

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0613142-5 A2**

(22) Data de Depósito: 15/06/2006  
(43) Data da Publicação: 21/12/2010  
(RPI 2085)



\* B R P I 0 6 1 3 1 4 2 A 2 \*

(51) *Int.Cl.:*  
A61K 31/5025  
A61P 31/12  
A61P 35/00  
A61P 1/16

(54) Título: **USO DE SANGLIFERINA EM HCV**

(30) Prioridade Unionista: 17/06/2005 US 60/691,497

(73) Titular(es): NOVARTIS AG

(72) Inventor(es): BEAT WEIDMANN, KAI LIN, KASPAR  
ZIMMERMANN

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler &  
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006023394 de 15/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/138507 de 28/12/2006

(57) Resumo: USO DE SANGLIFERINA EM HCV. A presente invenção refere-se o uso de um composto macrolídeo tal como uma sangliferina para o tratamento de prevenção de hepatite C e doenças relacionadas tais como fibrose hepática, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular.



PI0613142-5

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "USO DE SANGLIFERINA EM HCV".

A presente invenção refere-se a um novo uso para compostos macrolídeos tais como sangliferinas que se ligam a ciclofilinas.

5           As sangliferinas são uma classe de compostos macrolídeos policíclicos inicialmente isolados de caldos de fermentação de actinomicetos. Foi descoberto que sangliferinas exibem atividades de se ligar a ciclofilinas e, no caso de sangliferinas A-D, atividades imunossupressoras e atividades inibitórias da proliferação de células B e de células T. Entretanto, diferente  
10 dos compostos imunossupressores e antiinflamatórios conhecidos tais como ciclosporina A e FK506, as sangliferinas não têm atividade de ligação a FKBP ou atividade inibitória de calcineurina. Assim, as sangliferinas fornecem uma nova categoria de substância de fármaco tanto em termos de estrutura química como perfis de atividade diferentes.

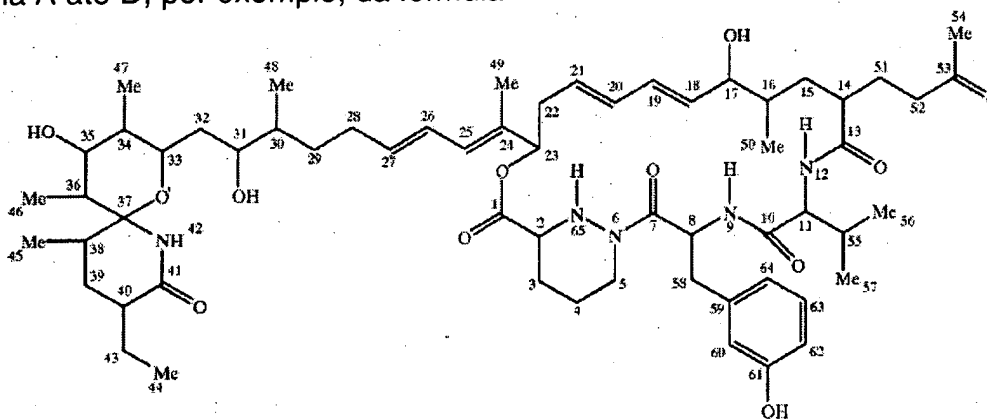
15           As sangliferinas e os métodos para sua preparação estão descritos em WO 97/02285, WO 98/07743, e US 006124453. Uma série de derivados de sangliferina, mini-sangliferinas, estão descritas em *J. Am. Chem. Soc* 2003, 125 (13), 3849-3859; *J. Org. Chem.* 2000, 65, 9255-9260; e *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38(16), 2443-2446.

20           Surpreendentemente, foi descoberto agora que as sangliferinas de ligação a ciclofilina têm um efeito inibitório contra o vírus da hepatite C (HCV).

Conseqüentemente, a presente invenção fornece o uso de um composto de ligação a ciclofilina tal como uma sangliferina para a prevenção  
25 ou tratamento de infecções de hepatite C, distúrbios induzidos por HCV ou inibidores da atividade da peptidilprolil cis-trans isomerase, ou condições associadas com doenças do fígado. Os agentes também podem ser usados, por exemplo, como um tratamento profilático em neonatos nascidos de mães infectadas por HCV ou em profissionais de saúde expostos ao vírus ou em  
30 receptores de transplante, por exemplo, receptores de transplante de fígado, para eliminar a possível infecção por HCV recorrente após o transplante.

A presente invenção refere-se ao uso de macrolídeos, referidos

aqui coletivamente com "sangliferinas" na prevenção ou tratamento de infecções de hepatite C. As sangliferinas são isoladas de caldos de fermentação de actinomicetos. As sangliferinas comumente conhecidas incluem sangliferina A até D, por exemplo, da fórmula



Sangliferina A

- 5 O anel macrocíclico da Sangliferina A a D é caracterizado em que i) as posições 1 a 6 compreendem um resíduo de ácido 3-carboxipiperidazinil carboxílico, ii) as posições 7 a 9, um resíduo de alfa-aminoácido aromático e iii) as posições 10 a 12, um resíduo de alfa-aminoácido alifático. O restante do anel macrocíclico é compreendido por um
- 10 resíduo de ácido hidróxi carboxílico, que fornece, no caso de Sangliferinas A até D, mais 11 átomos de carbono no anel macrocíclico primário.

De acordo com a prática convencional na química de macrolídeos, os átomos do anel macrocíclico primário de Sangliferina são numerados como indicado acima para Sangliferina A, começando com o átomo do

15 grupo carbonila da ligação de lactona macrocíclica como posição 1.

As sangliferinas A até D também podem ser caracterizadas pela presença de um novo sistema Espiro bicíclico acoplado na posição 23 do anel macrocíclico através de um grupo ligante de hidrocarbila.

As sangliferinas A a D podem ser submetidas à extensa manipulação química para se obter ainda macrolídeos adicionais da classe das Sangliferinas. Tais manipulações incluem a clivagem do anel macrocíclico, em particular no grupo óxi da lactona, clivagem do grupo ligante entre os sistemas de anel de macrolídeo e Espiro e manipulação, por exemplo, proteção, derivatização ou outra modificação química de grupamentos substituindo-

20

tes; por exemplo, como descrito a seguir. Meios adicionais de modificação ficarão aparentes para aqueles versados na técnica.

De acordo com a invenção, foi descoberto que as Sangliferinas têm um perfil característico e totalmente novo em termos de suas atividades biológicas contra infecções por hepatite C. Em particular, foi descoberto que elas exibem a combinação de atividades como descrito a seguir.

As sangliferinas tem um perfil de atividade que difere daquele dos compostos imunossuppressores e antiinflamatórios previamente conhecidos, tais como ciclosporinas e macrolídeos, por exemplo, da rapamicina e NIM811, indicando que as Sangliferinas tem um modo de ação diferente de tais compostos. Assim, as Sangliferinas fornecem uma nova categoria de substância de fármaco tanto em termos de estrutura como de atividade, o que pode ser esperado ampliar materialmente os limites da terapia imunossupressora, antiinflamatória e antiviral; por exemplo, para evitar ou reduzir efeitos colaterais indesejáveis das terapias imunossupressora e antiinflamatória prévias e/ou melhorar ou ampliar tal terapia para novas áreas de doença ou novas categorias de pacientes.

As sangliferinas, por exemplo, nas quais o anel macrolídeo está na forma de anel aberto, no qual as posições 26 e 27 no ligante de hidrocarbila entre os sistemas de anel macrolídeo e espiro são ambas substituídas por hidróxi, ou no qual o resíduo espiro acoplado ao anel macrocíclico tenha sido clivado ou truncado, geralmente não têm algumas ou todas as combinações atividades características de Sangliferina. Por exemplo, Sangliferinas nas quais o resíduo espiro está clivado, possuem tipicamente atividade de ligação a ciclofilina mas não possuem atividade imunossupressora significativa. Como ficará aparente para aqueles versados na técnica, entretanto, tais compostos fornecem componentes, intermediários ou blocos de construção chave valiosos para a preparação de novas Sangliferinas adicionais, e assim ampliam ainda mais o potencial terapêutico da classe das Sangliferinas.

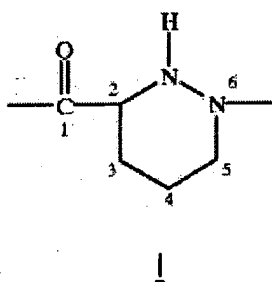
Já que sua presença parece ser essencial para a atividade biológica, por exemplo, das Sangliferinas A a D, o sistema espiro bicíclico também pode ser visto como fornecendo um componente estrutural com um

significado biológico chave, útil como um componente estrutural para derivatização ou modificação adicional tanto em relação à produção de mais Sangliferinas como para aplicação na derivatização ou modificação de outras substâncias de fármaco, por exemplo, para modificar a atividade de outras substâncias de fármaco imunossupressoras da classe dos macrolídeos.

Assim sendo, em um primeiro aspecto, a invenção fornece: um macrolídeo no qual i) as posições 2 a 6 incluídas no anel macrocíclico são fornecidas por um resíduo de ácido piperidazinil carboxílico; e/ou ii) as posições 7 a 9 incluídas no anel macrocíclico são fornecidas por um resíduo de alfa-aminoácido aromático; e/ou iii) as posições 10 a 12 incluídas no anel macrocíclico são fornecidas por um resíduo de alfa-aminoácido alifático, na forma livre ou protegida ou um sal desse.

Adequadamente, os macrolídeos da invenção compreendem dois, especialmente todos os três aspectos estruturais característicos i), ii) e iii).

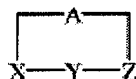
O resíduo de ácido piperidazinil carboxílico é adequadamente um resíduo de 1,2-piperidazin-3-carbóxi-1-ila do qual a porção carbóxi ocupa a posição 1 e o átomo de nitrogênio 1, a posição 6 do anel macrocíclico, por exemplo um resíduo de fórmula I



em que os números designados representam a posição dos átomos do resíduo no anel macrocíclico. Esse resíduo pode ser substituído ou não substituído no anel. Adequadamente é não substituído.

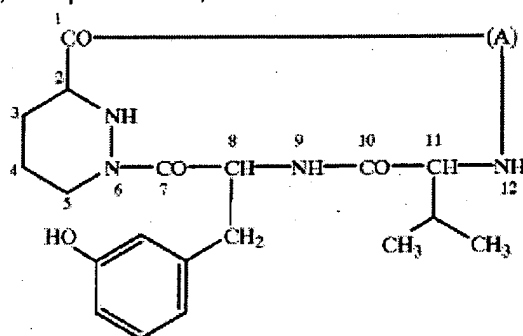
A porção carbóxi do resíduo de alfa-aminoácido aromático ocupa adequadamente a posição 7 do anel macrocíclico e a porção alfa-amino, a posição 9. Adequadamente, o alfa-aminoácido aromático é uma fenilalanina substituída ou não substituída, especialmente por resíduos hidróxi, metóxi, etóxi, OnPr, OiPr, na forma livre, protegida ou ativada.





## IV

em que, X, Y e Z são resíduos i), ii) e iii) como definido acima e A é um resíduo de ácido hidróxi carboxílico como definido acima, na forma livre ou protegida ou sal desse; em particular, o anel macrocíclico de fórmula V



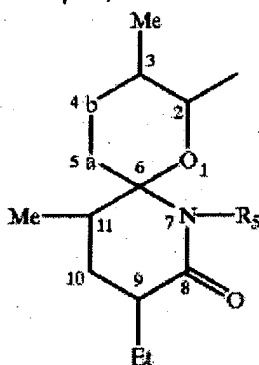
5

## V

na forma livre ou protegida, ou sal desse.

Geralmente, nas Sangliferinas, o anel macrocíclico é substituído no átomo de carbono adjacente à porção óxi da ligação de lactona. Tipicamente esse substituinte compreende um resíduo de 1-oxo-7-aza-espiro-{5.

10 5}-undecan-8-ona-2-ila, por exemplo, da fórmula VI



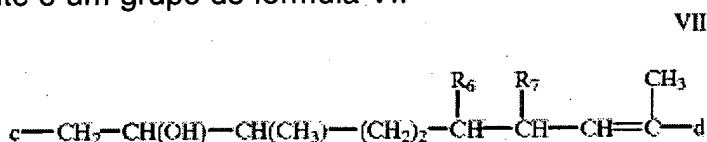
## VI

em que -a-b- é  $-(\text{Me})\text{C}=\text{CH}-$  ou  $-(\text{Me})\text{CH}-\text{CH}(\text{OH})-$  e R, é H ou Me (em que Me e Et representam metila e etila, respectivamente) na forma livre ou protegida, ou um sal desse ligado ao anel macrolídeo através de um ligante que compreende uma seqüência linear de 6 a 11, tipicamente 9 átomos de carbono entre o resíduo espiro e o anel macrolídeo.

