3-N-toluoil- $\beta$

5 -L-timidina (9)

A uma solução do composto 7 (86,6 g, 0,154 mol) em piridina anidra (1530 ml) contendo N-etildiisopropilaminas (53,6 ml) foi adicionado, em porções a 0°C, cloreto de p-toluoila (40,6 ml). A mistura de reação foi agitada por 2  
10 horas a temperatura ambiente, então água foi adicionada para parar a reação e a mistura de reação foi extraída com cloreto de metileno. A fase orgânica foi lavada com água, seca sobre sulfato de sódio e evaporada a secura para obter  
15 3',5'-di-O-benzoil-2'-deóxi-3-N-toluoil-5-iodo- $\beta$ -L-uridina bruta (8) que pode ser usada na próxima etapa sem purificação adicional.

Uma solução da mistura bruta 8, acetato de paládio (3,44 g), trifenilfosfina (8,0 g) em N-metilpirolidinona (1375 ml) com trietilamina (4,3 ml) foi agitada a  
20 temperatura ambiente por 45 minutos. Então, tetrametilestanho (42,4 ml) foi adicionado gota a gota a 0°C sob argônio. Após agitação a 100-110°C por toda a noite, a mistura de reação foi derramada em água e extraída com éter dietila. A solução orgânica foi seca sobre sulfato  
25 de sódio e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica gel [eluente: gradiente escalonado de acetato de etila (0-10%) em tolueno] para obter o composto 9 como uma espuma (42,3 g, 48,3% para as 2 etapas). <sup>1</sup>H NMR (DMSO)  $\delta$  ppm. 8,3-7,2  
30 (m, 15H, 2 C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO, 1 CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO, H-6), 6,29 (t, 1H, H-1', J =

7,0 Hz), 5,7 (m, 1H, H-3'), 4,7-4,5 (m, 3H, H-5', H-5'', H-4'), 2,7-2,6 (m, 2H, H-2', H-2''); FAB<0, (GT) m/e 567 (M-H)<sup>-</sup> 449 (M-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO)<sup>-</sup>, 243 (B)<sup>-</sup>, 121 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COO)<sup>-</sup>; FAB>0 (GT) 1137 (2M+H)<sup>+</sup>, 569 (M+H)<sup>+</sup>, 325 (M-B)<sup>-</sup>, 245 (B+2H)<sup>+</sup>, 119 (CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO)<sup>+</sup>.

Reagentes:

Cloreto de p-toluoila, Aldrich, 98%, ref. 10.663-1

Diisopropiletilamina: Aldrich, >99,5%, ref.

38.764-9

10 N-metilpirrolidinona: Aldrich, >99%, ref. 44.377-8

Acetato de paládio: Aldrich, >99,98%, ref. 37.987-5

Trifenilfosfina: Fluka, >97%, ref. 93092

Tetrametilestanho: Aldrich, >99%, ref. 14.647-1

2'-Deóxi-β-L-timidina

15 Uma solução do composto 9 (42,3 g, 0,074 mol) em metanol saturado com amônia (1850 ml) foi agitada a temperatura ambiente por dois dias. Após evaporação do solvente, o resíduo foi diluído com água e lavado várias vezes com acetato de etila. A camada aquosa foi separada,  
 20 evaporada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia de coluna sobre sílica gel [eluente: gradiente escalonado de metanol (0-10%) em cloreto de metileno] para obter 2'-deóxi-β-L-timidina pura (11,62 g, 64,8%) que foi cristalizado de etanol; ponto de fusão  
 25 185-188°C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ ppm 11,3 (s, 1H, NH), 7,70 (s, 1H, H-6), 6,2 (pt, 1H, H-1'), 5,24 (d, 1H, OH-3', J = 4,2 Hz), 5,08 (t, 1H, OH-5', J = 5,1 Hz), 4,2 (m, 1H, H-3'), 3,7 (m, 1H, H-4'), 3,5-3,6 (m, 2H, H-5', H-5''), 2,1-2,0 (m, 2H, H-2', H-2''); FAB<0, (GT) m/e 483 (2M-H)<sup>-</sup>, 349 (M+T-H)<sup>-</sup>,  
 30 241 (M-H)<sup>-</sup>, 125 (B)<sup>-</sup>; FAB>0 (GT) 243 (M+H)<sup>+</sup>, 127 (B+2H)<sup>+</sup>; )<sup>+</sup>;

$[\alpha]_D^{20} - 13,0$  ( $c = 1,0$  em DMSO); UV (pH 1)  $\lambda_{max}$ , = 267 nm ( $\epsilon = 9700$ ),  $\lambda_{min} = 254$  nm ( $\epsilon = 2000$ ).

**Reagente:**

Amônia metanólica: previamente saturada a  $-5^\circ\text{C}$ ,  
5 parada e mantida em congelador.

**Exemplo 6 - Síntese estereoseletiva de 2'-deóxi- $\beta$ -L-inosina ( $\beta$ -L-dI)**

$\beta$ -L-dI foi sintetizado por desaminação de 2'-  
deóxi- $\beta$ -L-adenosina ( $\beta$ -L-dA) seguindo um procedimento  
10 descrito anteriormente nas séries 9-D-glucopiranosila (Ref.  
I. Iwai, T. Nishimura e B. Shimizu, Synthetic Procedures in  
Nucleic Acid Chemistry, W. W. Aorbach e R. S. Tipson, eds.,  
John Wiley & Sons, Inc. New York, vol. 1, pp. 135-138  
(1968)).