15

O grupo ligante pode ser substituído ou não substituído e/ou

conter uma ou mais ligações insaturadas, em particular ligações duplas cumulativas ao longo de sua extensão. Adequadamente, o grupo ligante pode ser substituído por metila, por exemplo por dois grupos metila. Adequadamente, o grupo ligante pode ainda ser substituído por hidróxi, por exemplo, por três substituintes hidróxi e/ou pode ser etilenicamente insaturado, por exemplo, conter ligações duplas carbono-carbono. Mais adequadamente, o grupo ligante compreende um resíduo de 1,7-dimetil-nonan-9-ila, especialmente 1,7-dimetil-non-1-en-9-ila ou 1,7-dimetil-nona-1,3-dien-9-ila, opcionalmente substituído, por exemplo, na posição 3, 4 e/ou 8. Preferivelmente, o grupo ligante é um grupo de fórmula VII



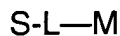
em que c representa ligação ao resíduo espiro; d representa a ligação ao anel macrocíclico e R6 e R7 são cada OH ou juntos representam uma ligação adicional, na forma livre ou protegida.

O grupo ligante geralmente estará acoplado ao anel macrocíclico no átomo de carbono imediatamente adjacente ao grupo óxi da lactona, isto é, quando o anel macrocíclico compreende um resíduo de 11-oxiundecanoil-11-ila na posição 11 desse.

Conseqüentemente, a invenção fornece compostos de fórmula

VIII

20

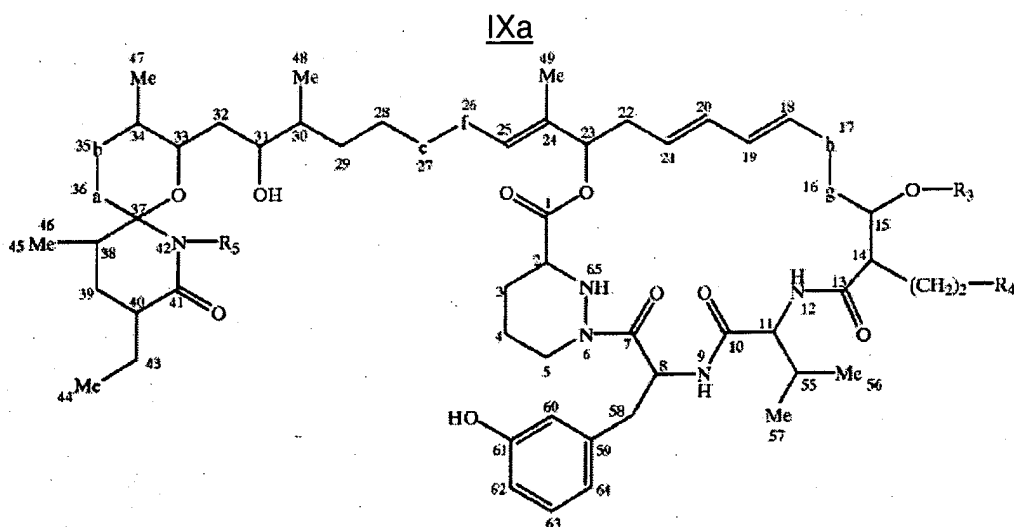
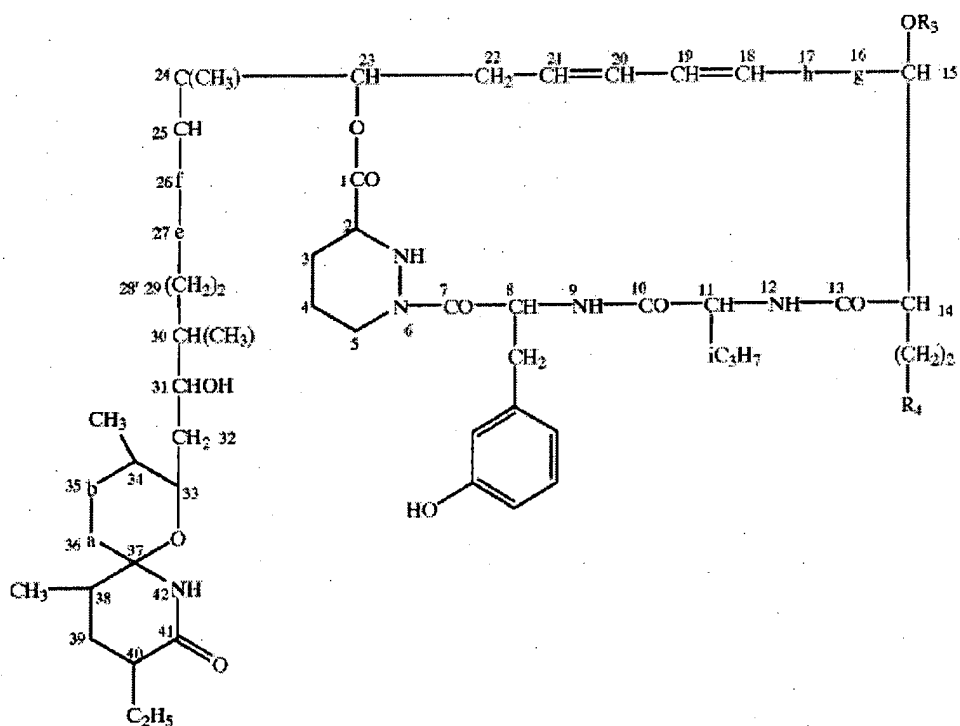


VIII

em que S representa um resíduo espiro bicíclico como previamente definido; L representa um grupo ligante como previamente definido e M representa um anel macrolídeo como previamente definido, na forma livre ou protegida, ou sais desses.

25

Compostos particulares da invenção são aqueles de fórmulas IXa e IX.



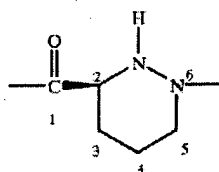
IX

em que -a-b—é como definido acima, -e-f- é -CH(OH)-CH(OH)- ou -CH=CH- ; -g-h- é como definido acima para -a-b-, e R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> e R<sub>5</sub> são como definidos acima, na forma livre ou protegida ou sais desses.

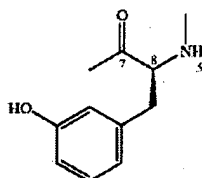
Os compostos de fórmulas I a IX contêm átomos de carbono assimétrico e assim podem existir em várias formas epiméricas. Todos os epímeros possíveis assim como as misturas diastereoisoméricas desses são abrangidas pela invenção. Entretanto, compostos de fórmulas VIII e IX nos quais o anel macrolídeo está na forma de um anel fechado e que são de estereoquímica apropriada possuem atividades que são características de

Sangliferinas, como aqui referidas. Epímeros que possuem atividades características de sangliferina são preferidos. Em geral, por exemplo, para uso farmacêutico de acordo com a invenção, epímeros que possuem atividades características de sangliferina na forma pura ou substancialmente pura (isto é, livre ou substancialmente livre de epímeros que não têm de atividades características de sangliferina), por exemplo que compreendem pelo menos 90%, por exemplo pelo menos 95% de epímero ativo (isto é, que compreendem menos do que 10%, por exemplo, menos do que 5% de epímero inativo) serão preferidos.

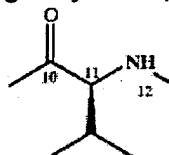
10 Preferivelmente, o resíduo de ácido 3-carboxipiperidazinil carboxílico i) nas posições 1 a 6 do anel macrocíclico tem a seguinte conformação:



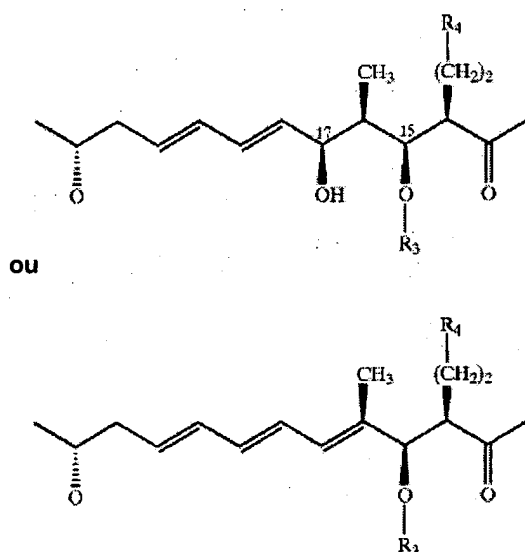
Preferivelmente, o aminoácido aromático ii) nas posições 7 a 9 do anel macrocíclico tem a configuração L, por exemplo é de configuração



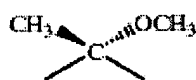
15 Preferivelmente, o aminoácido alifático iii) nas posições 10 a 12 do anel macrocíclico tem a configuração L, por exemplo é de configuração



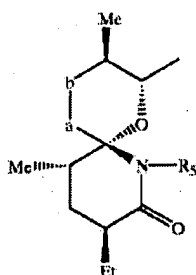
Quando o restante do anel macrocíclico compreende um resíduo de fórmula II, ele preferivelmente tem a configuração



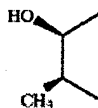
Quando R3 e R4 juntos preferivelmente são da configuração



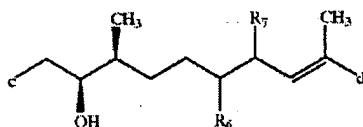
Preferivelmente, o resíduo de 1-oxo-7-aza-espiro-{5.5}-undecan-8-ona-2-ila tem a configuração



em que quando -a-b- é -(Me)CH-CH(OH)-, ele preferivelmente tem a configuração

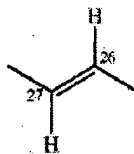


Quando o ligante é de fórmula VII, ele é preferivelmente de configuração

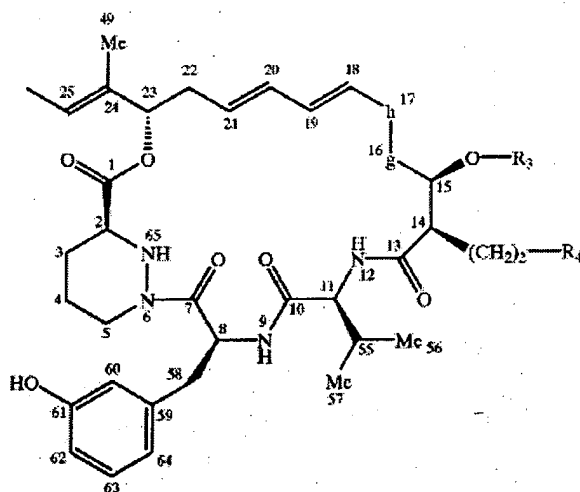
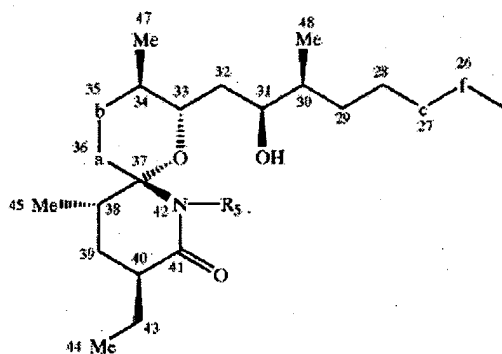


Quando R6 e R7 são cada OH, a configuração nas posições 26 e 27 é preferivelmente tanto 26(S), 27(S) quanto 26(R), 27(R). Quando R6 e R7 juntos representam uma ligação adicional, a configuração nas posições

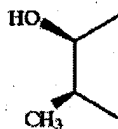
26 e 27 é preferivelmente



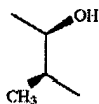
Compostos da invenção de fórmula IX têm preferivelmente a seguinte conformação



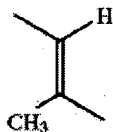
5 em que quando -a-b- é -(Me)CH-CH(OH)-, ele preferivelmente tem a configuração:



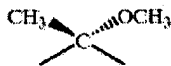
quando -e-f- é -CH(OH)-CH(OH)-, ele preferivelmente tem a configuração (S),(S) ou a configuração (R),(R); quando -g-h- é -(Me)CH-CH(OH)-, ele preferivelmente tem a configuração:



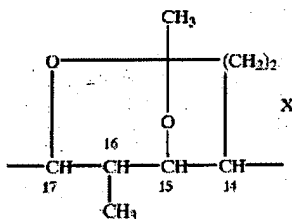
quando -g-h- é - (Me)C=CH-, ele preferivelmente tem a configuração:



e quando R3 e R4 estão fundidos juntos, eles são preferivelmente de configuração:



Os compostos da invenção podem estar na forma livre ou protegida, por exemplo, nas formas protegidas como descrito em "Protective Groups in Organic Synthesis" por T. W. Greene e P. G. M. Wuts, 2ª edição, 1991, John Wiley & Sons Inc., Nova Iorque. Em particular, grupos OH podem estar na forma protegida, por exemplo, na forma de silil éteres (por exemplo, como descrito nas páginas 68-86 de Greene & Wuts *ibid.*), ésteres (veja, por exemplo, páginas 87-103 de Greene & Wuts *ibid.*) e carbonatos (veja, por exemplo, páginas 104- 111 de Greene & Wuts *ibid.*). Tais formas protegidas também incluem formas protegidas internamente; por exemplo, no caso de macrolídeos de fórmula IX, em que -g-h- é -CH(CH<sub>3</sub>)-CH(OH)-, a forma protegida, onde as posições 14 a 17 do anel macrocíclico compreendem um resíduo de fórmula X:



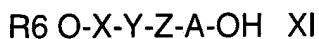
Também por exemplo, 1,3 dióis presentes em Sangliferinas podem estar protegidos como estruturas de anel apropriadas, por exemplo como descrito nas páginas 118-142 de Greene & Wuts *ibid.*

Compostos da invenção também existem na forma de sal. Exemplos de sais farmacologicamente aceitáveis adequados para uso de acordo com a invenção incluem sais de adição de ácido e de base como apropriado, levando em consideração os substituintes particulares presentes no composto, por exemplo formas de sal de HCl.

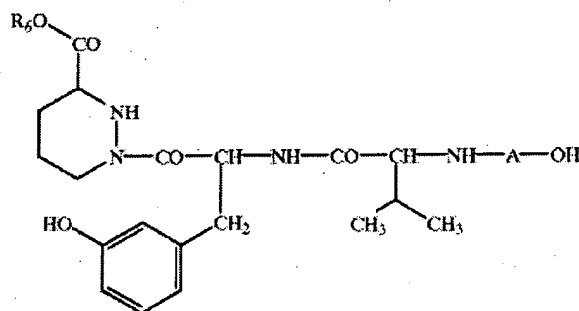
Como indicado anteriormente, o anel macrocíclico dos compos-

tos da invenção pode ser clivado, em particular, no grupo óxi da lactona, para fornecer compostos em que o anel macrocíclico está na forma de anel aberto. Geralmente, a clivagem do grupo óxi da lactona ocorre por hidrólise (solvólise), por exemplo para fornecer compostos macrocíclicos de anel a-

5 berto de fórmula XI:

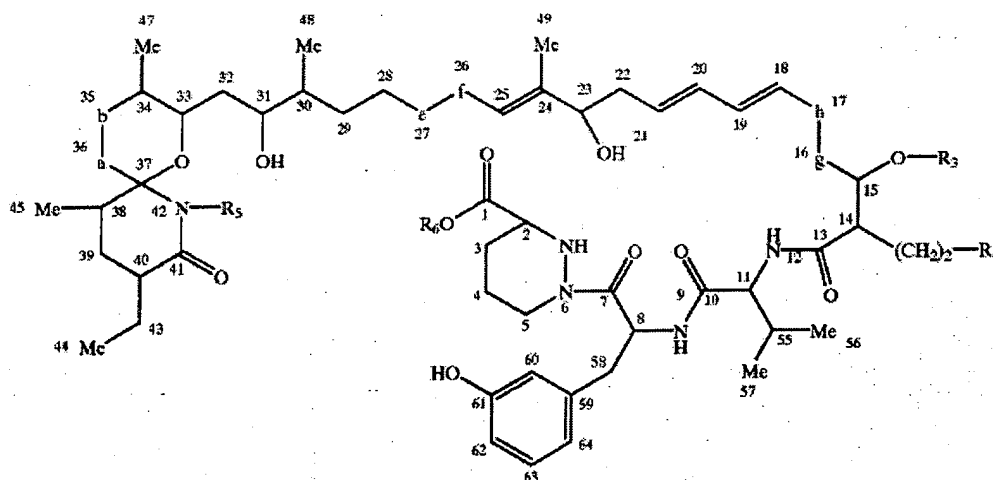


por exemplo de fórmula XII



XII

por exemplo um composto de fórmula IX'



IX'

10 em que X, Y, Z, A, -a-b-, -e-f-, -g-h-, R3, R4 e R5 são como definidos acima e R6 é H ou C<sub>1-4</sub> alquila, por exemplo, metila.

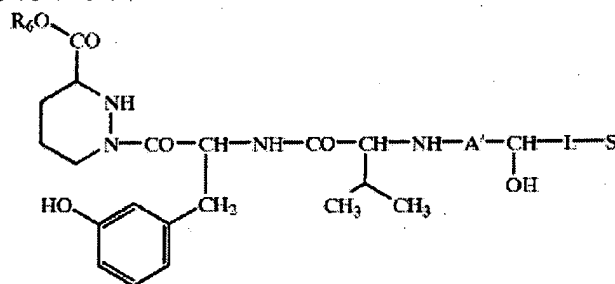
Tais formas de anel aberto fornecem meios intermediários para a modificação do sistema de anel macrocíclico básico de Sangliferina e também são parte da presente invenção.

15 Conseqüentemente, em um aspecto adicional a presente invenção fornece: um macrolídeo como definido aqui anteriormente em forma de anel aberto, o dito macrocíclico de anel aberto estando na forma livre ou protegida, ou sal desse; um composto R6 O-X-Y-Z-A-OH como definido acima,

na forma livre ou protegida, ou sal desse; um composto  $R_6$  O-X-Y-Z-A'-CH(OH)-L-S, em que -A'-CH(OH)—é um resíduo de ácido hidróxi carboxílico, por exemplo, um resíduo de fórmula II, como definido acima e os outros símbolos são como definidos acima, na forma livre ou protegida ou um sal

5 desses;

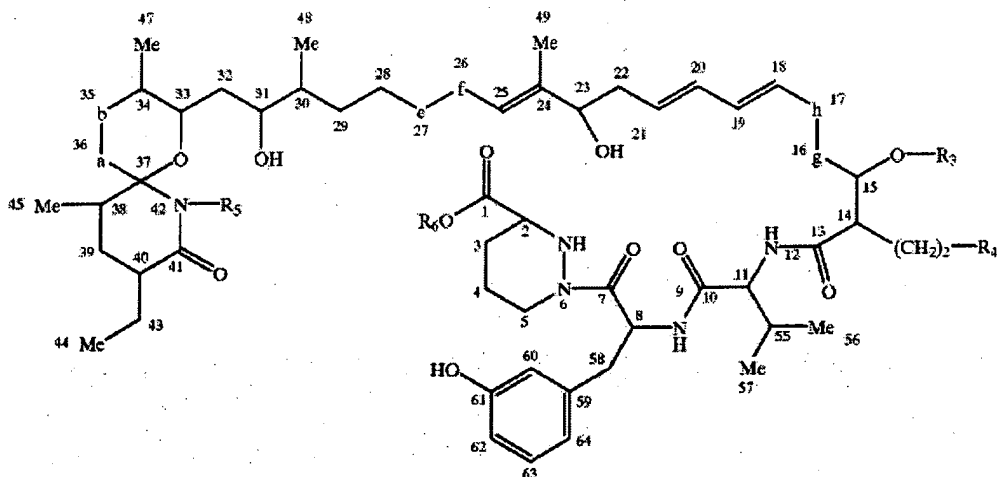
um composto de fórmula XII'



XII'

na forma livre ou protegida ou um sal desse;

um composto de fórmula IX'

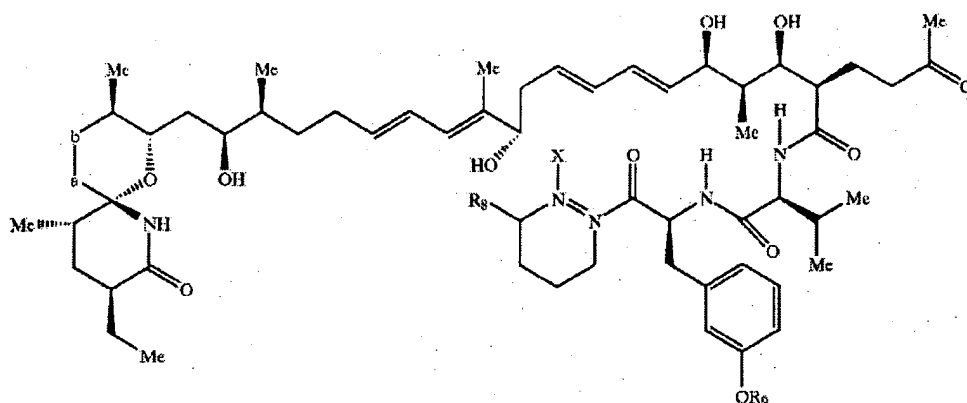


IX'

10

na forma livre ou protegida ou um sal desse.

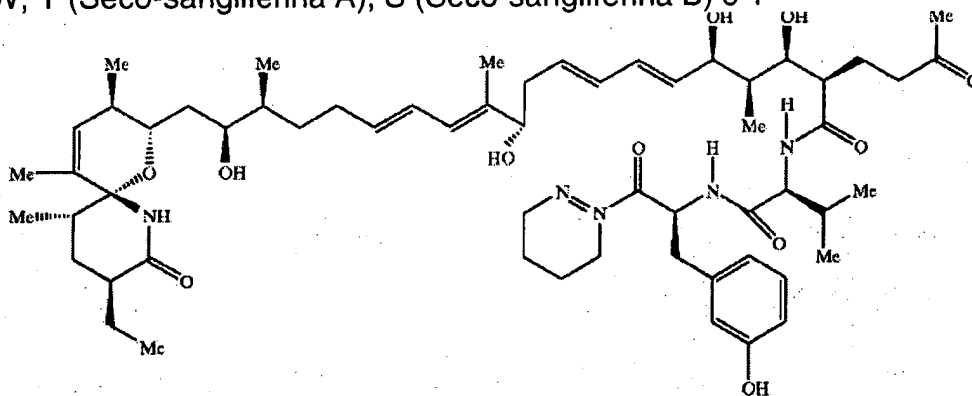
Em modalidades particulares desse aspecto, a invenção fornece um composto de fórmula IX''



IX''

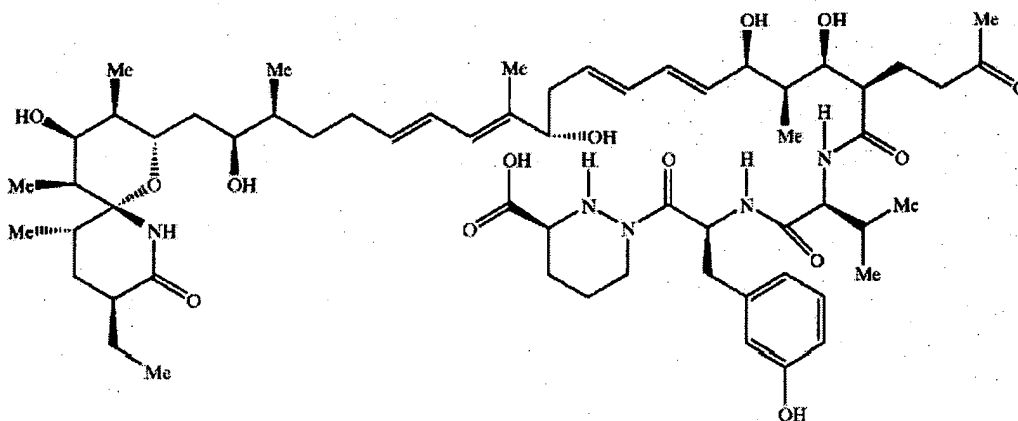
em que -a-b- é -(Me)C=CH- ou -(Me) CH-CH(OH)-; R<sub>8</sub> é H ou -C(O)-OR<sub>10</sub>, em que R<sub>10</sub> é H ou Me; R<sub>9</sub> é H ou, quando -a-b- é -(Me)CH-CH(OH)- e R é -C(O)- OMe, R<sub>9</sub> é Me, e X é H quando -N--N- representa uma ligação simples entre os dois átomos de N, ou X junto com -N--N- representa uma dupla ligação entre os dois átomos de N, na forma livre ou protegida ou um sal desse.