15



20

Assim, uma solução de  $\beta$ -L-dA (200 mg) em uma  
mistura de ácido acético (0,61 ml) e água (19 ml) foi  
aquecida com nitreto de sódio (495 mg), e a mistura foi  
agitada a temperatura ambiente por toda a noite. A solução  
25 foi então evaporada a secura sob pressão diminuída. Uma  
solução aquosa do resíduo foi aplicada a uma coluna de  
resina de troca de íon IR-120 ( $\text{H}^+$ ) e a coluna foi eluída  
com água. Frações apropriadas foram coletadas e evaporadas  
a secura para fornecer  $\beta$ -L-dI puro que foi cristalizado de  
30 metanol (106 mg, 53% rendimento não otimizado): ponto de

fusão = 209°C-211°C; UV (H<sub>2</sub>O),  $\lambda_{\max}$  = 247 nm; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) = 8,32 e 8,07 (2s, 1H cada, H-2 e H-8), 6,32 (pt, 1H, H-1; J=6,7 Hz), 4,4 (m, 1H, H-3'), 3,9 (m, 1H, H-4'), 3,7-3,4 (m, 2H parcialmente obscurecido por HOD, H-5',5"), 2,6 e 2,3 (2m, 1H cada, H-2' e H-2"); espectro de massa (glicerol-tioglicerol maduro, 1:1 v/v), FAB>0: 253 (m+H)<sup>+</sup>, 137 (base + 2H)<sup>+</sup>; FAB<0: 251 (m-H)<sup>-</sup>, 135 (base)<sup>-</sup>;  $[\alpha]_D^{20}$  = +19,3 (-c 0,88, H<sub>2</sub>O).

#### Atividade Anti-HBV dos Compostos Ativos

10 A capacidade dos compostos ativos de inibirem o desenvolvimento dos vírus em culturas de célula 2.2.15 (células HepG2 transformadas com vírus da hepatite) pode ser avaliada conforme descrito em detalhes acima.

Um sumário e descrição do ensaio para efeitos anti-15 viróticos neste sistema de cultura e a análise do DNA de HBV foram descritos (Korba e Milman, 1991, Antiviral Res., 15:217). As avaliações anti-viróticas são realizadas em duas passagens separadas das células. Todas as poças, em todas as placas, são semeadas na mesma densidade e ao mesmo 20 tempo.

Devido às variações inerentes nos níveis de ambos DNA intracelular e HBV extracelular, apenas depressões maiores do que 3,5 vezes (para DNA de vírus de HBV) ou 3,0 vezes (para intermediários de replicação de DNA de HBV) dos 25 níveis médios para estas formas de DNA de HBV nas células não tratadas são considerados como sendo estatisticamente significantes (P<0,05). Os níveis de DNA de HBV integrados em cada preparação de DNA celular (que permanece constante em uma base por célula nestes experimentos) são usados para 30 calcular os níveis de formas de DNA de HBV, pelo que,

garantindo que quantidades iguais de DNA celular sejam comparadas entre amostras separadas.

Valores típicos para DNA de vírus de HBV extracelular nas células não tratadas variam de 50 a 150 5 pg/ml de meio de cultura (média de aproximadamente 76 pg/ml). Os intermediários de replicação de DNA de HBV nas células não tratadas variam de 50 a 100 µg/pg de DNA de célula (média de aproximadamente 74 pg/µg DNA de célula). Em geral, as depressões nos níveis de DNA de HBV 10 intracelular devido ao tratamento com compostos anti-viróticos são menos pronunciadas, e ocorrem mais lentamente, do que as depressões nos níveis do DNA de vírus de HBV (Korba e Milman, 1991, Antiviral Res., 15:217).

A maneira pela qual as análises de hibridização são 15 realizadas para estes experimentos resultam em uma equivalência de aproximadamente 1,0 pg de DNA de HBV intracelular para 2-3 cópias genômicas por célula e 1,0 pg/ml de DNA de HBV extracelular para  $3 \times 10^5$  partículas de vírus/ml.

#### 20 Exemplo 7

A capacidade dos derivados de trifosfato de  $\beta$ -L-dA,  $\beta$ -L-dC,  $\beta$ -L-dU,  $\beta$ -L-2'-dG,  $\beta$ -L-dI e  $\beta$ -L-dT em inibir a hepatite B foi testada. A tabela 1 descreve as atividades inibidoras comparativas dos trifosfatos de  $\beta$ -L-dT ( $\beta$ -dT-TP),  $\beta$ -L-dC ( $\beta$ -L-dC-TP),  $\beta$ -L-dU ( $\beta$ -L-dU-TP) e  $\beta$ -L-dA ( $\beta$ -L-dA-TP) em polimerase de DNA de vírus da hepatite de marmota 25 (WHV), polimerases de DNA humano  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .

Tabela 1

Inibidor	Pol. De DNA de WHV IC <sub>50</sub>	Pol. de DNA $\alpha$ K <sub>i</sub> <sup>b</sup> (µM)	Pol. De DNA $\beta$ K <sub>i</sub> <sup>b</sup> (µM)	Pol. de DNA $\gamma$ K <sub>i</sub> <sup>b</sup> (µM)

$\beta$ -L-dT-TP	0,34	>100	>100	>100
$\beta$ -L-dA-TP	2,3	>100	>100	>100
$\beta$ -L-dC-TP	2,0	>100	>100	>100
$\beta$ -L-dU-TP	8	>100	>100	>100

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>: 50% de concentração inibidora

<sup>b</sup> Valor K<sub>i</sub> foi determinado usando DNA ativado de timo de bezerro como gabarito-primer e dATP como substrato. Os inibidores foram analisados por análise de manchamento  
5 Dixon. Sob estas condições, o K<sub>m</sub> médio de polimerase de DNA humano  $\alpha$  para dATP foi calculado como aproximadamente 2,6  $\mu$ M. A polimerase de DNA humano  $\beta$  exibiu um estado firme de K<sub>m</sub> de 3,33  $\mu$ M para dATP. A polimerase de DNA humano  $\gamma$  inibiu um K<sub>m</sub> firme de 5,2  $\mu$ M.