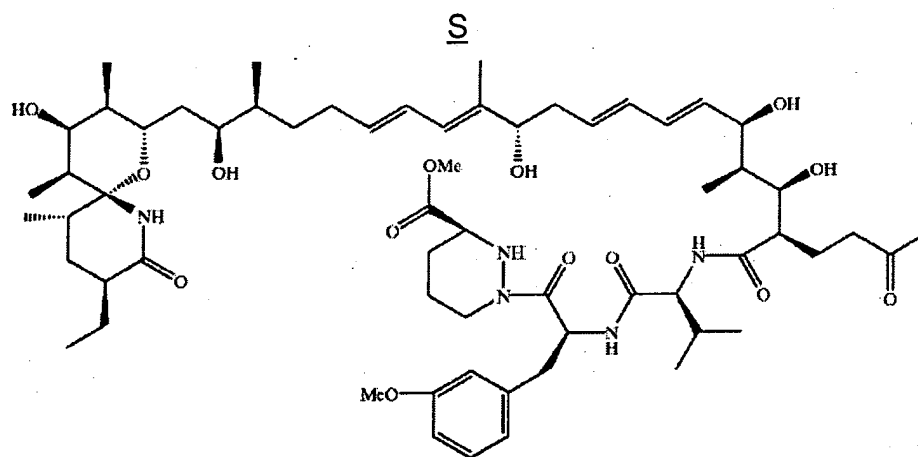
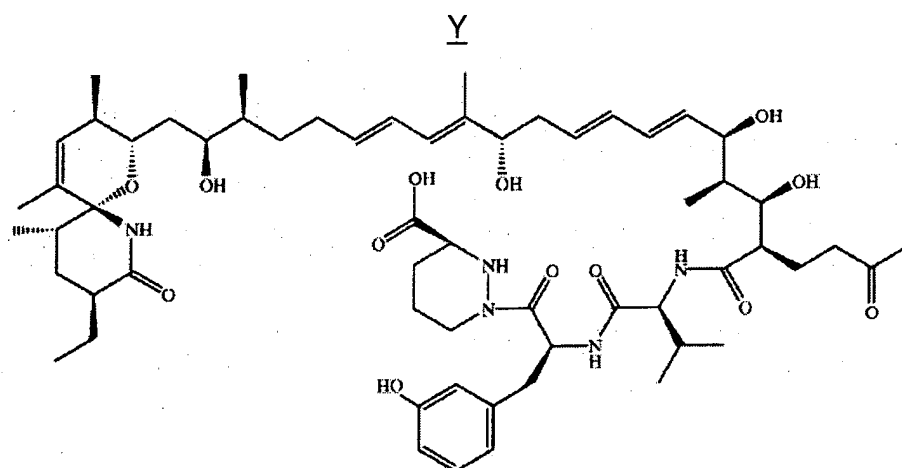
Mais particularmente, a invenção fornece compostos das fórmulas W, Y (Seco-sangliferina A), S (Seco-sangliferina B) e T



W

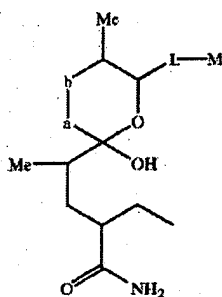
10





I

A invenção também inclui compostos nos quais o sistema de  
 5 anel 1-oxo-7-aza-espiro-{5, 5}-undecan-8-ona-2-ila está na forma de anel  
 aberto, por exemplo um composto de fórmula XIII



XII

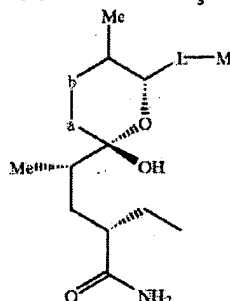
em que a, b, L e M são como definidos acima, na forma livre ou protegida ou  
 um sal desse.

10

Os compostos de anel aberto da invenção são preferivelmente  
 de conformação semelhante às conformações preferidas definidas acima

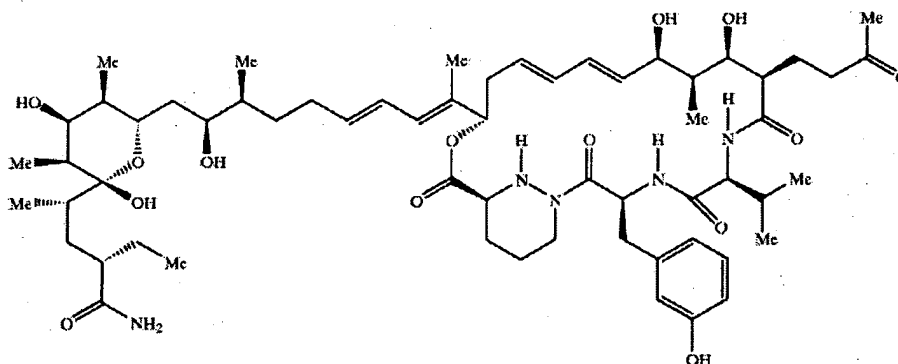
para compostos de anel fechado.

O sistema de anel espiro biciclo de anel aberto de compostos da fórmula XIII é preferivelmente de conformação:



em que quando -a-b- é -(Me) CH-CH(OH)-,

- 5 Em particular, a invenção fornece um composto de fórmula Z (Sangliferina E)



Z

na forma livre ou protegida ou um sal desse.

- 10 Os compostos das fórmulas IX", S, T, W, Y, XIII e Z são intermediários úteis para a preparação de sangliferinas em geral incluindo as formas de anel fechado e as formas de anel fechado de anel expandido.

- 15 Os compostos de fórmula IX" podem ser preparados pela clivagem do anel macrolídeo de uma sangliferina de anel fechado por exemplo, sangliferina A ou B no grupo óxi da lactona ou na vizinhança dele. Assim, por exemplo, os compostos de fórmula Y e T são preparados pelo tratamento de sangliferina A sob condições básicas, por exemplo para o composto de fórmula III na presença de um hidróxido de metal alcalino e, por exemplo, para o composto de fórmula IV na presença de metanol e um carbonato de metal alcalino.

20

Alternativamente, compostos de fórmula IX" podem ser obtidos

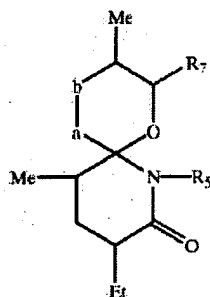
como isolados de culturas de um microrganismo que produz sangliferina. Por exemplo, os compostos de fórmulas Y e S podem ser obtidos como isolados de culturas de *Streptomyces* sp. A92-308110 como descrito aqui a seguir.

O isolamento dos compostos de fórmulas Y e S de culturas de *Streptomyces* sp. A92-308110 está descrito em US6124453.

O composto de fórmula Z pode ser obtido por clivagem do sistema de anel espirobicíclico entre o átomo de nitrogênio e o átomo central do sistema espiro. Alternativamente, o composto de fórmula Z pode ser obtido como um isolado de uma cultura de um microrganismo que produz sangliferina. Por exemplo, o isolamento do composto de fórmula Z de culturas de *Streptomyces* sp. A92-308110 está descrito em US6124453.

Macrolídeos de acordo com a invenção que têm um resíduo espiro biciclo acoplado ao anel macrocíclico também podem ser submetidos à clivagem do grupo ligante interveniente, por exemplo, em relação a fórmula IX, em particular na ligação dos resíduos 26 e 27, para produzir novos compostos Espirobiciclo separados e macrolídeos adicionais. Com também indicado anteriormente, esses compostos são úteis como intermediários, a porção espiro bicíclica das Sangliferinas tendo, em particular, um papel funcional integral na atividade biológica das Sangliferinas como uma classe.

Conseqüentemente, a presente invenção fornece um 1-oxo-7-aza-espiro-{5. 5}-undecan-8-ona-2-ila, na forma livre ou protegida ou um sal desse, em particular um composto de fórmula VI'

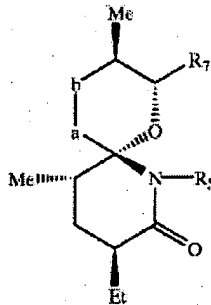


VI'

em que R7. é H, um grupo OH opcionalmente protegido, um grupo reativo funcional ou um grupo -CH<sub>2</sub> -CH(OH)- CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub> -CH<sub>2</sub> -CHO ou o equivalente de delta lactol desse, na forma livre ou protegida ou um sal desse.

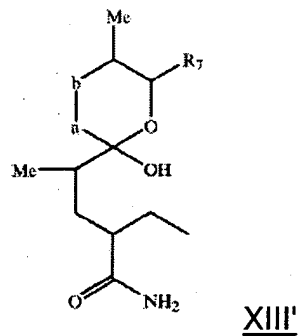
Preferivelmente, o composto de fórmula VI' tem a seguinte confi-

guração

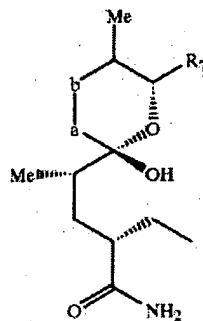


em que quando -a-b- é -(Me)CH-CH(OH)-, ele tem preferivelmente a configuração definida anteriormente.

A invenção também inclui um 1-oxo-7-aza-espiro-{5.5}-undecan-  
5 8-ona-2-ila de anel aberto, na forma livre ou protegida ou um sal desse, em particular um composto de fórmula XIII'

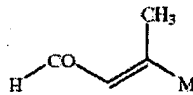


em que -a-b- e R7 são como definidos anteriormente, na forma livre ou protegida ou um sal desse. O sistema de anel espiro biciclo de anel aberto de compostos de fórmula XIII' é preferivelmente de conformação:

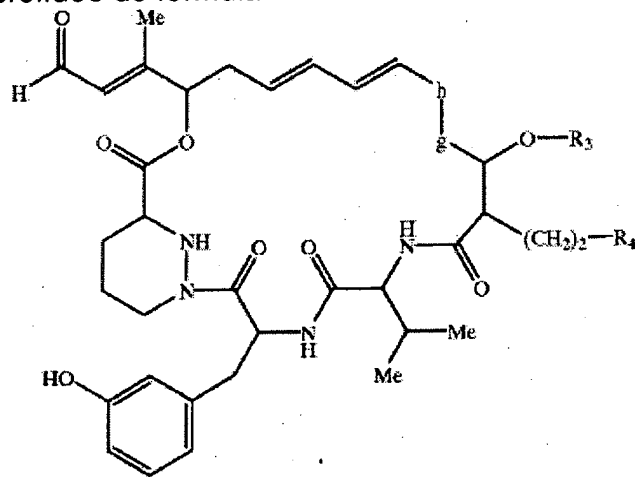


10 em que quando -a- b- é -(Me)CH-(OH)-, ele tem preferivelmente a configuração definida anteriormente.

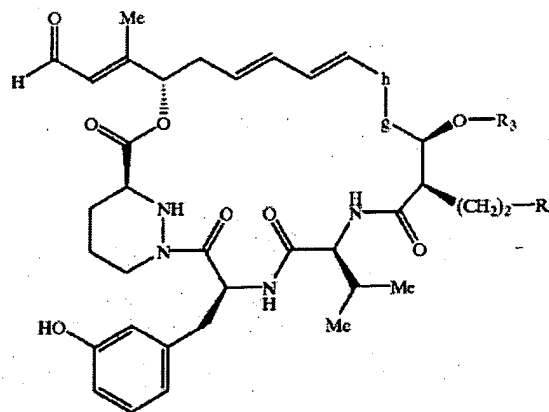
A invenção também fornece um macrolídeo de fórmula XIV

XIV

em que M é um anel macrolídeo como definido acima, em particular um macrolídeo de macrolídeo de fórmula XV

XV

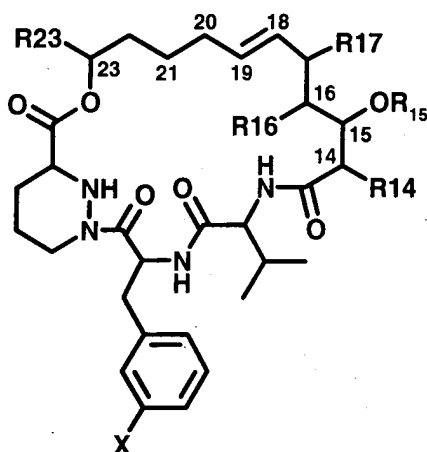
5 preferivelmente de conformação



- em que quando -g-h- é -(Me) CH-CH(OH)-, ele tem preferivelmente a configuração definida anteriormente e quando -g-h- é -(Me)C=CH-, ele tem preferivelmente a configuração como definida anteriormente e quando R3 e R4 estão fundidos juntos, eles têm preferivelmente a configuração aqui definida,
- 10 na forma livre ou protegida ou de anel aberto, ou um sal desse.