10

### Exemplo 8

A atividade do vírus anti-hepatite B de  $\beta$ -L-dA,  $\beta$ -L-dC,  $\beta$ -L-dU,  $\beta$ -L-2'-dG e  $\beta$ -L-dT foi testada em células Hep G-2 (2,2,15) transfectadas. A tabela 2 ilustra o efeito de  
15  $\beta$ -L-dA,  $\beta$ -L-dC,  $\beta$ -L-dU e  $\beta$ -L-dT contra replicação do vírus da hepatite B em células Hep G-2 (2,2,15) transfectadas.

Tabela 2

Composto	Vírus <sup>a</sup> de HBV EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	HBV Ri <sup>b</sup> EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Citotoxicidade IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Índice de Seletividade IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>
$\beta$ -L-dT	0,05	0,05	>200	>4000
$\beta$ -L-dC	0,05	0,05	>200	>4000
$\beta$ -L-dA	0,10	0,10	>200	>2000
$\beta$ -L-dI	1,0	1,0	>200	>200
$\beta$ -L-dU	5,0	5,0	>200	>40

<sup>a</sup> DNA extracelular

<sup>b</sup> Intermediários replicativos (DNA intracelular)

**Exemplo 9**

O efeito de  $\beta$ -L-dA,  $\beta$ -L-dC e  $\beta$ -L-dT em combinação com o desenvolvimento da-hepatite B foi medido nas células 2,2,15. Os resultados são fornecidos na Tabela 3.

5

**Tabela 3**

Combinação	Razão	EC <sub>50</sub>
L-dC + L-dT	1:3	0,023
L-dC + L-dT	1:1	0,053
L-dC + L-dT	3:1	0,039
L-dC + L-dA	1:30	0,022
L-dC + L-dA	1:10	0,041
L-dC + L-dA	1:3	0,075
L-dT + L-dA	1:30	0,054
L-dT + L-dA	1:10	0,077
L-dT + L-dA	1:3	0,035

Cada combinação produziu atividade anti-HBV que era sinérgica. Além disto, a combinação de L-dA + L-dC + L-dT era também sinérgica neste modelo.

**Exemplo 10**

10

A inibição da hepatite B nas células 2,2,15 por  $\beta$ -L-dA e  $\beta$ -L-dC, sozinha e em combinação foi medida. Os resultados são mostrados na Tabela 4.

**Tabela 4**

<sup>a</sup> $\beta$ -L-2'-deóxi-adenosina ( $\mu$ M)	<sup>b</sup> $\beta$ -L-2'-deóxi-citidina ( $\mu$ M)	% de inibição	°C.I.
0,5		90	
0,05		24	
0,005		1	
	0,5	95	

	0,05	40	
	0,005	10	
0,05	0,05	80	0,34
0,05	0,005	55	0,20
0,05	0,0005	50	0,56
0,005	0,05	72	0,35
0,005	0,005	54	0,35
0,005	0,0005	30	0,16
0,0005	0,05	50	0,83
0,0005	0,005	15	0,28
0,0005	0,0005	0	N.A.

<sup>a</sup> $\beta$ -L-2'-deóxi-adenosina: IC<sub>50</sub> = 0,09  $\mu$ M

<sup>b</sup> $\beta$ -L-2'-deóxi-citidina: IC<sub>50</sub> = 0,06  $\mu$ M

<sup>c</sup>Valores de índices de combinação indicam efeito de sinergismo (<1), efeito aditivo (=1) e efeito antagonista

5 (>1).

#### Exemplo 11

Foi determinada a eficácia de L-dA, L-dT e L-dC contra infecção por hepadnavírus em marmotas (*Marmota monax*) infectadas com vírus da hepatite de marmota (WHV).  
 10 Este modelo animal de infecção por HBV é amplamente aceito e provou ser útil para avaliação nos agentes anti-viróticos direcionados contra HBV.

Protocolo:

15 Grupos experimentais (n = 3 por grupo de animais/medicamento, n = animais/controle)

Grupo 1 veículo de controle

Grupo 2 lamivudina (3TC) (10 mg/kg/dia)

Grupos 3-6 L-dA (0,01, 0,1, 1,0, 10 mg/kg/dia)

Grupos 7-10 L-dT (0,01, 0,1, 1,0, 10 mg/kg/dia)

Grupos 11-14 L-dC (0,01, 0,1, 1,0, 10 mg/kg/dia)

Os medicamentos foram administrados por gavagem oral uma vez ao dia, e as amostras de sangue retiradas nos dias 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28 e nos dias de pós-tratamento +1, +3, +7, +14, +28 e +56. A avaliação da atividade e toxicidade baseou-se na redução de DNA de WHV em soro: manchamento por ponto, PCR quantitativo.

Os resultados são ilustrados na figura 3 e Tabela 5.

10

Tabela 5

Atividade Anti-Virótica de LdA, LdT, LdC em Modelo de Marmota de Infecção Crônica por HBV

	Controle	LdA	LdT	LdC
Dia	ng DNA-WHV por ml de soro <sup>1,2</sup>			
0	381	436	423	426
1	398	369	45	123
3	412	140	14	62
7	446	102	6	46
14	392	74	1	20

<sup>1</sup> LdA, LdT, LdC administrados oralmente uma vez ao dia a 10 mg/kg.

15

<sup>2</sup> Limite de detecção é de 1 ng/ml de DNA-WHV por ml de soro.

Os dados mostram que L-dA, L-dT e L-dC são altamente ativos neste modelo *in vivo*. Primeiro, a carga virótica é reduzida para níveis não detectáveis (L-dT) ou próximo a não detectáveis (L-dA, L-dC). Segundo, L-dA, L-dT e L-dC são mostrados como sendo mais ativos do que 3TC (lamivudina) neste modelo. Terceiro, a religação virótica não é detectada por pelo menos duas semanas após a retirada

20

de L-dT. Quarto, as curvas de resposta a dose sugerem que um aumento na dose de L-dA e L-dC mostraria atividade anti-virótica semelhante a de L-dT. Quinto, todos os animais recebendo os medicamentos ganharam peso e nenhuma toxicidade relacionada ao medicamento foi detectada.

#### Toxicidade dos Compostos

Análises de toxicidade foram realizadas para avaliar se quaisquer efeitos anti-viróticos observados são devidos ao efeito geral na viabilidade da célula. O processo usado é a medição do efeito de  $\beta$ -L-dA,  $\beta$ -L-dC e  $\beta$ -L-dT no desenvolvimento de ensaios clorogênicos de medula óssea humana, quando comparada à Lamuvidina. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6

Composto	CFU-GM ( $\mu$ M)	BFU-E ( $\mu$ M)
$\beta$ -L-dA	>10	>10
$\beta$ -L-dC	>10	>10
$\beta$ -L-dT	>10	>10
$\beta$ -L-dU	>10	>10
Lamuvidina	>10	>10

#### Preparação de Composições Farmacêuticas

Seres humanos que sofrem de quaisquer distúrbios descritos aqui, incluindo hepatite B, podem ser tratados por administração ao paciente de uma quantidade eficaz de um  $\beta$ -2'-deóxi- $\beta$ -L-eritro-pentofuranonucleosídeo, por exemplo,  $\beta$ -L-2'-deoxiadenosina,  $\beta$ -L-2'-deoxicitidina,  $\beta$ -L-2'-deoxiuridina,  $\beta$ -L-2'-deoxiguanosina ou  $\beta$ -L-2'-deoxitimidina ou um pro-medicamento farmacêuticamente aceitável ou sal do mesmo, em presença de um veículo farmacêuticamente aceitável ou diluente. Os materiais

ativos podem ser administrados por qualquer via apropriada, por exemplo, oral, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutânea ou topicamente, em forma líquida ou de sólido.

O composto ativo é incluído no veículo farmacologicamente aceitável ou diluente em uma quantidade suficiente para liberar ao paciente uma quantidade terapêuticamente ativa de composto para inibir replicação virótica *in vivo*, sem causar efeitos tóxicos sérios no paciente tratado. "Quantidade inibidora" significa uma quantidade de ingrediente ativo suficiente para exercer um efeito inibidor conforme medido, por exemplo, por um ensaio, tal como os descritos aqui.

Uma dose preferida do composto para todas as condições mencionadas acima estará na faixa de cerca de 1 a 50 mg/kg, preferivelmente 1 a 20 mg/kg, de peso corpóreo por dia, mais genericamente de 0,1 a cerca de 100 mg por quilograma de peso corpóreo do recipiente por dia. A faixa de dosagem eficaz do pro-medicamento farmacologicamente aceitável pode ser calculada com base no peso do nucleosídeo de origem a ser liberado. Se o pro-medicamento exibe propriamente atividade, a dosagem eficaz pode ser estimada como acima usando o peso do pro-medicamento, ou por outro meio conhecido do versado na técnica.

O composto é convenientemente administrado em unidade de qualquer forma de dosagem apropriada, porém não limitado a um que contenha 7 a 3000 mg, preferivelmente 70 a 1400 mg de ingrediente ativo por forma de dosagem unitária. A dosagem oral de 50-1000 mg é geralmente conveniente.

De forma ideal, o ingrediente ativo seria administrado para obter concentrações pico de plasma do composto ativo de cerca de 0,2 a 70  $\mu\text{M}$ , preferivelmente cerca de 1,0 a 10  $\mu\text{M}$ . Isto pode ser obtido, por exemplo, 5 por injeção intravenosa de uma solução de 0,1 a 5% do ingrediente ativo, opcionalmente em salmoura, ou administrado como um bolo do ingrediente ativo.

A concentração do composto ativo na composição de medicamento dependerá das taxas de absorção, inativação e 10 excreção do medicamento, bem como outros fatores conhecidos do versado na técnica. Deve ser observado que os valores de dosagem também variarão com a gravidade da condição a ser aliviada. Deve ser entendido, adicionalmente, que para qualquer indivíduo específico, os regimes de dosagem 15 específicos devem ser ajustados com o tempo, de acordo com a necessidade do indivíduo e do julgamento profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições e que as faixas de concentração estabelecidas aqui são apenas exemplares e não se destinam a limitar o 20 escopo ou prática da composição reivindicada. O ingrediente ativo pode ser administrado uma vez, ou pode ser dividido em várias doses menores a serem administradas em intervalos de tempo que variam.

Um modo preferido de administração do composto 25 ativo é o oral. As composições orais geralmente incluirão um diluente inerte ou um veículo comestível. Eles podem ser encobertas nas cápsulas de gelatina ou prensadas em comprimidos. Para a finalidade da administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser incorporado com excipientes 30 e usado na forma de comprimidos, trocisco ou cápsulas.

Agentes de ligação farmacologicamente compatíveis e/ou materiais coadjuvantes podem ser incluídos como parte da composição.

Os comprimidos, pílulas, cápsulas, trociscos e semelhantes podem conter quaisquer um dos ingredientes ou compostos que se seguem de uma natureza semelhante: um ligante tal como, celulose microcristalina, goma tragacanto ou gelatina; um excipiente, tal como amido ou lactose, um agente desintegrante, tal como, ácido algínico, Primogel, ou amido de milho; um lubrificante, tal como, estearato de magnésio ou Sterotes; um glidante, tal como, dióxido de silício coloidal; um agente adoçante, tal como, sacarose ou sacarina; ou um agente aromatizante tal como, menta, salicilato de metila ou aromatizante de laranja. Quando a forma unitária de dosagem é uma cápsula, ela pode conter, além do material do tipo acima, um veículo líquido, tal como um óleo graxo. Além disto, as formas de unidade de dosagem podem conter vários outros materiais que modificam a forma física da unidade de dosagem, por exemplo, revestimentos de açúcar, shelac, ou outros agentes entéricos.

O composto pode ser administrado como um componente de um elixir, suspensão, xarope, obreia, goma de mascar ou semelhante. Um xarope pode conter, além dos compostos ativos, sacarose como um agente adoçante e determinados preservantes, corantes e aromatizantes.