A invenção também fornece um macrolídeo particular de fórmula

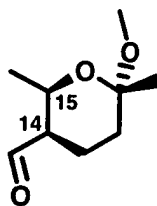
XVI

XVI

em que X é H, metóxi, etóxi, OnPr, OiPr;

R14 e R15 são independentemente H, metila, alquila, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquila, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-CO-CH<sub>3</sub>, ou R14 e R15 estão fundidos para formar uma cicloalquila de 5 a 7

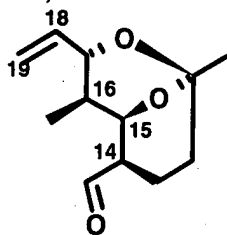
5. membros substituída ou não substituída, selecionado por exemplo da fórmula XVII;

XVII

R16 é H, ou Me ou (C<sub>1-4</sub>)alquila;

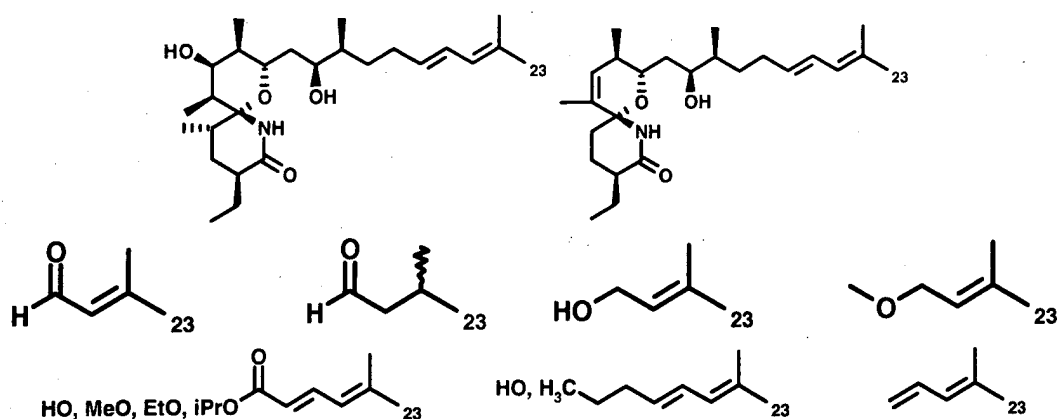
R17 é H, OH, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquila ou R14, R15 e R17 estão fundidos para formar

- 10 uma cicloalquila de fórmula XVIII;

XVIII

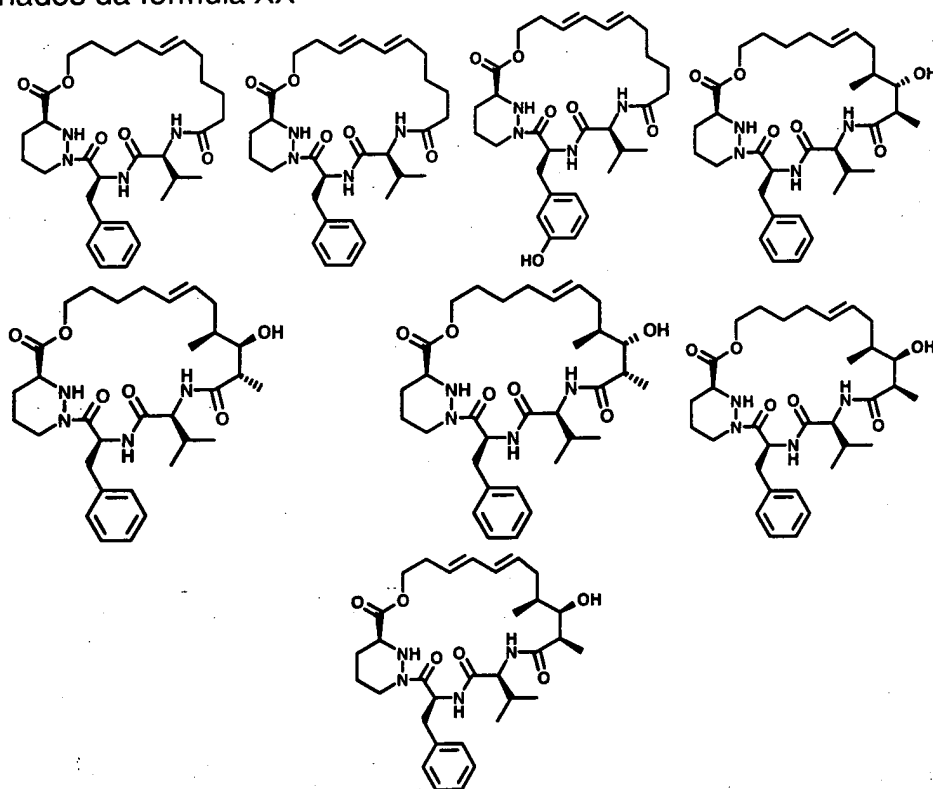
R23 é H, (C<sub>1-10</sub>)alquila de cadeia ramificada ou linear e/ou contém uma ou mais ligações insaturadas em particular ligações duplas ou triplas cumulativas ao longo de sua extensão, preferivelmente -CH=CH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-

- 15 OCH<sub>3</sub>, -CHO, -COOH, ou de fórmula XIX'



R23 pode ser substituído adequadamente como descrito aqui.

Em outro aspecto da invenção, macrolídeos particulares são selecionados da fórmula XX



Em um aspecto adicional a invenção inclui os macrolídeos e  
 5 compostos da invenção, em particular aqueles que são produtos naturais na  
 forma substancialmente purificada, por exemplo, pelo menos em 90%, prefe-  
 rivelmente em pelo menos 95% especialmente em pelo menos 98% de for-  
 ma pura.

Em uma modalidade particular da invenção, Sangliferinas A, B,  
 10 C e D, entre outras, são isoladas da nova *Streptomyces* sp. A92- 308110.  
 Amostras de *Streptomyces* sp. A92-308110 estão depositadas no Deutsche

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemanha em 3 de maio de 1995 sob os termos do Tratado de Budapeste e foram designadas com o número de depósito DSM 9954. O isolamento de Sangliferinas A, B, C, e D de culturas de *Streptomyces* sp. A92-30810 está descrito em US6124453.

Macrolídeos de acordo com a invenção, por exemplo compostos de fórmula IX; por exemplo Sangliferinas A, B, C e D e seus sais farmacêuticamente aceitáveis, daqui por diante genericamente "agentes da invenção" exibem atividades características de sangliferina, isto é, a seguinte combinação de atividades:

têm atividade de ligação à ciclofilina;  
têm atividade inibitória contra a peptidilprolil cis-trans isomerase;  
têm atividade imunossupressora;  
inibe a proliferação tanto de células B como de células T;  
mas não têm atividade de ligação à proteína que se liga a FK e não inibe a atividade da calcineurina.

A atividade biológica de macrolídeos da invenção, por exemplo de fórmula XVI, pode ser demonstrada em métodos de teste padronizados *in vitro* e *in vivo*, por exemplo como se segue.

A Resposta Proliferativa de Linfócitos ao Estímulo Alogênico pode ser preparada como segue. Células esplênicas ( $2 \times 10^5$ ) de camundongos Balb/c (fêmeas, 8-10 semanas) são co-incubadas por 4 dias com  $2 \times 10^5$  células esplênicas de camundongos CBA (fêmeas, 8-10 semanas). As células alogênicas induzem uma resposta proliferativa na população de célula esplênica que responde que é medida pela incorporação de um precursor marcado no DNA. Os macrolídeos da invenção, por exemplo, compostos de fórmula IX e seus sais farmacêuticamente aceitáveis, por exemplo, Sangliferinas A, B, C e D, têm  $IC_{50}$  na faixa de cerca de 30 até cerca de 200 nM quando comparada com a  $IC_{50}$  de cerca de 20 nM para ciclosporina A quando testada nesse ensaio. (T. Meo (1979) The MLR in the mouse. Em: "Immunological Methods", L. Lefkovits & B. Pernis, Eds. Academic Press, N.Y. pp. 227-239).

Células esplênicas ( $2 \times 10^5$ ) de camundongos CBA são incubadas por 48 horas com 50  $\mu\text{g/ml}$  de LPS mais o composto de teste. A proliferação é medida pela incorporação de precursor marcado no DNA. Macrolídeos da invenção, por exemplo, compostos de fórmula IX e seus sais farmacologicamente aceitáveis, por exemplo Sangliferinas A, B, C e D, inibem a proliferação de célula B e têm  $\text{IC}_{50}$  na faixa de cerca de 40 até cerca de 100 micromolar. (Greaves, M. & J. Janossy, 1972, "Elicitation of selective T and B lymphocyte response by cell surface binding ligands." *Transplant Rev.*, 11:87; Janossy, G. & M. F. Greaves, 1971, "Lymphocyte activation, I, Response of T and B lymphocytes to phytomitogens.", *Clin. Exp. Immunol.* 9:483-498).

A citotoxicidade é determinada pelo uso da linhagem celular monocítica humana THP1 ( $5 \times 10^4$  células/poço) que são incubadas na presença de IFN $\gamma$  (100 U/ml) e LPS (5 microgramas/ml) mais o composto de teste (até 10 micromolar) por 24 a 72 h a 37°C. As células vivas são quantificadas usando a leitura colorimétrica de MTT que mede a atividade enzimática da desidrogenase mitocondrial em células vivas (Mossman 1983). Macrolídeos da invenção, por exemplo, compostos de fórmula IX e seus sais farmacologicamente aceitáveis, por exemplo, Sangliferinas A, B, C e D, têm  $\text{IC}_{50}$  na faixa de cerca 1000-5000 nM após 24 h de incubação nesse ensaio (Mossman T. J. (1983), "Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays", *J. Imm. Methods*, 65, 55-63).

Células mononucleares são preparadas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis usando a separação por densidade de Ficoll-Hypaque de acordo com o método de Hansell *et al.* (1991). Células ( $10^5$  células/poço em 200 microlitros de RPMI 10% de FCS por volume) são incubadas com diluições seriadas dos compostos de teste por 30 min a 37°C antes da adição de estímulo. Interferon gama (100 U/ml) e LPS (5 microgramas/ml) são usados como estímulos para induzir a liberação de Fator de Necrose de Tumor (TNF) alfa pelas células mononucleares do sangue periférico. Após 3 h de incubação, as células são centrifugadas (1200 rpm por 10 min) e os sobrenadantes são coletados. A quantidade de TNF presente

nos sobrenadantes celulares é determinada usando um kit de ensaio imunoabsorvente ligado a enzima comercialmente disponível. Macrolídeos da invenção, por exemplo, compostos de fórmula IX e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo, Sangliferinas A, B, C e D, têm  $IC_{50}$  na faixa de cerca de 200 a cerca de 1000 nM quando testados nesse ensaio.

Um ensaio de ligação à ciclofilina adequado é o teste de ELISA competitivo descrito por Quesniaux em Eur. J. Immunol. 1987 17 1359-1365. Nesse teste, o composto a ser testado é adicionado durante a incubação de ciclofilina (ciclofilina A humana recombinante) com BSA-ciclosporina A revestida e a concentração necessária para dar uma inibição de 50% da reação de controle sem competidor é então calculada ( $IC_{50}$ ). Um ensaio alternativo é o teste de ligação competitiva descrito por Schneider *et al.* em Biochemistry (1994), 33, 8218-8224, que envolve a adição de composto de teste durante a incubação de ciclofilina biotinilada (ciclofilina A humana recombinante) com BSA-ciclosporina A revestida. A quantidade de ciclofilina biotinilada ligada na presença e ausência de um composto de teste é determinada pela incubação com fosfatase alcalina acoplada à estreptavidina. Macrolídeos da invenção, por exemplo, compostos de fórmula IX e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo, Sangliferinas A, B, C e D, têm  $IC_{50}$  na faixa de cerca de 10 até cerca de 100 nM, em comparação com a  $IC_{50}$  de cerca de 80 nM para ciclosporina A quando testada nesses ensaios.

Ensaio *in vitro* adicionais que podem ser usados para demonstrar a atividade biológica de Sangliferinas são os ensaios com gene repórter de IL-2 e ensaios com células esplênicas estimuladas por ConA (indicativo do efeito sobre a ativação de célula T).

Macrolídeos da invenção, por exemplo compostos de fórmula IX, por exemplo, Sangliferina A, B, C e D não tem atividade de ligação à proteína de ligação de FK e não inibem a atividade de calcineurina quando testados em testes padronizados para essas atividades.

Agentes da invenção são úteis como agentes farmacêuticos, por exemplo, como imunossuppressores assim como antiinflamatórios e/ou antivirais.