O composto ou um derivado farmacologicamente aceitável ou sais dos mesmos pode também ser misturado com outros materiais ativos que não fornecem a ação desejada ou com materiais que suplementam a ação desejada, tal como,

antibióticos, anti-fungos, anti-inflamatórios, inibidores de protease ou outro nucleosídeo ou agentes antivírus não nucleosídeos. Soluções ou suspensões usadas para aplicação parenteral, intradérmica, subcutânea ou tópica podem  
5 incluir os componentes que se seguem: um diluente estéril, tal como água para injeção, solução de salmoura, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; agentes anti-bactérias, tais como, álcool benzilo ou metil parabenos; antioxidantes,  
10 tais como, ácido ascórbico ou bissulfeto de sódio, agentes quelantes, tais como, ácido etilenodiaminotetraacético; tampões, tais como, acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste da toxicidade, tais como, cloreto de sódio ou dextrose. A preparação de origem pode ser embutida  
15 em ampolas, seringas descartáveis ou ampolas de doses múltiplas feitas de vidro ou plástico.

Se administrados intravenosamente, os veículos preferidos são salmoura fisiológica ou salmoura tamponada de fosfato (PBS).

20 Em uma concretização preferida, os compostos ativos são preparados com veículos que protegerão o composto contra eliminação rápida do corpo, tais como, formulação de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas de liberação microencapsulados. Polímeros biodegradáveis,  
25 biocompatíveis podem ser usados, tais como, etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido poliacético. Processos para preparação de tais formulações estarão claros aos versados na técnica. Estes materiais podem também ser obtidos  
30 comercialmente da Alza Corporation.

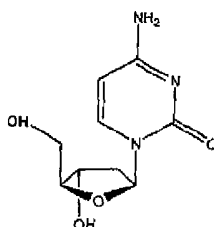
Suspensões lipossômicas (incluindo lipossomos dirigidos às células infectadas com anticorpos monoclonais para antígenos viróticos) são também preferidos como veículos farmacêuticamente aceitáveis. Estes podem ser  
5 preparados de acordo com os processos conhecidos dos versados na técnica, por exemplo, conforme descrito na patente US número 4.522.811. Por exemplo, formulações lipossômicas podem ser preparadas por dissolução de lipídeo(s) apropriado(s) (tais como, estearoil fosfatidil  
10 etanolamina, estearoil fosfatidil colina, arachadoil fosfatidil colina e colesterol) em um solvente inorgânico, que é então evaporado, deixando atrás uma película fina de lipídeo seco na superfície do recipiente. Uma solução aquosa do composto ativo ou seus derivados monofosfato,  
15 difosfato e/ou trifosfato é então introduzida no recipiente. O recipiente é então agitado manualmente para o material de lipídeo livre dos lados do recipiente e para dispersar os agregados de lipídeo, pelo que, formando a suspensão lipossômica.

20 Esta invenção foi descrita com referência às suas concretizações preferidas. Variações e modificações da invenção, serão óbvios aos versados na técnica da descrição detalhada precedente da invenção. Será entendido que todas as variações e modificações podem estar incluídas dentro do  
25 escopo desta invenção.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma quantidade efetiva de um  $\beta$ -L-2'-desoxinucleosídeo possuindo a fórmula:

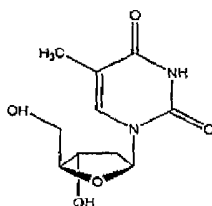
5



ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, caracterizado por ser na produção de um medicamento para o tratamento de infecção por hepatite B em um hospedeiro.

2. Uso de uma quantidade efetiva de um  $\beta$ -L-2'-desoxinucleosídeo possuindo a fórmula:

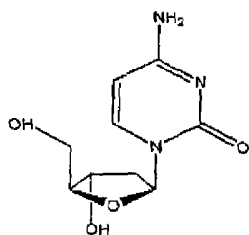
15



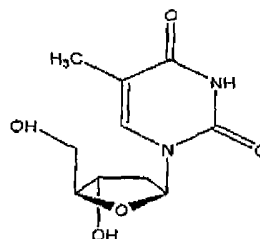
ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, caracterizado por ser na produção de um medicamento para o tratamento de infecção por hepatite B em um hospedeiro.

3. Uso de uma quantidade efetiva da combinação dos seguintes  $\beta$ -L-2'-desoxinucleosídeos possuindo a fórmula:

25



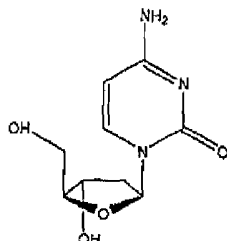
e



30 ou um sal farmacologicamente aceitável dos mesmos,

caracterizado por ser na produção de um medicamento para o tratamento de infecção por hepatite B em um hospedeiro.

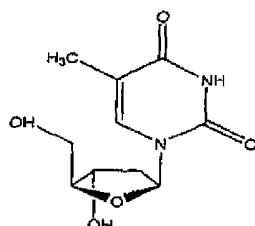
4. Uso de uma quantidade efetiva de um  $\beta$ -L-2'-  
5 desoxinucleosídeo possuindo a fórmula:



10 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, ou em  
combinção ou alternância com uma quantidade efetiva de  
um composto selecionado de um grupo consistindo em  $\beta$ -L-  
2'-hidroximetil-5-(citosin-1-il)-1,3-oxatiolano (3TC), cis-2-  
hidroxietil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano (FTC),  $\beta$ -L-2'-  
15 fluoro-5-metil-arabinofuranolil-uridina (L-FMAU),  $\beta$ -D-2,6-  
diaminopurina dioxolano (DAPD), fanciclovir, penciclovir, 2-amino-  
1,9-diidro-9-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)-2-metilenociclopentil]-  
6H-purin-6-ona (entecavir, BMS-200475), 9-[2-(fosfono-  
metóxi)etil]adenina (PMEA, adefovir, dipivoxil); lobucavir,  
20 ganciclovir e ribavirina; caracterizado por ser na produção  
de um medicamento para o tratamento de infecção por hepatite B  
em um hospedeiro.

5. Uso de uma quantidade efetiva de um  $\beta$ -L-2'-  
desoxicitidina possuindo a fórmula:

25



ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, ou em  
30 combinação ou alternância com uma quantidade efetiva de

um composto selecionado de um grupo consistindo em  $\beta$ -L-2'-hidroximetil-5-(citosin-1-il)-1,3-oxatiolano (3TC), cis-2-hidroximetil-5-(5-fluorocitosin-1-il)-1,3-oxatiolano (FTC),  $\beta$ -L-2'-fluoro-5-metil-arabinofuranolil-uridina (L-FMAU),  $\beta$ -D-2,6-diaminopurina dioxolano (DAPD), fanciclovir, penciclovir, 2-amino-1,9-diidro-9-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)-2-metilenociclopentil]-6H-purin-6-ona (entecavir, BMS-200475), 9-[2-(fosfono-metóxi)etil]adenina (PMEA, adefovir, dipivoxil); lobucavir, ganciclovir e ribavirina, caracterizado pelo fato de ser na produção de um medicamento para o tratamento de infecção por hepatite B em um hospedeiro.

6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado pelo fato o  $\beta$ -L-2'-desoxinucleosídeo está pelo menos 95% na sua forma enantiomérica designada.

7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que o  $\beta$ -L-2'-desoxinucleosídeo é administrado em um carreador farmacologicamente aceitável.

8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato que o carreador farmacologicamente aceitável é adequado para a administração oral.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o carreador farmacologicamente aceitável é adequado para a administração intravenosa.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o carreador farmacologicamente aceitável é adequado para a

administração parenteral.

11. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o carreador farmacologicamente aceitável é adequado para a  
5 administração intradérmica.

12. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o carreador farmacologicamente aceitável é adequado para a administração subcutânea.

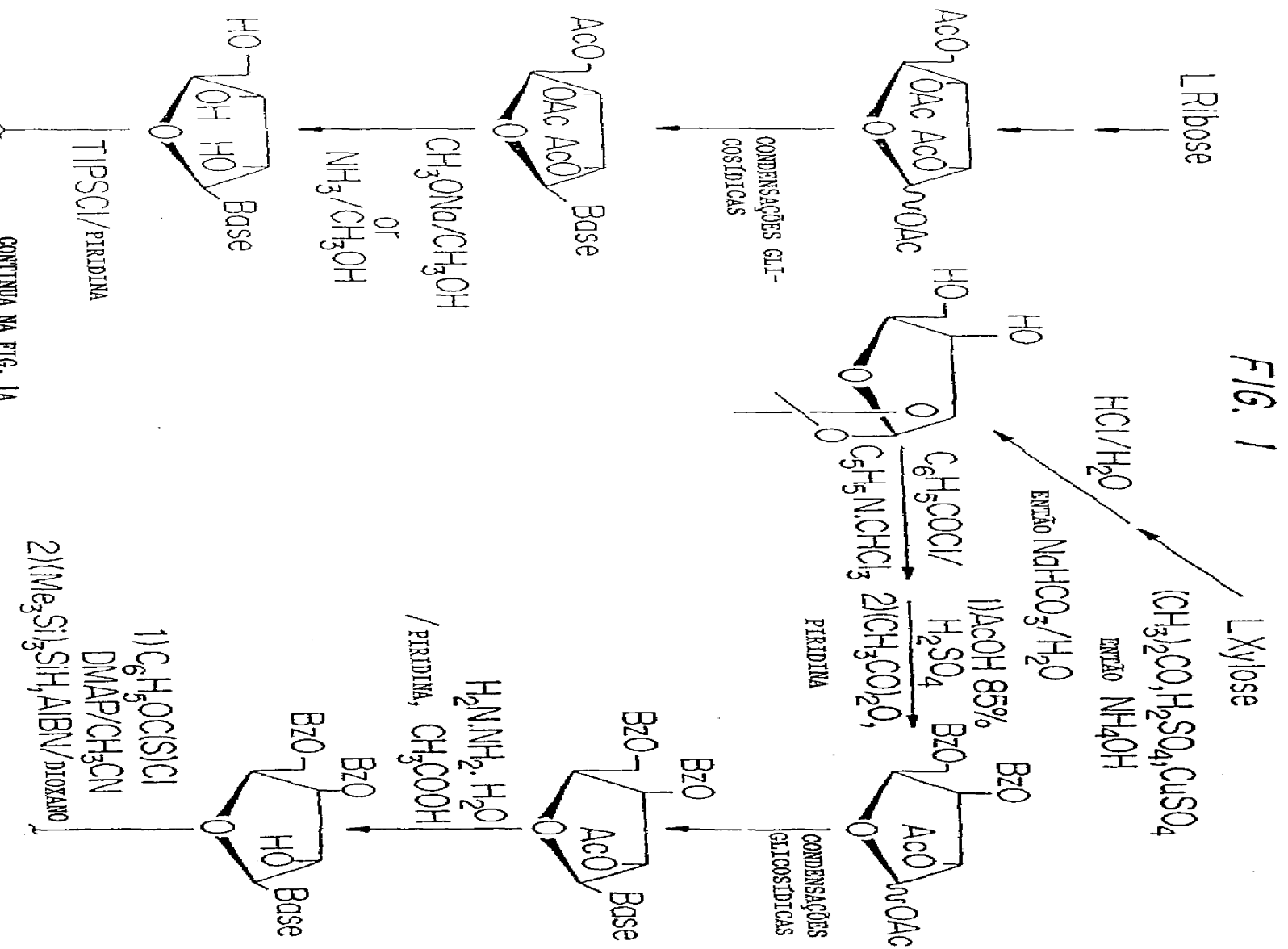
10 13. Uso, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o carreador farmacologicamente aceitável é adequado para a administração tópica.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 7,  
15 caracterizado pelo fato de que o  $\beta$ -L-2'-desoxinucleosídeo está na forma de uma dose unitária.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a dose unitária contém de 10 a 1500 mg do  $\beta$ -L-2'-desoxinucleosídeo.