Eles são, em particular, úteis para prevenção de distúrbios associados com infecção viral de hepatite, particularmente hepatite C. Adicionalmente, os agentes da invenção têm uso terapêutico na inibição de distúrbios associados com atividade de peptidilprolil cis-trans isomerase (PPIase). PPIases são um tipo de ciclofilina que servem para acelerar o dobramento de proteína pela catálise da isomerização cis-trans de ligações peptídicas imídicas de prolina em oligopeptídeos. Macrolídeos da invenção se ligam a ciclofilinas e inibem a atividade de PPI.

Agentes da invenção também são úteis para o tratamento de doenças auto-imunes e condições inflamatórias, em particular condições inflamatórias com uma etiologia que inclui um componente auto-imune tal como artrite (por exemplo, artrite reumatóide, artrite crônica progressiva e artrite deformante) e doenças reumáticas.

Em uma série de modalidades específicas adicionais ou alternativas, a presente invenção também fornece:

- 1.1 Um método para prevenir ou tratar infecções por hepatite C ou distúrbios induzidos por HCV tais como fibrose hepática, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular em um indivíduo em necessidade disso, que compreende administrar ao dito indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de ligação à ciclofilina, tal como uma sangliferina, por exemplo um composto de fórmula \_ sozinho ou em combinação com um ou mais co-agentes.
- 1.2 Um método para inibir a replicação de HCV em um meio, que compreende aplicar a esse meio uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de ligação à ciclofilina, tal como uma sangliferina, por exemplo um composto de fórmula \_ .
- 1.3 Um método para inibir a replicação de HCV em um em um paciente em necessidade disso, que compreende administrar a esse indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de ligação à ciclofilina, tal como uma sangliferina, por exemplo, um composto de fórmula \_ .
- 1.4 Um método para prevenir a recorrência de infecção por HCV em um

receptor de transplante em necessidade disso, que compreende administrar ao dito receptor uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de ligação à ciclofilina, tal como uma sangliferina, por exemplo, um composto de fórmula \_ .

- 5           2.    Uso de um composto de ligação à ciclofilina tal como uma sangliferina na preparação de uma composição farmacêutica para uso em qualquer método definido acima.
3.    Uma composição farmacêutica para uso em qualquer método definido acima, que compreende um composto de ligação à ciclofilina tal como uma sangliferina junto com um ou mais diluentes ou
- 10           veículos farmacêuticamente aceitáveis para isso.

            Além disso, as sangliferinas da invenção que possuem atividade de ligação à ciclofilina podem ser úteis como reagentes em imunoenaios de deslocamento para ciclosporinas e outros compostos de ligação à ciclofilina, por exemplo no procedimento do ensaio descrito no pedido de patente WO

15           95/07468. Esse pedido de patente refere-se a um procedimento de ensaio para determinar a concentração de um produto farmacêutico de ligação à imunofilina, por exemplo, Ciclosporina, no sangue; o procedimento compreende adicionar um competidor de ligação que desloca o produto farmacêutico dos complexos imunossupressor-imunofilina no sangue; adicionar um

20           receptor que se liga ao produto farmacêutico, mas não significativamente ao competidor de ligação; separar o complexo receptor-produto farmacêutico da amostra; e determinar a quantidade do produto farmacêutico. As sangliferinas podem ser usadas como competidoras de ligação em tais ensaios; por

25           exemplo, para deslocar ciclosporinas de ciclofilinas, dessa maneira liberando a ciclosporina para quantificação, por exemplo, por um anticorpo monoclonal que é específico para ciclosporina .

            De acordo com o antecedente, a presente invenção fornece ainda um aspecto adicional:

- 30           4.    Uma combinação farmacêutica que compreende a) um primeiro agente que é um composto de ligação à ciclofilina tal como uma sangliferina, por exemplo, um composto de fórmula I e b) um co-

agente, por exemplo, um ou mais agentes farmacêuticos fornecidos aqui.

- 5 5. Um método como definido acima que compreende a co-administração, por exemplo, concomitantemente ou em seqüência, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de ligação à ciclofilina tal como uma sangliferina, por exemplo, um composto de fórmula I e um co-agente, por exemplo, um ou mais agentes farmacêuticos fornecidos aqui.

10 O composto da invenção pode ser administrado por qualquer via convencional, em particular enteralmente, por exemplo oralmente, por exemplo na forma de soluções para beber, comprimidos ou cápsulas ou parenteralmente, por exemplo na forma de soluções ou suspensões injetáveis. As composições farmacêuticas preferidas podem ser, por exemplo, aquelas baseadas em micro-emulsões como descrito em UK 2.222.770 A.

15 Em outro aspecto, co-agentes adequados podem ser co-administrados em tratamentos de combinação ou de alternância. Os termos "co-administração" ou "administração combinada" ou semelhantes como utilizados aqui pretendem abranger a administração dos agentes terapêuticos selecionados a um paciente, e pretendem incluir regimes de tratamento nos  
20 quais os agentes não são necessariamente administrados pela mesma via de administração ou ao mesmo tempo. Combinações fixas também estão dentro do escopo da presente invenção. A administração de uma combinação farmacêutica da invenção resulta em efeito benéfico, por exemplo, um efeito terapêutico sinérgico ou aditivo, comparado à monoterapia na qual  
25 apenas um dos ingredientes farmacêuticamente ativos é aplicado. Co-agentes adequados para co-administração com o composto da invenção incluem mas não são limitados a:

(1) Interferons ou conjugados de interferons tais como:

- 30 (a) Intron-A<sup>®</sup>, interferon alfa-2b (Schering Corporation, Kenilworth, NJ),  
(b) PEG-Intron<sup>®</sup>, peginteferon alfa-2b (Schering Corporation, Kenilworth, NJ),  
(c) Roferon<sup>®</sup>, interferon alfa-2a recombinante (Hoffmann-La Roche,

Nutley, NJ),

(d) Pegasys<sup>®</sup>, peginterferon alfa-2a (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ),

(e) Berefor<sup>®</sup>, interferon alfa 2 disponível (Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, CT),

5 (f) Sumiferon<sup>®</sup>, uma mistura purificada de interferons alfa naturais (Sumitomo, Japão),

(g) Wellferon<sup>®</sup>, interferon alfa n1 linfoblástico (GlaxoSmithKline),

(h) Infergen<sup>®</sup>, interferon alfa consenso (InterMune Pharmaceuticals, Inc., Brisbane, CA e Amgen, Inc., Newbury Park, CA),

10 (i) Alferon<sup>®</sup>, uma mistura de interferons alfa naturais (Interferon Sciences, e Purdue Frederick Co., CT),

(j) Viraferon<sup>®</sup>;

(k) Interferons conjugados incluem, por exemplo, Albuferon (Human Genome Science) que é conjugado à albumina humana. Interferon conjugado a um polímero solúvel em água ou homopolímeros de óxido de polialquileno tais como polietileno glicol (PEG) ou polipropileno glicóis, polióis polioxietilenados, copolímeros desses e copolímeros de bloqueio desses. Como uma alternativa a polímeros à base de óxido de polialquileno, materiais efetivamente não antigênicos tais como dextrano, polivinil pirrolidonas, poliácridamidas, alcoóis polivinílicos, polímeros à base de carboidratos e semelhantes podem ser usados. Conjugados de interferon-polímero estão descritos em

15 US 4766106, US 4917888, EPA 0 236 987, EPA 0 510 356 e WO 95/13090. Já que a modificação polimérica reduz suficientemente

20 as respostas antigênicas, o interferon estranho não precisa ser completamente autólogo. Interferon usado para preparar conjugados de polímero podem ser preparados a partir de um extrato de mamífero, tais como interferon humano, de ruminante ou bovino ou produzidos de forma recombinante.

30 Outras formas de interferons incluem interferon-beta, gama, tau e omega, tais como Rebif (Interferon beta 1a) de Serono, Omniferon (interferon natural) de Viragen, ou Omega Interferon de Boehringer Ingelheim;

Interferons orais tais como interferon alfa oral de Amarillo Biosciences;

Em outro aspecto, exemplos adicionais de interferons incluem interferon alfa peguilado, por exemplo, interferon  $\alpha$ -2a peguilado, interferon  $\alpha$ -2b peguilado, interferon consenso peguilado, ou produto purificado de interferon- $\alpha$  peguilado. Interferon  $\alpha$ -2a peguilado está descrito na Patente Europeia 593.868 (incorporada aqui por referência em sua totalidade) e disponível comercialmente, por exemplo, sob o nome comercial de PEGASYS<sup>®</sup> (Hoffmann-La Roche). Interferon- $\alpha$ -2b peguilado está descrito, por exemplo, na Patente Europeia 975.369 (incorporada aqui por referência em sua totalidade) e disponível comercialmente, por exemplo, sob o nome comercial de PEG-INTRON A<sup>®</sup> (Schering Plough). Interferon de consenso peguilado está descrito em WO 96/11953 (incorporado aqui por referência em sua totalidade).

#### (2) Antivirais

Agentes antivirais podem ser compostos ou biológicos que são eficazes para inibir a formação e/ou replicação de um vírus em um mamífero. Isso inclui agentes que interferem com os mecanismos do hospedeiro e com os virais, necessários para a formação e/ou replicação de um vírus em um mamífero, tais como ribavirina (1-beta-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida) de Valeant Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA, Rebetol<sup>®</sup> de Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ, e Copegus<sup>®</sup> de Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ, análogos de ribavirina em desenvolvimento, tais como Levovirina e Viramidina de Valeant, e Monofosfato de Mizoribina;

#### (3) Inibidores de Protease

Inibidores da serina protease NS3-4A de HCV tais como inibidores de protease à base de substrato (Attwood *et al.*, "Antiviral peptide derivatives.", PCT WO 98/22496, 1998; Attwood *et al.*, Antiviral Chemistry and Chemotherapy 1999, 10, 259-273; Attwood *et al.*, "Preparation and use of amino acid derivatives as anti-viral agents.", Pub de Patente alemã DE 19914474; Tung *et al.* "Inhibitors of serine proteases, particularly hepatitis C virus NS3 protease"; PCT WO 98/17679), incluindo alfacetoamidas e hidrazinouréias e inibidores que terminam em um eletrófilo tal como ácido ou fos-

fonato borônico (Llinas-Brunet *et al.* "Hepatitis C inhibitor peptide analogues", PCT WO 99/07734);

Inibidores de protease descritos em patentes U.S. para tratamento de HCV, por exemplo, Patente U.S. Nº 6.004.933 para Spruce *et al.* que descreve uma classe de inibidores de cisteína protease para inibir endopeptidase 2 de HCV; Patente U.S. Nº 5.990.276 para Zhang *et al* que descreve inibidores sintéticos de protease NS3 de vírus de hepatite C; Patente U.S. Nº 5.538.865 para Reyes *et al.*; Peptídeos como inibidores de serina protease NS3 de HCV que são descritos em WO 02/008251 para Corvas International, Inc., e WO 02/08187 e WO 02/008256 para Schering Corporation; Tripeptídeos inibidores de HCV que são descritos nas Patentes U.S. Nos. 6.534.523, 6.410.531 e 6.420.380 para Boehringer Ingelheim e WO 02/060926 para Bristol Myers Squibb (incorporadas aqui por referência em suas totalidades); Peptídeos de Diarila como inibidores de serina protease NS3 de HCV que estão descritos em WO 02/48172 para Schering Corporation; Imidazoleidinonas como inibidores de serina protease NS3 de HCV que estão descritos em WO 02/18198 para Schering Corporation e WO 02/48157 para Bristol Myers Squibb (incorporadas aqui por referência em suas totalidades); WO 98/17679 para Vertex Pharmaceuticals e WO 02/48116 para Bristol Myers Squibb também descrevem inibidores de protease de HCV (incorporadas aqui por referência em suas totalidades).

(4) Inibidores de protease NS3 não baseados em substrato tais como derivados de 2,4,6-triidróxi-3-nitro-benzamida (Sudo K. *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 238 643-647; Sudo K. *et al.* *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 1998, 9, 186), incluindo RD3-4082 e RD3-4078;

(5) Uma fenantrenoquinona que possui atividade contra protease em um ensaio de SDS-PAGE e autoradiografia, isolada do caldo de cultura de fermentação de *Streptomyces* sp., Sch 68631 (Chu M. *et al.*, *Tetrahedron Letters*, 1996, 37, 7229-7232), (Chu M *et al.*, *Tetrahedron Letters* 37:7229-7232, 1996); Sch 351633, isolado do fungo *Penicillium grieofulvum* (Chu M. *et al.*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9:1949-1952); inibidores seleti-

vos projetados com base na macromolécula de eglin c., que é isolada da sanguessuga e é um potente inibidor de diversas serina proteases tais como proteases A e B de *S. griseus*,  $\nabla$ -quimotripsina, quimase e subtilisina (Qasim M.A. *et al.*, *Biochemistry* 36:1598-1607, 1997).