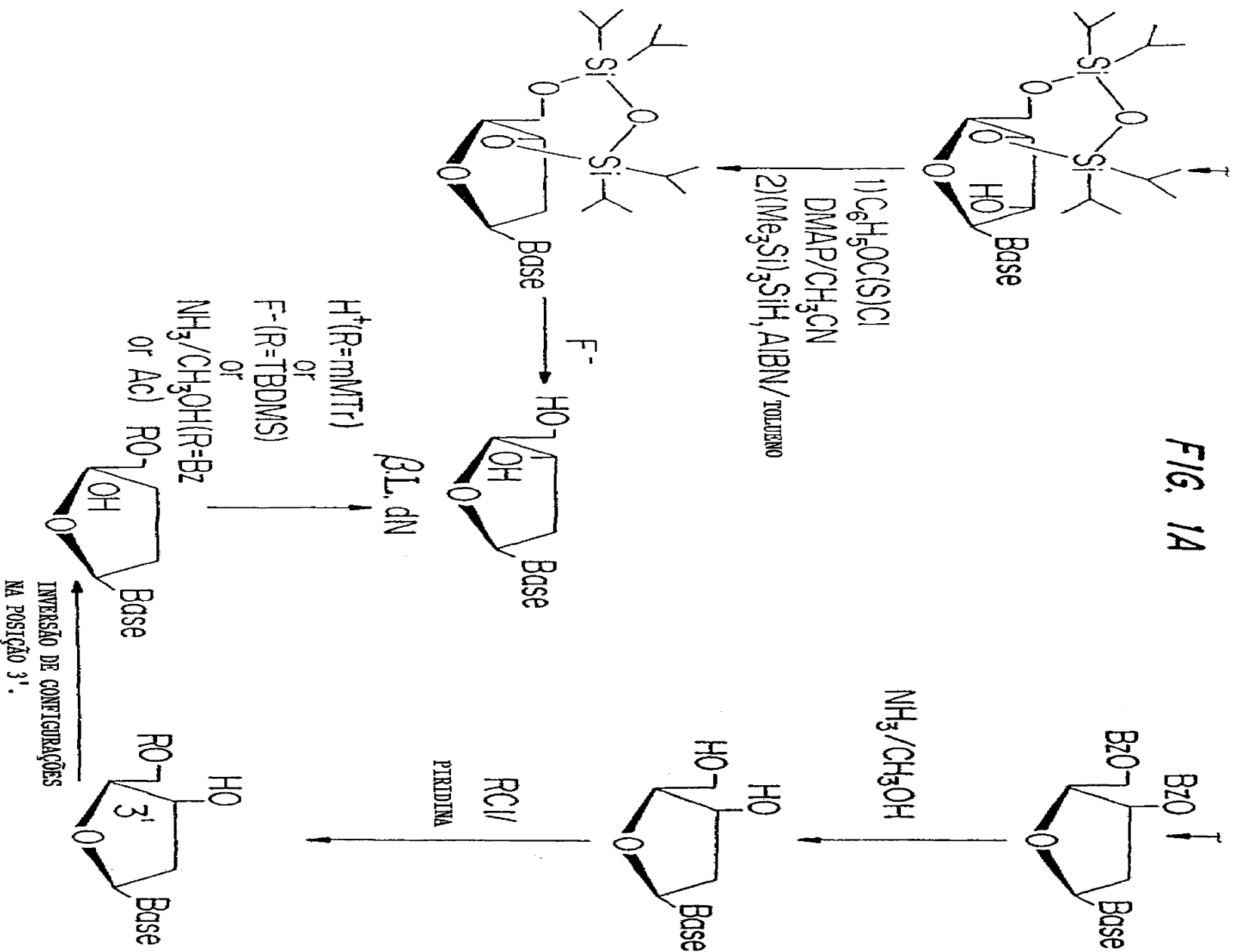
20 16. Uso de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que a dose unitária é um comprimido ou cápsula.

17. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,  
25 13, 14, 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que o hospedeiro é um humano.

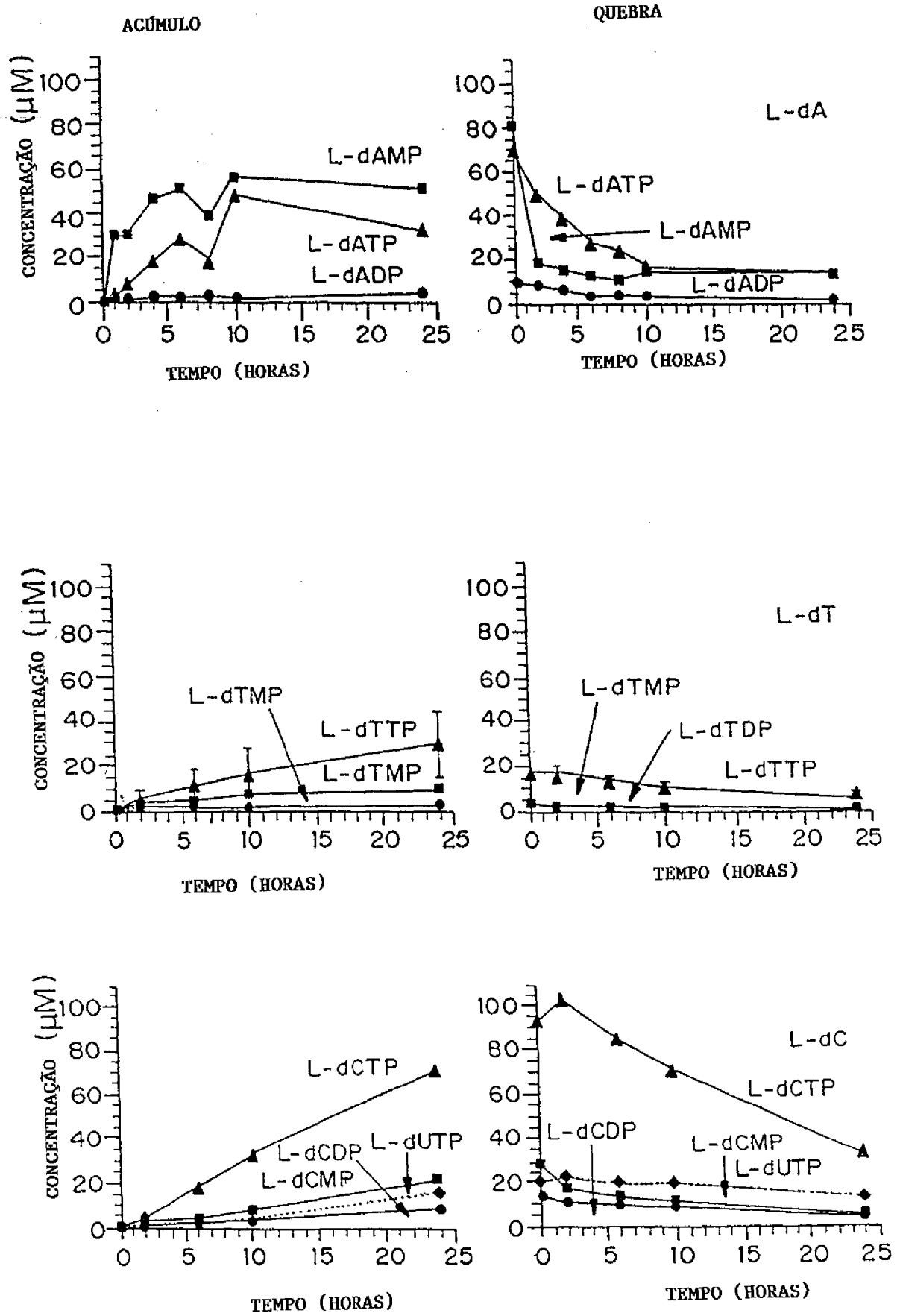


CONTINUA NA FIG. 1A

FIG. 1A



3/4  
**FIG. 2**



(n = 3 POR GRUPO DE TRATAMENTO COM MEDICAMENTO, n = 4 POR GRUPO DE PLACEBO, DOSE 10 mg/kg ORALMENTE POR DIA).

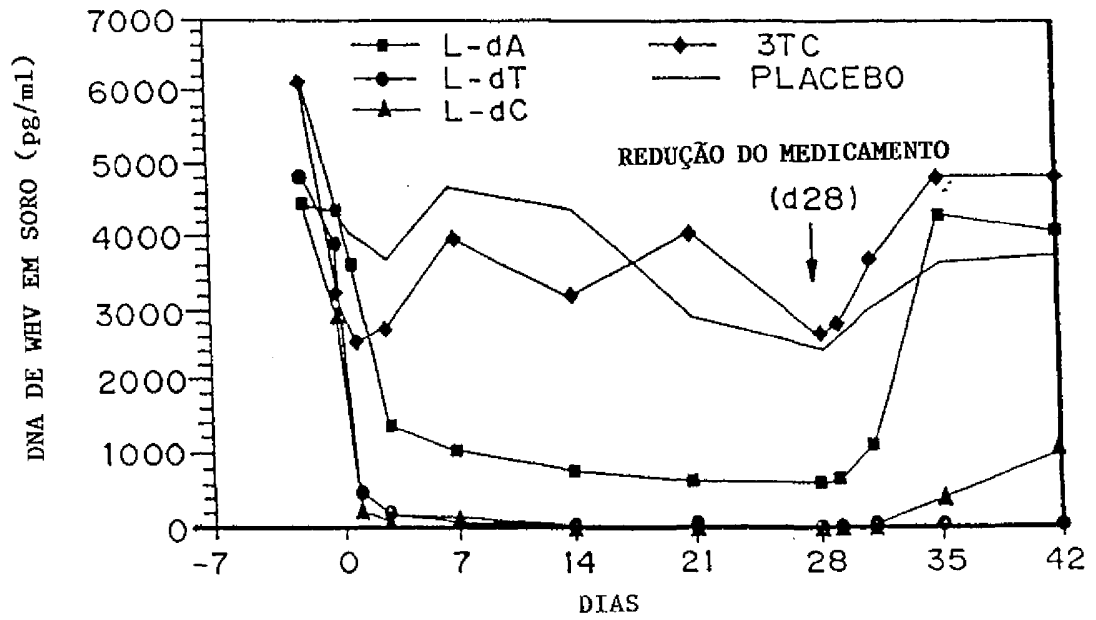


FIG. 3

**β-L-2'-DESOXINUCLEOSÍDEOS PARA TRATAMENTO DE HEPATITE B**

Esta invenção é direcionada a um método para tratamento de um hospedeiro infectado com hepatite B compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um anti-HBV biologicamente ativo 2'-dioxi-β-L-erito-pentafuranonucleotídeo ou um sal ou pró-medimento do mesmo farmacologicamente aceitável, onde o 2'-dioxi-β-L-erito-pentafuranonucleotídeo tem a fórmula (I) onde R é selecionado a partir do grupo consistindo de H, alquila em cadeia direta, ramificada ou cíclica, CO-alquila, CO-arila, CO-alquioxialquila CO-ariloxialquila, arila CO substituída, alquilsulfonila, arilsulfonila, aralquilsulfonila, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato ou derivado de fosfato; e BASE é uma base purina ou pirimidina que pode ser opcionalmente substituída. O 2'-dioxi-β-L-erito-pentafuranonucleotídeo ou um sal ou pró-medimento do mesmo farmacologicamente aceitável pode ser administrado tanto sozinho ou em combinação com outro 2'-dioxi-β-L-erito-pentafuranonucleotídeo ou em combinação com outro agente anti-hepatite.