5 (6) Tiazolidinas e benzanilidas identificadas em Kakiuchi N. *et al.* *J. FEBS Letters* 421, 217-220; Takeshita N. *et al.* *Analytical Biochemistry*, 1997, 247, 242-246. Derivados de tiazolidina que mostram inibição relevante em um ensaio de HPLC de fase reversa com uma proteína de fusão NS3/4A e substrato NS5A/5B (Sudo K. *et al.*, *Antiviral Research*, 1996, 32, 9-18); especialmente o composto RD-16250 que possui uma porção de cinamoila fundida  
10 substituída com uma cadeia de alquila longa, RD4 6205 e RD4 6193.

(7) Inibidores da serina protease NS3-4A de HCV, que incluem BILN 2061 de Boehringer Ingelheim, VX-950 por Vertex, SCH-503034 e SCH-351633, de Schering-Plough, e outros inibidores de protease de HCV em desenvolvimento pré-clínico e clínico por GlaxoSmithKline, Bristol Myers Squibb, Abbot, Roche, Merck, Pfizer, e Gilead;

(8) Análogos de nucleosídeo

Telbivudina de Idenix (US 6444652, US6596700, e WO0196353). Inibidores de nucleosídeo ou não-nucleosídeo de RNA polimerase dependente de RNA NS5B de HCV, tal como éster de 2'-C-metil-3'-O-L-valina ribofuranosil citidina (NM283, Idenix) como descrito em WO  
20 2004/002422.

Nucleosídeos ramificados descritos por Idenix Pharmaceuticals para uso no tratamento de flavivírus (incluindo HCV) e pestivírus nas Publicações Internacionais Nos. WO 01/90121 e WO 01/92282 (incorporadas aqui por referência nas suas totalidades). Especificamente, um método de tratamento de infecção por hepatite C (e flavivírus e pestivírus) em humanos e outros animais hospedeiros está descrito nas publicações de Idenix que inclui administrar uma quantidade eficaz de um nucleosídeo B-D ou B-L 1',  
25 2', 3' ou 4'-ramificado biologicamente ativo ou um sal ou pró-farmaco farmacologicamente aceitável desses, administrado tanto sozinho quanto em combinação com outro agente antiviral, opcionalmente em um veículo farmaceu-  
30

ticamente aceitável

Análogos de nucleosídeos em outros pedidos de patente que descrevem o uso de tratamento de um vírus de hepatite C incluem: PCT-CA00/01316 (WO 01/32153; depositado em 3 de novembro de 2000) e  
 5 PCT/CA01/00197 (WO 01/60315; depositado em 19 de fevereiro de 2001) depositados por BioChem Pharma, Inc., (agora Shire Biochem, Inc.); PCT/US02/01531 (WO 02/057425; depositado em 18 de janeiro de 2002) e PCT/US02/03086 (WO 02/057287; depositado em 18 de janeiro de 2002) depositados por Merck & Co., Inc., PCT/EP01/09633 (WO 02/18404; publicado em 21 de agosto de 2001) depositado por Roche, e Publicações PCT  
 10 N<sup>os</sup> WO 01/79246 (depositada em 13 de abril de 2001), WO 02/32920 (depositada em 18 de outubro de 2001) e WO 02/48165 por Pharmasset, Ltd. (cujas descrições estão aqui incorporadas por referência em suas totalidades)

15 2'-fluoronucleosídeos descritos na Publicação PCT N<sup>o</sup> WO 99/43691 para Emory University (incorporada aqui por referência em sua totalidade), intitulada "2'-Fluoronucleosides";

Nucleosídeos 2'-modificados descritos por Eldrup *et al.* (Sessão Oral V, "Hepatitis C Virus, Flaviviridae"; 16<sup>a</sup> Conferência Internacional sobre  
 20 Pesquisa Antiviral (27 de abril de 2003, Savannah, GA));

Análogos de nucleosídeos e nucleosídeos 2'-modificados descritos em Bhat *et al.* (Sessão Oral V, "Hepatitis C Virus, Flaviviridae" 2003 (Sessão Oral V, "Hepatitis C Virus, Flaviviridae"; 16<sup>a</sup> Conferência Internacional sobre Pesquisa Antiviral (27 de abril de 2003, Savannah, GA); p A75);

25 Nucleosídeos 2'-modificados descritos em Olsen *et al.* (Sessão Oral V, "Hepatitis C Virus, Flaviviridae"; 16<sup>a</sup> Conferência Internacional sobre Pesquisa Antiviral (27 de abril de 2003, Savannah, GA) p A76)

Compostos pré-clínicos incluem R803 (Rigel), JTK-003 (Japan Tabacco), HCV-086 (ViroPharma/Wyeth), R-1479 (Roche);

30 (9) Inibidores da nucleotídeo polimerase e gliotoxina (Ferrari R. *et al. Journal of Virology*, 1999, 73, 1649-1654), e o produto natural cerulenina (Lohmann V. *et al. Virology*, 1998, 249, 108-118);

(10) Inibidores da helicase NS3 de HCV, tais como VP\_50406 de ViroPharma e compostos de Vertex, outros inibidores de helicase descritos em Patente U.S Nº 5.633.388 e PCT WO 97/36554;

5 (11) Moléculas anti-sentido direcionadas contra o genoma de HCV ou qualquer componente celular que é necessário para a replicação viral.

Oligodesoxinucleotídeos de fosforotioato (S-ODN) complementares aos trechos de seqüência na região não-codificante (NCR) 5' do vírus (Alt M. *et al.*, *Hepatology*, 1995, 22, 707-717), ou nucleotídeos 326-348 que compreendem a terminação 3' da NCR e nucleotídeos 371-388 localizados  
10 na região codificante central do RNA de HCV (Alt M. *et al.*, *Archives of Virology*, 1997, 142, 589-599; Galderisi U. *et al.*, *Journal of Cellular Physiology*, 199, 181, 251-257); tais como ISIS 14803 por Isis Pharm/Elan, oligonucleotídeos anti-sentido por Hybridon, AVI bioPharma e Chugai, AVI-4065 (AVI BioPharma), ou uma seqüência anti-sentido complementar a qualquer parte do  
15 genoma de HCV que aumenta a eficácia da terapia;

(12) Inibidores da tradução dependente de IRES (Ikeda N *et al.*, "Agent for the prevention and treatment of hepatitis C.", Pub. Patente Japonesa JP-08268890; Kai Y *et al.* "Prevention and treatment of viral diseases", Pub. Patente Japonesa JP-10101591); tais como ISIS 14803 por Isis Pharm/Elan,  
20 inibidores de IRES por PTC Therapeutics, Anadys, Immusol, RiboTargets, e SomaGenics;

(13) Ribozimas, tais como ribozimas resistentes à nuclease (Maccjak, D.J. *et al.*, *Hepatology* 1999, 30, resumo 995) e aquelas na Patente U.S. Nº 6.043.077 de Barber *et al.*, e. Patentes U.S Nos. 5.869.253 e 5.610.054 de  
25 Draper *et al.* (incorporadas aqui por referência em suas totalidades) por exemplo, HEPTAZYME de RPI, e Sirna Therapeutics Inc.;

(14) Um inibidor de outros alvos no ciclo de vida de HCV incluindo entrada viral, montagem e maturação tal como Celgosivir (MBI 3253), um inibidor de processamento de glicoproteína por Migenix, inibidor de fusão por Trimeris,  
30 ACH-0137171 por Achillion;

(15) Agentes imuno-moduladores

Agonistas de receptor tais como agonistas do receptor seme-

- lhante a "toll" (TLR) incluem ANA245, ANA971, ANA975 (US 5041426, 4880784) por Anadys; CpG-10101 um agonista de TLR-9 (Coley Pharmaceuticals); um inibidor de IMPDH, ácido micofenólico, um sal ou pró-fármaco desse, micofenolato de sódio ou mofetil micofenolato ou Merimebodib (VX-497, por Vertex); timosina alfa-1 (Zadaxin ou sua combinação, por SciClone); SCV-07 (SciClone), Belerofon (IFN- $\alpha$  melhorada por Nautilus); CIVACIR (Imunoglobulina de hepatite C) por NABI, ou um agonista do receptor S1P, por exemplo, FTY720 ou análogo desse opcionalmente fosforilado, por exemplo, como descrito em EP627406A1, EP778263A1, EP1002792A1, WO02/18395, WO02/76995, WO 02/06268, JP2002316985, WO03/29184, WO03/29205, WO03/62252 e WO03/62248, cujas descrições estão incorporadas aqui pela referência em suas totalidades; Resiquimod [VML 600] por 3M Pharmaceuticals, um análogo de imiquimod que é um potente indutor de interferon- $\alpha$  e outras citocinas;
- 5
- 10
- 15 (16) Um agente anti-fibrótico, tal como um derivado N-fenil-2-pirimidina-  
amina, imatinibe (Gleevec), IP-501 por Indevus, e Interferon gama 1b por  
InterMune, Pirfenidona (Múltiplo: agonista de TGF Beta, antagonista de FGF,  
antagonista de PDGF) por Intermune, Marnac, Shionogi;
- (17) Vacinas terapêuticas por Intercell (vacina de peptídeo terapêutico IC41  
20 HCV), Epimmune/Genecor, Merix, Tripep (Chiron-VacC), imunoterapia (The-  
rapore) por Avant, terapia de célula T por CellExSys, anticorpo monoclonal  
XTL-002 por STL, ANA 246 e ANA 246 por Anadys, uma vacina terapêutica  
direcionada para E2 por Innogenetics, mAb contra a proteína do envelope  
E2 por XTL Bio, GI-5005 (Globelimmune Inc), InnoVac-C (WO 9967285, In-  
25 nogenetics), IC-41 (Intercell), interferon alfa-n3 (Interferon Sciences), Engerix  
B (SmithKline Beecham);
- (18) Outros compostos incluem Ursodiol (EP00269516, Axcan Pharma), HE-  
2000 (um análogo de DHEA, Colthurst Ltd), EHC-18 (um imunomodulador,  
Enzo biochem), diidrocloreto de histamina (um agonista H2, WO09104037,  
30 Estero-Anstalt), 1-amino-alquilciclohexanos (Patente U.S Nº 6.034.134), lipí-  
deos de alquila (Pat. U.S. Nº 5.922.757), vitamina E e outros antioxidantes  
(Patente U.S. Nº 5.922.757), ácidos biliares (U.S. Pat. Nº 5.846.99964), áci-

- do N-(fosfonoacetil)-L-aspartico) Pat. U.S. Nº 5.830.905), benzenodicarboxamidas (Pat. U.S. Nº 5.633.388), derivados de ácido poliadenílico (Pat U.S. Nº 5.496.546), 2'3'-didesoxiinosina (Pat. U.S. Nº 5.026.687), benzimidazóis (Pat. U.S. Nº 5.891.874), extratos de plantas (Pat. U.S. Nº 5.837.257, Pat. U.S. Nº 5.725.859 e Pat. U.S. Nº 6.056.961) e piperidinas (Pat. U.S. Nº 5.830.905); ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspartico, benzenodicarboxamidas, derivados de ácido poliadenílico, inibidores da glicosilação, e agentes citoprotetores não específicos que bloqueiam a injúria celular causada por infecção viral;
- 10 (19) Qualquer outro composto atualmente em desenvolvimento pré-clínico ou clínico para o tratamento de HCV, incluindo Interleucina-10 (Schering-Plough), AMANTADINE (Symmetrel) por Endo Labs Solvay, inibidor de caspase IDN-6556 por Idun Pharma, HCV/MF59 por Chiron, CEPLENE (dicloreto de histamina) por Maxim, IDN-6556 por Idun PHARM, T67, um inibidor de
- 15 beta-tubulina por Tularik, FK788 por Fujisawa Healthcare, IdB1016 (Siliphos, fitossomo de silibin-fosfatidil colina oral), Dication por Immtech, hemopurificador por Aethlon Medical, UT 231B por United Therapeutics; HepeX-C SM1, PPVO-Bay55-8800 (Parapoxvirus ovis) por Bayer; Refanalin (mimético de HGF) por Angion, R803 (Rigel), JTK-003, JTK-002, e JTK-109 (todos de
- 20 Japan Tobacco), HCV-086 (ViroPharma/Wyeth), ISIS-14803 (ISIS Pharmaceuticals), GS-9132 (um inibidor de polimerase por Achillion Pharmaceuticals), HCV-793 (Pharmasset e Roche), R1626 (Roche).

Compostos ou fármacos em desenvolvimento pré-clínico podem ser facilmente identificados por aquele versado na técnica pela pesquisa de

25 informação de ensaio clínico na internet, por exemplo, e informação publicada pelas respectivas empresas.

- (20) Compostos que aumentam a eficácia de uma terapia de combinação incluindo um antifolato, uma 5-fluoropirimidina (incluindo 5-fluorouracil), um análogo de citidina tal como  $\beta$ -L-1,3-dioxolanil citidina ou  $\beta$ -L-1,3-dioxolanil 5-
- 30 fluorocitidina, antimetabólitos (incluindo antimetabólitos de purina, citarabina, fludarabina, floxuridina, 6-mercaptopurina, metotrexato, e 6-tioguanina), hidroxiuréia, inibidores mitóticos (incluindo CPT-11, etoposídeo (VP-21), taxol,

e alcalóides da vinca tais como vincristina e vinblastina, um agente alquilante (incluindo mas não limitado a busulfan, clorambucil, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina, melfalan, e tiotepa), agentes alquilantes não clássicos, compostos que contêm platina, bleomicina, um antibiótico anti-tumor, uma antraciclina tal como doxorrubicina e daunomicina, uma antracenediona, inibidores da topoisomerase II, agentes hormonais (incluindo mas não limitados a corticosteróides (dexametasona, prednisona, e metilprednisona), andrógenos tais como fluoximesterona e metiltestosterona, estrogênios tais como dietilestilbestrol, antiestrogênios tais como tamoxifeno, análogos de LHRH tais como leuprolídeo, antiandrogênios tais como flutamida, aminoglutetimida, acetato de megestrol, e medroxiprogesterona), asparaginase, carmustina, lomustina, hexametil-melamina, dacarbazina, mitotane, estreptozocina, cisplatina, carboplatina, levamasol, e leucovorin. Os compostos da presente invenção também podem ser usados em combinação com agentes de terapia com enzima e moduladores do sistema imune, tais como interleucina, fator de necrose tumoral, fator estimulador de colônia de macrófago e fator estimulador de colônia.

A utilidade de um composto ou agente terapêutico de ligação a ciclofilina, tal como sangliferina, no tratamento de doenças e condições como as especificadas anteriormente acima pode ser demonstrada em testes padronizados clínicos ou *in vitro*, por exemplo, de acordo com os métodos anteriormente descritos.

#### A. *In vitro*

Os efeitos de várias sangliferinas da invenção sobre a replicação do genoma de HCV são examinados usando as células de replicon de HCV.

A linhagem celular de replicon de HCV, clone A, é licenciada por Apath, LLC. As células são cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco), contendo 10% de soro fetal bovino inativado por calor (FBS, Gibco), L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos não essenciais (Gibco), e 1 mg/ml de G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Para determinar o efeito antiviral dos compostos, as células de replicon de HCV (clone A) são tratadas com compostos diluídos seriadamen-

te em DMEM suplementado com 2% de FBS e 0,5% de DMSO por 48 h, então, o RNA intracelular total foi extraído e o nível de RNA de HCV é determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real (Taqman) usando iniciadores específicos para HCV (5'-TCT TCA CGC AGA AAG CGT CTA-3' e 5'-CTG GCA ATT CCG GTG TAC T-3') Sequência ID No: 1 e sonda (5'-6-FAM-TCC TGG AGG CTG CAC GAC ACT CAT A-TAMRA-3') Sequência ID No: 2. Para cada tratamento, a quantidade de RNA de HCV é normalizada contra a quantidade total de RNA extraído, que é determinada em um ensaio Quant-iT (Molecular Probe). Cada dado obtido representa a média de seis replicas em cultura celular. IC<sub>50</sub> é a concentração do composto na qual o nível de RNA de HCV nas células de replicon está reduzido em 50%. Para monitorar o efeito citotóxico dos compostos, a viabilidade de células de replicon após 48 h de tratamento com o composto é determinada usando um ensaio baseado num composto de tetrazólio (MTS) (*CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega, Madison, WI). CC<sub>50</sub> é a concentração do composto na qual a viabilidade celular está reduzida em 50%.

#### B. Ensaio Clínico

Um total de 15~30 pacientes com infecção viral por hepatite C são arrolados em um estudo de 2~12 semanas. Cada paciente recebe uma dose terapêutica eficaz de um composto de ligação à ciclofilina, tal como sangliferina. Os níveis séricos de carga de RNA viral são monitorados durante o curso do tratamento e em um período de acompanhamento de 2 semanas tipicamente para todos os pacientes.

A extensão do tratamento e as dosagens necessárias para se obter respostas virológicas mantidas em pacientes com hepatite C devem ser determinadas em ensaios clínicos adicionais envolvendo um número maior de pacientes e um período de tratamento mais longo de até 12 meses com 6 meses de acompanhamento.

As dosagens diárias necessárias para a prática do método da presente invenção variarão na dependência, por exemplo, do composto de ligação à ciclofilina empregado, do hospedeiro, do modo de administração e da severidade da condição a ser tratada.

Sangliferina pode ser administrada como único ingrediente ou junto com outros fármacos, por exemplo, um fármaco que tem atividades anti-HCV, por exemplo, um interferon alfa, interferon alfa peguilado, ribavirina, um inibidor da polimerase de HCV tal como NM283, ou um inibidor de protease de HCV tal como SCH503034 e VX-950. Dosagens diárias com relação aos co-agentes usados variarão na dependência, por exemplo, dos efeitos sinérgicos com o composto empregado, do hospedeiro, do modo de administração e da severidade da condição a ser tratada.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para prevenir ou tratar hepatite C e doenças relacionadas tais como fibrose hepática, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular em um indivíduo em necessidade disso, que compreende administrar ao dito  
5 indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de ligação a ciclofilina, tal como um macrolídeo.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 no qual o macrolídeo é uma sangliferina de fórmula VII

S-L-M

10 em que S representa uma cadeia (C<sub>1-10</sub>)alquila ramificada ou linear;  
L representa um ligante que compreende uma seqüência linear de 6 a 11 átomos de carbono; e M representa um anel macrocíclico em que as posições 2 a 6 do dito anel macrocíclico são fornecidas por um resíduo de ácido piperidazinil carboxílico substituído ou não substituído de fórmula I; em que  
15 as posições 7 a 9 do dito anel macrocíclico são fornecidas por um resíduo de alfa-aminoácido aromático em que a porção carbóxi do resíduo de alfa-aminoácido aromático ocupa a posição 7 do dito anel macrocíclico e a porção alfa-amino do resíduo de alfa-aminoácido aromático ocupa a posição 9 do dito anel macrocíclico, as posições 10 a 12 do dito anel macrocíclico são  
20 fornecidas por um resíduo de alfa-aminoácido alifático em que a porção carbóxi do resíduo de alfa-aminoácido alifático ocupa a posição 10 do dito anel macrocíclico e a porção alfa-amino do resíduo de alfa-aminoácido alifático ocupa a posição 12 do dito anel macrocíclico, o restante do anel macrocíclico que compreende um resíduo de ácido hidróxi-carboxílico que tem uma de  
25 extensão de cadeia de 6 a 20 átomos, a porção óxi do qual completa uma ligação lactona macrocíclica e cuja porção carbonila forma uma ligação amida com o grupo alfa.-amino na posição 12 do anel macrocíclico, na forma livre ou protegida ou um sal desse.

3. Método para inibir a replicação de HCV em um meio, que  
30 compreende aplicar a esse meio uma quantidade eficaz de um composto de ligação à ciclofilina tal como uma sangliferina.

4. Método para inibir a replicação de HCV em um paciente em

necessidade disso, que compreende administrar a esse indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de ligação à ciclofilina tal como uma sangliferina.

5           5. Método para prevenir a recorrência de infecção por HCV em um receptor de transplante em necessidade disso, que compreende administrar ao dito receptor uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de ligação a ciclofilina tal como uma sangliferina.

10           6. Uso de um composto de ligação a ciclofilina tal como uma sangliferina na prevenção ou tratamento de hepatite C e doenças relacionadas e tais como fibrose hepática, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular.

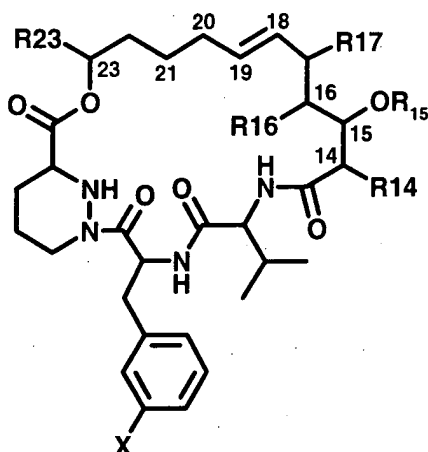
7. Uso de um composto de ligação a ciclofilina tal como uma sangliferina na preparação de uma composição farmacêutica para uso em um método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

15           8. Composição farmacêutica para uso em um método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, que compreende um composto de ligação a ciclofilina tal como uma sangliferina junto com um ou mais diluentes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis para isso.

20           9. Combinação farmacêutica que compreende a) um primeiro agente que é um composto de ligação a ciclofilina tal como uma sangliferina, e b) um co-agente que tem propriedades anti-HCV.

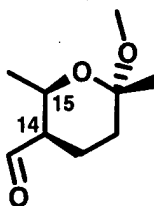
25           10. Método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, compreendendo co-administração concomitante ou em seqüência de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de ligação a ciclofilina tal como uma sangliferina e um co-agente que tem propriedades anti-HCV.

11. Método, uso, composição ou combinação como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o composto de ligação a ciclofilina é um composto da fórmula



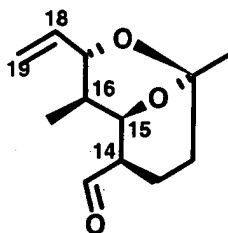
em que X é H, metóxi, etóxi, OnPr, OiPr;

R14 e R15 são independentemente H, metila, alquila, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquila, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-CO-CH<sub>3</sub>, ou R14 e R15 são fundidos para formar uma cicloalquila de 5 a 7 membros substituída ou não substituída: selecionada da fórmula



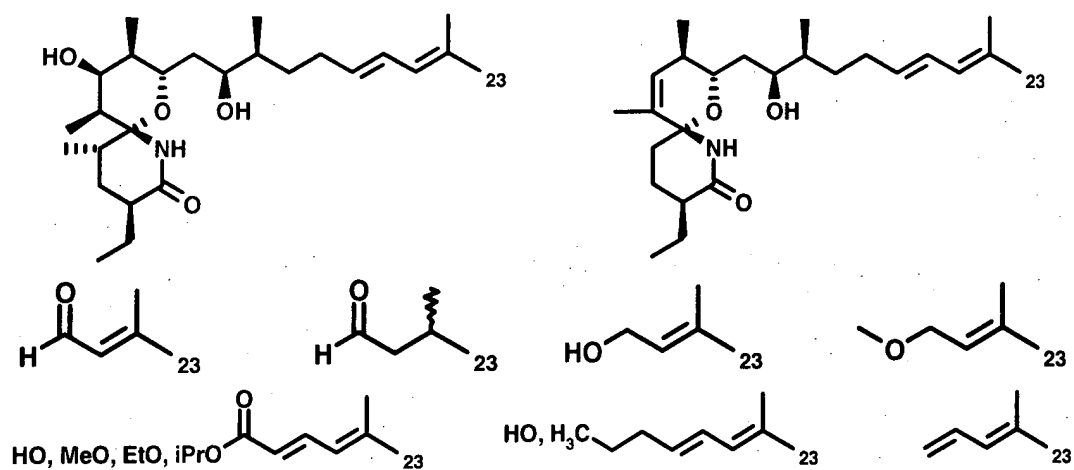
5 R16 é H, ou Me ou (C<sub>1-4</sub>)alquila;

R17 é H, OH, -O-(C<sub>1-4</sub>)alquila ou R14, R15 e R17 são fundidos para formar uma cicloalquila da fórmula



R23 é H, (C<sub>1-10</sub>)alquila de cadeia ramificada ou linear e/ou contém uma ou mais ligações insaturadas em particular ligações duplas ou triplas cumulativas ao longo de sua extensão.

12. Método, uso, composição ou combinação de acordo com a reivindicação 11 em que R23 é selecionado a partir do grupo que consiste em -CH=CH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>, -CHO, -COOH, ou de fórmula XIX'.



13. Método, uso, composição, ou combinação substancialmente como definido e descrito acima.

## RESUMO

Patente de Invenção: "USO DE SANGLIFERINA EM HCV".

A presente invenção refere-se o uso de um composto macrolídeo tal como uma sangliferina para o tratamento de prevenção de hepatite C e doenças relacionadas tais como fibrose hepática, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular.