República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0419345-8 B1

(22) Data do Depósito: 21/04/2004

(45) Data de Concessão: 22/12/2020

(54) Título: USO DO (2R)-2-DESOXI-2-FLÚOR-2-C-METIL NUCLEOSÍDEO E DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE O COMPREENDE

(51) Int.Cl.: C07H 19/00.

(30) Prioridade Unionista: 30/05/2003 US 60/474,368.

(73) Titular(es): GILEAD PHARMASSET LLC.

(72) Inventor(es): JEREMY CLARK.

(86) Pedido PCT: PCT US2004012472 de 21/04/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/003147 de 13/01/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 25/03/2011

(62) Pedido Original do Dividido: PI0410846-9 - 21/04/2004

(57) Resumo: COMPOSTOS, COMPOSIÇÕES E USOS PARA O TRATAMENTO DE UMA INFECÇÃO POR FLAVIVIRIDAE. A invenção apresentada fornece composições e métodos de tratamento de uma infecção por Flaviviridae, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo, Vírus da febre amarela, e uma infecção por rinovírus em um hospedeiro, incluindo animais, e especialmente humanos, com o uso de (2'R) -2' - desoxi-2' flúor-2'-C-metil nucleosídeos, ou um sal ou pró-medicamento farmaceticamente aceitável desses.

USO DO (2'R)-2'-DESOXI-2'-FLÚOR-2'-C-METIL NUCLEOSÍDEO E DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE O COMPREENDE

[001] Pedido dividido do PI 0410846-9, depositado em 21 de abril de 2004.

Campo da Invenção

[002] A presente invenção inclui (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeos tendo a configuração β-D natural e métodos para o tratamento de infecções por Flaviviridae, especialmente vírus da hepatite C (HCV).

Fundamento da Invenção

[003] A infecção por vírus da hepatite C (HCV) é um grande problema de saúde que leva à doença hepática crônica, como cirrose e carcinoma hepatocelular, em um número substancial de indivíduos infectados, estimados como sendo de 2-15% da população mundial. Há um número estimando de 4,5 milhões de pessoas infectadas nos Estados Unidos isoladamente, de acordo com o *U. S. Center for Disease Control*. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, há mais de 200 milhões de indivíduos infectados pelo mundo, com pelo menos 3 a 4 milhões sendo infectados a cada ano. Uma vez infectadas, cerca de 20% das pessoas eliminam o vírus, mas o restante pode abrigar o HCV para o resto de suas vidas. Dez a vinte por cento de indivíduos cronicamente infectados desenvolvem eventualmente cirrose destruidora de fígado ou câncer. A doença viral é transmitida por via parenteral por sangue e produtos de sangue contaminados, agulhas contaminadas ou por via sexual e verticalmente de mães infectadas ou mães portadoras para sua prole. Os tratamentos atuais para infecção por HCV, que são restritos a imunoterapia com interferon-α recombinante isoladamente ou em combinação com o análogo de nucleosídeo ribavirina, são de benefício clínico limitado uma vez que a resistência se desenvolve rapidamente. Além disso, não há qualquer vacina estabelecida para HCV. Consequentemente, há uma necessidade urgente por melhores agentes

terapêuticos que combatam de forma eficaz a infecção crônica por HCV.

[004] O vírion do HCV é um vírus envelopado de RNA filamento-positivo com uma única sequência genômica de oligorribonucleotídeo de cerca de 9.600 bases que codificam uma poliproteína de cerca de 3.010 aminoácidos. Os produtos de proteína do gene de HCV consistem nas proteínas estruturais C, E1 e E2, e as proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A e NS4B e NS5A e NS5B. Acredita-se que as proteínas não estruturais (NS) forneçam o mecanismo catalítico para a replicação viral. A protease NS3 libera NS5B, a RNA polimerase dependente de RNA da cadeia de poliproteína. NS5B polimerase de HCV é necessária para a síntese de um RNA de duplo filamento a partir de um RNA viral de filamento único que serve como um modelo no ciclo de replicação de HCV. Portanto, NS5B polimerase é considerada como sendo um componente essencial no complexo de replicação de HCV (K. Ishi, *et al*., *Expression of Hepatitis C Virus NS5B Protein: Characterization of Its RNA Polymerase Activity e RNA Binding*, *Heptology*, 29: 1227-1235 (1999); V. Lohmann, *et al*., *Biochemical e Kinetic Analysis of NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase of the Hepatitis C Virus, Virology*, 249: 108-118 (1998)). A inibição de NS5B polimerase de HCV evita a formação do RNA de duplo filamento de HCV e constitui, portanto, em uma abordagem atrativa para o desenvolvimento de terapias antivirais específicas para HCV.

[005] HCV pertence a uma família muito maior de vírus que partilham várias características comuns.

Vírus Flaviviridae

[006] A família *Flaviviridae* de vírus compreende pelo menos três gêneros distintos: pestivírus, que causam doenças em gado e porcos; flavivírus, que são a causa primária de doenças como febre da dengue e febre amarela; e hepacivírus, cujo único membro é HCV. O gênero flavivírus inclui mais de 68

membros separados em grupos com base na relevância sorológica (Calisher *et al*., J. Gen. Virol, 1993,70, 37-43). Os sintomas clínicos variam e incluem febre, encefalite e febre hemorrágica (Fields Virology, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., e Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Filadélfia, PA, 1996, capítulo 31, 931-959). Flavivírus de interesse global que estão associados a doença humana incluem os vírus da febre da dengue hemorrágica (DHF), vírus da febre amarela, síndrome do choque e Vírus da encefalite Japonesa (Halstead, S. B., *Rev. Infect*. Dis., 1984, 6, 251-264; Halstead, S. B., *Science*, 239: 476-481, 1988; Monath, T. P., New Eng. *J. Med*, 1988, 319, 641-643).

[007] O gênero pestivírus inclui o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus da febre suína clássica (CSFV, também chamado vírus da cólera de porcos) e vírus da doença da fronteira dos ovinos (BDV) (Moennig, V. *et al*., Adv. Vir. Res. 1992,41, 53-98). Infecções por pestivírus de animais de fazenda domesticados (gado, porcos e carneiros) causam perdas econômicas significativas em todo o mundo. BVDV causa doença mucosa em gado e é de importância econômica significativa para a indústria de gado (Meyers, G. e Thiel, H. J., Advances in Virus Research, 1996, 47, 53-118; Moennig V., *et al*., Adv. Vir. Res. 1992, 41, 53-98). Pestivírus humanos não foram tão bem caracterizados como os pestivírus animais. No entanto, análises sorológicas indicam uma considerável exposição de pestivírus em humanos.

[008] Pestivírus e hepacivírus são grupos de vírus intimamente relacionados com a família *Flaviviridae*. Outros vírus intimamente relacionados nessa incluem o vírus GB A, agentes semelhantes ao vírus GB A, o vírus GB B e o vírus GB C (também chamado vírus da hepatite G, HGV). O grupo de hepacivírus (vírus da hepatite C; HCV) consiste em inúmeros vírus intimamente relacionados, mas genotipicamente distinguíveis que infectam humanos. Há pelo menos 6 genótipos de HCV e mais de 50 subtipos. Devido às similaridades entre pestivírus

e hepacivírus, combinadas à pouca capacidade dos hepacivírus de crescer eficientemente em cultura de células, vírus da diarréia viral bovina (BVDV) é frequentemente usado como um substituto para o estudo do vírus HCV.

[009] A organização genética de pestivírus e hepacivírus é muito similar. Esses filamentos positivos do RNA do vírus possuem uma única estrutura larga de leitura aberta (ORF) que codifica todas as proteínas virais necessárias para a replicação viral. Essas proteínas são expressas como uma poliproteína que é processada junto e após a tradução por proteinases celulares quanto codificadas por vírus para gerar as proteínas virais maduras. As proteínas virais responsáveis pela replicação do RNA do genoma viral estão localizadas aproximadamente no terminal carboxi. Dois terços da ORF são denominados proteínas não estruturais (NS). A organização genética e processamento de poliproteína da porção da proteína não estrutural da ORF para pestivírus e hepacivírus é muito similar. Tanto para os pestivírus quanto os hepacivírus, as proteínas não estruturais (NS) maduras, em ordem sequencial do terminal amino da região codificadora da proteína não estrutural ao terminal carboxi da ORF, consistem em p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B.

[0010] As proteínas NS de pestivírus e hepacivírus partilham domínios de sequência que são característicos de funções específicas de proteína. Por exemplo, as proteínas NS3 de vírus em ambos os grupos possuem motivos de sequência de aminoácidos característicos de serina proteinases e de helicases (Gorbalenya *et al*., (1988) *Nature* 333: 22; Bazan e Fletterick (1989) *Virology* 171: 637-639; Gorbalenya *et al*., (1989) *Nucleic Acid Res*. 17.3889-3897). De forma similar, as proteínas NS5B de pestivírus e hepacivírus têm os motivos característicos de RNA polimerases direcionadas a RNA (Koonin, E. V. e Dolja, V. V. (1993) *Crir. Rev. Biochem. Molec. Biol*. 28: 375-430).

[0011] Os papéis e funções reais das proteínas NS de pestivírus e

hepacivírus no ciclo da vida dos vírus são diretamente análogos. Em ambos os casos, a serina proteinase NS3 é responsável por todo o processo proteolítico dos precursores de poliproteína abaixo de sua posição na ORF (Wiskerchen e Collett (1991) *Virology* 184 : 341-350; Bartenschlager *et al*., (1993) *J. Virol*. 67:3835-3844; Eckart *et al*., (1993) *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 192: 399-406; Grakoui *et al*., (1993) *J. Virol.* 67:2832-2843; Grakoui *et al*., (1993) *Proc. Natl. Acad Sci*. USA90: 10583- 10587;Hijikata *et al*., (1993) *J. Virol*. 67: 4665-4675; Tome *et al*., (1993) *J. Virol*. 67: 4017-4026). A proteína NS4A, em ambos os casos, age como um cofator com a serina protease NS3 (Bartenschlager *et al*., (1994) *J. Virol*. 68: 5045-5055; Failla *et al*., (1994) *J. Virol*. 68 : 3753-3760; Xu *et al*., (1997) *J. Viral*. 71:53 12-5322). A proteína NS3 de ambos os vírus também funciona como uma helicase (Kim *et al*., (1995) *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 215: 160-166; Jin e Peterson (1995) *Arch. Biochem. Biophys*., 323: 47-53; Warrener e Collett (1995) *J. Virol*. 69: 1720-1726). Finalmente, as proteínas NS5B de pestivírus e hepacivírus têm a atividade de RNA polimerases direcionadas a RNA previstas (Behrens *et al*., (1996) *EMBO.* 15: 12-22; Lechmann *et al*., (1997) *J. Virol*. 71: 8416-8428; Yuan *et al*., (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 232: 231-235; Hagedorn, PCT WO 97/12033; Zhong *et al*., (1998) *J. Virol*. 72.9365-9369).

Tratamento de infecção por HCV com Interferon

[0012] Interferons (IFNs) têm sido comercialmente disponíveis para o tratamento de hepatite crônica por quase uma década. IFNs são glicoproteínas produzidas por células imunes em resposta a infecção viral. IFNs inibem a replicação de inúmeros a vírus, incluindo HCV quando usados como o único tratamento para a infecção de hepatite C, IFN pode, em certos casos, suprimir HCV-RNA sérico a níveis indetectáveis. Adicionalmente, IFN pode normalizar os níveis de amino transferase sérica. Infelizmente, o efeito de IFN é temporário e uma reposta sustentada ocorre em apenas 8%-9% dos pacientes cronicamente

infectados com HCV (Gary L. Davis. *Gastroenterology* 18:S104-S114, 2000). A maior parte dos pacientes, entretanto, têm dificuldade em tolerar o tratamento com interferon, o que causa severos sintomas semelhantes a gripe, perda de peso e ausência de energia e vigor.

[0013] Inúmeras patentes revelam *Flaviviridae*, incluindo HCV e tratamentos que usam terapias baseadas em interferon. Por exemplo, Patente U.S. Nº 5.980.884 para Blatt *et al*., revela métodos para novo tratamento de pacientes aflingidos com HCV que usa interferon de consenso. Patente U.S. Nº 5.942.223 para Bazer *et al*., revela uma terapia anti-HCV que usa interferon-tau ovino ou bovino. Patente U.S. Nº 5. 928.636 para Alber *et al*., revela a terapia de combinação de interleucina-12 e interferon alfa para o tratamento de doenças infecciosas incluindo HCV. Patente U.S. Nº 5.849.696 para Chretien *et al*., revela o uso de timosinas, isoladamente ou em combinação com interferon, para tratar HCV. Patente U.S. Nº 5.830.455 para Valtuena *et al*., revela uma terapia de combinação para HCV que emprega interferon e um *scavenger* de radical livre. Patente U.S. Nº 5.738.845 para Imakawa revela o uso de proteínas de interferon tau humano para tratar HCV. Outros tratamentos para HCV baseados em interferon são revelados na Patente U.S. Nº 5.676.942 para Testa *et al*., Patente U.S. Nº 5.372.808 para Blatt *et al*. e Patente U.S. Nº 5.849.696. Inúmeras patentes também revelam formas peguiladas de interferon, como Patente U.S. Nºs. 5.747.646, 5.792.834 e 5.834.594 para Hoffmann-La Roche; Publicação PCT No. WO 99/32139 e WO 99/32140 para Enzon; WO 95/13090 e Patente U.S. Nºs. 5.738.846 e 5.711.944 para Schering; e Patente U.S. Nº 5.908.621 para Glue *et al*.

[0014] Interferon alfa-2a e interferon alfa-2b são atualmente aprovados como monoterapia para o tratamento de HCV. ROFERON®-A (Roche) é a forma recombinante de interferon alfa-2a. PEGASYS® (Roche) é a forma peguilada (ou

seja, modificada por polietileno glicol) de interferon alfa-2a. INTRON®A (Schering Corporation) é a forma recombinante de Interferon alfa-2b, e PEG-INTRON (Schering Corporation) é a forma peguilada de interferon alfa-2b.

[0015] Outras formas de interferon alfa, assim como de interferon beta, gama, tau e omega estão atualmente em desenvolvimento clínico para o tratamento de HCV. Por exemplo, INFERGEN (interferon alfacon-1) por InterMune, OMNIFERON (interferon natural) por Viragen, ALBUFERON por Human Genome Sciences, REBIF (interferon beta-1a) por Ares-Serono, Interferon Omega por BioMedicine, Interferon Alfa Oral por Amarillo Biosciences e interferon gama, interferon tau e interferon gama-1b por InterMune são em desenvolvimento.

Ribavirina

[0016] Ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) é um análogo nucleosídeo antiviral sintético, não indutor de interferon, de amplo espectro vendido sob o nome comercial Virazole (The Merck Index, 11ª edição, Editor: Budavari, S., Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, pl304, 1989). Patente U.S. No. 3.798.209 e RE29.835 revelam e reivindicam a ribavirina. Ribavirina é estruturalmente similar à guanosina, e tem atividade *in vitro* contra vários vírus DNA e RNA incluindo Flaviviridae (Gary L. Davis *Gastroenterology* 118:5104-5114, 2000).

[0017] Ribavirina reduz os níveis séricos de amino transferase ao normal em 40% dos pacientes, mas não diminui os níveis séricos de HCV-RNA (Gary L. Davis 2000). Portanto, ribavirina isoladamente não é eficaz na redução dos níveis de RNA viral. Adicionalmente, ribavirina tem toxicidade significativa e é conhecida por induzir anemia. Ribavirina não é aprovada para monoterapia contra HCV. Ela foi aprovada em combinação com interferon alfa-2a ou interferon alfa-2b para o tratamento de HCV.

[0018] Ribavirina é um inibidor conhecido de inosina monofosfato desidrogenase que não tem atividade específica anti-HCV no sistema de replicação de HCV (Stuyver *et al*., *Journal of Virology*, 2003, 77, 10689-10694).

Combinação de Interferon e Ribavirina

[0019] O padrão atual de tratamento de hepatite crônica C é a terapia de combinação com um interferon alfa e ribavirina. A combinação de interferon e ribavirina para o tratamento de infecção por HCV foi relatada como sendo eficaz no tratamento de pacientes que nunca tiveram contato com interferon (Battaglia, A. M. *et al*., Ann. Pharmacother. 34: 487-494,2000) assim como para o tratamento de pacientes quando a doença histológica já está presente (Berenguer, M. *et al*. Antivir. Ther. 3 (Suppl. 3): 125-136, 1998). Estudos mostraram que mais pacientes com hepatite C respondem à terapia de combinação de interferon-alfa peguilado/ribavirina que à terapia de combinação com interferon alfa não peguilado. Entretanto, como na monoterapia, efeitos colaterais significativos se desenvolvem durante a terapia de combinação, incluindo hemólise, sintomas semelhante a gripe, anemia, e fadiga. (Gary L. Davis, 2000). Terapia de combinação com cápsulas de PEG-INTRON® (peginterferon alfa-2b) e REBETOL® (Ribavirina, USP) são disponíveis por Schering Corporation. REBETOL® (Schering Corporation) também foi aprovado em combinação com ÍNTRON® (Interferon alfa-2b, recombinante, Schering Corporation). PEGASYS® de Roche (interferon alfa-2ª pequilado) e COPEGUS® (ribavirina), assim como Ribosphere® de *Three River Pharmacetical* também são aprovados para o tratamento de HCV.

[0020] As Publicações PCT N^{os} WO 99/59621, WO 00/37110, WO01/81359, WO 02/32414 e WO 03/024461 por Schering Corporation revelam o uso de terapia de combinação de interferon alfa peguilado e ribavirina para o tratamento de HCV. As Publicações PCT Nos. WO 99/15194, WO 99/64016 e WO

00/24355 por Hoffmann-La Roche Inc. também revelam o uso de terapia de combinação de interferon alfa peguilado e ribavirina para o tratamento de HCV.

Métodos adicionais para tratar infecções por Flaviviridae

[0021] O desenvolvimento de novos agentes antivirais para infecções por *Flaviviridae*, especialmente hepatite C, está atualmente em progresso. Inibidores específicos de enzimas derivadas de HCV como inibidores de protease, helicase, e polimerase estão sendo desenvolvidos. Medicamentos que inibem outras etapas na replicação de HCV também estão sendo desenvolvidos, por exemplo, medicamentos que bloqueiam a produção de antígenos de HCV pelo RNA (inibidores de IRES), medicamentos que evitam o processamento normal de proteínas de HCV (inibidores de glicosilação), medicamentos que bloqueia a entrada de HCV nas células (por bloqueio de seu receptor) e agentes citoprotetores não específicos que bloqueiam o dano celular causado pela infecção viral. Além disso, abordagens moleculares também estão sendo desenvolvidas para tratar a hepatite C, por exemplo, ribozimas, que são enzimas que quebram moléculas específicas de RNA viral, oligonucleotídeos anti-senso, que são segmentos complementares pequenos de DNA que se ligam ao RNA viral e inibem a replicação viral, e técnicas de interferência de RNA estão sob investigação (Bymock *et al*., *Antiviral Chemistry & Chemoterapia*, 11: 2; 79-95 (2000); De Francesco *et al*., in *Antiviral Research*, 58: 1- 16 (2003); e Kronke *et al*., *J. Virol*., 78: 3436-3446 (2004).

[0022] Vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um pestivírus que pertence à família *Flaviviridae* e tem sido usado como um substituto para teste *in vitro* dos agentes antivirais potenciais. Embora atividade contra BVDV possa sugerir atividade contra outros flavivírus, um composto pode ser frequentemente inativo contra BVDV e ativo contra um outro flavivírus. Sommadossi e La Colla revelaram (*Methods and compositions for treating flaviviruses and pestiviruses*,

PCT WO01/92282) que ribonucleosídeos que contêm um grupo metil na posição de cima 2' têm atividade contra BVDV. Entretanto, não está claro se esses compostos podem inibir outros flavivírus, incluindo HCV em cultura de células ou o nível de HCVNS5B. Surpreendentemente, embora essa publicação revele um grande número de compostos que são 2'-metil-2'-X-ribonucleosídeos, onde X é um halogênio, flúor não é considerado. Além disso, uma via sintética que leva aos nucleosídeos halogenados na posição de baixo 2' não é conhecida por esses inventores.

[0023] O vírus da dengue (DENV) é o agente causador da febre da Dengue hemorrágica (DHF). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), dois quintos da população mundial estão agora em risco de infecção por esse vírus. Um número estimado de 500.000 casos de DHF requer hospitalização a cada ano com uma taxa de mortalidade de 5% em crianças.

[0024] O vírus do oeste do Nilo (WNV), um flavivírus previamente conhecido como existindo apenas em regiões intertropicais, tem surgido nos últimos anos em áreas temperadas da Europa e América do Norte, apresentando uma ameaça à saúde pública. A manifestação mais séria de infecção por WNV é a encefalite fatal em humanos. Surtos em Nova Iorque e ocorrências esporádicas no sul dos Estados Unidos têm sido relatados desde 1999.

[0025] Não há atualmente qualquer tratamento preventivo de infecção por HCV, vírus da Dengue (DENV) ou vírus do oeste do Nilo. As terapias atualmente aprovadas, que existem apenas contra HCV, são limitadas. Exemplos de agentes antivirais que foram identificados como ativos contra o flavivírus da hepatite C incluem:

[0026] 1) Inibidores da Protease:

[0027] Inibidores da protease NS3 baseados em substrato (Attwood et al., PCT WO 98/22496 1998; Attwood et al., Antiviral Chemistry and Chemotherapy

1999, 10,259-273; Attwood et al., (1999) Preparation and use of amino acid derivatives as anti-viral agents, Publicação de Patente Germânica DE 19914474; Tung et al. Inhibitors of serine proteases, particularmente hepatitis C virus NS3 protease, PCT WO 98/17679), incluindo alfacetamidas e hidrazinouréias e inibidores que terminam em um eletrófilo tal como ácido borônico ou fosfonato (Llinas-Brunet et al., Hepatitis C inhibitor peptide analogues, PCT WO 99/07734) estão sendo investigados.

[0028] Inibidores de protease NS3 não baseados em substrato tal como derivados de 2,4,6-trihidroxi-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, o primeiro substituído na amida com uma cadeia de 14 carbonos e o último processando um grupo para-fenoxifenil também estão sendo investigados.

[0029] SCH 68631, uma fenantrenoquinona, é um inibidor de protease de HCV (Chu M. et al., Tetrahedron Letters 37: 7229-7232,1996). Em um outro exemplo, pelos mesmos autores, SCH 351633, isolado do fungo Penicillium griseofulvum, foi identificado como um inibidor de protease (Chu M. et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9:1949-1952). A potência nanomolar contra a enzima de protease NS3 de HCV foi atingida pelo desenho de inibidores seletivos baseados na macromolécula eglina c. Eglina c, isolada de sanguessuga, é um potente inibidor de várias serinas proteases tais como proteases A e B de S. griseus, α-quimiotripsina, quimase e subtilisina. Qasim M. A. et al., Biochemistry 36: 1598-1607, 1997.

[0030] Várias patentes U.S. revelam inibidores de protease para o tratamento de HCV. Por exemplo, a Patente U.S. No. 6.004.933 para Spruce et al., revela uma classe de inibidores de protease de cisteína para inibição de endopeptidase 2 de HCV. A Patente U.S. No. 5.990.276 para Zhang et al., revela

inibidores sintéticos da protease NS3 do vírus de hepatite C. O inibidor é uma subseqüência de um substrato da protease NS3 ou um substrato do co-fato NS4A. O uso de enzimas de restrição para tratar HCV é revelado na Patente U.S. No. 5.538.865 para Reyes et al. Peptídeos como inibidores de serina protease NS3 de HCV são revelados em WO 02/008251 para Corvas International, Inc, e WO 02/08187 e WO 02/008256 para Schering Corporation. Tripeptídeos inibidores de HCV são revelados 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. Diaril peptídeos como inibidores de serina protease NS3 de HCV são revelados em WO 02/48172 para Schering Corporation. Imidazolidinonas como inibidores de serina protease NS3 de HCV são reveladas em WO 02/08198 para Schering Corporation e WO 02/48157 para Bristol Myers Squibb. WO 98/17679 para Vertex Pharmaceuticals e WO 02/48116 para Bristol Myers Squibb também revelam inibidores protease de HCV.

[0031] 2) Derivados de tiazolidina que mostram inibição relevante em um de 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-1-6250, que possui uma porção cinamoil fundida substituída com uma cadeia longa de alquil, RD4 6205 e RD4 6193;

[0032] 3) Tiazolidinas e benzanilidas identificadas em Kakiuchi N. et al., J. EBS Letters 421:217-220; Takeshita N. et al., Analytical Biochemistry 1997, 247:242-246;

[0033] 4) Uma fenantrenequinona, possuindo atividade contra protease em um ensaio de SDS PAGE e de auto-radiografia isolada do caldo de cultura de fermentação de Streptomyces sp., Sch 68631 (Chu M. et al., Tetrahedron Letters 1996, 37: 7229-7232), e Sch 351633, isolado do fungo Penicillium griseofulvum, que demonstrou atividade em um ensaio de proximidade de cintilação (Chu M.

et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9:1949-1952);

[0034] 5) Inibidores de helicase (Diana G. D. et al., Compounds, composições and métodos for treatment of hepatitis C, Patente U.S. No. 5.633.358; Diana G. D. et al., Piperidine derivatives, composições farmacêuticas thereof and their use in the treatment of hepatitis C, PCT WO 97/36554);

[0035] 6) Inibidores de polimerase de nucleotídeo 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);

[0036] 7) Oligodesoxinucleotídeos de fosforotioato anti-senso (S-ODN) complementar a estiramentos de sequência na região não codificadora 5' (NCR) do vírus (Alt M. et al.,Hepatology, 1995,22, 707-717), ou nucleotídeos 326-348 que compreendem a extremidade 3' da NCR e nucleotídeos 371-388 localizados no núcleo da região codificador do RNA de HCV (Alt M. et al., Archives of Virology, 1997, 142, 589-599; Galderisi U. et al., Journal of Cellular Physiology, 1999,181, 251-257);

[0037] 8) Inibidores de tradução dependente de IRES (Ikeda N et al. Agents for the prevention and treatment of hepatitis C, Publicação de Patente japonesa JP-08268890; Kai, Y. et al. Prevention and treatment of viral diseases, Publicação de Patente japonesa JP-10101591)

[0038] 9) Ribozimas, tais como ribozimas resistentes a nuclease (Maccjak, D. J. et al., Hepatology 1999,30, abstract 995) e aquelas reveladas na Patente U. S. No. 6.043.077 para Barber et al. e Patentes U. S. Nos. 5.869.253 e 5.610.054 para Draperet al.;

[0039] 10) Análogos de nucleosídeo também estão sendo desenvolvidos para o tratamento de Infecções por Flaviviridae.

[0040] Idenix Pharmaceuticals revela o uso de certos nucleosídeos ramificados no tratamento of Flavivírus (incluindo HCV) e pestivírus nas

Publicações Internacionais Nos WO 01/90121 e WO 01/92282. Especificamente, um método para o tratamento de infecção de hepatite C (e Flavivírus e pestivírus) em humanos e outros hospedeiros animais é revelado nas publicações Idenix que incluem a administração de uma quantidade eficaz de um nucleosídeo β-D ou β-L 1', 2', 3' ou 4'-ramificado biologicamente ativo ou um sal farmaceuticamente aceitável ou derivado desse, administrado isoladamente ou em combinação com um outro agente antiviral, opcionalmente em um transportador farmaceuticamente aceitável.

[0041] WO 2004/002422 para Idenix publicada em 8 de janeiro de 2004 revela uma família de 2'-metil nucleosídeos para o tratamento de infecções por flavivírus. WO 2004/002999 para Idenix, publicada em 8 de janeiro de 2004 revela uma série de 2' ou 3' pró-fármaco de nucleosídeos 1', 2', 3', ou 4' ramificados para o tratamento de infecções por flavivírus incluindo infecções por HCV.

[0042] Outros pedidos de patentes revelam o uso de certos análogos de nucleosídeo para tratar infecção por vírus da hepatite C incluindo: PCT/CA00/01316 (WO01/32153; depositada em 3 de novembro de 2000) e PCT/CAOI/00197 (WO 01/60315; depositada em 19 de fevereiro de 2001) depositada por BioChem Pharma, Inc. (agora Shire Biochem, Inc.); PCT/US02/01531 (WO 02/057425; depositada em 18 de janeiro de 2002) e PCT/US02/03086 (WO 02/057287; depositada em 18 de janeiro de 2002) depositada por Merck & Co., Inc., PCT/EPOT/09633 (WO 02/18404; publicada em 21 de agosto de 2001) depositada por Roche, e Publicação PCT Nos. WO01/79246 (depositada em 13 de abril de 2001), WO 02/32920 (depositada em 18 de outubro de 2001) e WO 02/48165 por Pharmasset, Ltd.

[0043] WO 2004/007512 para Merck & Co. revela inúmeros compostos de nucleosídeo revelados como inibidores de RNA polimerase viral dependente de

RNA. Os nucleosídeos revelados nessa publicação são primariamente nucleosídeos substituídos com 2'-metil-2'-hidroxi. WO 02/057287 para Merck *et al*., publicada em 25 de julho de 2002, revela um grande gênero de nucleosídeos derivados de pirimidina de substituições 2'-metil-2'-hidroxi. WO 2004/009020 para Merck *et al*., revela uma série de derivados de tionucleosídeo como inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA. WO 03/105770 para Merck *et al*., revela uma series de derivados carbocíclicos nucleosídeo que são úteis para o tratamento de infecções por HCV.

[0044] Publicação PCT Publication No WO 99/43691 para Emory University, intitulada 2'-Fluoronucleosides revela o uso de certos 2'-fluornucleosídeos para tratar HCV.

[0045] Eldrup et al. (Oral Session V, Hepatite C Virus, Flaviviridae; 16th International Conference on Antiviral Research (27 de Abril de 2003, Savannah, Ga.)) descreve a relação estrutura atividade de nucleosídeos 2'-modificados para inibição de HCV.

[0046] Bhat et al. (Oral Session V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae; 16th International Conference on Antiviral Research (27 de Abril de 2003, Savannah, Ga.); p A75) descrevem a síntese e as propriedades farmacocinéticas de análogos de nucleosídeo como possíveis inibidores da replicação de RNA de HCV. Os autores relatam que nucleosídeos 2'-modificados demonstram potente atividade inibitória em ensaios de replicon baseados em célula.

[0047] Olsen et al. (Oral Session V, Hepatite C Virus, Flaviviridae; 16th International Conference on Antiviral Research (27 de Abril de 2003, Savannah, Ga.) p A76) também descrevem o efeitos dos nucleosídeos 2'-modificados sobre a replicação de RNA de HCV.

[0048] 11) Outros compostos mistos incluindo 1-amino-alquilciclohexanos (Patente U. S. No. 6.034.134 para Gold et al), lipídeos de alquila (Patente U.S.

No. 5.922.757 para Chojkier et al), vitamina E e outros antioxidantes (Patente U.S. No. 5.922.757 para Chojkier et al), esqualeno, amantidina, ácidos de bile (Patente U.S. No. 5.846.964 para Ozeki et al.), ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspártico, (Patente U.S. No. 5.830.905 para Diana et al.), benzenodicarboxamidas (Patente U.S. No. 5.633.388 para Diana et al.), derivados de ácido poliadenílico (Patente U.S. No. 5.496.546 para Wang et al.), 2',3'-didesoxiinosina (Patente U.S. No. 5.026.687 para Yarchoan et al.), benzimidazóis (Patente U.S. No. 5.891.874 para Colacino et al (extratos de plantas (Patente U. S. No. 5.837.257 para Tsai et al., Patente U.S. No. 5.725.859 para Omer et al., e Patente U.S. No. 6.056.961), e piperidenas (Patente U.S. No. 5.830.905 para Diana et al.).

[0049] 12) Outros compostos atualmente em desenvolvimento pré-clínico ou clínico para o tratamento do vírus da hepatite C incluem: Interleucina-10 por Schering-Plough, IP-SO1 por Interneuron, Merimebodib (VX-497) por Vertex, AMANTADINE® (Symmetrel) por Endo LabsSolvay, HEPTAZYME® por RPI, IDN-6556 by por Idun Pharma., XTL-002 por XTL., HCV/MF59 por Chiron, CIVACIR® (Imunoglobulina de Hepatite C) por NABI, LEVOVIRIN® por ICN/Ribapharm, VIRAMIDINE® por ICN/Ribapharm, ZADAXIN® (alfa-1 timosina) por Sci Clone, timosina mais interferon de reação com PEG por Sci Clone, CEPLENE® (diidrocloreto de histamina) por Maxim, VX 950/LY 570310 por Vertex/Eli Lilly, ISIS 14803 por Isis Pharmaceutical/Elan, IDN-6556 por Idun Pharmaceuticals, Inc., JTK 003 por AKROS Pharma, BILN-2061 por Boehringer Ingelheim, CellCept (micofenolato mofetil) por Roche, T67, um inibidor de β-tubulina, por Tularik, uma vacina terapêutica direcionada para E2 por Innogenetics, FK788 por Fujisawa Healthcare, Inc., 1dB 1016 (Siliphos, silibin-fosfatidilcolina fitosoma oral), inibidores de replicação de RNA (VP50406) por ViroPharma/Wyeth, vacina terapêutica por Intercell, vacina terapêutica por Epimmune/Genencor, inibidor

de IRES por Anadys, ANA 245 e ANA 246 por Anadys, imunoterapia (Therapore) por Avant, inibidor de protease por Corvas/SChering, inibidor de helicase por Vertex, inibidor de fusão por Trimeris, terapia de células T por CellExSys, inibidor de polimerase por Biocryst, química de RNA de alvo por PTC Therapeutics, Dication por Immtech, Int., inibidor de protease por Agouron, inibidor de protease por Chiron/Medivir, terapia anti-senso por AVIBioPharma, terapia anti-senso por Hybridon, hemopurificador por Aethlon Medical, vacina terapêutica por Merix, inibidor de protease por Bristol-Myers Squibb/Axys, Chron-VacC, uma vacina terapêutica, por Tripep, UT231B por United Therapeutics, inibidor de protease, helicase e polimerase por Genelabs Technologies, inibidores de IRES por Immusol, R803 por Rigel Pharmaceuticals, INFERGEN® (interferon alfacon-1) por InterMune, OMNIFERON® (interferon natural) por Viragen, ALBUFERON® por Human Genome Sciences, REBIF® (interferon beta-1a) por Ares-Serono, Interferon Omega por BioMedicine, Alfa Interferon Oral por Amarillo Biosciences, interferon gama, interferon tau, e Interferongama-1b por InterMune. Rigel Pharmaceuticals está desenvolvendo um inibidor de polimerase de HCV não nucleosídico, R803, que está sendo promissor como sinérgico com IFN e ribavirina.

[0050] 13) Um resumo de vários medicamentos em investigação, que inclui vários dos discutidos anteriormente, que estão atualmente em várias fases de desenvolvimento para o tratamento de HCV, são sumarizados abaixo:

Medicamento	**Mecanismo/alvo**	**Companhia**	**Status nos EUA**
BILN-2061	inibidor de Serina-protease NS3	Boehringer Ingelheim	Fase II
ISIS 14803	Anti-senso/ evita tradução de RNA	ISIS/Elan	Fase II
Viramidina	Pró-fármaco de	Ribapharm	Fase II

	Ribavirina		
NM 283	Inibidor de RNA polimerase de HCV	Idenix	Fase II/III
VX-497	Inibidor de IMPDH	Vertex	Fase I/II
JKT-003	Inibidor de RNA polimerase de HCV	Japan Tobacco/Akros	Fase I/II
Levovirin	Análogo de L-Ribavirina	Ribapharm/ Roche	Fase I/II
Isatoribine ANA245	Análogo de nucleosídeo Interage com receptor TLR7	Anadys	Fase I
Albuferon	Modulador imune	Human Genome Sciences	Fase I
Peg-Infergen	Modulador imune	Intermune	Fase I
VX-950	Inibidor de HCV NS3-4A protease	Vertex	Pré-clínica
SCH 6	Inibidor de HCV NS3-4A protease	Schering Plough	Pré-clínica
R803	Inibidor de RNA polimerase de HCV	Rigel	Fase I
HCV-086	-	ViroPharma/ Wyeth	Fase I
R1479	Inibidor de RNA polimerase de HCV	Roche	Fase I

[0051] Pró-fármacos de nucleosídeo foram previamente descritos para o tratamento de outras formas de hepatite. WO 00/09531 e WO01/96353 para Idenix Pharmaceuticals, revelam 2'-desoxi-β-L-nucleosídeos e seus pró-fármaco 3' para o tratamento de HBV. A Patente U.S. No. 4.957.924 para Beauchamp

revela vários ésteres terapêuticos de aciclovir.

[0052] Em vista do fato de que a infecção por HCV atingiu níveis epidêmicos ao redor do mundo, e tem efeitos trágicos sobre o paciente infectado, permanece uma forte necessidade de fornecer novos agentes farmacêuticos para tratar hepatite C que tenham baixa toxicidade para o hospedeiro.

[0053] Adicionalmente, em face da ameaça crescente de outras infecções por flaviviridae, permanece uma forte necessidade de fornecer novos agentes farmacêuticos eficazes que tenham baixa toxicidade para o hospedeiro.

Sumário da Invenção

[0054] Não há atualmente qualquer tratamento preventivo de infecção por Vírus da hepatite C (HCV), vírus da Dengue (DENV) vírus do oeste no Nilo (WNV) e as terapias atualmente aprovadas, que existem apenas contra HCV, são limitadas. O desenho e desenvolvimento de compostos farmacêuticos é essencial, especialmente aqueles que são sinérgicos com outros medicamentos aprovados e investigados para *Flaviviridae* e em particular HCV, para a evolução de padrões de tratamento, incluindo terapias de combinação mais eficazes.

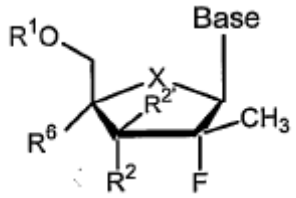
[0055] A presente invenção fornece um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo (β-D ou β-L), ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse, e o uso de tais compostos para o tratamento de um hospedeiro infectado com um vírus que pertence à família *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo e vírus da febre amarela. Em adição, os nucleosídeos da presente invenção se mostram ativos contra rinovírus. Rinovírus (RVs) são pequenos vírus (30 nm), não envelopados que contêm um genoma de ácido ribonucleico (RNA) de filamento único em um capsídeo icosaédrico (de 20 lados). RVs pertence à família *Picornaviridae*, que inclui os gêneros Enterovírus (poliovíus, oxsackievírus grupos A e B, echovíus, enterovírus numerados) e Hepatovírus (vírus da hepatite A). Aproximadamente 101 sorotipos são

identificados atualmente. Rinovírus são mais frequentemente associados ao resfriado comum, nasofaringite, crupe, pneumonia, otite média e exacerbações de asma.

[0056] O inventor fez a descoberta inesperada de que as substituições 2' nos nucleosídeos β-D ou β-L da presente invenção transmitem maior especificidade para o vírus da hepatite C assim como exibem menor toxicidade após administração a um hospedeiro. A invenção também inclui um método para tratar uma infecção por *Flaviviridae*, que inclui vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo e vírus da febre amarela e infecção por rinovírus, que inclui a administração de uma quantidade antiviral eficaz de um nucleosídeo β-D ou β-L aqui revelado, ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável, opcionalmente em um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável, opcionalmente em combinação ou alternância com um outro agente antiviral eficaz.

[0057] Os nucleosídeos da presente invenção, possuem as propriedades únicas de terem maior especificidade pelo vírus da hepatite C e menor toxicidade em cultura ou quando administrados a um animal. Uma razão potencial, mas não limitante para isso é a presença da substituição 2'-flúor no anel de ribose. Por exemplo, Patente U. S. No. 6.348.587 para Schinazi *et al*., revela uma família de compostos de 2'-flúor nucleosídeo que são úteis no tratamento de vírus da infecção de hepatite C. Em contraste, estão as substituições 2'-metil como encontradas em 2'-C-metilcitidina como mostrado em WO 2004/02999 para Idenix onde a substituição 2'-metil no anel do nucleosídeo na posição 2' não é específica para a hepatite C.

[0058] Portanto, em um aspecto, o nucleosídeo antiviral eficaz é um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo (β-D ou β-L) ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse de fórmula geral:



onde

(a) Base é uma base de purina ou pirimidina de ocorrência natural ou modificada;

(b) X é O, S, CH2, Se, NH, N-alquil, CHW (R, S, ou racêmico), C(W)2, onde W é F, Cl, Br, ou I;

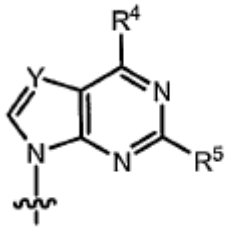
(c) R^1 e R^7 são independentemente H, fosfato, incluindo 5'- monofosfato, difosfato, trifosfato, ou um pró-fármaco de fosfato estabilizado, H-fosfonato, incluindo H-fosfonatos estabilizados, acil, incluindo fenil e acil inferior opcionalmente substituídos, alquil, incluindo alquil inferior, carboxialquilamino O-substituído ou seus derivados peptídicos, éster de sulfonato, incluindo alquil ou arilalquil sulfonil, incluindo metanossulfonil e benzil, onde o grupo fenil é opcionalmente substituído, um lipídeo, incluindo a fosfolipídeo, um L ou D-aminoácido, um carboidrato, um peptídeo, um colesterol, ou outro grupo de partida farmaceuticamente aceitável que quando administrado *in vivo* é capaz de fornecer um composto onde R^1 é H ou fosfato; R^2 é OH ou fosfato; R^1 e R^2 ou R^7 também podem ser ligados com grupo fosfato cíclico; e

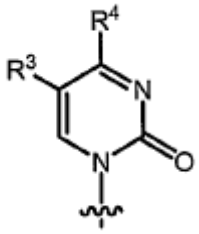
(d) R^2 e $R^{2'}$ são independentemente H, C_{1-4} alquil, C_{1-4} alquenil, C_{1-4} alquinil, vinil, N_3, CN, Cl, Br, F, I, NO_2, C(O)O(C_{1-4} alquil), C(O)O(C_{1-4} alquil), C(O)O(C_{1-4} alquinil), C(O)O(C_{1-4} alquenil), O(C_{1-4} acil), O(C_{1-4} alquil), O(C_{1-4} alquenil), S(C_{1-4} acil), S(C_{1-4} alquil), S(C_{1-4} alquinil), S(C_{1-4} alquenil), SO(C_{1-4} acil), SO(C_{1-4} alquil), SO(C_{1-4} alquinil), SO (C_{1-4} alquenil), SO_2(C_{1-4} acil), SO_2(C_{1-4} alquil), SO_2(C_{1-4} alquinil), SO_2(C_{1-4} alquenil), O_3S(C_{1-4} acil), O_3S(C_{1-4} alquil), O_3S(C_{1-4} alquenil), NH_2, NH(C_{1-4} alquil), NH(C_{1-4} alquenil), NH(C_{1-4} alquinil), NH(C_{1-4} acil), N(C_{1-4} alquil)$_2$, N(C_{1-4} acil)$_2$, onde alquil, alquinil, alquenil e vinil são opcionalmente substituídos por

N_3, CN, um a três halogênios (Cl, Br, F, I), NO_2, C(O)O(C_{1-4} alquil), C(O)O(C_{1-4} alquil), C(O)O(C_{1-4} alquinil), C(O)O(C_{1-4} alquenil), O(C_{1-4} acil), O(C_{1-4} alquil), O(C_{1-4} alquenil), S(C_{1-4} acil), S(C_{1-4} alquil), S(C_{1-4} alquinil), S(C_{1-4} alquenil), SO(C_{1-4} acil), SO(C_{1-4} alquil), SO(C_{1-4} alquinil), SO(C_{1-4} alquenil), SO_2(C_{1-4} acil), SO_2(C_{1-4} alquil), SO_2(C_{1-4} alquinil), SO_2(C_{1-4} alquenil), O_3S(C_{1-4} acil), O_3S(C_{1-4} alquil), O_3S(C_{1-4} alquenil), NH_2, NH(C_{1-4} alquil), NH(C_{1-4} alquenil), NH(C_{1-4} alquinil), NH(C_{1-4} acil), N(C_{1-4} alquil)$_2$, N(C_{1-4} acil)$_2$, R^2 e $R^{2'}$ podem se unir para formar um vinil opcionalmente substituído por um ou dois de N_3, CN, Cl, Br, F, I, NO_2; OR^7 e

(e) R^6 é um alquil opcionalmente substituído (incluindo alquil inferior), ciano (CN), CH_3, OCH_3, OCH_2CH_3, hidroxi metil (CH_2OH), fluormetil (CH_2F), azido (N_3), CHCN, CH_2N_3, CH_2NH_2, CH_2NHCH_3, $CH_2N(CH_3)_2$, alcino (opcionalmente substituído), ou flúor.

[0059] Em vários aspectos da invenção, a base pode ser selecionada de:





onde

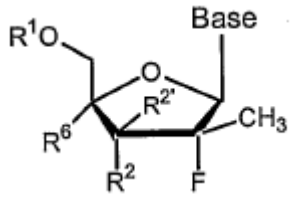
(a) Y é N ou CH;

(b) R^3, R^4 e R^5 são independentemente H, halogênio (incluindo F, Cl, Br, I), OH, OR', SH, SR', NH_2, NHR', NR'$_2$, alquil inferior de C_1-C_6, alquil inferior de C_1-C_6 halogenado (F, Cl, Br, I) como CF_3 e CH_2CH_2F, alquenil inferior de C_2-C_6 como $CH=CH_2$, alquenil inferior de C_2-C_6 halogenado (F, Cl, Br, I) como CH=CHCl, CH=CHBr e CH=CHI, alquinil inferior de C_2-C_6 como C≡CH, alquinil inferior de C_2-C_6 halogenado (F, Cl, Br, I), alcoxi inferior de C_1-C_6 como CH_3O e CH_3CH_2O, alcoxi inferior de C_1-C_6 halogenado (F, Cl, Br, I), hidroxialquil inferior, como CH_2OH e

CH_2CH_2OH, CO_2H, C(O)R', CO_2R', $CONH_2$, CONHR', $CONR'_2$, $CH{=}CHCO_2H$, $CH{=}CHCO_2R'$;

onde R' é um alquil opcionalmente substituído de C_1-C_{12}, cicloalquil, alquinil opcionalmente substituído de C_2-C_6, alquenil inferior opcionalmente substituído de C_2-C_6 ou acil opcionalmente substituído ou no caso de NHR' e C(O)R', R' pode ser um resíduo de aminoácido.

[0060] Ainda em um outro aspecto, o (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-medicamento farmaceuticamente aceitável desse pode ser de fórmula:



onde

(a) base, Y, R^1, R^2, $R^{2'}$, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 e R' são como acima descrito;

[0061] Vários aspectos da presente invenção também incluem composições farmacêuticas que compreendem quaisquer um de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo (β-D ou β-L) aqui descritos ou seus sais ou pró-medicamentos farmaceuticamente aceitáveis desse e um transportador farmaceuticamente aceitável.

[0062] A presente invenção também fornece em vários aspectos, métodos para o tratamento ou profilaxia de uma infecção por vírus da hepatite C, infecção por vírus do oeste do Nilo, uma infecção viral de febre amarela ou uma infecção por rinovírus em um hospedeiro que compreende a administração de uma quantidade eficaz de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeos (β-D ou β-L) aqui revelados. A invenção também inclui métodos para tratamento ou prevenção de infecção por *Flaviridae*, incluindo todos os membros do gênero

Hepacivírus (HCV), gênero Pestivírus (BVDV, CSFV, BDV) ou gênero Flavivírus (grupo de vírus da Dengue, Vírus da encefalite Japonesa (incluindo vírus do oeste do Nilo), e Vírus da febre amarela).

[0063] Em vários aspectos, o (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil β-D-nucleosídeo tem uma EC_{50} (concentração eficaz para atingir 50% de inibição) quando testado em um ensaio adequado baseado em célula, de menos que 15 micromolar e mais particularmente, menos que 10 ou 5 micromolar. Em outros aspectos, o nucleosídeo é enantiomericamente enriquecido.

[0064] A presente invenção também fornece métodos para o tratamento ou profilaxia de uma infecção por vírus da hepatite C, Infecção por vírus do oeste do Nilo, uma infecção viral de febre amarela ou uma infecção por rinovírus em um hospedeiro que compreende a administração de uma quantidade eficaz de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeos (β-D ou β-L) aqui revelados, ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse, em combinação ou alternância com um ou mais de outros agentes antivirais eficazes , opcionalmente em um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável desse, como aqui descrito. Exemplos não limitantes dos tipos de agentes antivirais ou seus pró-fármaco que podem ser usados em combinação com os compostos aqui revelados incluem, mas não se limitam a: interferon, incluindo interferon alfa 2a, interferon alfa 2b, um interferon peguilado, interferon beta, interferon gama, interferon tau e interferon omega; uma interleucina, incluindo interleucina 10 e interleucina 12; ribavirina; interferon em combinação com ribavirina; um inibidor de protease incluindo inibidor de NS3; um inibidor de helicase; um inibidor de polimerase; gliotoxina; um inibidor de IRES; e oligonucleotídeo anti-senso; um derivado de tiazolidina; uma benzanilida, uma ribozima; um outro nucleosídeo, pró-fármaco de nucleosídeo ou derivado de nucleosídeo; um 1-amino-alquilciclohexano; um antioxidante incluindo vitamina

E; *squalene*; amantadina; um ácido de bile; ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspártico; uma benzenodicarboxamida; ácido poliadenílico; benzimidazóis; timosina; um inibidor de beta tubulina; uma vainc profilática; silibin-fosfatidilcolina fitosoma; e micofenolato.

[0065] Os aspectos não limitantes a seguir ilustram alguma metodologia geral de como obter os nucleosídeos da presente invenção. Especificamente, a síntese dos nucleosídeos pode ser realizada por um de dois meios gerais:

1) alquilação do bloco de construção de carboidrato modificado adequado, subsequente fluoração, seguida por ligação para formar os nucleosídeos da presente invenção (Esquema 1) ou

2) glicosilação para formar o nucleosídeo seguido por alquilação e fluoração dos nucleosídeos pré-formados da presente invenção (Esquema 2).

[0066] Adicionalmente, os L-enantiômeros que correspondem aos compostos da invenção podem ser preparados seguindo os mesmos métodos gerais (Esquemas 1 ou 2), iniciando com o bloco de construção de L-carboidrato correspondente ou L-enantiômero do nucleosídeo como o material de iniciação.

[0067] Portanto, a presente invenção inclui pelo menos as seguintes características gerais:

(a) β-D e β-L nucleosídeos com as fórmulas gerais reveladas, ou seus sais ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis desses, como aqui descrito;

(b) processos para a preparação de β-D e β-L nucleosídeos com a fórmula geral revelada, ou seus sais ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis desses, como aqui descrito;

(c) composições farmacêuticas que compreendem um β-D ou β-L nucleosídeo de fórmulas gerais reveladas, ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse, em um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável desse, como aqui descrito, para o tratamento ou

profilaxia de uma infecção viral em um hospedeiro;

(d) composições farmacêuticas que compreendem um β-D ou β-L nucleosídeo de fórmulas gerais reveladas, ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse, em combinação com um ou mais de outros agentes antivirais eficazes, opcionalmente em um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável desse, como aqui descrito, para o tratamento ou profilaxia de uma infecção viral em um hospedeiro;

(e) métodos para o tratamento ou profilaxia de uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo e vírus da febre amarela e infecção por rinovírus em um hospedeiro que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um β-D ou β-L nucleosídeo das fórmulas gerais reveladas, ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse, opcionalmente em um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável desse, como aqui descrito;

(f) métodos para o tratamento ou profilaxia de uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo e vírus da febre amarela e infecção por rinovírus em um hospedeiro que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um β-D ou β-L nucleosídeo das fórmulas gerais reveladas, ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse, em combinação ou alternância com um ou mais de outros agentes antivirais eficazes, opcionalmente em um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável desse, como aqui descrito;

(g) uso de um β-D ou β-L nucleosídeo das fórmulas gerais reveladas, ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse, opcionalmente em um transportador farmaceuticamente aceitável, como aqui descrito, para o tratamento ou profilaxia de uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo e vírus da febre amarela e infecção por

rinovírus em um hospedeiro;

(h) uso de um β-D ou β-L nucleosídeo das fórmulas gerais reveladas, ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse, em combinação ou alternância com um ou mais de outros agentes antivirais eficazes, opcionalmente em um transportador farmaceuticamente aceitável, como aqui descrito, para o tratamento ou profilaxia de uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo e vírus da febre amarela e infecção por rinovírus em um hospedeiro;

(i) uso de um β-D ou β-L nucleosídeo das fórmulas gerais reveladas, ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse, opcionalmente em um transportador farmaceuticamente aceitável, como aqui descrito, na manufatura de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo e vírus da febre amarela e infecção por rinovírus em um hospedeiro;

(j) uso de um β-D ou β-L nucleosídeo das fórmulas gerais reveladas, ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse, em combinação ou alternância com um ou mais de outros agentes antivirais eficazes, opcionalmente em um transportador farmaceuticamente aceitável, como aqui descrito, na manufatura de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo e vírus da febre amarela e infecção por rinovírus em um hospedeiro;

(k) uso de um β-D ou β-L nucleosídeo das fórmulas gerais reveladas, ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse, opcionalmente em um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável, como aqui descrito, em uma terapia médica, ou seja, como antiviral, por exemplo, para o tratamento ou profilaxia de uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo e vírus da febre amarela e infecção por rinovírus;

(l) uso de um β-D ou β-L nucleosídeo das fórmulas gerais reveladas, como aqui descrito, ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse, ou seja, como agente antiviral, em combinação ou alternância com um ou mais de outros agentes terapêuticos, ou seja, um outro agente antiviral, opcionalmente em um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável, como aqui descrito, em uma terapia médica, por exemplo, para o tratamento ou profilaxia de uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo e vírus da febre amarela e infecção por rinovírus em um hospedeiro.

Breve Descrição das Figuras

[0068] **Figura 1** é uma descrição gráfica da redução dose dependente da replicação do RNA de HCV baseada no tratamento com β-D(2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina. **(A)**: a redução viral foi comparada à redução dos níveis de RNA celular (RNA ribossômico) para obter valores de índice terapêutico. EC_{90} que representa 90% da concentração eficaz em 96 horas após a administração dose dependente de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina foi determinada como sendo 5 μM. **(B)**: RNA de HCV foi significativamente reduzido em uma maneira dose dependente por 7 dias após tratamento com 25 μM.

[0069] **Figura 2** apresenta a mudança média de peso (%) de camundongos fêmeas de tipo Swiss no estudo de toxicidade de β-D-(2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina em várias doses. Injeções intraperitoniais foram administradas nos dias 0 a 5 de 0, 3,3, 10, 33, 100 mg/kg. Cada grupo de dosagem continha 5 camundongos e nenhum camundongo morreu durante o estudo de 30 dias.

[0070] **Figura 3** apresenta a farmacocinética de β-D-(2'R)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-C- metilcitidina em macacos Rhesus que receberam uma única dose (33,3 mg/kg) oral ou intravenosa de β-D-(2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina.

Descrição Detalhada da Invenção

[0071] Várias modalidades da invenção são agora descritas em detalhe. Como usado nessa descrição e através das reivindicações que se segue, o significado de “um”, “uns” e “o/a” inclui referência no plural a menos que o contexto indique claramente de outra forma. Além disso, como usado nessa descrição e nas reivindicações que se segue, o significado de “em” inclui “em” e “sobre” a menos que o contexto indique claramente de outra forma.

[0072] Os termos usados nessa especificação geralmente têm seus significados comuns na técnica, dentro do contexto da invenção e no contexto específico onde cada termo é usado. Certos termos que são usados para descrever a invenção são discutidos abaixo, ou em outra parte na especificação, para fornecer um guia adicional para o profissional na descrição das composições e métodos da invenção e como fazê-los e usá-los. Para conveniência, certos termos podem ser enfatizados, por exemplo, o uso de itálico e/ou aspas. O uso de enfatização não tem influência sobre o escopo e significado de um termo; o escopo e significado de um termo são o mesmo, no mesmo contexto, seja ou não enfatizado. Deve ser observado que as mesmas coisas podem ser ditas em mais de uma maneira. Conseqüentemente, linguagem alternativa e sinônimos podem ser usados para qualquer um dos termos aqui discutidos, também não deve ser dada qualquer significância especial ao fato de um termo ser ou não elaborado como aqui discutido. Sinônimos para certos termos são fornecidos. Um relato de um ou mais sinônimos não exclui o uso de outros sinônimos. O uso de exemplos em qualquer parte nessa especificação, incluindo exemplos de quaisquer termos aqui discutidos, é apenas ilustrativo e, de nenhuma forma, limita o escopo e significado da invenção oud e qualquer termo exemplificado. Da mesma forma, a invenção não é limitada a várias modalidades apresentadas nessa especificação.

[0073] Como aqui usado, “cerca de” ou “aproximadamente” devem significar 20 por cento, preferivelmente 10 por cento e mais preferivelmente 5 por cento de um valor ou faixa dada. Quantidades numéricas aqui apresentadas são aproximadas, significando que o termo “cerca de” ou “aproximadamente” pode ser deduzido, se não expressamente determinado.

[0074] A presente invenção fornece (2’*R*)-2’-desoxi-2’-flúor-2’-*C*-metil nucleosídeos e seus sais e pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis para o tratamento de infecção por vírus da hepatite C, infecção por vírus do oeste do Nilo, uma infecção viral de febre amarela ou uma infecção por rinovírus em um hospedeiro.

[0075] Os compostos revelados ou seus derivados ou sais farmaceuticamente aceitáveis ou formulações farmaceuticamente aceitáveis que contêm esses compostos são úteis na prevenção e tratamento de infecções por HCV. Além disso, esses compostos ou formulações podem ser usados profilaticamente para prevenir o retardar o progresso de doença clínica em indivíduos que são antígeno anti-HCV positivos ou que forma expostos ao HCV.

[0076] Os compostos aqui revelados podem ser convertidos em um éster farmaceuticamente aceitável por reação com um agente de esterificação adequado, por exemplo, um haleto ou anidrido ácido. O composto ou seu derivado farmaceuticamente aceitável pode ser convertido em um sal farmaceuticamente aceitável desse em uma maneira convencional, por exemplo, por tratamento com uma base adequada. O éster ou sal do composto pode ser convertido no composto parente, por exemplo, por hidrólise.

Definições

[0077] O termo “independentemente” é usado nessa para indicar que a variável, que é independentemente aplicada, varia independentemente de aplicação a aplicação. Assim, em um composto tal como R^aXYR^a, onde R^a é

“independentemente carbono ou nitrogênio”, ambos R^a podem ser carbono, ambos R^a podem ser nitrogênio, ou um R^a pode ser carbono e o outro R^a nitrogênio.

[0078] Como aqui usado, os termos “enantiomericamente puro” ou “enantiomericamente enriquecido” se referem a uma composição de nucleosídeo que compreende pelo menos aproximadamente 95%, e preferivelmente aproximadamente 97%, 98%, 99% ou 100% de um único enantiômero daquele nucleosídeo.

[0079] Como aqui usado, o termo "substancialmente livre de” ou "substancialmente na ausência de” se refere a uma composição de nucleosídeo que inclui pelo menos 85 ou 90% em peso, preferivelmente 95% a 98% em peso, e ainda mais preferivelmente 99% a 100% em peso, do enantiômero designado daquele nucleosídeo. Em uma modalidade preferida, nos métodos e compostos dessa invenção, os compostos são substancialmente livres de enantiômeros.

[0080] De forma similar, o termo “isolado” se refere a uma composição de nucleosídeo que inclui pelo menos 85 ou 90% em peso, preferivelmente 95% a 98% em peso e ainda mais preferivelmente 99% a 100% em peso, do nucleosídeo, o restante compreendendo outras espécies químicas ou enantiômeros.

[0081] O termo “alquil”, como aqui usado, a menos que especificado de outra maneira, se refere a um hidrocarboneto saturado primário, secundário ou terciário, linear, ramificado ou cíclico de tipicamente C_l a C_{10}, e especificamente inclui metil, trifluormetil, etil, propil, isopropil, ciclopropil, butil, isobutil, *t*-butil, pentil, ciclopentil, isopentil, neopentil, hexil, isohexil, ciclohexil, ciclohexilmetil, 3-metilpentil, 2,2-dimetilbutil, e 2,3-dimetilbutil. O termo inclui tanto grupos alquil substituídos quanto não substituídos. Grupos alquil podem ser opcionalmente substituídos com uma ou mais porções selecionadas do grupo

que consiste em hidroxila, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfônico, sulfato, ácido fosfônico, fosfato, ou fosfonato, ou qualquer outro grupo funcional viável que não iniba a atividade farmacológica desse composto, não protegido ou protegido, como necessário, como é conhecido por aqueles habilitados na técnica, por exemplo, como ensinado em T. W. Greene e P. G. M.Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª ed. , John Wiley & Sons, 1999, aqui incorporado por referência.

[0082] O termo “alquil inferior”, como aqui usado, e a menos que especificado de outra maneira, se refere a um grupo alquil C_1 a C4 saturado linear, ramificado, ou se adequado cíclico, (por exemplo, ciclopropil), incluindo tanto formas substituídas quanto não substituídas. A menos que determinado especificamente de outro modo nesse pedido, quando o alquil é uma porção adequada, o alquil inferior é preferido. De forma similar, quando alquil ou alquil inferior é uma porção adequada, alquil não substituído ou alquil inferior é preferido.

[0083] O termo “alquilamino” ou “arilamino” se refere a um grupo amino que tem um ou dois substituintes de alquil ou aril, respectivamente.

[0084] O termo "protegido" como aqui usado e a menos que definido de outra forma se refere a um grupo que é adicionado a um oxigênio, nitrogênio, ou átomo de fósforo para prevenir sua reação adicional ou para outros propósitos. Uma ampla variedade de grupos de proteção de oxigênio e nitrogênio é conhecida por aqueles habilitados na técnica de síntese orgânica. Exemplos não limitantes incluem: C(O)-alquil, C(O)Ph, C(O)aril, CH_3, CH_2-alquil, CH_2-alquenil, CH_2Ph, CH_2-aril, CH_2O-alquil, CH_2O-aril, SO_2-alquil, SO_2-aril, *terc*-butildimetilsilil, *terc*-butildifenilsilil, e 1,3-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxanilideno).

[0085] O termo “aril”, como usado nessa, e a menos que especificado de

outra forma, se refere a fenil, bifenil, ou naftil, e preferivelmente fenil. O termo inclui porções substituídas e não substituídas. O grupo aril pode ser substituído com uma ou mais porções selecionadas do grupo que consiste em hidroxila, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfônico, sulfato, ácido fosfônico, fosfato, ou fosfonato, protegidos ou não protegidos como necessário, como conhecido por aqueles habilitados na técnica, por exemplo, como ensinado em Greene, e P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999.

[0086] O termo “alcaril” ou ”alquilaril” se refere a um grupo alquil com um substituinte de aril. O termo “aralquil” ou “arilalquil” se refere a um grupo aril com um substituinte de alquil.

[0087] O termo “halo”, como aqui usado, inclui cloro, bromo, iodo, e flúor.

[0088] O termo “acil” se refere a um éster de ácido carboxílico no qual a porção não-carbonil do grupo éster é selecionada de alquil ou alquil inferior linear, ramificado ou cíclico, alcoxialquil incluindo metoximetil, aralquil incluindo benzil, ariloxialquil tal como fenoximetil, aril incluindo fenil opcionalmente substituído com halogênio (F, Cl, Br ou I), C_1 a C_4 alquil ou C_1 a C_4 alcoxi, ésteres de sulfonato tal como alquil ou aralquil sulfonil incluindo metanossulfonil, o mono, di ou trifosfato éster, tritil ou monometoxitritil, benzil substituído, trialquilsilil (por exemplo dimetil-t-butilsilil) ou difenilmetilsilil (por exemplo, dimetil-t- butilsilil) ou difenilmetilsilil. Grupos aril nos ésteres compreendem um grupo fenil.

[0089] O termo “acil inferior” se refere a um grupo acil no qual a porção não carbonil é alquil inferior.

[0090] O termo base de “purina” ou “pirimidina” inclui, mas não é limitado a, adenina, N^6-alquilpurinas, N^6-acilpurinas (onde acil é C(O)(alquil, aril, alquilaril, ou arilalquil), N^6-benzilpurina, N^6-halopurina, N^6-vinilpurina, purina N^6-

acetilênica, N^6-acilpurina, N^6-hidroxialquil purina, N^6-alquilaminopurina, N^6-tioalquil purina, N^2-alquilpurinas, N^2-alquil-6-tiopurinas, timina, citosina, 5-fluorcitosina, 5-metilcitosina, 6-azapirimidina, incluindo 6-azacitosina, 2- e/ou 4-mercaptopirimidina, uracil, 5-halouracil, incluindo 5-fluoruracil, C^5-alquilpirimidinas, C^5-benzilpirimidinas, C^5-halopirimidinas, C^5-vinilpirimidina, pirimidina C^5-acetilênica, C^5-acil pirimidina, C^5-hidroxialquil purina, C^5-amidopirimidina, C^5-cianopirimidina, C^5-iodopirimidina, C^6-iodopirimidina, C^5-Br-vinilpirimidina, C^6-Br-vinilpirimidina, C^5-nitropirimidina, C^5-aminopirimidina, N^2-alquilpurinas, N^2-alquil-6-tiopurinas, 5-azacitidinil, 5-azauracilil, triazol-piridinil, imidazolpiridinil, pirrolpirimidinil, e pirazolopirimidinil. Bases de purina incluem, mas não são limitadas a, guanina, adenina, hipoxantina, 2,6-diaminopurina, e 6-cloropurina. Grupos de oxigênio e nitrogênio funcionais na base podem ser protegidos como necessário ou desejado. Grupos de proteção adequados são bem conhecidos por aqueles experientes na técnica, e incluem trimetilsilil, dimetil-hexilsilil, t-butil dimetilsilil, e *t*-butil difenilsilil, tritil, grupos alquil e grupos acil tais como acetil e propionil, metanossulfonil, e p-toluenossulfonil.

[0091] O termo “acil” ou “éster O-ligado” se refere a um grupo de fórmula C(O)R’, onde R’ é um alquil linear, ramificado ou cíclico (incluindo alquil inferior), aminoácido, aril incluindo fenil, alcaril, aralquil incluindo benzil, alcoxialquil incluindo metoximetil, ariloxialquil tal como fenoximetil; ou alquil substituído (incluindo alquil inferior), aril incluindo fenil opcionalmente substituído com cloro, bromo, flúor, iodo, C_1 a C_4 alquil ou C_1 a C_4 alcoxi, éster de sulfonato tal como alquil ou aralquilsulfonil incluindo metanossulfonil, o mono, di ou trifosfato éster, tritil ou monometoxi-tritil, benzil substituído, alcaril, aralquil incluindo benzil, alcoxialquil incluindo metoximetil, ariloxialquil tal como fenoximetil. Grupos aril nos ésteres compreendem um grupo fenil. Em particular, grupos acil incluem acetil, trifluoracetil, metilacetil, ciclopropilacetil, ciclopropil

carboxi, propionil, butiril, hexanoil, heptanoil, octanoil, neo-heptanoil, fenilacetil, 2-acetoxi-2-fenilacetil, difenilacetil, α-metoxi-α-triflúormetil-fenilacetil, bromoacetil, 2-nitro-benzenoacetil, 4-cloro-benzenoacetil, 2-cloro-2, 2-difenilacetil, 2-cloro-2-fenilacetil, trimetilacetil, clorodifluoracetil, perfluoracetil, fluoracetil, bromodifluoracetil, metoxiacetil, 2-tiofenoacetil, clorossulfonilacetil, 3-metoxifenilacetil, fenoxiacetil, terc-butilacetil, tricloroacetil, monocloro-acetil, dicloroacetil, 7H-dodecaflúor-heptanoil, perflúor-heptanoil, 7H-dodeca-fluorheptanoil, 7-clorododecaflúor-heptanoil, 7-cloro-dodecaflúor-heptanoil, 7H-dodecaflúor-heptanoil, 7H-dodeca-fluorheptanoil, nona-flúor-3, 6-dioxa-heptanoil, nonaflúor-3,6-dioxaheptanoil, perfluor-heptanoil, metoxibenzoil, metil 3-amino-5-feniltiofeno-2-carboxil, 3,6-dicloro-2-metoxi-benzoil, 4-(1,1,2,2-tetraflúor-etoxi)-benzoil, 2-bromo-propionil, omega-aminocAbril, decanoil, n-pentadecanoil, estearil, 3- ciclopentil-propionil, 1-benzeno-carboxil, O-acetil mandelil, pivaloil acetil, 1-adamantano-carboxil, ciclohexane-carboxil, 2,6-piridinadicarboxil, ciclopropano-carboxil, ciclobutano-carboxil, perfluorciclohexil carboxil, 4-metilbenzoil, clorometil isoxazolilcarbonil, perfluorciclohexil carboxil, crotonil, 1-metil-1H-indazol-3-carbonil, 2-propenil, isovaleril, 1-pirrolidinacarbonil, 4-fenilbenzoil. Quando o termo acil é usado, significa uma revelação específica e independente de acetil, trifluoracetil, metilacetil, ciclopropilacetil, propionil, butiril, hexanoil, heptanoil, octanoil, neo-heptanoil, fenilacetil, difenilacetil, ct-trifluormetil-fenilacetil, bromoacetil, 4-cloro-benzeneacetil, 2-cloro-2,2- difenilacetil, 2-cloro-2-fenilacetil, trimetilacetil, clorodifluoracetil, perfluoracetil, fluoracetil, bromodifluoracetil, 2-tiofenoacetil, terc-butilacetil, tricloroacetil, monocloro-acetil, dicloroacetil, metoxibenzoil, 2-bromo-propionil, decanoil, n-pentadecanoil, estearil, 3-ciclopentil-propionil, 1- benzeno-carboxil, pivaloil acetil, 1-adamantano-carboxil, ciclohexano-carboxil, 2,6-piridinadicarboxil,

ciclopropano-carboxil, ciclobutane-carboxil, 4-metilbenzoil, crotonil, 1-metil-1H-indazol-3-carbonil, 2-propenil, isovaleril, 4-fenilbenzoil.

[0092] O termo “aminoácido” inclui α, β, γ ou δ aminoácidos de ocorrência natural e sintéticos, e inclui mas não se limita a, aminoácidos encontrados em proteínas, ou seja glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina. Em uma modalidade preferida, o aminoácido está na configuração L. Alternativamente, o aminoácido pode ser um derivado de alanil, valinil, leucinil, isoleuccinil, prolinil, fenilalaninil, triptofanoil, metioninil, glicinil, serinil, treoninil, cisteinil, tirosinil, asparaginil, glutaminil, aspartoil, glutaroil, lisinil, argininil, histidinil, β-alanil, β-valinil, β-leucinil, β-isoleucinil, β-prolinil, β-fenilalaninil, β-triptofanoil, β-methioninil, β-glicinil, β-serinil, β-treoninil, β-cisteinil, β-tirosinil, β-asparaginil, β-glutaminil, β-aspartoil, β-glutaroil, β-lisinil, β-argininil ou β-histidinil. Quando o termo aminoácido é usado, ele é considerado como uma revelação específica e independente de cada um dos ésteres de α, β, γ ou δ glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina nas configurações D e L.

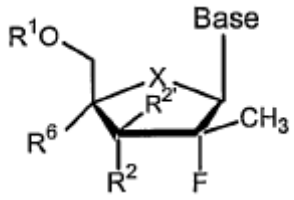
[0093] O termo “hospedeiro”, como usado aqui, se refere a um organismo unicelular ou multicelular no qual o vírus pode se replicar, incluindo linhas de células e animais, e preferivelmente um humano. Alternativamente, o hospedeiro pode estar carregando uma parte do genoma viral, cuja replicação ou função pode ser alterada pelos compostos da presente invenção. O termo hospedeiro especificamente se refere a células infectadas, células transfectadas com todo ou parte do genoma viral e animais, em particular, primatas e humanos. Na maior parte das aplicações da presente invenção, o hospedeiro é

um paciente humano**.** Aplicações veterinárias, em certas indicações, entretanto, são claramente percebidas pela presente invenção.

[0094] O termo “sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável” é usado através da especificação para descrever qualquer forma farmaceuticamente aceitável (tal como um éster, éster de fosfato, sal de um éster ou um grupo relacionado) de um composto que sob administração a um paciente fornece o composto ativo. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem aqueles derivados de bases e ácidos inorgânicos ou orgânicos farmaceuticamente aceitáveis. Sais adequados incluem aqueles derivados de metais alcalinos tais como potássio e sódio, metais alcalinos terrosos tais como cálcio e magnésio entre numerosos outros ácidos bem conhecidos na técnica farmacêutica. Pró-fármacos farmaceuticamente aceitáveis se referem a um composto que é metabolizado, por exemplo, hidrolisado ou oxidado, no hospedeiro para formar o composto da presente invenção. Exemplos típicos de pró-fármaco incluem compostos que têm grupos de proteção biologicamente instáveis em uma porção funcional do composto ativo. Pró-fármaco incluem compostos que podem ser oxidados, reduzidos, aminados, desaminados, hidroxilados, desidroxilados, hidrolisados, desidrolisados, alquilados, desalquilados, acilados, desacilados, fosforilados, desfosforilados para produzir o composto ativo.

I. Composto ativo e derivados e sais fisiologicamente aceitáveis desses

[0095] Um (2’*R*)-2’-desoxi-2’-flúor-2’-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse é fornecido com a estrutura:



onde Base se refere a uma base de purina ou pirimidina de ocorrência natural ou modificada; X é O, S, CH_2, Se, NH, N-alquil, CHW, $C(W)_2$, onde W é F,

Cl, Br, ou I;

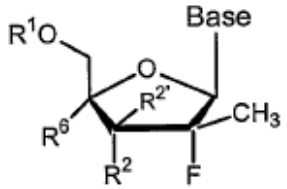
R^1 e R^7 são independentemente H, fosfato, incluindo monofosfato, difosfato, trifosfato, ou um pró-fármaco de fosfato estabilizado, H-fosfonato, incluindo H-fosfonatos estabilizados, acil, incluindo fenil e acil inferior opcionalmente substituídos, alquil, incluindo alquil inferior, carboxialquilamino O-substituído ou seus derivados peptídicos, éster de sulfonato, incluindo alquil ou arilalquil sulfonil, incluindo metanossulfonil e benzil, onde o grupo fenil é opcionalmente substituído, um lipídeo, incluindo a fosfolipídeo, um L ou D-aminoácido, um carboidrato, um peptídeo, um colesterol, ou outro grupo de partida farmaceuticamente aceitável que quando administrado *in vivo* é capaz de fornecer um composto onde R^1 é H ou fosfato; R^2 é OH ou fosfato; R^1 e R^2 ou R^7 também podem ser ligados com grupo fosfato cíclico; e

R^2 e $R^{2'}$ são independentemente H, C_{1-4} alquil, C_{1-4} alquenil, C_{1-4} alquinil, vinil, N_3, CN, Cl, Br, F, I, NO_2, C(O)O(C_{1-4} alquil), C(O)O(C_{1-4} alquil), C(O)O(C_{1-4} alquinil), C(O)O(C_{1-4} alquenil), O(C_{1-4} acil), O(C_{1-4} alquil), O(C_{1-4} alquenil), S (C_{1-4} acil), S(C_{1-4} alquil), S(C_{1-4} alquinil), S(C_{1-4} alquenil), SO(C_{1-4} acil), SO(C_{1-4} alquil), SO(C_{1-4} alquinil), SO(C_{1-4} alquenil), SO_2(C_{1-4} acil), SO_2(C_{1-4} alquil), SO_2(C_{1-4} alquinil), SO_2(C_{1-4} alquenil), O_3S(C_{1-4} acil), O_3S(C_{1-4} alquil), O_3S(C_{1-4} alquenil), NH_2, NH(C_{1-4} alquil), NH(C_{1-4} alquenil), NH(C_{1-4} alquinil), NH(C_{1-4} acil), N(C_{1-4} alquil)$_2$, N(C_{1-18} acil)$_2$, onde alquil, alquinil, alquenil e vinil são opcionalmente substituídos por N_3, CN, um a três halogênios (Cl, Br, F, I), NO_2, C(O)O(C_{1-4} alquil), C(O)O(C_{1-4} alquil), C(O)O(C_{1-4} alquinil), C(O)O(C_{1-4} alquenil), O(C_{1-4} acil), O(C_{1-4} alquil), O(C_{1-4} alquenil), S(C_{1-4} acil), S(C_{1-4} alquil), S(C_{1-4} alquinil), S(C_{1-4} alquenil), SO(C_{1-4} acil), SO(C_{1-4} alquil), SO(C_{1-4} alquinil), SO(C_{1-4} alquenil), SO_2(C_{1-4} acil), SO_2(C_{1-4} alquil), SO_2(C_{1-4} alquinil), SO_2(C_{1-4} alquenil), O_3S(C_{1-4} acil), O_3S(C_{1-4} alquil), O_3S(C_{1-4} alquenil), NH_2, NH(C_{1-4} alquil), NH(C_{1-4} alquenil), NH(C_{1-4} alquinil), NH(C_{1-4} acil), N(C_{1-4} alquil)$_2$, N(C_{1-4} acil)$_2$, OR^7, R^2 e $R^{2'}$ podem se ligar para formar um vinil opcionalmente

substituído por um ou dois de N_3, CN, Cl, Br, F, I, NO_2; e

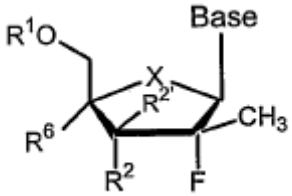
R^6 é um alquil opcionalmente substituído (incluindo alquil inferior), ciano (CN), CH_3, OCH_3, OCH_2CH_3, hidroxi metil (CH_2OH), fluormetil (CH_2F), azido (N_3), CHCN, CH_2N_3, CH_2NH_2, CH_2NHCH_3, $CH_2N(CH_3)_2$, alcino (opcionalmente substituídos), ou flúor.

[0096] Em uma segunda modalidade, um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse é fornecido com a estrutura:



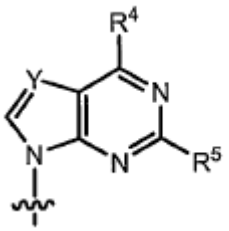
onde Base, R^1, R^2, $R^{2'}$, R^6 e R^7 são como acima definido.

[0097] Uma terceira modalidade fornece um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse com a estrutura:

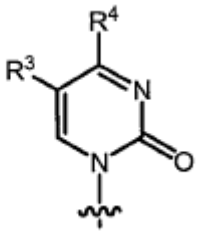


onde X, R^1, R^2, $R^{2'}$, R^6 e R^7 são como acima definido, e

Base é selecionada de



(a)



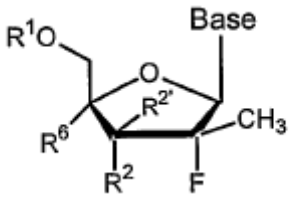
(b)

Y é N ou CH;

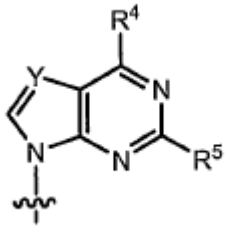
R^3, R^4 e R^5 são independentemente H, halogênio (incluindo F, Cl, Br, I), OH, OR', SH, SR', NH_2, NHR', NR'_2, alquil inferior de C_1-C_6, alquil inferior de C_1-C_6 halogenado (F, Cl, Br, I) como CF_3 e CH_2CH_2F, alquenil inferior de C_2-C_6 como $CH=CH_2$, alquenil inferior de C_2-C_6 halogenado (F, Cl, Br, I) como CH=CHCl, CH=CHBr e CH=CHI, alquinil inferior de C_2-C_6 como C≡CH, alquinil inferior de C_2-C_6 halogenado (F, Cl, Br, I), alcoxi inferior de C_1-C_6 como CH_3O e CH_3CH_2O, alcoxi inferior de C_1-C_6 halogenado (F, Cl, Br, I), hidroxialquila inferior como CH_2OH e CH_2CH_2OH, CO_2H, $C(O)R_2$, CO_2R', $CONH_2$, CONHR', $CONR'_2$, $CH=CHCO_2H$, $CH=CHCO_2R'$;

R' é um alquil opcionalmente substituído de C_1-C_{12}, cicloalquil, alquinil opcionalmente substituído de C_2-C_6, alquenil inferior opcionalmente substituído de C_2-C_6 ou acil opcionalmente substituído ou no caso de NHR' e C(O)R', R' pode ser um resíduo de aminoácido.

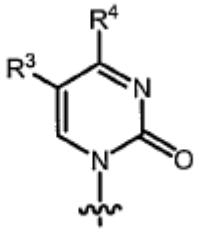
[0098] Em uma quarta modalidade, um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse é fornecido com a estrutura:



onde base é selecionada de



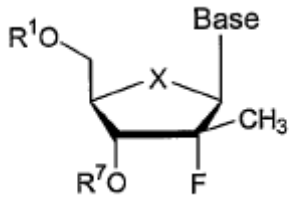
(a)



(b)

e, onde R^1, R^2, $R^{2'}$, R^3, R^4, R^5, R^6 e Y são como acima definido.

[0099] Uma quinta modalidade fornece um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse com a estrutura:

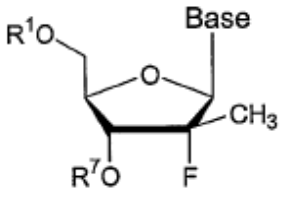


onde Base se refere a uma base de purina ou pirimidina de ocorrência natural ou modificada;

R^7 é independentemente H, fosfato, incluindo monofosfato, difosfato, trifosfato, ou um pró-fármaco de fosfato estabilizado, H-fosfonato, incluindo H-fosfonatos estabilizados, acil, incluindo fenil e acil inferior opcionalmente substituídos, alquil, incluindo alquil inferior, carboxialquilamino O-substituído ou seus derivados peptídicos, éster de sulfonato, incluindo alquil ou arilalquil sulfonil, incluindo metanossulfonil e benzil, onde o grupo fenil é opcionalmente substituído, um lipídeo, incluindo a fosfolipídeo, um L ou D-aminoácido, um carboidrato, um peptídeo, um colesterol, ou outro grupo de partida farmaceuticamente aceitável que quando administrado *in vivo* é capaz de fornecer um composto onde R^1 ou R^7 é independentemente H ou fosfato; R^1 e R^7 também podem ser ligados com grupo fosfato cíclico; e

onde X e R^1 são como acima definido.

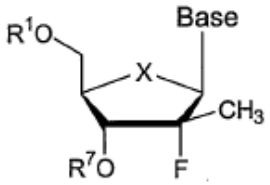
[00100] Em uma sexta modalidade, um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse é fornecido com a estrutura:



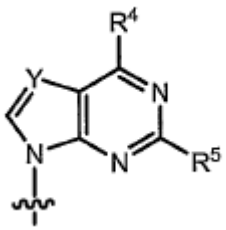
onde Base se refere a uma base de purina ou pirimidina de ocorrência natural ou modificada; e

onde R^1 e R^7 são como acima definido.

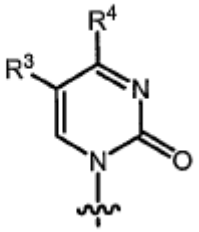
[00101] Uma sétima modalidade fornece um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse com a estrutura:



onde Base é selecionada de



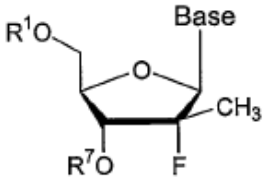
(a)



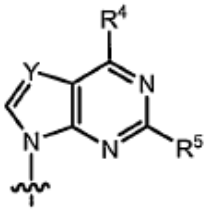
(b)

e onde X, Y, R^1, R^3, R^4, R^5, R^7 e R' são como acima definido.

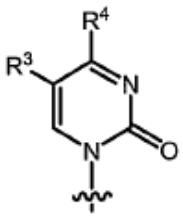
[00102] Em uma oitava modalidade, um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse é fornecido com a estrutura:



onde Base é selecionada de



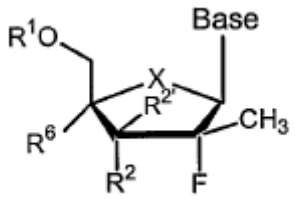
(a)



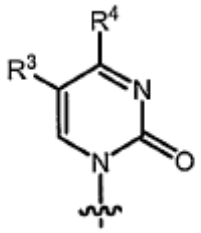
(b)

e, onde Y, R^1, R^3, R^4, R^5, R^7 e R’ são como acima definido.

[00103] Uma nona modalidade fornece um (2’*R*)-2’-desoxi-2’-flúor-2’-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse com a estrutura:

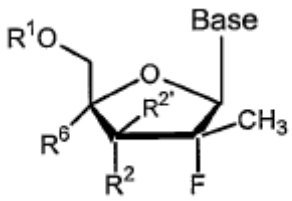


onde Base é:

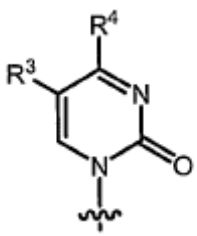


e onde X é definido como acima, R^1 é H, R^2 é OH, $R^{2'}$ é H, R^3 é H, R^4 é NH_2 ou OH, e R^6 é H.

[00104] Em uma décima modalidade, um (2’*R*)-2’-desoxi-2’-flúor-2’-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse é fornecido com a estrutura:

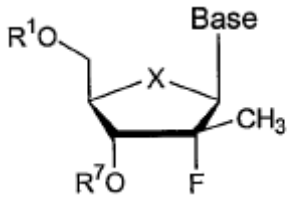


onde Base é:

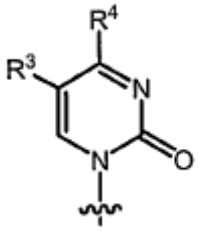


e onde R^1 é H, R^2 é OH, $R^{2'}$ é H, R^3 é H, R^4 é NH_2 ou OH, e R^6 é H.

[00105] Uma décima-primeira modalidade fornece um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse com a estrutura:

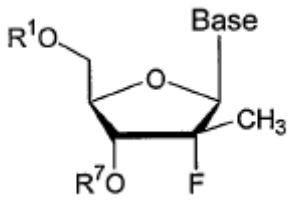


onde Base é:

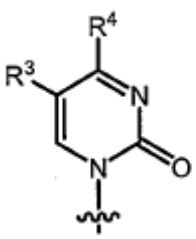


e onde X é definido como acima, R^1 é H, R^3 é H, R^4 é NH_2 ou OH, R^6 é H, e R^7 é H.

[00106] Em uma décima-segunda modalidade, um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse é fornecido com a estrutura:

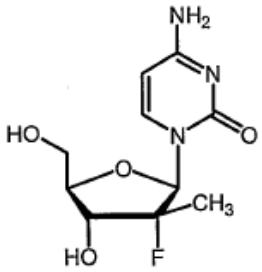


onde Base é:

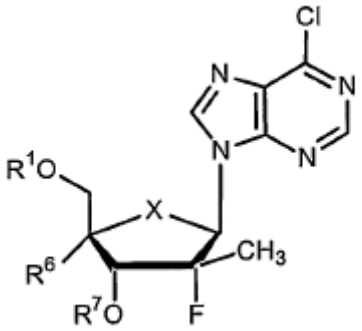


e onde R^1 é H, R^3 é H, R^4 é NH_2 ou OH, e R^7 é H.

[00107] Uma décima-terceira modalidade fornece um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável desse com a estrutura:

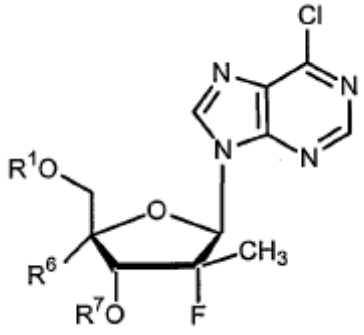


[00108] Em uma décima-quarta modalidade, um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo, seu sal ou produto farmaceuticamente aceitável desse é fornecido pela estrutura:



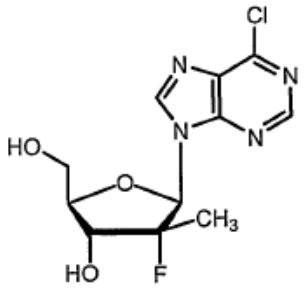
onde X, R^1, R^6 e R^7 são como acima definido.

[00109] Em uma décima-quinta modalidade, um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo, seu sal ou produto farmaceuticamente aceitável desse é fornecido pela estrutura:

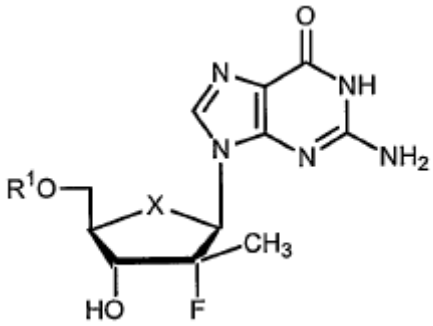


onde R^1, R^6 e R^7 são como acima definido.

[00110] Em uma décima-sexta modalidade, um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo, seu sal ou produto farmaceuticamente aceitável desse é fornecido pela estrutura:

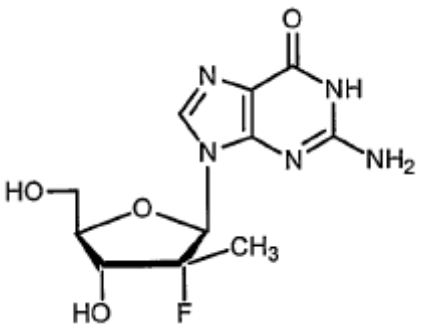


[00110] Em uma décima-sétima modalidade, um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo, seu sal ou produto farmaceuticamente aceitável desse é fornecido pela estrutura:

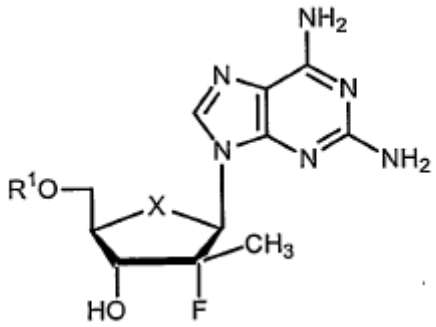


onde X e R^1 são como acima definido.

[00111] Em uma décima-oitava modalidade, um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo, seu sal ou produto farmaceuticamente aceitável desse é fornecido pela estrutura:

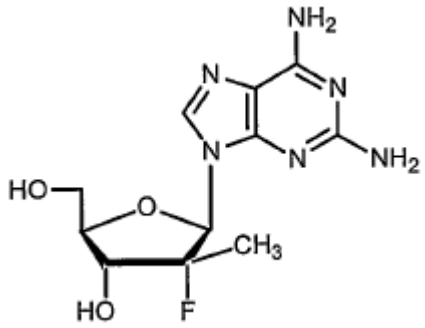


[00112] Em uma décima-nona modalidade, um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo, seu sal ou produto farmaceuticamente aceitável desse é fornecido pela estrutura:

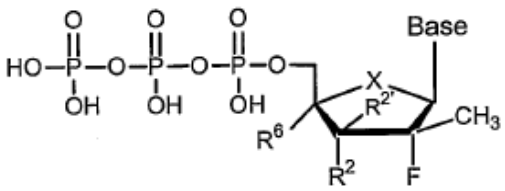


onde X e R^1 são como acima definido.

[00113] Em uma vigésima modalidade, um (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metil nucleosídeo, seu sal ou produto farmaceuticamente aceitável desse é fornecido pela estrutura:

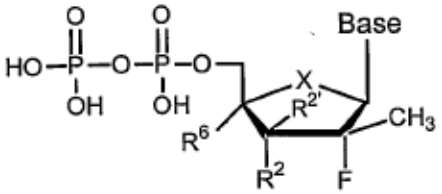


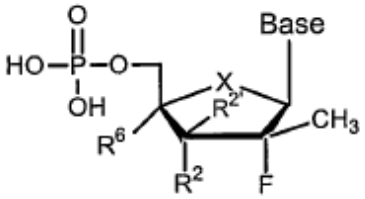
[00114] A presente invenção também contempla derivados de éster de ácido 5'-trifosfato trifosfórico do grupo 5'-hidroxila de um composto de nucleosídeo da presente invenção tendo a seguinte fórmula estrutural geral:



onde Base, X, R^2, $R^{2'}$ e R^6 são definido como acima.

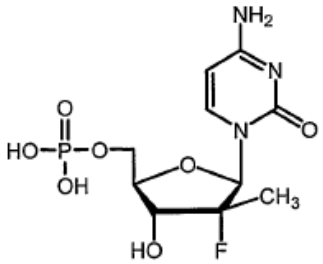
[00115] Os compostos da presente invenção também devem incluir sais do éster de trifosfato farmaceuticamente aceitáveis assim como sais farmaceuticamente aceitável de derivados de éster de 5’-difosfato e 5’-monofosfato com as seguintes fórmulas estruturais, respectivamente.

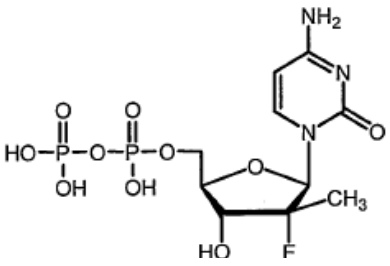


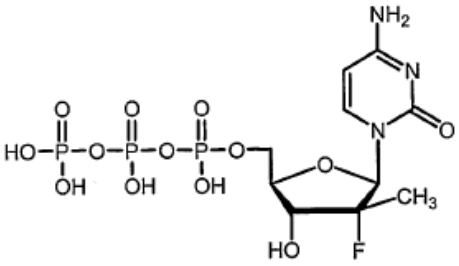


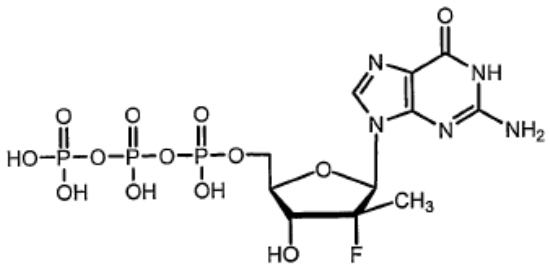
onde Base, X, R^2, $R^{2'}$ e R^6 são como acima definido.

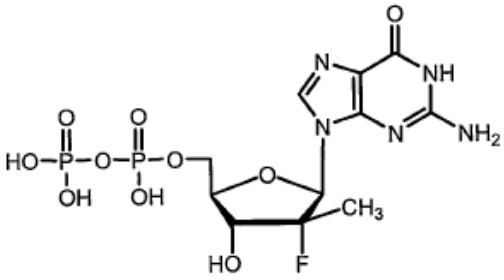
[00116] Exemplos não limitantes adicionais de derivados de ácido fosfórico são os nucleosídeos da presente invenção que são mostrados abaixo:

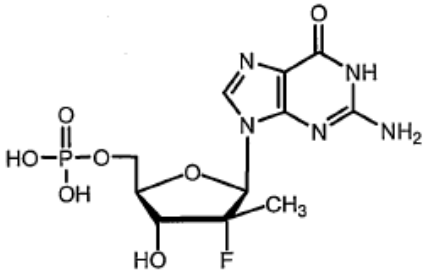


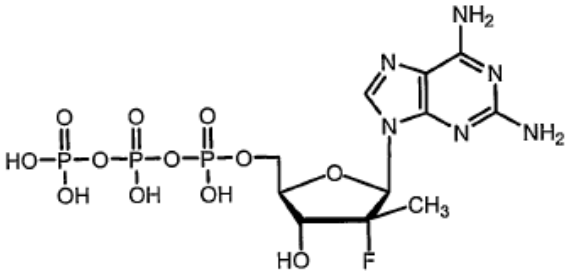


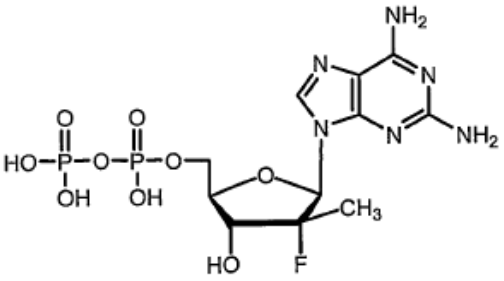


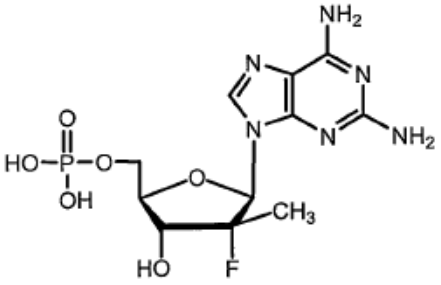












[00117] A presente invenção também contempla que qualquer derivado de fosfato nucleosídeo pode incluir um 5'-(*S*-acil-2-tioetil)fosfato ou "SATE" derivado de mono ou di-éster dos 5'-monofosfatos.

[00118] Modalidades alternativas são também contempladas onde o grupo N-4 amino em um derivado de fosfato nucleosídeo pode ser substituído com H, F, Cl, Br ou I.

[00119] Modalidades adicionais incluem pró-fármaco 3' e/ou 5' como descrito em mais detalhes nessa.

[00120] Nas várias modalidades, os derivados fluorados são preferidos. Flúor é visto como "isoestérico" com hidrogênio devido a seu tamanho (raio de Van der Waals para H é 1,20A e para F 1,35A). Entretanto, o peso atômico (18,998) e eletronegatividade do flúor (4,0 [escala de Pauling], 4,000 [escala de Sanderson]) são mais similares ao oxigênio (3,5 [Pauling] 3,654 [Sanderson]) que ao hidrogênio (2,1 [Pauling], 2,592 [Sanderson]) (March, J., *Advances in Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure* Terceira edição, 1985, p. 14., *Wiley Interscience*, New York). Flúor é conhecido por ser capaz de formar uma ligação de hidrogênio, mas diferente de um grupo hidroxila (que pode agir tanto como aceitador de próton quando doador de próton) flúor age apenas como um aceitador de próton. Por outro lado, 2'-flúor-ribonucleosídeos podem ser vistos como análogos tanto de ribonucleosídeos quanto de desoxinucleosídeos. Eles podem ser melhor reconhecidos por RNA polimerase viral no nível de trifosfato que pela RNA polimerase do hospedeiro assim inibindo seletivamente a enzima viral.

II. Sais e pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis

[00121] Em casos onde os compostos são suficientemente básicos ou ácidos para formar sais básicos ou ácidos estáveis não tóxicos, a administração do composto como um sal farmaceuticamente aceitável pode ser adequada. Sais

farmaceuticamente aceitáveis incluem aqueles derivados de bases e ácidos inorgânicos ou orgânicos farmaceuticamente aceitáveis. Sais adequados incluem aqueles derivados de metais alcalinos como potássio e sódio, metais alcalinos terrosos como cálcio e magnésio, entre numerosos outros ácidos bem conhecidos no campo farmacêutico. Em particular, exemplos de sais farmaceuticamente aceitável são sais de adição de ácido orgânico formados com ácidos, que formam um ânion fisiologicamente aceitável, por exemplo, tosilato, metanossulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α-cetoglutarato**,** e α-glicerofosfato. Sais inorgânicos adequados também podem ser formados, incluindo, sais de sulfato, nitrato, bicarbonato, e carbonato.

[00122] Sais farmaceuticamente aceitáveis podem ser obtidos usando procedimentos padrão bem conhecidos na técnica, por exemplo pela reação de um composto suficientemente básico tal como uma amina com um ácido adequado gerando um ânion fisiologicamente aceitável. Metal alcalino (por exemplo, sódio, potássio ou lítio) ou metal alcalino terroso (por exemplo, cálcio) sais de ácidos carboxílicos também podem ser feitos.

[00123] Qualquer um dos nucleosídeos aqui descritos podem ser administrados como um pró-fármaco de nucleotídeo para aumentar a atividade, biodisponibilidade, estabilidade ou de outra forma alterar as propriedades do nucleosídeo. Inúmeros ligantes de pró-fármaco de nucleotídeo são conhecidos. Em geral, alquilação, acilação ou outra modificação lipofílica do mono, di ou trifosfato do nucleosídeo aumentará a estabilidade do nucleotídeo. Exemplos de grupos substituintes que podem substituir um ou mais hidrogênios na porção fosfato são alquil, aril, esteróides, carboidratos, incluindo açúcares, 1,2-diacilglicerol e álcoois. Vários são descritos em R. Jones e N. Bischofberger, *Antiviral Research*, 27 (1995) 1-17. Qualquer um desses pode ser usado em

combinação com os nucleosídeos revelados para atingir um efeito desejado.

[00124] O nucleosídeo ativo pode ser também fornecido como um 5'-fosfoéter lipídeo ou um 5'-éter lipídeo, como revelado nas referências a seguir, que são aqui incorporadas por referência: Kucera, L. S., N. Iyer, E. Leake, A. Raben, Modest E. K., D. L. W., e C. Piantadosi. 1990. *Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation AIDS Res. Hum. Retro Viruses*. 6:491- 501; Piantadosi, C., J. Marasco C. J., S. L. Morris-Natschke, K. L. Meyer, F. Gumus, J. R. Surles, K. S. Ishaq, L. S. Kucera, N. Iyer, 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; Hosteller, K. Y., D. D. Richman, D. A. Carson, L. M. Stuhmiller, G. M. T. van Wijk, e H. van den Bosch. 1992. *Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxyithymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3'- deoxythymidine*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 36: 2025.2029; Hosetler, K. Y., L. M. Stuhmiller, H. B. Lenting, H. van den Bosch, e D. D. Richman, 1990. *Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviralnucleosides J. Biol. Chem.* 265: 61127.

[00125] Exemplos não limitantes de patentes U. S. que revelam substituintes lipofílicos adequados que podem se incorporados de forma covalente no nucleosídeo, preferivelmente na posição 5'-OH do nucleosídeo ou preparações lipofílicas, incluem Patentes U. S. Nos. 5.149.794; 5.194.654; 5.223.263; 5.256.641; 5.411.947; 5.463.092; 5.543.389; 5.543.390; 5.543.391; e 5.554.728, todas aqui incorporadas por referência. Pedidos de patente estrangeiras que revelam substituintes lipofílicos que podem ser unidos aos nucleosídeos da presente invenção, ou preparações lipofílicas, incluem WO 89/02733, WO 90/00555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO

94/26273, WO 96/15132, EP 0 350 287, EP 93917054.4, e WO 91/19721.

III. Composições Farmacêuticas

[00126] Composições farmacêuticas baseadas em um composto β-D ou β-L aqui revelado ou seu sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável podem ser preparadas em uma quantidade terapeuticamente eficaz para tratar uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo, vírus da febre amarela, e uma infecção por rinovírus, opcionalmente em combinação com um aditivo, transportador ou excipiente farmaceuticamente aceitável. A quantidade terapeuticamente eficaz pode variar com a infecção ou condição a ser tratada, sua severidade, do regime de tratamento a ser empregado, da farmacocinética do agente usado, assim como do paciente tratado.

[00127] Em um aspecto de acordo com a presente invenção, o composto de acordo com a presente invenção é formulado preferivelmente em uma mistura com um transportador farmaceuticamente aceitável. Em geral, é preferível administrar a composição farmacêutica em forma de administração oral, porém as formulações podem ser administradas por via parenteral, intravenosa, intramuscular, transdérmica, bucal, subcutânea, supositórios ou outra via. Formulações intravenosas e intramusculares são preferivelmente administradas em solução salina estéril. Uma pessoa habilitada na técnica pode modificar a formulação dentro dos ensinamentos da especificação para fornecer numerosas formulações para uma via de administração em particular sem transformar as composições da presente invenção em instáveis ou que comprometam sua atividade terapêutica. Em particular, uma modificação de um composto desejado para torná-la mais solúvel em água ou outro veículo, por exemplo, pode ser facilmente realizada por modificação rotineira (formulação de sal, esterificação etc.).

[00128] Em certas formas de dosagem farmacêutica, a forma de pró-fármaco do composto, especialmente incluindo aciladas (acetilada ou outra) e derivados de éter, ésteres de fosfato e varias formas de sal dos presentes compostos, é preferida. Uma pessoa habilitada na técnica reconhecerá como modificar facilmente o presente composto a uma forma de pró-fármaco para facilitar a liberação do composto ativo a um local desejado no organismo hospedeiro ou paciente. O profissional também pode tirar vantagem dos parâmetros farmacocinéticos favoráveis da forma de pró-fármaco, quando aplicável, na liberação do composto desejado a um local desejado no organismo hospedeiro ou paciente para maximizar o efeito pretendido do composto no tratamento de uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo, vírus da febre amarela, e uma infecção por rinovírus.

[00129] A quantidade de composto incluída em formulações terapeuticamente ativas, de acordo com a presente invenção, é uma quantidade eficaz para tratar a infecção ou condição, em modalidades preferidas, uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo, vírus da febre amarela, e uma infecção por rinovírus. Em geral, uma quantidade terapeuticamente eficaz do presente composto em forma de dosagem farmacêutica varia comumente de cerca de 50 mg a cerca de 2.000 mg ou mais, dependendo do composto usado, da condição ou infecção tratada e da via de administração. Para os objetivos da presente invenção, uma quantidade profilaticamente ou preventivamente eficaz das composições, de acordo com a presente invenção, está na mesma faixa de concentração como acima apresentado para quantidade terapeuticamente eficaz e é comumente a mesma que a quantidade terapeuticamente eficaz.

[00130] A administração do composto ativo pode variar de contínua (gotejamento intravenoso) a várias administrações orais por dia (por exemplo,

Q.I.D., B.I.D., etc.) e pode incluir administração oral, tópica, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutânea, transdérmica (que inclui um agente de intensificação de penetração), bucal e supositório, entre outras vias de administração. Comprimidos orais revestidos entéricos também podem ser usados para melhorar a biodisponibilidade e estabilidade dos compostos de uma via de administração oral. A forma de dosagem mais eficaz dependerá da farmacocinética do agente particular escolhido, assim como da severidade da doença no paciente. Formas de dosagem oral são particularmente preferidas, pela facilidade de administração e provável adaptação favorável do paciente.

[00131] Para preparar as composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais dos compostos de acordo com a presente invenção são preferivelmente misturados com um transportador farmaceuticamente aceitável de acordo com técnicas farmacêuticas de formação de compostos convencionais para produzir a dose. Um transportador pode ter uma variedade de formas dependendo da forma da preparação desejada para administração, por exemplo, oral ou parenteral. Na preparação de composições farmacêuticas em forma de dosagem oral, qualquer um dos meios farmacêuticos usuais pode ser usado. Portanto, para preparações orais líquidas como suspensões, elixires e soluções, transportadores adequados e aditivos incluindo água, glicóis, óleos, álcoois, agentes flavorizantes, conservantes, agentes corantes e outros podem ser usados. Para preparações orais sólidas como pós, comprimidos, cápsulas e para preparações sólidas como supositórios, podem ser usados veículos e aditivos adequados, incluindo amidos, veículos de açúcar, tais como dextrose, manitol, lactose e veículos relacionados, diluentes, agentes de granulação, lubrificantes, ligantes, agentes de desintegração e semelhantes. Se desejado, os comprimidos ou cápsulas podem ter revestimento entérico para a liberação sustentada por técnicas

padronizadas. O uso destas formas de dosagem pode ter um impacto significativo sobre a biodisponibilidade dos compostos no paciente.

[00132] Para formulações parenterais, o veículo compreenderá normalmente água estéril ou solução aquosa de cloreto de sódio, embora outros ingredientes, incluindo aqueles que auxiliam na dispersão, também podem ser incluídos. Quando se usa água e esta tiver que ser mantida estéril, as composições e veículos também devem ser esterilizados. Suspensões injetáveis também podem ser preparadas, quando então podem ser empregados veículos líquidos adequados, agentes de suspensão e semelhantes.

[00133] Suspensões lipossômicas (incluindo lipossomos dirigidos a antígenos virais) também podem ser preparadas por métodos convencionais para a produção de veículos farmaceuticamente aceitáveis. Isto pode ser adequado para a liberação de nucleosídeos livres, nucleosídeos de acil ou formas de pró-fármaco de éster fosfato dos compostos de nucleosídeo de acordo com a presente invenção.

[00134] Em modalidades particularmente preferidas de acordo com a presente invenção, os compostos e composições são usados para tratar, prevenir ou retardar o surgimento de infecções por *Flaviviridae,* incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo, vírus da febre amarela, e uma infecção por rinovírus. Os presentes compostos são preferivelmente administrados por via oral, mas podem ser administrados por via parenteral, tópica ou em forma de supositório.

[00135] Os compostos de acordo com a presente invenção, em função de sua baixa toxicidade para as células hospedeiras em certos casos, podem ser empregados de forma vantajosa profilaticamente para evitar infecções por *Flaviviridae* incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo, vírus da febre amarela, e uma infecção por rinovírus ou para evitar a ocorrência de sintomas

clínicos associados à infecção viral ou condição. Dessa forma, a presente invenção também engloba métodos para o tratamento profilático de infecção viral e, em particular, infecções por *Flaviviridae*, incluindo o vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo, vírus da febre amarela, e uma infecção por rinovírus. Nesse aspecto, de acordo com a presente invenção, as presentes composições são usadas para prevenir ou retardar o surgimento de uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo, vírus da febre amarela, e uma infecção por rinovírus. Esse método profilático compreende a administração a um paciente em necessidade de tal tratamento, ou que está em risco de desenvolvimento do vírus ou condição, de uma quantidade de um composto de acordo com a presente invenção eficaz para aliviar, prevenir ou retardar o surgimento da infecção viral ou condição. No tratamento profilático, de acordo com a presente invenção, é preferível que o composto antiviral utilizado deva ter baixa toxicidade e preferivelmente deva ser não tóxico ao paciente. É particularmente preferível, nesse aspecto da presente invenção, que o composto que é usado seja eficaz ao máximo contra o vírus ou condição e deve exibir um mínimo de toxicidade ao paciente. No caso de uma infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo, vírus da febre amarela, e uma infecção por rinovírus, compostos de acordo com a presente invenção, que podem se usados para tratar esses estados de doença, podem ser administrados na mesma faixa de dosagem para tratamento terapêutico (ou seja, cerca de 250 microgramas até 1 grama ou mais de uma quatro vezes por dia para uma forma de dosagem oral) como um agente profilático para prevenir a proliferação da infecção viral, ou alternativamente, para prolongar o surgimento de infecção viral, que se manifesta em sintomas clínicos.

[00136] Além disso, compostos de acordo com a presente invenção podem ser administrados em combinação ou alternância com um ou mais agentes

antivirais, incluindo outros compostos da presente invenção. Certos compostos de acordo com a presente invenção podem ser eficazes para melhorar a atividade biológica de certos agentes de acordo com a presente invenção por redução do metabolismo, catabolismo ou inativação de outros compostos e como tal, são co-administrados para esse efeito pretendido.

IV. Estereoisomerismo e Polimorfismo

[00137] Estima-se que os nucleosídeos da presente invenção possuem vários centros quirais e podem existir e ser isolados em formas oticamente ativas e racêmicas. Alguns compostos podem exibir polimorfismo. Deve ser compreendido que a presente invenção engloba qualquer forma racêmica, oticamente ativa, diastereomérica, polimórfica, ou estereoisomérica ou misturas dessas, de um composto da invenção, que possui as propriedades úteis aqui descritas. É bem conhecido na técnica como preparar formas oticamente ativas (por exemplo, por resolução da forma racêmica por técnicas de recristalização, por síntese de materiais de iniciação oticamente ativos, por síntese quiral ou por separação cromatográfica usando uma fase estacionária quiral).

[00138] Carbonos do nucleosídeo são quirais, seus substituintes não hidrogênio (a base e os grupos CHOR, respectivamente) podem ser *cis* (no mesmo lado) ou *trans* (nos lados opostos) com relação ao sistema de anel de açúcar. Os quatro isômeros óticos, portanto, são representados pelas seguintes configurações (quando orientam a porção de açúcar em um plano horizontal de forma que o átomo de oxigênio está na parte de trás): *cis* (com ambos grupos "acima", que corresponde à configuração de nucleosídeos β-D de ocorrência natural), *cis* (com ambos grupos "abaixo", que é uma configuração β-L de ocorrência não natural), *trans* (com o substituinte de C2' "acima" e o substituinte de C4' "abaixo"), e *trans* (com o substituinte de C2' "abaixo" e o com o

substituinte de C4’ “acima”). Os “nucleosídeos D” são nucleosídeos *cis* em uma configuração natural e os “nucleosídeos L” são nucleosídeos *cis* na configuração de ocorrência não natural.

[00139] Do mesmo modo, a maioria dos aminoácidos é quiral (desenhada como L ou D, onde o enantiômero L é a configuração de ocorrência natural) e pode existir como enantiômeros separados.

[00140] Exemplos de métodos para obter materiais oticamente ativos são conhecidos na técnica, e incluem pelo menos os seguintes.

i) separação física de cristais - uma técnica por onde cristais macroscópicos dos enantiômeros individuais são separados manualmente. Essa técnica pode ser usada se os cristais dos enantiômeros separados existirem, ou seja, o material é um conglomerado, e os cristais são visualmente distintos;

ii) cristalização simultânea - uma técnica por onde os enantiômeros individuais são cristalizados separadamente a partir de uma solução do racemato, possível apenas se o último for um conglomerado no estado sólido;

iii) resoluções enzimáticas - uma técnica por onde separação parcial ou completa de um racemato em virtude de diferentes taxas de reação para os enantiômeros com uma enzima;

iv) síntese assimétrica enzimática – uma técnica sintética por onde pelo menos uma etapa da síntese usa uma reação enzimática para obter um precursor enantiomericamente puro ou precursor sintético enriquecido do enantiômero desejado;

v) síntese assimétrica química – uma técnica sintética por onde o enantiômero desejado é sintetizado a partir de um precursor aquiral sob condições que produzem assimetria (ou seja, quiralidade) no produto, que pode ser atingida usando catalisadores quirais ou auxiliares quirais;

vi) separações de diastereômero - uma técnica por onde um composto

racêmico reage com um reagente enantiomericamente puro (o auxiliar quiral) que converte os enantiômeros individuais a diastereômeros. Os diastereômeros resultantes são então separados por cromatografia ou cristalização em virtude de suas diferenças estruturais agora mais distintas e o auxiliar quiral posteriormente removido para obter o enantiômero desejado;

vii) transformações assimétricas de primeira e segunda ordem - uma técnica por onde diastereômeros do racemato se equilibram para produzir uma preponderância na solução do diastereômero do enantiômero desejado ou onde cristalização preferencial do diastereômero do enantiômero desejado perturba o equilíbrio de forma que eventualmente em princípio todo o material é convertido ao diastereômero cristalino do enantiômero desejado. O enantiômero desejado é então liberado do diastereômero;

viii) resoluções cinéticas – essa técnica se refere à realização de resolução parcial ou completa de um racemato (ou de uma resolução adicional de um composto parcialmente resolvido) em virtude de taxas de reação desigual dos enantiômeros com um reagente quiral, não racêmico ou catalisador sob condições cinéticas;

ix) síntese enantio-específica de precursores não racêmicos – uma técnica sintética por onde o enantiômero desejado é obtido a partir de materiais de iniciação não quirais e onde a integridade estereoquímica não é ou é apenas minimamente comprometida pelo curso da síntese;

x) cromatografia líquida quiral - uma técnica por onde os enantiômeros de um racemato são separados em uma fase móvel líquida em virtude de suas interações diferentes com uma fase estacionária. A fase estacionária pode ser feita de material quiral ou a fase móvel pode conter um material quiral adicional para provocar as interações diferentes;

xi) cromatografia a gás quiral - uma técnica por onde o racemato é

volatilizado e os enantiômeros são separados em virtude de suas interações diferentes na fase móvel gasosa com uma coluna contendo uma fase adsorvente quiral não racêmica fixa;

xii) extração com solventes quirais - uma técnica por onde os enantiômeros são separados em virtude de dissolução preferencial de um enantiômero em um solvente quiral particular;

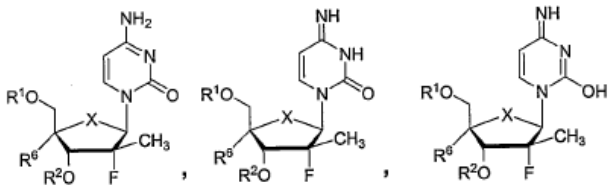
xiii) transporte através de membranas quirais - uma técnica por onde um racemato é colocado em contato com uma fina barreira de membrana. A barreira tipicamente separa dois fluidos miscíveis, um contendo o racemato, e um que dirige força tal como concentração ou pressão diferencial causa transporte preferencial através da barreira de membrana. A separação ocorre como um resultado da natureza quiral não racêmica da membrana que permite que apenas um enantiômero do racemato passe através dela.

[00141] Cromatografia quiral, incluindo cromatografia em leito móvel simulada, é usada em uma modalidade. Uma ampla variedade de fases quirais estacionárias é comercialmente disponível.

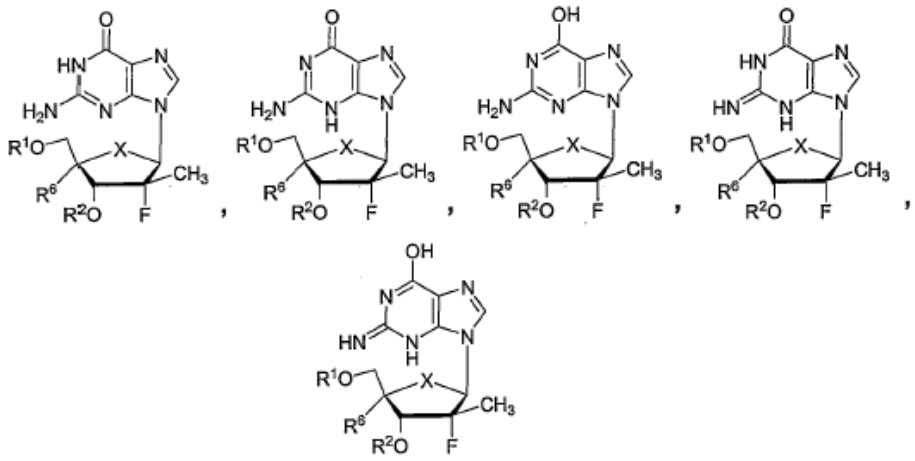
[00142] Alguns dos compostos aqui descritos contêm ligações duplas olefínicas e, a menos que especificado de outra maneira, devem incluir ambos isômeros geométricos E e Z.

[00143] Além disso, alguns dos nucleosídeos aqui descritos, podem existir como tautômeros, como, tautômeros de ceto-enol. Os tautômeros individuais assim como misturas desses devem ser englobados nos compostos da presente invenção como ilustrado abaixo.

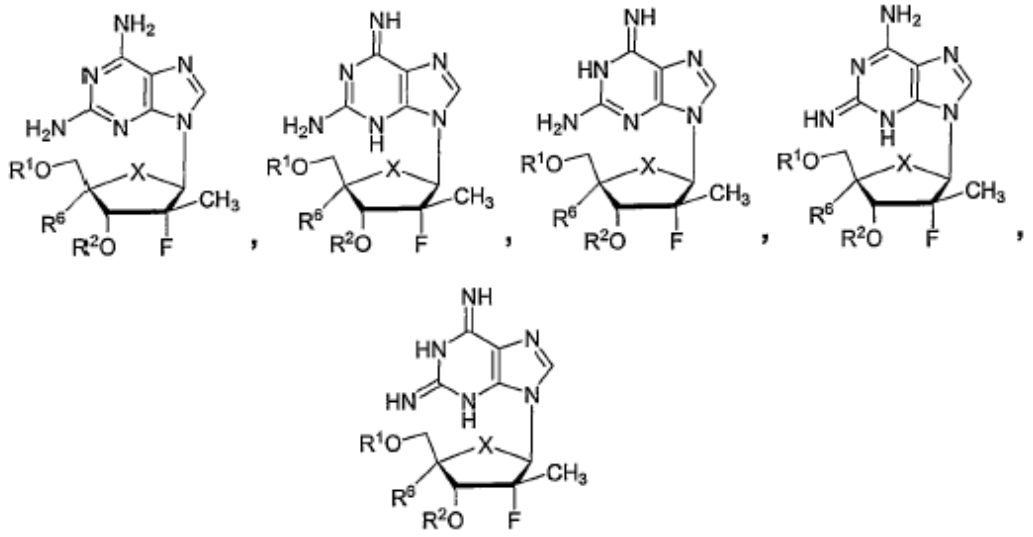
[00144] Uma (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina:



[00145] Uma (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilguanosina:



Uma (2'*R*)-2-amino-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metiladenosina:



[00146] Em cada um dos exemplos acima, a primeira estrutura desenhada é a forma preferida.

V. Pró-fármacos e Derivados

[00147] O composto ativo pode ser administrado como qualquer sal ou pró-fármaco que sob administração ao recipiente é capaz de fornecer diretamente ou indiretamente o composto parente, ou que exibe atividade em si. Exemplos não limitantes são os sais farmaceuticamente aceitáveis (alternativamente referidos como "sais fisiologicamente aceitáveis"), e um composto, que foi alquilado, acilado ou modificado na posição 5' ou na base de purina ou pirimidina (um tipo de "pró-fármaco farmaceuticamente aceitável"). Além disso, as

modificações podem afetar a atividade biológica do composto, em alguns casos aumentado a atividade sobre o composto parente. Isso pode ser facilmente avaliado por preparação do sal ou pró-fármaco e teste de sua atividade antiviral de acordo com os métodos aqui descritos, ou outros métodos conhecidos por aqueles habilitados na técnica.

Sais Farmaceuticamente Aceitáveis

[00148] Em casos onde os compostos são suficientemente básicos ou ácidos para formar sais básicos ou ácidos estáveis não tóxicos, a administração do composto como um sal farmaceuticamente aceitável pode ser adequada. Exemplos de sais farmaceuticamente aceitáveis são sais de adição de ácido orgânico formados pela adição de ácidos, que formam um ânion fisiologicamente aceitável, por exemplo, tosilato, metanossulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α-cetoglutarato, α-glicerofosfato, formato, fumarato, propionato, glicolato, lactato, piruvato, oxalato, maleato, e salicilato. Sais inorgânicos adequados também podem ser formados, incluindo, sais de sulfato, nitrato, bicarbonato, sais de carbonato, hidrobromato e ácido fosfórico. Em uma modalidade preferida, o sal é um sal mono ou dihidrocloreto.

[00149] Sais farmaceuticamente aceitáveis podem ser obtidos usando procedimentos padrão bem conhecidos na técnica, por exemplo pela reação de um composto suficientemente básico tal como uma amina com um ácido adequado gerando um ânion fisiologicamente aceitável. Metal alcalino (por exemplo, sódio, potássio ou lítio) ou metal alcalino terroso (por exemplo, cálcio) sais de ácidos carboxílicos também podem ser feitos. Em uma modalidade, o sal é um sal de hidrocloreto, hidrobrometo ou mesilato do composto. Em uma modalidade adicional, o sal farmaceuticamente aceitável é um sal de dihidrocloreto dihidrobrometo ou dimesilato.

Formulações de Pró-fármaco de Nucleotídeo

[00150] Os nucleosídeos aqui descritos podem ser administrados como um pró-fármaco de nucleotídeo para aumentar a atividade, biodisponibilidade, estabilidade ou de outra forma alterar as propriedades do nucleosídeo. Inúmeros ligantes de pró- medicamento de nucleotídeo são conhecidos. Em geral, alquilação, acilação ou outra modificação lipofílica do mono, di ou trifosfato do nucleosídeo reduz a polaridade e permite a passagem em células. Exemplos de grupos substituintes que podem substituir um ou mais hidrogênios na porção fosfato são alquil, aril, esteróides, carboidratos, incluindo açúcares, 1,2-diacilglicerol e álcoois. Vários são descritos em R. Jones e N. Bisehoferger, *Antiviral Research*, 1995,27: 1-17. Qualquer um desses pode ser usado em combinação com os nucleosídeos revelados para atingir um efeito desejado.

[00151] Em uma modalidade alternativa, o composto é administrado como um fosfonato ou derivado de SATE

[00152] O nucleosídeo ativo pode ser também fornecido como um 2', 3' e/ou 5'-fosfoéter lipídeo ou um 2', 3' e/ou 5'-éter lipídeo. Exemplos não limitantes são descritos e incluem as referências a seguir, que são aqui incorporadas por referência: Kucera, L.S., N. Iyer, E. Leake, A. Raben, Modest E.K., D.L.W., e C. Piantadosi. 1990. *Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation AIDS Res. Hum. Retro Virus*. 6:491- 501; Piantadosi, C., J. Marasco C.J., S.L. Morris- Natschke, K.L. Meyer, F. Gumus, J.R. Surles, K. S. Ishaq, L. S. Kucera, N. Iyer, CA. 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; Hosteller, K. Y., D. D. Richman, D. A. Carson, L. M. Stuhmiller, G. M. T. van Wijk, e H. van den Bosch. 1992. *Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-*

deoxythymine diphosphate dimyristoilglycerol, a lipid prodrug of 3,-deoxythymine Antimicrob. Agents Chemother. 36: 2025.2029; Hosetler, K. Y., L. M. Stuhmiller, 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: 61127.

[00153] Exemplos não limitantes de Patentes U.S. que revelam substituintes lipofílicos adequados que podem ser incorporados de forma covalente no nucleosídeo, preferivelmente na posição 2',3' e/ou 5'-OH do nucleosídeo ou preparações lipofílicas, incluem Patentes U.S. Nos. 5.149.794 (22 de setembro de 1992, Yatvin *et al*.); 5.194.654 (16 de março de 1993, Hostetler *et al*.), 5.223.263 (29 de junho de1993, Hostetler *et al*.); 5.256.641 (26 de outubro de 1993, Yatvin *et al*.); 5.411.,947 (2 de maio de 1995, Hostetler *et al*.); 5.463.092 (31 de outubro de 1995, Hostetler *et al*.); 5.543.389 (6 de agosto de 1996, Yatvin *et al*.); 5.543.390 (6 de agosto de 1996, Yatvin *et al*.); 5.543.391 (6 de agosto de 1996 Yatvin *et al*.); e 5.554.728 (10 de setembro de 1996; Basava *et al*.), todas aqui incorporadas por referência. Aplicações de patente estrangeiras que revelam substituintes lipofílicos que podem ser unidos aos nucleosídeos da presente invenção, ou preparações lipofílicas, incluem WO 89/02733, WO 90/00555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO 94/26273, WO 96/15132, EP 0 350 287, EP 93917054.4, e WO 91/19721.

[00154] Aril ésteres, especialmente fenil ésteres, também são fornecidos. Exemplos não limitantes são revelados em DeLambert *et al*., *J. Med. Chem*. 37: 498 (1994). Fenil ésteres contendo um orto éster carboxílico para o fosfato também são fornecidos. Khaninei e Torrence, *J. Med Chem*.; 39: 4109-4115 (1996). Em particular, benzil ésteres, que geram o composto parente, em alguns casos usando substituintes na posição orto ou para, para acelerar a hidrólise, são fornecidos. Exemplos dessa classe de pró-fármaco são descritos por Mitchell *et*

al., *J. Chem*. Soc. Perkin Trans. I 2345 (1992); Brook, *et al*. WO 91/19721; e Glazier *et al*. WO 91/19721.

[00155] Também são fornecidos ésteres fosfonados cíclicos e não cíclicos. Exemplos não limitantes são revelados em Hunston *et al*., *J. Med. Chem*. 27: 440-444 (1984) e Starrett *et al*. *J. Med. Chem*. 37: 1857- 1864 (1994). Adicionalmente, são fornecidos ésteres de 3',5'-fosfato cíclicos. Exemplos não limitantes são revelados em Meier *et al*. *J. Med. Chem*. 22: 811-815 (1979). ésteres de 1',3'-propanil fosfonado e ésteres de fosfato cíclicos, tais como os que contêm um anel de aril fundidos, ou seja, o éster ciclosaligenil, também são fornecidos (Meier *et al*., *Bioorg. Med. Chem*. Lett. 7: 99-104 (1997)). Ésteres de 1',3'-propanil cíclicos não substituídos dos monofosfatos também são fornecidos (Farquhar *et al*., *J. Med. Chem*. 26: 1153 (1983); Farquhar *et al*., *J. Med Chem*. 28: 1358 (1985)). Além disso, ésteres de 1',3'-propanil cíclicos substituídos com um grupo pivaloiloxi metiloxi em C-1' são forncidos (Freed *et al*., *Biochem. Pharmac*. 38: 3193 (1989); Biller *et al*., Pat. U. S. No. 5.157.027).

[00156] Fosforamidatos cíclicos são conhecidos por clivar *in vivo* por um mecanismo oxidativo. Portanto, em uma modalidade da presente invenção, vários 1',3' propanil cíclico fosforamidatos substituídos são fornecidos. Exemplo não limitantes são reveldos por Zon, *Progress in Med. Chem*. 19,1205 (1982). Adicionalmente, são fornecidos inúmeros pró-ésteres 2' e 3' substituídos. Substituintes de 2' incluem metil, dimetil, bromo, trifluormetil, cloro, hidroxila, e metoxi; substituintes de 3' incluindo fenil, metil, trifluormetil, etil, propil, i-propil, e ciclohexil. Também são fornecidos vários análogos 1'-substituídos.

[00157] Ésteres cíclicos de compostos contendo fósforo também são fornecidos. Exemplo não limitantes são descritos a seguir:

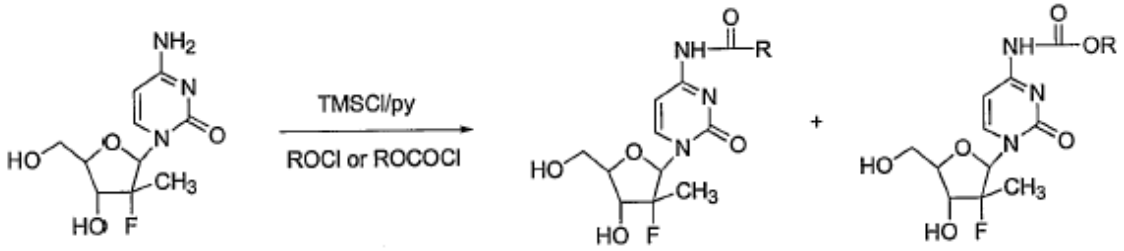
- di e tri ésteres de ácido fosfóricos como relatado em Nifantyev *et al*., *Phosphorus, Sulfur Silicon and Related Elements*, 113: 1 (1996);

Wijnberg *et al*., EP-180276 A1;

- ésteres de ácido de fosforoso (III). Kryuchkov *et al*., Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim. 6: 1244 (1987). Alguns dos compostos foram reivindicados como sendo úteis para a síntese assimétrica de precursores de L-Dopa. Sylvain *et al*., DE3S 12781 A1;
- fosforamidatos. Shih *et al*., Bull. *Inst. Chem. Acad Sin*, 41: 9 (1994); Edmundson *et al*., *J. Chem*. Res. Synop. 5:122 (1989); e
- fosfonatos. Neidlein *et al*., Heterocycles 35: 1185 (1993).

Pró-fármacos de N^4-acil

[00158] A invenção também fornece pró-fármacos de N^4-acil. Um exemplo não limitante de um derivado de N^4-acil de (2'*R*)-2'-F-2'-*C*-metilcitidina é mostrado abaixo:

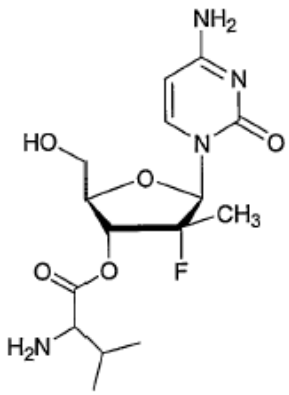


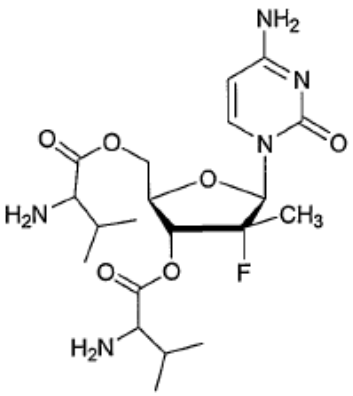
onde R pode ser qualquer grupo acil como aqui descrito.

[00159] A invenção também contempla outras modalidades, onde o pró-fármaco de um (2'R)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-C-metil nucleosídeo (β-D ou β-L) inclui porções biologicamente cliváveis nas posições 3' e/ou 5'. Porções preferidas são naturais de ésteres de aminoácido D ou L sintéticos, incluindo d ou L-valil, embora preferivelmente ésteres de L- aminoácidos, como L-valil, e ésteres de alquil incluindo acetil. Portanto, essa invenção inclui especificamente éster de aminoácido 3'-L ou D e éster de diaminoácido 3',5'-L ou D de (2'R)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-C-metil nucleosídeos (β-D ou β-L) preferivelmente aminoácido L, com qualquer base desejada de purina ou pirimidina, onde o medicamento parente tem opcionalmente um EC_{50} de menos que 15 micromolar, e ainda mais é

preferivelmente de menos que 10 micromolar; 3’-(alquil ou aril)éster ou 3’,5’-L-di(alquil ou aril)éster de (2’*R*)-2’-desoxi-2’-flúor-2’-*C*-metil nucleosídeos (β-D ou β-L) com qualquer base desejada de purina ou pirimidina, onde o medicamento parente opcionalmente tem um EC_{50} de menos que 10 ou 15 micromolar; e pró-fármacos com 3’,5’-diestéres de (2’*R*)-2’-desoxi-2’-flúor-2’-*C*-metil nucleosídeos (β-D ou β-L) em que (i) o éster 3’ é um éster de aminoácido e o éster 5’ é um éster de alquil ou aril; (ii) ambos ésteres são ésteres de aminoácido; (iii) ambos ésteres são independentemente ésteres de alquil ou aril; e (iv) o éster 3’ é independentemente um éster de alquil ou aril e o éster 5’ é um éster de aminoácido, onde o medicamento parente tem opcionalmente um EC_{50} de menos que 10 ou 15 micromolar.

[00160] Exemplos não limitantes de pró-fármacos que estão de acordo com a invenção são:





VI. Terapia de Combinação ou Alternância

[00161] Em uma outra modalidade, para o tratamento, inibição, prevenção e/ou profilaxia de qualquer infecção viral aqui descrita, o composto ativo ou seu derivado ou sal pode ser administrado em combinação ou alternância com um outro agente antiviral. Em geral, em terapia de combinação, dosagens eficazes de dois ou mais agentes são administradas juntas, enquanto durante a terapia de alternância, uma dosagem eficaz de cada agente é administrada em série. As

dosagens dependerão das taxas de absorção, inativação e excreção do medicamento assim como de outros fatores conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Deve ser observado que os valores de dosagem também irão variar com a severidade da condição a ser aliviada. Deve ser compreendido que para qualquer pessoa em particular, os regimes e esquemas de dosagem específicos devem ser ajustados pelo tempo de acordo com a necessidade individual e com o julgamento profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições.

[00162] Foi reconhecido que variantes resistentes a medicamentos flavivírus, pestivírus ou HCV podem surgir depois de tratamento prolongado com um agente antiviral. A resistência a medicamentos ocorre mais tipicamente por mutação de um gene que codifica para uma enzima usada na replicação viral. A eficácia de um medicamento contra infecção viral pode ser prolongada, aumentada, ou restabelecida por administração do composto em combinação ou alternância com um segundo, e talvez um terceiro composto antiviral que induz uma mutação diferente daquela causada pela droga mestra. Alternativamente, a farmacocinética, biodistribuição ou outros parâmetros do medicamento podem ser alterados por tal terapia de combinação ou alternância. Em geral, a terapia de combinação é tipicamente preferida sobre a terapia de alternância porque ela induz múltiplos estresses simultâneos no vírus.

[00163] Por exemplo, uma pessoa habilitada na técnica reconhecerá que qualquer medicamento ou terapia antiviral pode ser usada em combinação ou alternância com qualquer nucleosídeo da presente invenção. Qualquer um dos tratamentos antivirais descritos no “Fundamento da Invenção” pode ser usado em combinação ou alternância com os compostos descritos nessa especificação. Exemplos não limitantes dos tipos de agentes antivirais ou seus pró-fármaco que podem ser usados em combinação com os compostos aqui revelados incluem:

interferon, incluindo interferon alfa 2a, interferon alfa 2b, um interferon peguilado, interferon beta, interferon gama, interferon tau e interferon omega; uma interleucina, incluindo interleucina 10 e interleucina 12; ribavirina; interferon alfa ou interferon alfa peguilado em combinação com ribavirina ou levovirina; levovirina; um inibidor de protease incluindo um inibidor de NS3, um inibidor de NS3-4A; um inibidor de helicase; um inibidor de polimerase incluindo HCV RNA polimerase e um inibidor de NS5B polimerase; gliotoxina; um inibidor de IRES; e oligonucleotídeo anti-senso; um derivado de tiazolidina; uma benzanilida, uma ribozima; um outro nucleosídeo, pró-fármaco de nucleosídeo ou derivado de nucleosídeo; um 1-amino-alquilciclohexano; um antioxidante incluindo vitamina E; squalene; amantadina; um ácido da bile; ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspártico; uma benzenodicarboxamida; ácido poliadenílico; um benzimidazol; timosina; um inibidor de beta tubulina; uma vacina profilática; um modulador imune, um inibidor de IMPDH; silibin-fosfatidilcolina fitosoma; e micofenolato.

[00164] Exemplos não limitantes adicionais dos tipos de medicamentos ou seus pró-fármaco acima descritos incluem: aciclovir (ACV), ganciclovir (GCV ou DHPG) e seus pró-fármacos (por exemplo, valil-ganciclovir), E-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina (BVDU), (E)-5-vinil-1-β-D-arabonosiluracil (VaraU), (E)-5-(2-bromovinil)-1-β-D- arabinosiluracil (BV-araU), 1-(2-desoxi-2-flúor-β-D-arabinosil)-5-iodocitosina (D-FIAC), 1-(2-desoxi-2-flúor- β-L-arabinosyl)-5-metiluracil (L-FMAU, ou clevudine), (*S*)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)adenina[(S)-HPMPA], (*S*)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)-2,6-diaminopurina [(S)-HPMPDAP], (*S*)-1-(3-hidroxi-2-fosfonil-metoxipropil) citosina [(*S*)-HPMPC ou ciclofivir] e (2*S*, 4*S*)-1-[2-(hidroximetil)-1,3-dioxolan-4-il]-5-iodouracil (L-5-IoddU), entecavir, lamivudine (eTC), LdT, LdC, tenofovir e adefovir, o enantiômero (-) de 2-hidroximetil-5-(5-

fluorcitosin-1-il)-1,3-oxatiolano ((-)-FTC); o enantiômero (-) de 2-hidroximetil-5-(5-citosin-1-il)-1,3-oxatiolano (3TC); carbovir, aciclovir, famciclovir, penciclovir, AZT, DDI, DDC, L-(-)-FMAU, D4T, amdoxovir, Reverset, Racivir, abacavir, L-DDA, pró-fármaco de fosfato e β-D-dioxolanil-6-cloropurina (ACP), inibidores de RT não nucleosídicos como nevirapina, MKC-442, DMP-226 (sustiva), inibidores de protease como indinavir, saquinavir, Kaletra, atazanavir; e compostos anti-HIV como BILN-2061, ISIS 14803; viramidine, NM 283, VX-497, JKT-003, levovirin, isatoribine, albuferon, Peg-infergen, VX-950, R803, HCV-086, R1479 e DMP45.

Composições Farmacêuticas

[00165] Hospedeiros, incluindo humanos, infectados com pestivírus, flavivírus, HCV ou um outro organismo que se replica através de uma RNA polimerase viral dependente de RNA, ou para tratamento de qualquer distúrbio aqui descritos, podem ser tratados pela administração ao paciente de uma quantidade eficaz do composto ativo ou um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável desse na presença de um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável. Os materiais ativos podem ser administrados por qualquer via adequada, por exemplo, via oral, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutânea, ou tópica, em forma líquida ou sólida.

[00166] Uma dose de preferência do composto para infecção por *Flaviviridae*, incluindo vírus da hepatite C, vírus do oeste do Nilo e vírus da febre amarela e infecção por rinovírus estará na faixa de cerca de 50 a 2.000 mg uma a quatro vezes por dia. Doses menores podem ser úteis e as faixas podem incluir de 50 - 1.000 mg uma a quatro vezes por dia. A escala de dosagem eficaz dos sais e pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis pode ser calculada baseada no peso do nucleosídeo parente a ser liberado. Se o sal ou pró-fármaco exibe atividade em si, a dosagem eficaz pode ser estimada como acima usando o peso do sal ou pró- medicamento, ou por outros meios conhecidos por aqueles

experientes na técnica.

[00167] O composto é convenientemente administrado em uma unidade de qualquer forma de dosagem adequada, incluindo, mas não limitadas a uma que contém 25 a 3.000 mg, preferivelmente 50 a 2.000 mg de ingrediente ativo por forma de dosagem unitária. Uma dosagem oral de 50-1.000 mg é usualmente conveniente, incluindo em formas de uma dosagem ou de dosagens múltiplas de 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1.000 mg. Também são contempladas doses de 0,1-50 mg, ou 0,1-20 mg ou 0,1-10,0 mg. Além disso, doses menores podem ser utilizadas no caso de administração por uma via não oral, como, por exemplo, por injeção ou inalação.

[00168] Idealmente o ingrediente ativo deve ser administrado para atingir concentrações plasmáticas de pico (Cmax) do composto ativo de cerca de 5,0 a 70 μM, preferivelmente cerca de 5,0 a 15 μM. Isso pode ser realizado, por exemplo, pela injeção intravenosa de uma solução 0,1 a 5% do ingrediente ativo, opcionalmente em solução salina, ou administrado como um bolo do ingrediente ativo.

[00169] A concentração do composto ativo na composição de medicamento dependerá das taxas de absorção, inativação, e excreção do medicamento assim como de outros fatores conhecidos por aqueles experientes na técnica. Deve-se notar que os valores de dosagem também irão variar de acordo com a severidade da condição a ser aliviada. Deve ser também entendido que para qualquer objetivo particular, os regimes de dosagem específicos devem ser ajustados pelo tempo de acordo com a necessidade individual e o julgamento profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições e que as faixas de concentração apresentadas adiante nessa são apenas para fins de exemplo e não pretendem limitar o escopo ou prática da composição reivindicada. O ingrediente ativo pode ser administrado em uma, ou

pode ser dividido em várias doses menores a serem administradas em intervalos variados de tempo.

[00170] Uma via de administração de preferência do composto ativo é a via oral. Composições orais geralmente incluirão um diluente inerte ou um transportador comestível. Eles podem ser incluídos em cápsulas de gelatina ou compressos em comprimidos. Para o objetivo da administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser incorporado com excipientes e usado na forma de comprimidos, pastilhas ou cápsulas. Agentes de ligação farmaceuticamente compatíveis, e/ou materiais adjuvantes podem ser incluídos como parte da composição.

[00171] Os comprimidos, pílulas, cápsulas, pastilhas e semelhantes podem conter vários dos seguintes ingredientes, ou compostos de natureza similar: um ligante tal como celulose microcristalina, goma tragacanto ou gelatina; um excipiente tal como amido ou lactose, um agente de desintegração tal como ácido algínico, Primogel, ou amido de milho; um lubrificante tal como estearato de magnésio ou Sterotes; um glidante tal como dióxido de silicone coloidal; um agente adoçante tal como sacarose ou sacarina; ou um agente flavorizante tal como hortelã, metil salicilato ou sabor de laranja. Quando a forma de dosagem unitária é uma cápsula, ela pode conter, em adição a material do tipo acima, um transportador líquido tal como um óleo graxo. Em adição, formas de dosagem unitárias podem conter vários outros materiais que modificam a forma física da unidade de dosagem, por exemplo, coberturas de açúcar, goma-laca, ou outros agentes entéricos.

[00172] Os compostos podem ser administrados como um componente de um elixir, suspensão, xarope, wafer, goma de mascar ou semelhante. Um xarope pode conter, em adição aos compostos ativos, sacarose como um agente adoçante e certos preservativos, corantes e colorante e flavorizantes.

[00173] O composto ou seus derivados ou sais farmaceuticamente aceitáveis desses podem também ser misturados com outros materiais ativos que não prejudicam a ação desejada, ou com materiais que suplementam a ação desejada, tal como antibióticos, antifúngicos, antiinflamatórios ou outros agentes antivirais incluindo outros compostos nucleosídicos. Soluções ou suspensões usadas para aplicação parenteral, intradérmica, subcutânea, ou tópica podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixados, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol, ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tal como álcool benzílico ou metil parabeno; antioxidantes tal como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tal como ácido etilenodiaminatetra–acético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste de tonicidade tal como cloreto de sódio ou dextrose. A preparação parenteral pode ser colocada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de dose múltipla feitos de vidro ou plástico.

[00174] Se administrado por via intravenosa, transportadores de preferência são a solução salina fisiológica ou solução salina tamponada por fosfato (PBS).

[00175] Em uma modalidade preferida, os compostos ativos são preparados com transportadores que irão proteger o composto contra eliminação rápida do corpo, tal como formulação de liberação controlada, incluindo implantes, e sistemas de liberação micro-encapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tal como acetato de etileno vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Métodos para preparação de tais formulações estarão aparentes àqueles habilitados na técnica. Os materiais também podem ser obtidos comercialmente de Alza Corporation.

[00176] Suspensões lipossômicas (incluindo lipossomos que visam células infectadas com anticorpos monoclonais para antígenos virais) são também preferidos como transportadores farmaceuticamente aceitáveis. Esses podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, formulações de lipossomo podem ser preparadas pela dissolução do(s) lipídeo(s) adequado(s) (tais como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, aracadoil fosfatidil colina e colesterol) em um solvente inorgânico que é então evaporado, deixando para trás uma fina película de lipídeo seco na superfície do recipiente. Uma solução aquosa do composto ativo ou seu derivado de monofosfato, difosfato, e/ou trifosfato é então introduzida no recipiente. O recipiente é então agitado manualmente para liberar o material lipídico das laterais do recipiente e para dispersar os agregados lipídicos, dessa forma formando a suspensão lipossômica.

VII. Métodos Biológicos

Teste Antiviral de Compostos Candidatos com sistema de Replicon de HCV em células Huh7.

[00177] Células Huh7 com *replicon* de HCV contendo podem ser cultivadas em meio DMEM (alta glicose, sem piruvato) contendo soro bovino fetal 10%, 1 x aminoácidos não essenciais (100 unidades/mL), Pen-Strep-Glu (100 unidades/litro, 100 micrograma/litro, e 2.92 mg/litro, respectivamente) e 500 a 1000 microgramas/mililitro de G418. Os ensaios de rastreamento antivirais podem ser realizados no mesmo meio, sem G418, como se segue: para manter as células em fase de crescimento logarítmico, as células são semeadas em placa de 96 cavidades em baixa densidade, por exemplo, 1.000 células por cavidade. O composto de teste é adicionado imediatamente depois de semear as células e é incubado por um período de 3 a 7 dias a 37°C em um incubador. O meio é então removido, e as células são preparadas para extração total de ácido

nucleico (incluindo RNA de replicon e RNA de hospedeiro). RNA de replicon pode ser então amplificado em um protocolo de Q-RT-PCR, e quantificado pelo mesmo critério. As diferenças observadas nos níveis de RNA de replicon de HCV comparadas ao controle não tratado é um modo de expressar a potência de antiviral do composto de teste.

[00178] Em um outro ambiente típico, um composto deve reduzir a atividade de RNA polimerase viral, mas não a atividade de RNA polimerase do hospedeiro. Portanto, a quantificação de *r*RNA ou beta-actina *m*RNA (ou qualquer outro fragmento de RNA de hospedeiro) e comparação com níveis de RNA do controle sem medicamento é uma medição relativa do efeito inibidor do composto de teste sobre as RNA polimerases celulares.

Ensaio de fosforilação de nucleosídeo para trifosfato ativo

[00179] Para determinar o metabolismo celular dos compostos, células Huh-7 são btidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD), e cresceram em frascos de cultura de tecido de 225 cm^2 em meio essencial mínimo suplementado com aminoácidos não essenciais, 1% penicilina-estreptomicina. O meio é renovado a cada três dias, e as células são sub-cultivadas uma vez por semana. Depois da separação das monocamadas aderentes com uma exposição de 10 minutos a 30 mL de tripsina-EDTA e três lavagens consecutivas com meio, células Huh-7 confluentes são semeadas em uma densidade de 2,5 x 10^6 células por cavidade em uma placa de 6 cavidades e expostas a 10 μM de composto ativo marcado com [^{3}H] (500 dpm/pmol) pelos períodos de tempo especificado. As células são mantidas a 37°C sob uma atmosfera de CO_2 a 5%. Nos pontos de tempo selecionados, as células foram lavadas três vezes com solução salina tamponada por fosfato gelada (PBS). Composto ativo extracelular e seus respectivos metabólitos são extraídos por incubação do pélete de célula de um dia para o outro a -20°C com 60% metanol seguido por extração com 20 μL

adicionais de metanol frio por uma hora em um banho de gelo. Os extratos são então combinados, secos sob fluxo de ar filtrado leve e estocados a –20°C até análise por HPLC.

Ensaio de Biodisponibilidade em Macacos Cinomolgus

[00180] Uma semana antes do início do estudo, o macaco Cinomolgus é implantado cirurgicamente com um cateter venoso crônico e porta de acesso venoso subcutâneo (VAP) para facilitar a coleta de sangue e passa por exame físico incluindo avaliações de hematologia e de química sérica e o peso corporal é registrado. Cada macaco (total de seis), recebe aproximadamente 250 μCi composto marcado com ^{3}H combinado com cada dose de composto ativo, em um nível de dose de 10 mg/kg em uma concentração de dose de 5 mg/mL, por meio de um bolo intravenoso (3 macacos, IV), ou via engorda oral (3 macacos, PO). Cada seringa de dose é pesada antes da dosagem para determinar gravimetricamente a quantidade de formulação administrada. Amostras de urina são coletadas por meio de um pan catch nos intervalos designados (aproximadamente 18-0 horas pré-dose, 0-4, 4-8 e 8-12 horas pós-dosagem) e processadas. Amostras de sangue são coletadas também (pré-dose, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 6, 8, 12 e 24 horas pós-dosagem) via cateter venoso crônico e VAP ou de uma veia periférica se o procedimento de cateter venoso crônico não for possível. As amostras de sangue e urina são analisadas para a concentração máxima (Cmax), tempo quando a concentração máxima é atingida (T_{max}), área sob a curva (AUC), meia-vida da concentração de dosagem ($T_{1/2}$), depuração (CL), volume e distribuição de estado estável (V_{ss}) e biodisponibilidade (F).

Ensaio de Toxicidade de Medula Óssea

[00181] Células de medula óssea humana são coletadas de voluntários saudáveis normais e a população mononuclear é separada por centrifugação de gradiente Ficoll-Hypaque como descrito previamente em Sommadossi J-P,

Carlisle R. *Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine for normal human hematopoietic progenitor cells in vitro Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1987; 31:452-454; e Sommadossi J-P, Schinazi RF, Chu CK, Xie M-Y. *Comparison of cytotoxicity of the (-)- and (+)-enantiomer of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine in normal human bone marrow progenitor cells Biochemical Pharmacology* 1992; 44:1921-1925. Os ensaios de cultura para CFU-GM e BFU-E são realizados usando um método de Agar macio de bicamada ou metilcelulose. Drogas são diluídas em meio de cultura de tecido e filtradas. Depois de 14 a 18 dias a 37°C em uma atmosfera umidificada de CO_2 a 5% em ar, as colônias maiores que 50 células são contadas usando um microscópio invertido. Os resultados são apresentados como a inibição percentual da formação de colônias na presença de droga comparada às culturas controladas por solvente.

Ensaio de Toxicidade Mitocondrial

[00182] Cinquenta microlitros de 2X diluições de medicamento foram adicionados por cavidade em uma placa de 96 cavidades. Um controle "sem medicamento" (apenas meio) foi usado para determinar a quantidade máxima de DNA mitocondrial produzida e de DNA ribossômico. 3TC @ 10 μM foi usado como um controle negativo, e ddC @ 10 μM foi usado como um controle tóxico. Os níveis de DNA ribossômico foram suados para determinar a toxicidade específica para a mitocôndria ou citotoxicidade. Células HepG2 (5.000 células/cavidades a 50 μL) foram adicionadas à placa. A placa foi incubada a 37°C em uma atmosfera de CO_2 a 5% umidificada por 7 dias. Após incubação, o sobrenadante foi removido e estocado para quantificação de ácido lático e o DNA total foi extraído das células como descrito em RNeasy 96 handbook (fevereiro de 1999), páginas 22-23. Não foram realizadas digestões de DNA, portanto o RNA e DNA total foram extraídos.

[00183] O DNA extraído foi amplificado e a mudança no DNA mitocondrial e DNA ribossômico para cada amostra foi determinada. A diferença de dobra em DNA mitocondrial normalizado para DNA ribossômico em relação ao controle foi calculada.

[00184] Foi realizada quantificação de ácido lático pelo kit de teste de ácido lático D/ácido lático L (BoehringerMannheim/R-Biopharm/Roche). A quantidade total de ácido lático produzida para cada amostra foi encontrada assim como a mudança de dobra na produção de ácido lático (% de ácido lático/% de rDNA) como descrito nas instruções do fabricante.

Ensaio de Citotoxicidade

[00185] 50 μL de 2X diluições de medicamento foram adicionados por cavidade em uma placa de 96 cavidades. As concentrações finais do medicamento variaram de 1 a 100 μM. Um controle "sem medicamento" (apenas meio) foi usado para determinar os valores de absorbancia mínima e um controle "células + meio apenas" foi usado para valor de absorbancia máxima. Um controle de solvente também foi usado. As células foram então adicionadas (PBM: 5 x 10^4 células/cavidade; CEM: 2,5 x 10^3 células/cavidade; Vero, HepG2, Huh-7, e Clone A: 5 x 10^3 células/cavidade) e incubadas a 37°C em atmosfera umidificada de CO_2 a 5% por 3-5 dias (PBM: 5 dias; CEM: 3 dias, todos os outros: 4 dias). Após incubação, 20 μL de corante MTS foram adicionados do ensaio de proliferação celular de solução aquosa de título de célula a cada cavidade e as placas foram novamente incubadas por 2-4 horas. A absorbancia (490 nm) foi então lida em um leitor de placa de ELISA usando as cavidades de meio apenas/nenhuma célula como vazios. A inibição percentual foi encontrada e usada para calcular a CC_{50}.

Toxicidade *in vivo* em Camundongos

[00186] Toxicidade *in vivo* também foi determinada após injeções nos

camundongos fêmeas Swiss dos vários nucleosídeos revelados na presente invenção. Injeções intraperitoniais foram administradas nos dias 0, dia 1, dia 2, dia 3, e dia 5 de doses variáveis do nucleosídeo particular. animais separados foram injetados com veículo como grupos de controle. Nesses estudos, cada grupo de dosagem continha 5-10 camundongos. A mudança de peso médio em cada um dos camundongos foi medida como um sinal de toxicidade do composto.

Ensaio de redução de rendimento (BVDV)

[00187] Células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) cresceram em meio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado com 10% de soro equino e 100 μg/mL penicilina-estreptomicina. As células foram semeadas em placas de 96 cavidades em 5 x 10^3 células/cavidade e incubadas por 72h a 37°C em uma atmosfera umidificada de CO_2 a 5%. As células foram infectadas com BVDV citopático (cepa NADL) ou não citopático (cepa SD-1) em uma diluição de vírus de 10^{-2} e incubadas por 45 min. As monocamadas de células foram lavadas três vezes com meio. Compostos de teste contendo meio fresco em concentrações de resposta de dose ou ribavirina, como um controle positivo, foram adicionados às culturas e meio não contendo medicamento foi adicionado ao controle sem medicamento. Após 72h de incubação, o sobrenadante foi coletado e e RNA viral foi extraído usando o mini kit QIAmp Viral RNA (Qiagen, CA). A carga viral foi determinada por Q-RT-PCR usando iniciadores específicos para NADL ou SD-1 (1).

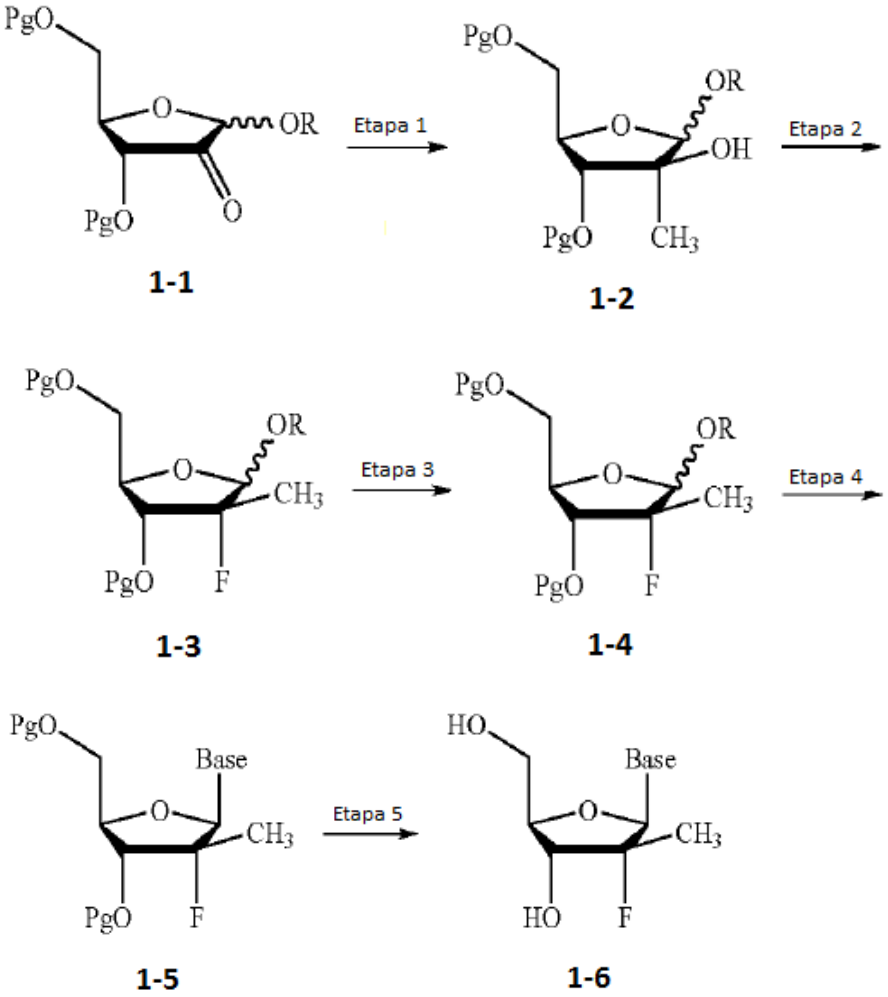
VIII. Protocolo Sintético

[00188] As modalidades não limitantes a seguir ilustram algumas metodologias gerais para obter os nucleosídeos da presente invenção. Dois métodos gerais representativos para a preparação de compostos da presente invenção são apresentados nos Esquemas 1 e 2 enquanto exemplos mais

específicos desses métodos gerais são fornecidos no Esquema 3 (Exemplo 1), Esquema 4 (Exemplo 2), Esquema 5 (Exemplo 3), e Esquema 6 (Exemplo 4). O Esquema 1 representa um processo generalizado que se inicia de um (2*R*) 2-desoxi-2-metil-2-flúor-carboidrato e forma os nucleosídeos da presente invenção por condensação com uma nucleobase. O Esquema 2 se inicia a partir de um nucleosídeo pré-formado de purina ou pirimidina, opcionalmente substituído em C-4' e constrói C-2' (*R*) metil, flúor nucleosídeos da presente invenção. Embora esses esquemas ilustrem a síntese de compostos da presente invenção de fórmulas gerais (I) e (II) onde há um anel de furanose na configuração β-D-ribo, isso não pretende ser uma limitação ao escopo do processo da invenção de qualquer forma e não deve ser assim interpretado. Aqueles habilitados na técnica de síntese de nucleosídeo e nucleotídeo perceberão facilmente que variações conhecidas das condições e processos dos seguintes procedimentos de preparação e manipulações conhecidas da nucleobase podem ser usados para preparar esses e outros compostos da presente invenção. Além disso, os L-enantiômeros que correspondem aos compostos da invenção podem ser preparados seguindo os mesmos métodos, iniciando com o bloco de construção de L-carboidrato correspondente ou L-enantiômero de nucleosídeo como o material de iniciação.

1. *Glicosilação da nucleobase com um açúcar modificado adequado*

Esquema 1



Pg = grupo de proteção

R= alquil inferior, acil, mesil, benzoil

Base = como aqui definido

[00189] Etapa 1 no esquema 1 introduz o grupo 2-metil pelo uso de um agente de alquilação adequado como brometo de metil lítio, trimetilalumínio, ou metilmagnésio em um solvente anidro como tetrahidrofurano (THF), clorofórmio, ou éter dietílico. Compostos **1-1** até **1-4** podem ser puramente α ou β ou podem existir como uma mistura anomérica contendo ambos α e β anômeros em qualquer proporção. Entretanto, a configuração anomérica preferida de estrutura **1-1** é β.

[00190] Etapa 2 introduz o átomo de flúor na posição 2 do alquil furanosídeo. Isso pode ser realizado por tratamento do álcool terciário, **1-2**, com

um reagente de fluoração comercialmente disponível como trifluoreto de (dietilamino) enxofre (DAST) ou Deoxofluor em um solvente anidro, aprótico como tetrahidrofurano, clorofórmio, diclorometano, ou tolueno. Preferivelmente a estereoquímica procede com inversão na configuração em C-2. Ou seja, iniciando de um C-2 hidroxila “acima” (ou arabinofuranosídeo) na estrutura **1-2**, o C-2 flúor é “abaixo” no ribofuranosídeo intermediário **1-3**.

[00191] Na etapa 3, os grupos de proteção opcionais (Pg) podem ser desprotegidos e re-protegidos para grupos mais adequados para as manipulações remanescentes (T. W. Greene e P. G. M. Wuts,*Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999). Por exemplo, éteres de benzila (Bn) podem ser difíceis de remover no nucleosídeo protegido, **1-5** e podem ser desprotegidos e substituídos com um grupo mais fácil de remover do nucleosídeo de tipo estrutural **1-5**. Além disso, a posição anomérica (C-1) também pode ser opcionalmente manipulada a um grupo adequado para a reação de ligação com a nucleobase (etapa 4). Vários métodos para manipulações anoméricas são estabelecidos para aqueles habilitados na técnica de síntese de nucleosídeos. Alguns exemplos não limitantes por tratamento do alquil furanosídeo (**1-3**, R = alquil) com uma mistura de anidrido acético, ácido acético e uma quantidade catalítica de ácido sulfúrico (acetólise) para fornecer a estrutura **1-4** onde R = Ac, com grupos de proteção opcionais. Também, o grupo alquil em **1-3** pode ser convertido a um acetato, benzoato, mesilato, tosilato, triflato ou tosilato, por exemplo, por hidrólise do grupo 1-*O*alquil a um grupo 1-hidroxila pelo uso de um ácido mineral que consiste em, mas não se limita a, ácido sulfúrico, ácido hidroclorídrico e ácido hidrobrômico ou um ácido orgânico que consiste em, mas não se limita a, mas ácido trifluoracético, ácido acético e ácido fórmico (em temperatura ambiente ou temperatura elevada). O açúcar de redução pode ser então convertido ao carboidrato desejado por

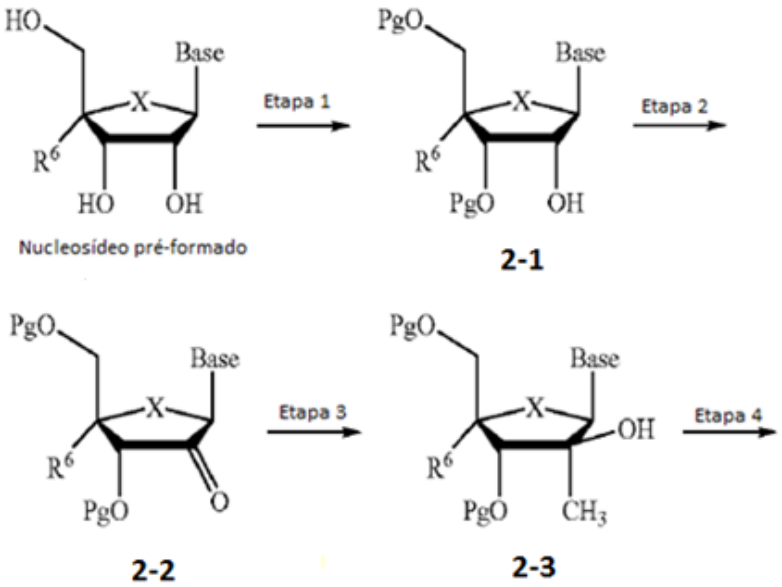
tratamento com cloreto de acetila, anidrido acético, cloreto de benzoila, anidrido benzóico, cloreto de metanossulfonila, anidrido tríflico, cloreto de trifila cloreto de tosila na presença de uma base adequada como trietilamina, piridina ou dimetilaminopiridina.

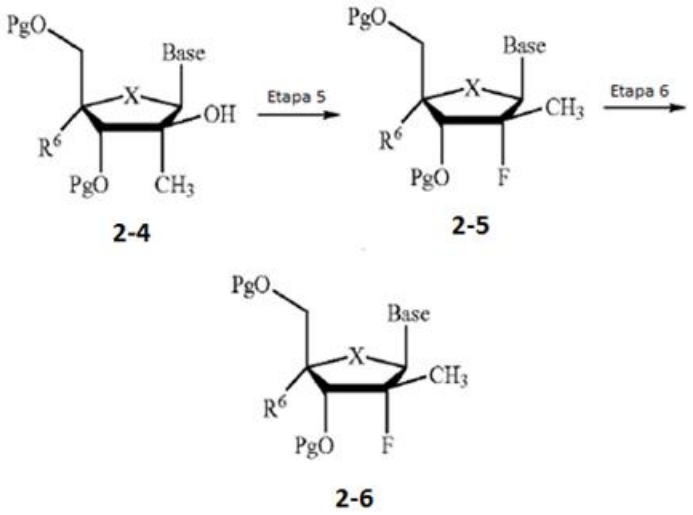
[00192] A ligação nucleosídica é construída por tratamento de intermediário **1-3** ou **1-4** com a nucleobase persililada adequada na presença de um ácido de Lewis como tetracloreto de estanho, tetracloreto de titânio, trimetilsililtriflato ou um reagente de mercúrio (II) ($HgO/HgBr_2$) usualmente em uma temperatura elevada em um solvente aprótico como tolueno, acetonitrila, benzeno, ou uma mistura de qualquer um ou de todos esses solventes.

[00193] Os grupos de proteção opcionais nesses nucleosídeos protegidos ou fórmula estrutural **1-5** podem ser clivados seguindo metodologias de desproteção estabelecidas (T. W. Greene e P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999).

2. *Modificação de um nucleosídeo pré-formado*

Esquema 2





Pg = grupo de proteção

Base = como aqui definido (opcionalmente protegida)

X = como aqui definido

R^6 = como aqui definido

[00194] O material de iniciação para esse processo é um nucleosídeo de purina ou pirimidina adequadamente substituído com um 2'-OH e 2'-H. O nucleosídeo pode ser comprado ou pode ser preparado por qualquer meio incluindo técnicas padrão de ligação. O nucleosídeo pode ser opcionalmente protegido com grupos de proteção adequados, preferivelmente com grupos acil ou silil, por métodos bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica, como ensinado por T.W. Greene e P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis* 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999.

[00195] O nucleosídeo de purina ou pirimidina pode ser então oxidado na posição 2' com o agente de oxidação adequado em um solvente compatível em uma temperatura adequada para gerar o nucleosídeo 2' modificado. Possíveis agentes de oxidação são uma mistura de dimetilsulfóxido, anidrido trifluoracético ou anidrido acético (uma oxidação de Swern/Moffat), trióxido de cromo ou outro reagente de cromato, periodinano de Dess-Martin ou por tetróxido de rutênio/periodato de sódio.

[00196] O nucleosídeo 2’-cetona opcionalmente protegido é então alquilado usando tais agentes de alquilação, metil lítio, trimetilalumínio, brometo de metilmagnésio ou reagentes similares em um solvente anidro como tetrahidrofurano (THF), clorofórmio, ou éter dietílico usualmente em temperaturas abaixo de 0°C. Compostos da estrutura de fórmula **2-3** são preferidos tendo a configuração 2’(*S*) ou 2’-metil “abaixo”, 2’-OH “acima”.

[00197] O nucleosídeo de estrutura **2-3** pode ser desprotegido e re-protegido com inúmeros grupos de proteção como um *O*-acil (alquil ou aril), *O*-sulfonil, ou um *N*-acil (alquil ou aril) para a base. Essa etapa opcional de re-proteção não precisa ser limitada aos grupos de proteção que funcionam como grupos de proteção química. Outros grupos de proteção como grupos acil de cadeia longa entre 6 e 18 unidades de carbono ou aminoácidos podem ser introduzidos independentemente da nucleobase ou do açúcar. Os grupos de proteção podem servir como pró-fármaco da substância ativa.

[00198] Etapa 5 introduz o átomo de flúor na posição 2’ do nucleosídeo pré-formado. Isso pode ser realizado por tratamento do álcool terciário, **2-4**, com um reagente de fluoração comercialmente disponível como as trifluoreto de (dietilamino) enxofre (DAST) ou Deoxofluor em um solvente anidro, aprótico como tetrahidrofurano, clorofórmio, diclorometano, ou tolueno. Preferivelmente a estereoquímica procede com inversão na configuração na posição 2’. Ou seja, iniciando de um C-2’ hidroxila “acima” (arabinofuranosídeo) na estrutura **2-4**, o C-2 flúor é “abaixo” no nucleosídeo intermediário **2-5**. A configuração absoluta de um nucleosídeo de estrutura **2-4** é (2’*S*) enquanto a configuração absoluta de um nucleosídeo de estrutura **2-5** é (2’*R*).

[00199] Subsequentemente, os nucleosídeos de estrutura tipo **2-5** podem ser desprotegidos por métodos bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica, como ensinado por T. W. Greene e P. G. M. Wuts, *Protective Groups in*

Organic Synthesis 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999.

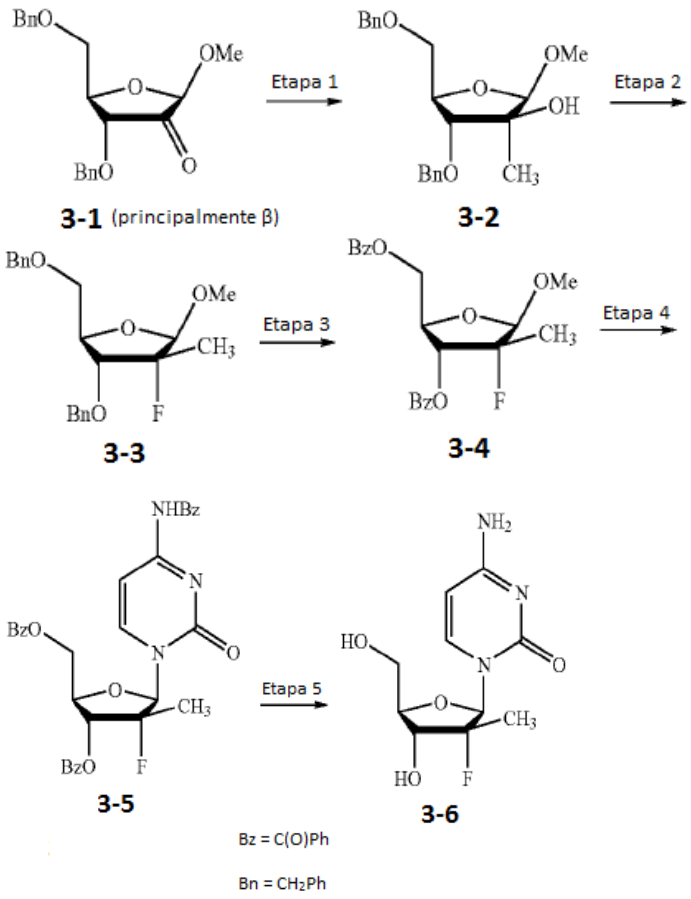
Os exemplos de trabalho seguintes fornecem uma compreensão adicional do método da presente invenção e também exemplificam os exemplos gerais nos Esquemas 1 e 2 acima. Esses exemplos têm finalidade ilustrativa e não visam limitar o escopo da invenção. Solventes, reagentes ou condições de reação equivalentes, similares ou adequadas podem ser substituídos por aqueles solventes, reagentes ou condições de reação em particular descritos, sem se afastar do escopo geral do método.

Exemplos

Exemplo 1

Síntese de (2'R)-2'-Desoxi-2'-flúor-2'-C-Metilcitidina iniciando a partir de um Carboidrato

Esquema 3



[00200] **Etapa 1**: Composto **3-1** (7,7 g, 0,022 mmol) foi dissolvido em éter dietílico anidro e resfriado a –78°C. A essa solução foi adicionado MeLi (30 mL, 1,6 M em éter dietílico). Após a reação estar completa, a mistura foi tratada com cloreto de amônio (1 M, 65 mL) e a fase orgânica foi separada, seca (Na_2SO_4), filtrada e concentrada até secar. Cromatografia em sílica gel seguida por cristalização de éter dietílico-hexanos gerou composto puro **3-2** (6,31 g). ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,40 (s, 3H), 3,41 (s, 3H), 3,49 (dd, 1H, *J*= 10,3, 6,89 Hz), 3,57 (dd, 1H, *J*= 10,3, 3,88 Hz), 3,84 (d, 1H, *J*= 7,3 Hz), 4,03 (m, 1H), 4,48 (s, 1H), 4,58 (m, 3H), 4,83 (d, 1H, *J*= 11,6 Hz), 7,31-7,36 (m, 10H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 18,4, 55,4, 72,2, 73,4, 79,5, 80,2, 84,7, 107,4, 127,7, 127,8, 127,83, 128,5, 138,2, 138,3.

[00201] **Etapa 2**: Composto **3-2** foi dissolvido em CH_2Cl_2 e foi tratado com DAST (4,0 mL, 30,3 mmol) em temperatura ambiente. A solução foi agitada em temperatura ambiente de um dia para o outro. A mistura assim obtida foi despejada em $NaHCO_3$ saturado (100 mL) e lavada com $NaHCO_3$ saturado (1 x 15 mL). A camada orgânica foi também trabalhada da maneira usual. Cromatografia em sílica gel (1:5 EtOAc-hexanos) gerou composto bruto **3-3** (0,671 g) que era suficientemente puro para a próxima etapa. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,43 (d, 3H, *J*= 22,8 Hz), 3,35 (s, 3H), 3,49 (dd, 1H, *J*= 10,5, 5,4 Hz), 3, 55 (dd,1H, *J* = 10,5, 4,1 Hz), 3,87 (dd,1H, *J*= 23,5, 7,5 Hz), 4,26 (m,1H), 4,56 (d, 2H, *J* = 6,9 Hz), 4,66 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz), 4,72 (d, 1H, *J* = 10,8 Hz), 7,29- 7,36 (m, 10H) ; ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 17,0 (d,*J* = 24,4 Hz), 55,2, 77,1, 73,4, 73,8, 77,3, 80,3, 81,2 (d, *J*= 16 Hz), 99,7 (d, *J*= 178,9 Hz), 106,8 (d, *J*= 32,0 Hz), 127,7, 127,8, 128,1, 128,3, 128,5, 128,6, 137,8, 138,3; ^{19}F NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ-8,2(m,1F).

[00202] **Etapa 3**: Composto **3-3** (0,39 g, 1,1 mmol) foi dissolvido em 1:2 EtOH-EtOAc e tratado com Pd/C (~0,1 g) e ciclohexeno (~1 mL). A mistura foi aquecida até refluxo de um dia para o outro e então filtrada através de celite. O

solvente foi removido *in vacuo* e o resíduo foi dissolvido em piridina (~5 mL). A essa solução foi adicionado cloreto de benzoila (0,22 mL, 1,83 mmol) e a mistura foi agitada em temperatura ambiente de um dia para o outro. A piridina foi removida *in vacuo* e o resíduo foi dividido entre CH_2Cl_2 e $NaHCO_3$ saturado (10,0 mL). A fase orgânica foi seca (Na_2SO_4), filtrada, e a solução foi concentrada até secar. Cromatografia em coluna forneceu 0,350 g de composto puro **3-4**. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,53 (d, 3H, *J*= 22,4 Hz), 3,39 (s, 3H), 4,46 (dd, 1H, *J*= 11,6, 4,7 Hz), 4,58 (m, 1H), 4,65 (dd, 1H, *J*= 11,6, 3,9Hz), 4,87 (d, 1H, *J*= 9,9 Hz), 5,64 (dd, 2H, *J*= 24,1, 7,8 Hz), 7,29-7,36 (m, 10H) ; ^{19}F RMN (100 MHz, $CDCl_3$): δ -7,5 (m,1F).

[00203] **Etapa 4**: Uma solução de bis(trimetilsilil)-N-benzoilcitosina (0,28 g, 0,77 mmol) e composto **3-4** (0,20 g, 0,5 mmol) em 1,2 dicloroetano (2 mL) e tolueno (2 mL) foi tratado com TMSOTf (0,15 mL, 0,77mmol). Depois da maior parte do material de iniciação ter desaparecido como julgado por TLC, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente, lavada com água (1 x 5 mL), salmoura (1 x 5 mL), seca (Na_2SO_4), filtrada e concentrada até secar. Cromatografia instantânea seguida por cristalização de CH_2Cl-hexanos gerou o composto **3-5** (68 mg). P.f.241°C; 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,49 (d, 3H, J= 22,4 Hz), 4,64 (dd, 1H, J= 12,9, 3,4 Hz), 4,73 (app d, 1H, J= 9,5 Hz), 4,89 (dd, 1H,J = 12,7, 2,2 Hz), 5,56 (dd, 1H, J = 20,7, 8,6 Hz), 6,52 (d, 1H, J= 15,9 Hz), 7,38-7,67 (m, 10H), 7,89 (d, 2H, J= 6,9 Hz), 8,07-8,11 (m, 5H), 8,67 (s, 1H); ^{19}F RMN (100 MHz, $CDCl_3$): δ 2,85 (m, 1F).

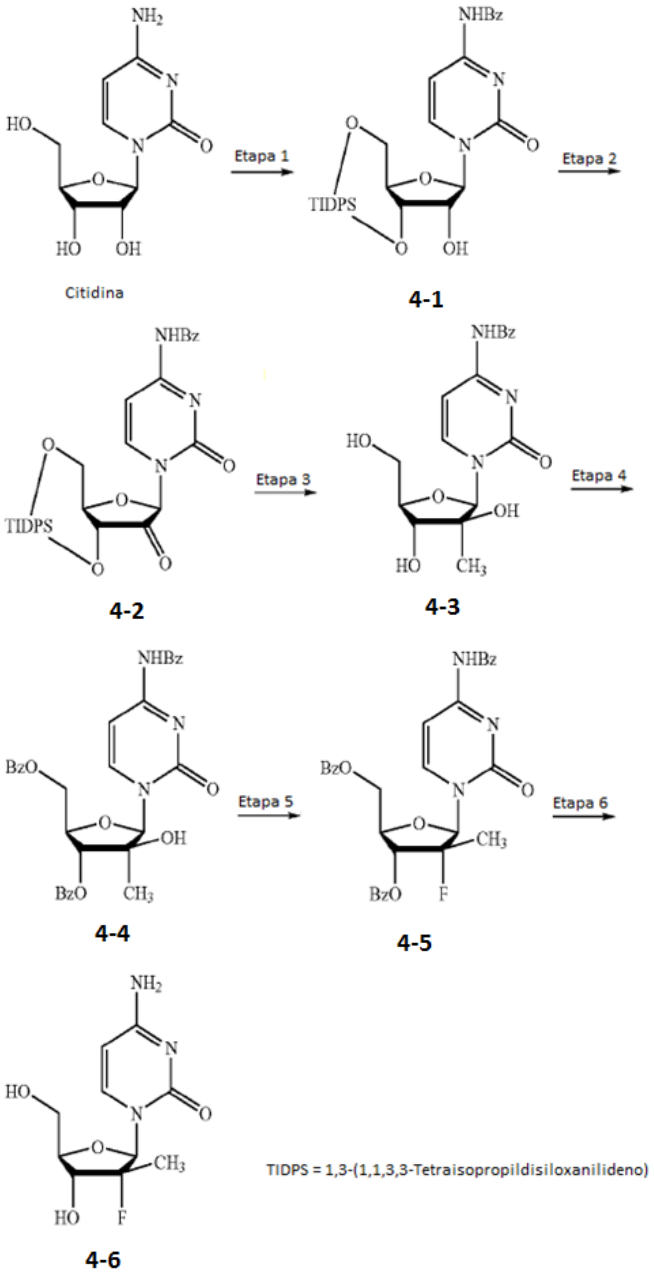
[00204] **Etapa 5**: Composto **3-5** (40 mg, 0,05 mmol) foi dissolvido em amônia metanólica e agitado em temperatura ambiente por 48 h. A solução foi concentrada até secar e cromatografada (SiO_2) eluição com 1:4 EtOH-CH_2Cl_2. O rendimento foi de cerca de 12 mg de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina puro, **3-6**. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d6): δ 1,16 (d, 3H, *J*= 22,0 Hz), 3,61 (dd, 1H,

J= 11,6, 5,2 Hz), 3,60-3,83 (m, 3H, *J*= 10,5, 5,4 Hz), 5,24 (s, 1H, intercambiável com D20), 5,59 (s, 1H, intercambiável com D20), 5,71 (d, 1H, *J*= 7,3 Hz), 6,08 (d, 1H, *J*= 19,0 Hz), 7,24 (d, 1H, *J* = 17,7 Hz, intercambiável com D20), 7,87 (d, 1H); ^{19}F NMR (100 MHz, DMSO-d6): δ 4,13 (m, 1F).

Exemplo 2

Síntese de (2'R)-2'-Desoxi-2'-flúor-2'-C-Metilcitidina a partir de Citidina

Esquema 4



[00205] **Etapa 1:** Para uma suspensão de citidina (100 g, 0,411 mol) em DMF (2,06 L) é adicionado anidrido benzóico (102,4 g, 0,452 mol). A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 20 h. O DMF foi removido *in vacuo* e o resíduo foi triturado com éter dietílico. O sólido resultante foi coletado por filtração de sucção e lavado com éter dietílico (2 x 200 mL). Secagem adicional *in vacuo* em temperatura ambiente gerou a N^4 benzamida (140,6 g, 98, 3%). Uma porção desse material (139,3 g, 0,401 mol) foi dissolvida em piridina anidra (1,2 L) e foi tratada com 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropil-disiloxano (141,4 mL, 0,441 mol) em temperatura ambiente. A solução foi agitada em temperatura ambiente de um dia para o outro. A mistura foi concentrada quase até secar *in vacuo* e co-evaporada com tolueno (3 x 200 mL). O resíduo foi tratado com EtOAc (1,8 L) e lavado com HCl (2 x 200 mL, 0,05 N), $NaHCO_3$ (5%, 2 x 400 mL). A camada orgânica foi lavada, seca (Na_2SO_4), filtrada, e evaporada até secar. Composto **4-1** (256,5 g, > 100%) foi isolado como uma espuma branca e usado sem posterior purificação.

[00206] **Etapa 2:** Composto **4-1** (236,5 g, 0,40 mol) foi dissolvido em THF seco (1,22 L). DMSO anidro (180,8 mL, 2,1 mol) foi adicionado e a solução resultante foi resfriada entre –20°C e –15°C. Anidrido trifluoracético (90,6 mL, 0,64 mol) foi adicionado em gotas por 45 minutos e a solução foi agitada entre –20°C e –15°C por 2 hrs após o que trietilamina anidra (223,5 mL, 1,6 mol) foi adicionada por 20 min. A reação bruta contendo cetona **4-2** foi dissolvida em EtOAc (500 mL), e a solução resultante foi lavada com H_2O (3 x 400 mL), seca (Na_2SO_4) e os solventes foram removidos *in vacuo* para gerar um sólido amarelo que foi purificado em uma coluna de sílica gel eluindo com um gradiente escalonado de Et_2O (0-60%) em hexanos seguido por um gradiente escalonado de EtOAc (50-100%) em hexanos. A cetona bruta assim obtida (~192 g) foi cristalizada de éter de petróleo para gerar cetona **4-2** (138,91 g, 57,5% de

citidina) como um sólido branco e 22 g de material de iniciação que não reagiu, **4-1**, como um sólido amarelo.

[00207] **Etapa 3:** Composto **4-2** (48,57 g, 8,26 mmol) foi dissolvido em tolueno anidro (~400 mL) e o solvente foi removido *in vacuo* com exclusão de umidade. O resíduo foi então posteriormente seco *in vacuo* (bomba de óleo) por mais 2 h. Com exclusão estrita de umidade, a espuma residual foi dissolvida em éter dietílico anidro (1,03 L) sob argônio. A solução resultante foi resfriada a –78°C sob argônio e MeLi (1,6 M, 258,0 mL, 0,413 mol) foi adicionado em gotas *via* funil de adição. Depois da adição estar completa, a mistura foi agitada por 2 h a –78°C. 1 M de NH_4Cl aquoso (500 mL) foi adicionado lentamente. Após aquecimento até a temperatura ambiente, a mistura foi lavada com H_2O (2 x 500 mL), seca (Na_2SO_4), e então concentrada até secar para gerar uma espuma marrom (~60 g, > 100%).

[00208] A reação foi realizada mais duas vezes usando 37,62 g e 56,4 g do composto **4-2**. Os produtos brutos combinados (128,0 g, 0,212 mol) foram dissolvidos em THF (1,28 L) e tratado com HOAc concentrado (23 mL, 0,402 mol). À solução foi adicionado TBAF (384,0 mL, 1 M em THF). A solução foi agitada em temperatura ambiente por 0,75 h e a mistura foi tratada com sílica gel (750 g) e concentrada até secar. O pó foi colocado em uma coluna de sílica gel embalada em CH_2Cl_2. Eluição com 1:7 EtOH-CH_2Cl_2 gerou um sólido marrom ceroso escuro que foi pré-adsorvido em sílica gel (300 g) e cromatografado como antes. O composto **4-3** (46,4 g, 53,0 % de **4-2**) foi isolado como um sólido quase branco. ^{1}H RMN (DMSO-d6):δ 1,20 (s, 3H, CH_3), 3,62-3,69 (m, 2H), 3,73-3,78 (m, 2H), 5,19 (t, 1H, *J*= 5,4 Hz, OH-5'), 5,25 (s, 1H, OH-2'), 5,52 (d, 1H, *J*= 5,0 Hz, OH-3'), 5,99 (s, 1H, H-1'), 7,32 (d, 1H, *J*= 5,8 Hz), 7,50(Tt, 2H, *J*= 7,7 Hz), 7,62 (Tt,1H, *J*= 7,3 Hz), 8,00 (d, 2H, *J*= 7,3 Hz), 8,14 (d, 1H, *J*= 6,9 Hz), 11,22 (s, 1H, NH), Análise calculada para $C_{17}H_{19}N_3O_6 \bullet 0{,}5\ H_2O$: C, 55,13; H, 5,44 ; N, 11,35, Encontrado: C, 55,21; H,

5,47; N, 11,33.

[00209] **Etapa 4:** Composto **4-3** (46,0 g, 0,13 mol) foi dissolvido em piridina anidra e concentrado até secar *in vacuo*. O xarope resultante foi dissolvido em piridina anidra sob argônio e resfriado a 0°C com agitação. A solução marrom foi tratada com cloreto de benzoila (30 mL, 0,250 mol) em gotas por 10 min. O banho de gelo foi removido e a agitação foi continuada por 1,5 h onde TLC não mostrou qualquer material de iniciação remanescente. A mistura foi extinta pela adição de água (5 mL) e concentrada até secar. O resíduo foi dissolvido em uma quantidade mínima de CH_2Cl_2 e lavado com $NaHCO_3$ saturado (1 x 500 mL) e H_2O (1 x 500 mL). A fase orgânica foi seca (Na_2SO_4) e filtrada, concentrada até secar e cromatografada em sílica gel eluição com um gradiente escalonado de EtOAc-hexanos (25-60%) para fornecer o composto **4-4** como uma espuma amarela (48,5 g, 67%). ^{1}H RMN ($CDCl_3$): δ 1,64 (s, 3H, CH_3), 4,50 (m, 1H, H-4), 4,78-4,85 (m, 2H, H-5', 5a'), 5,50 (d, 1H, *J*= 3,4 Hz, H-3'), 6,42 (s, 1H, H-1'), 7,44-7,54 (m, 7H, Ar), 7,57-7,66 (m, 3H, Ar), 7,94 (d, 2H, *J*= 7,8 Hz), 8,05-8,09 (m, 4H, Ar), 8,21 (d, 1H, *J*= 7,3 Hz), Análise Calculada para $C_{31}H_{27}N_3O_8$: C, 65,37; H, 4,78; N, 7,38, Encontrado: C, 65,59; H, 4,79; N, 7,16.

[00210] **Etapa 5:** Composto **4-4** (7,50 g, 0,013 mol) foi dissolvido em tolueno anidro (150 mL) sob argônio e resfriado a –20°C. DAST (2,5 mL, 18,9 mmol) foi adicionado lentamente e o banho de resfriamento foi removido depois da adição estar completa. A agitação foi continuada por 1 h e a mistura foi despejada em $NaHCO_3$ saturado (100 mL) e lavada até que a evolução do gás cessasse. A fase orgânica foi seca (Na_2SO_4), concentrada e purificada por cromatografia em sílica gel eluição com 1:1 EtOAc-hexanos. O rendimento foi 1,22 g (16,3%) de **4-5** puro como um sólido branco. P.f. 241°C (CH_2Cl_2-hexanos); ^{1}H RMN ($CDCl_3$): δ 1,49 (d, 3H, *J* = 22,4 Hz, CH_3), 4,64 (dd, 1H, *J*= 3,44, 12,9 Hz, H-5'), 4,73 (d, 1H, *J*= 9,5 Hz, H-4'), 4,90 (dd, 1H, *J*= 2,4, 12,7 Hz,H-5a'), 5,56 (dd, 1H,

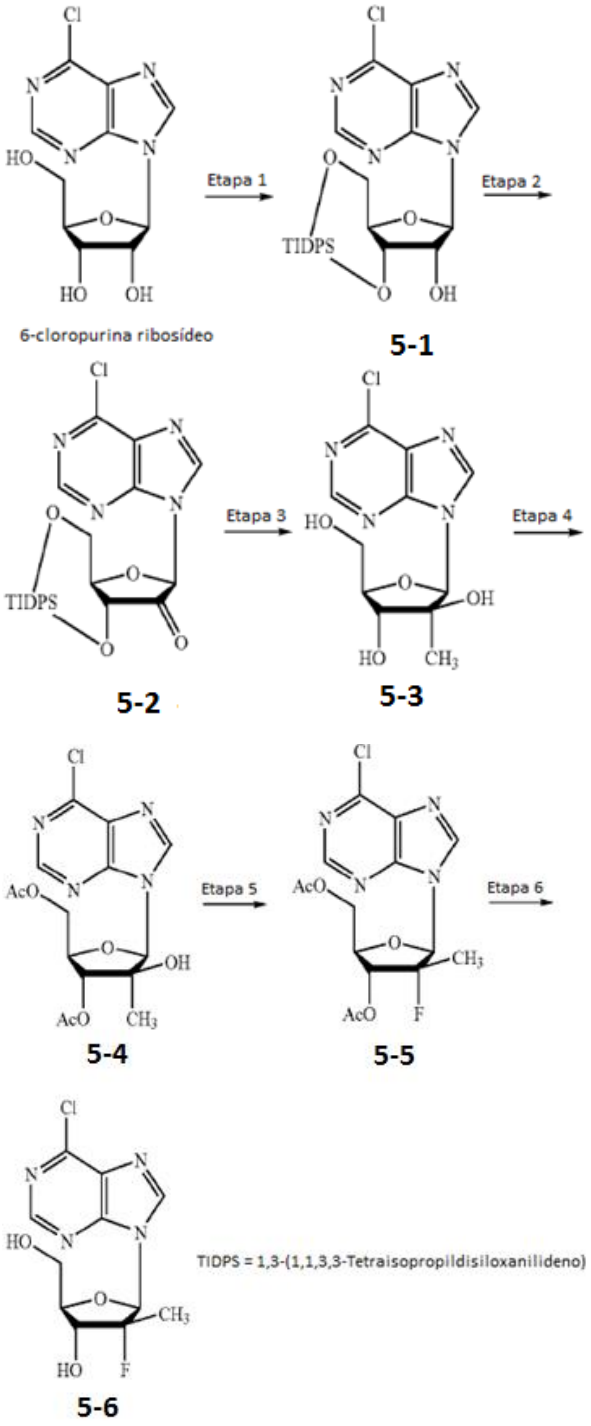
J= 8,6, 20,7 Hz, H-3'), 6,52 (d, 1H, *J*= 18,0 Hz,H-1'), 7,47-7,57 (m, 7H, Ar), 7,62-7,71 (m, 3H, Ar), 7,89 (d, 2H, *J*= 6,9 Hz), 8,07-8,11(m, 5H, Ar), 8,67 (bs, 1H, NH), ^{19}F NMR ($CDCl_3$): δ 3,3 (m), Análise Calculada para $C_{31}H_{26}FN_3O_7$ ● 0,7 H_2O: C, 63,74; H, 4,72; N, 7,20, Encontrado: C, 63,71; H, 4,54; N, 7,20.

[00211] **Etapa 6:** Composto **4-5** (6,30 g, 0,011 mol) foi suspenso em amônia metanólica (*ca* 7 N, 150 mL) e agitado em temperatura ambiente de um dia para o outro. O solvente foi removido *in vacuo*, co-evaporado com metanol (1 x 20 mL), e pré-adsorvido em sílica gel. O pó branco foi colocado em uma coluna de sílica gel (embalada em $CHCl_3$) e a coluna foi eluída com 9% EtOH em $CHCl_3$, então 17% EtOH e finalmente 25% EtOH em $CHCl_3$. A concentração das frações contendo o produto, filtração através de um disco de 0,4 μm e liofilização de água gerou o composto **4-6**, 2,18 g (76%), ^{1}H RMN (DMSO-d6): δ 1,17 (d, 3H, *J* = 22,3 Hz, CH_3), 3,63 (dd, 1H, *J*= 2,7, 13,7 Hz, H-5'), 3,70-3,84 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,24 (app s, 1H, OH-3'), 5,60 (d, 1H, *J*= 5,4 Hz, H-5'), 5,74 (d, 1H, *J*= 7,71 Hz, H-5), 6,07 (d, 1H, *J*= 18,9 Hz, H-1'), 7,31 (s, 1H, NH_2), 7,42 (s, 1H, NH_2), 7,90 (d, 1H, *J*= 7,3 Hz, H-6). ^{19}F RMN (DMSO-d6) : δ 2,60 (m). Análise Calculada para $C_{10}H_{14}FN_3O_4$ ● 1,4 H_2O: C, 44,22; H, 5,95; N, 14,77, Encontrado: C, 42,24; H, 5,63; N, 14,54. Composto **4-6** (0,10 g, 0,386 mmol) foi convertido ao sal de cloridrato por dissolução em água (2 mL) e ajuste do pH a aproximadamente 3,0 com 1 M HCl. A água foi removida *in vacuo* e o resíduo foi cristalizado de EtOH aquoso para gerar **4-6** como o sal de cloridrato (71,0 mg). P. f. 243°C (dec); ^{1}H RMN (DMSO-d6) :δ 1, 29 (d, 3H, *J* = 22,6 Hz, CH_3), 3,65 (dd, 1H, *J*= 2,3, 12,7 Hz, H-5'), 3,76-3,90 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,96 (d, 1H, *J*= 17,3 Hz,H-1'), 6,15 (d, 1H, *J*= 7,9 Hz, H-5), 8,33 (d, 1H, *J*= 7,9 Hz, H-6), 8,69 (s, 1, 5H, NH), 9,78 (s, 1,5H, NH). ^{19}F RMN (DMSO-d6):δ 1,69 (m), Análise Calculada para $C_{10}H_{14}FN_3O$ ● HCl: C, 40,62; H, 5,11; N, 14,21, Encontrado: C, 40,80; H, 5,09; N, 14,23.

Exemplo 3

Síntese de (2'R)-6-Cloro-2'-Desoxi-2'-flúor-2'-C-Metilpurina a partir de 6-Cloropurina Ribosídeo.

Esquema 5



[00212] **Etapa 1:** O nucleosídeo, 6-cloropurina ribosídeo, (3,18 g, 11,09 mmol) foi dissolvido em piridina anidra (300 mL) e foi tratado em gotas com 1,3-

dicloro-1,1,3,3-tetraisopropil-disiloxano (4,08mL, 12,75 mmol) a 0°C sob uma atmosfera de argônio. A solução foi trazida até a temperatura ambiente e agitada de um dia para o outro. A mistura foi concentrada até quase secar *in vacuo*, dissolvida em uma quantidade mínima de clorofórmio e lavada com HCl (100 mL, 0,05 N) e $NaHCO_3$ (5%, 100 mL). A camada orgânica foi seca (Na_2SO_4), filtrada, e evaporada até secar para gerar composto **5-1** como um vidro âmbar (6,10 g, > 100%) que foi usado sem purificação adicional. ^{1}H RMN ($CDCl_3$): δ 1,01-1, 13(m, 24H), 4,03-4,18 (m, 3H), 4,58 (d, 1H, *J*= 5,2 Hz), 5,01(m, 1H), 6,07 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,71 (s, 1H).

[00213] **Etapa 2**: Composto **5-1** (7,13 g, 13,47 mmol) foi dissolvido em THF seco (35 mL). DMSO anidro (5,11 mL, 72,06 mmol) foi adicionado e a solução resultante foi resfriada entre –20°C e –15°C. Anidrido trifluoracético (3,06 mL, 21,69 mmol) foi adicionado em gotas por 45 minutos e a solução foi agitada entre –20°C e –15°C por 2 hrs após a trietilamina anidra (8,08 mL, 57,92 mmol) foi adicionada por 20 min. A reação bruta contendo cetona **5-2** foi dissolvida em Et_2O (25 mL) e a solução resultante foi lavada com H_2O (2 x 50 mL), seca (Na_2SO_4) e os solventes foram removidos *in vacuo* para gerar um sólido amarelo que foi purificado em uma coluna de sílica gel eluição com um gradiente escalonado de 0-50% éter de petróleo-éter dietílico gerou o composto **5-2** como uma mistura com o diol geminal correspondente. O vidro foi dissolvido em CH_2Cl_2 e agitado em um excesso de $MgSO_4$ por 36 h. A mistura, livre do diol geminal, foi filtrada e evaporada até secar para gerar composto **5-2** como um vidro âmbar (7,0 g, 97%). ^{1}H RMN ($CDCl_3$): δ 1,01-1,13 (m, 24H), 4,09-4,22 (m, 3H), 5,55 (d, 1H, *J*= 9,6 Hz), 5,80 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,61 (s, 1H).

[00214] **Etapa 3:** Uma solução do composto **5-2** (7,0 g, 13,26 mmol) em tetrahidrofurano anidro (45 mL) foi resfriada a –78°C com agitação sob uma atmosfera de argônio. À solução foi adicionado brometo de metilmagnésio

(15,85mL, 3,0 M em éter etílico) em gotas por um período de 30 min. Após agitação por mais 3 h a –78°C, a reação foi extinta pela adição cuidadosa de 1 M NH_4Cl aquoso (50,0 mL). Depois de aquecer até a temperatura ambiente, a mistura foi lavada com H_2O (2 x 500 mL), seca (Na_2SO_4) e concentrada até secar para gerar uma espuma marrom (3,8 g) que foi dissolvida em tetrahidrofurano (50 mL) e tratada com a solução de TBAF (18,9 mL, 1 M solução em THF) e ácido acético glacial (0,85 mL) em temperatura ambiente. A solução foi agitada em temperatura ambiente por 2h, concentrada até secar e purificada por e cromatografia em sílica gel para gerar composto **5-3** (2,0 g, 50%).

[00215] **Etapa 4:** Composto **5-3** (0,491 g, 1,63 mmol) foi dissolvido em piridina (3 mL) e tratado com anidrido acético (0,38 mL, 4,08 mL) em temperatura ambiente. A solução foi agitada em temperatura ambiente por 2 h após o que, a solução foi concentrada até secar e tratada com éter dietílico (10 mL) e água (5 mL). A camada orgânica foi também lavada com água (2 x 10 mL), seca (Na_2SO_4), filtrada, e evaporada até secar para gerar o composto **5-4** como uma espuma (0,450 g, 91,0%), ^{1}H RMN ($CDCl_3$): δ 1,39 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 4,27 (m, 1H), 4,49 (dd, 1H, *J*= 4,2, 11,9 Hz), 4,57 (dd, 1H, *J*= 6,16, 11,9 Hz), 5,14 (d, 1H, *J*= 3,1 Hz), 6,25 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,75 (s, 1H).

[00216] **Etapa 5:** Composto **5-4** (0,100 g, 0,259 mmol) foi dissolvido em tolueno anidro (3,0 mL) sob argônio e resfriado a –20°C. DAST (0,2 mL, 1,55 mmol) foi adicionado lentamente e o banho de resfriamento foi removido após a adição estar completa. A agitação foi continuada por 1 h e a mistura foi despejada em $NaHCO_3$ saturado (100 mL) e lavada até a evolução de gás cessar. A fase orgânica foi seca (Na_2SO_4), concentrada e purificada por e cromatografia em sílica gel eluição com 30% Et_2O-éter de petróleo deu **5-5** puro (0,028 g, 27,9%), ^{1}H RMN ($CDCl_3$): δ 1,24 (d, 3H, *J* = 22,8 Hz), 2,20 (s, 3H), 2,22 (s, 3H), 4,41-4, 55 (m, 3H), 4,47 (dd, 1H, *J*= 9,2, 22,0 Hz), 6,37 (d, 1H, *J*= 17,6 Hz), 8,45 (s, 1H),

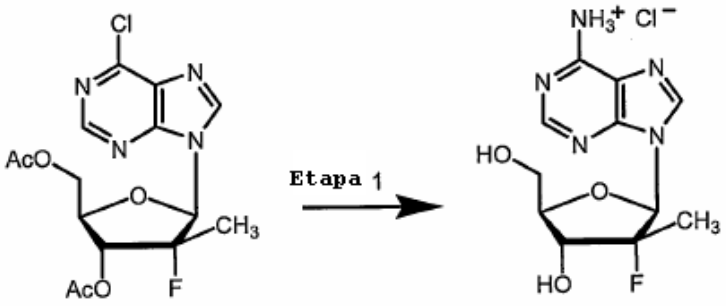
8,82 (s, 1H).

[00217] **Etapa 6:** Composto **5-5** (0,018 g, 0,047 mmol) foi dissolvido em metanol (5 mL) e tratado com uma solução de metóxido de sódio (3,6 mg, 0,67 mmol) em metanol (5 mL). A solução foi agitada em temperatura ambiente por 1 h, neutralizada com ácido acético concentrado e cromatografada em sílica gel eluição com um gradiente escalonado de Et_2O/metanol (0-5%) para gerar composto **5-6** (0,010 g, 70,9%), ^{1}H RMN ($CDCl_3$): δ 1,23 (d, 3H, *J* = 22,4 Hz), 4,04 (dd, 1H, *J*= 2,11, 12,5 Hz), 4,17 (dd,1H, *J*= 1,5, 9,2 Hz), 4,25 (dd, 1H, *J*= 1,9, 12,3 Hz), 4,61 (dd, 1H, *J*= 9,2, 22,3 Hz), 6,37 (d, 1H, *J*= 17,3 Hz), 8,70 (s, 1H), 8,78 (s, 1H).

Exemplo 4

Síntese de (2'R)-2'-Desoxi-2'-flúor-2'-C-Metiladenosina a partir de (2R)-6-Cloro-2'-Desoxi-2'-flúor-2'-C-Metilpurina

Esquema 6



5-5 **6-1**

[00218] **Etapa 1:** Composto **5-5** (0,100 g, 0,26 mmol) foi aquecido em um tubo de pressão com amônia metanólica (ca. 7 N, 25 mL) a 80°C por 12 h. A reação bruta foi pré-adsorvida em sílica gel e purificada por cromatografia em coluna eluindo com um gradiente escalonado de Et2O-MeOH (0-5%). O produto impuro foi convertido no sal de hidrocloridrato por dissolução do composto em uma quantidade mínima de etanol e tratamento da solução com 0,5 mL de uma solução de HCl de 0,6 M. Concentração até quase secar gerou o composto **6-1**

como cristais quase brancos (0,020g, 24, 2%), ^{1}H RMN ($CD_3$0D) :δ 1,19 (d,3H, *J* = 22,3 Hz), 3,88 (dd, 1H, *J*= 2,7, 12,7 Hz), 4,06 (dd, 1H, *J*= 2,1, 12,5 Hz), 4,11 (app d, 1H, *J*= 9,2 Hz), 4,35 (dd,1H, *J*= 9,4, 24,5 Hz), 6,35 (d,1H, *J*= 16,5 Hz), 8,43 (s,1H), 8,85 (s,1H).

Exemplo 5

Atividade antiviral de f (2R)-2'-Desoxi-2'-flúor-2'-C-Metilcitidina

Ensaio de replicon de HCV

[00219] A atividade anti-flavivírus dos compostos foi determinada como descrito por Stuyver, *et al*., (*Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhea and hepatitis C viruses in culture*, *Antimicrobial Agents and Chemoterapia* 47: 244-254 (2003)). O composto foi dissolvido em DMSO e adicionado ao meio de cultura em concentrações finais que variam de 3 a 100 μM. uma incubação de 4 dias resultou na redução dependente de dose do RNA de replicon de HCV (Figura 1A). Uma redução de 1-log de RNA de replicon (ou valor de EC_{90}) foi atingida em aproximadamente 2,5 μm. A medida da redução de rRNA deu uma indicação do efeito inibidor sobre as polimerases celulares. Subtração desse valor de toxicidade celular dos valores antivirais resultou na linha de índice terapêutico e valor de EC_{90}. Baseado nesses cálculos, um valor médio de EC_{90}, corrigido para toxicidade celular, de aproximadamente 2,5 μM foi obtido. A Figura 1A mostra a redução dependente de dose do RNA de replicon de HCV baseada no tratamento com (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina. A redução viral foi comparada à redução de níveis celulares de RNA (RNA ribossômico) para obter valores de índice terapêutico. EC_{90} representa 90% de concentração eficaz em 96 horas seguida por administração dependente de dose de(2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina. A Figura 1B mostra a redução prolongada no RNA de replicon de HCV até 7 dias após tratamento com 5 e 25 μM.

[00220] A atividade de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina no sistema de replicon é sumarizada na Tabela 1. Os valores de EC_{90} para (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina assim como de 2'-*C*-metilcitidina e 2'-*C*-metiladenosina são mostrados para três clones separados de replicon (HCV-WT (De tipo selvagem), 9-13 e 21-5) assim como dois outros clones (S282T e rRNA). Os valores de EC_{90} para (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina estavam na faixa de 1,6 a 4,6 μM para os clones de replicon. Em contraste os valores de EC_{90} para 2'-*C*-metilcitidina estavam na faixa de 6,6-37,4 μM. Surpreendentemente, os valores de EC_{90} para 2'-*C*-metiladenosina eram comparáveis àqueles de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina. A atividade de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina e 2'-*C*-metilcitidina em outros replicons testados é mostrada na tabela 2.

Ensaio de Polimerase

[00221] A Tabela 3 mostra a potência de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina-5'-trifosfato (TP) no ensaio de polimerase NS5B. A concentração inibidora 50% foi determinada como estando na faixa de 1,7 a 7,7 μM.

Toxicidade

[00222] Um sumário dos dados de toxicidade para (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina usando o ensaio de toxicidade mitocondrial é mostrado nas Tabelas 6 e 7. A Tabela 7 mostra a ausência de efeitos de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina e 2'-*C*-metilcitidina sobre a síntese de DNA mitocondrial e ausência de efeitos sobre aumento de ácido lático nesse ensaio. Os resultados mostram a relativa ausência de toxicidade de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina. A Tabela 6 mostra uma análise de citotoxicidade em várias linhas de células (Clone A, Huh7, HepG2, MDBK, PBM, CEM, Vero, MRC-5). A concentração citotóxica 50% (CC_{50}) foi maior que 75-100 μM em todos os clones testados para (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina assim como 2'-*C*-

metilcitidina. Em contraste está a toxicidade relativa de 2'-*C*-metiladenosina.

[00223] O efeito dos análogos de nucleosídeos testados sobre as células de medula óssea humana é mostrado na Tabela 9. como mostrado, os valores de IC_{50} para 2'-metil-2'-fluorcitidina foram significativamente maiores (98,2, BFU-E) e 93,9 (CFU-GM) quando comparados à 2'-metilcitidina ou AZT. Os resultados mostram que 2'-metil-2'-fluorcitidina era significativamente menos tóxica quando comparada aos outros compostos de nucleosídeo.

Estudos em Animal

[00224] A Figura 2 descreve a mudança média de peso (%) de camundongos fêmeas Swiss *in vivo,* a análise de toxicidade de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina em várias doses. Injeções intraperitoniais foram dadas no dia 0 ao dia 5 de 0, 3,3, 10, 33, 100 mg/kg. Cada grupo de dosagem continha 5 camundongos e nenhum camundongo morreu durante o estudo de 30 dias. Nenhuma toxicidade significativa foi observada nos camundongos.

[00225] A Figura 3 e Tabela 6 resumem os parâmetros farmacocinéticos de (2'*R*)-2'- desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina em macacos Rhesus que receberam dose única (33,3 mg/kg) oral (Tabela 6, Figura 3) ou dose intravenosa (Figura 3) de (2'*R*)-2'-desoxi-2'- fluoro-2'-*C*-metilcitidina.

Outra Atividade Antiviral

[00226] Um sumário da faixa de atividade antiviral de (2'R)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-C-metilcitidina é mostrado na Tabela 4. A Tabela mostra que em adição ao vírus HCV (2'R)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-C-metilcitidina mostra atividade contra Rinovírus, vírus do oeste do Nilo, Vírus da febre amarela, e vírus da Dengue.

[00227] A Tabela 5 mostra ausência de atividade de (2'R)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-C-metilcitidina sobre BVDV de modelos que substituem HCV assim como de outros vírus incluindo HIV, HBV e Corona vírus. Em contraste, 2'-C-metilcitidina e 2'-C-metiladenosina mostram maior atividade no modelo que substitui HCV,

BVDV. Esses resultados mostram a necessidade de rastreamento dessa série de compostos contra o sistema de replicon de HCV versus sistemas que substituem HCV.

Tabela 1: Sumario da Atividade de Replicon Anti-HCV de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina*

Replicon	(2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina	2'-*C*-metilcitidina	2'-*C*-metil adenosina
HCV-WT 1b	4,6 ± 2,0	21,9 ± 4,3	2,1 ± 0,27
S282T mut.1b	30,7 ± 11,7	37,4 ± 12,1	> 100
9-13 (subgenômico)	4,6 ± 2,3	13,0	0,7
21-5 (comprimento total)	1,6 ± 0,7	6,6	0,6

*Valores representam EC_{90} (μM)

Tabela 2: Atividade de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina e 2'-*C*-metilcitidina em outros Replicons

	(2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina			2'-*C*-metilcitidina		
Replicon	EC_{90} (μM)	IC_{90} (μM)		EC_{90} (μM)	IC_{90} (μM)	
		GAPDH	MTT		GAPDH	MTT
1b (Ntat)	3,8	> 100	> 100	27,2	> 100	> 100
1b (Btat)	11,5	> 100	> 100	31,1	> 100	> 100
1a (pp1aSI-7)	34,7	> 100	> 100	35,0	> 100	> 100

Tabela 3: Ensaio de polimerase de NS5B de HCV 1b (IC_{50}, μM)

	(2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina TP	2'-*C*-metilcitidina TP	2'-*C*-metiladenosina TP
NS5B de tipo selvagem	1,7 ± 0,4[a]	6,0 ± 0,5	20,6 ± 5,2
	7,7 ± 1,2[b]		
S282T	2,0[a]		

	8,3 ± 2,4[c]	26,9 ± 5,5	> 100

[a] valores determinados usando lote 1; [b] valor determinado usando lotes 2 e 3; e [c] valor determinado usando lote 2.

Tabela 4: Sumário da Atividade Antiviral de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina

Vírus	Célula	EC_{50}, CPE (μM)	EC_{50}, NR[a] (μM)	CC_{50}, CPE (μM)	CC_{50}, NR[a] (μM)
Oeste do Nilo	Vero	32	12	> 100	32
Dengue tipo 2	Vero	32/55	> 100/> 100	> 100	> 100
Febre amarela	Vero	19/3,2	32/12	> 100	> 100
Influenza A (H1N1)	MDCK	> 100	> 100	> 100	> 100
Influenza A (H3N2)	MDCK	> 100	> 100	> 100	> 100
Influenza B	MDCK	> 100	> 100	> 100	> 100
Rinovírus tipo 2	KB	25	20	> 100	> 100
VEE	Vero	> 100	> 100	> 100	> 100
SARSCoV	Vero	> 100	> 100	> 100	> 100

[a]Nr = red. neutra

Tabela 5: Sumário da Atividade Antiviral de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina

Vírus	(2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina (EC_{90}, μM)	2'-*C*-metilcitidina (EC_{90}, μM)	2'-*C*-metiladenosina (EC_{90}, μM)
BVDV ncp	> 22	0,5	1,2
BVDV cp	>100	2	1,5
RSV	>100	>100	>100
HIV[a]	>100	ND	ND
HBV	>10	>10	ND
Coronavírus 229E	>100	ND	ND

ND = não determinado

Tabela 6: Estudos de Citotoxicidade[a]

Linha de células	(2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina CC_{50}, μM	2'-*C*-metilcitidina CC_{50}, μM	2'-*C*-metiladenosina CC_{50}, μM
Clone A	>100	>100	37
Huh7	>100	>100	30
HepG2	75	>100	58
MDBK	>100	>100	
PBM	>10		
CEM	>100		
VERO	>100		
MCR-5	>100		

[a] Resultados determinados usando ensaio MTS

Tabela 7: Estudo de Toxicidade Mitocondrial

Composto	Síntese de mtDNA IC_{50}, μM	Aumento de ácido lático
(2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina	>25	Nenhum efeito, ≥33 μM
2'-*C*-metilcitidina	>25	Nenhum efeito, ≥33 μM

Tabela 8: Parâmetros PK Preliminares em macacos Rhesus após uma única Dose Oral de (2'*R*)-2'-desoxi-2'-flúor-2'-*C*-metilcitidina em 33,3 mg/kg

Parâmetro	unidades	Média ± SD
C_{max}	μM	9,6 ± 2,7
T_{max}	Horas	2 ± 1
$AUC_{0\text{-último}}$	μMxh	44,2 ± 22,2
T 1/2	Horas	3,9 ± 0,1
Biodisponibilidade	F%	21 ± 11

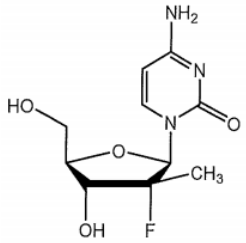
Tabela 9: Efeito de Análogo de nucleosídeos sobre células de medula óssea humanas

Composto (β-D-análogo)	BFU-E	CFU-GM

	IC_{50}, μM	
2’-flúor-2’-C-metilcitidina	98,2	93,9
2’-C-metilcitidina	20,1	13,2
AZT	0,08	0,95

REIVINDICAÇÕES

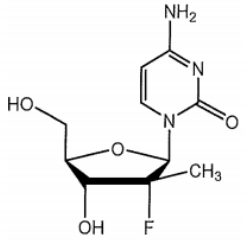
1. Uso do (2’R)-2’-desoxi-2’-flúor-2’-C-metil nucleosídeo (β-D), ou de um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, apresentando a estrutura:



caracterizado pelo fato de ser para preparar um medicamento para tratar hepatite C, febre do oeste do Nilo e/ou febre amarela.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a doença é hepatite C.

3. Uso de uma composição farmacêutica compreendendo o (2’R)-2’-desoxi-2’-flúor-2’-C-metil nucleosídeo (β-D), ou de um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, apresentado a estrutura:



caracterizado pelo fato de ser para preparar um medicamento para tratar hepatite C, febre do oeste do Nilo e/ou febre amarela.

4. Uso de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a doença é hepatite C.

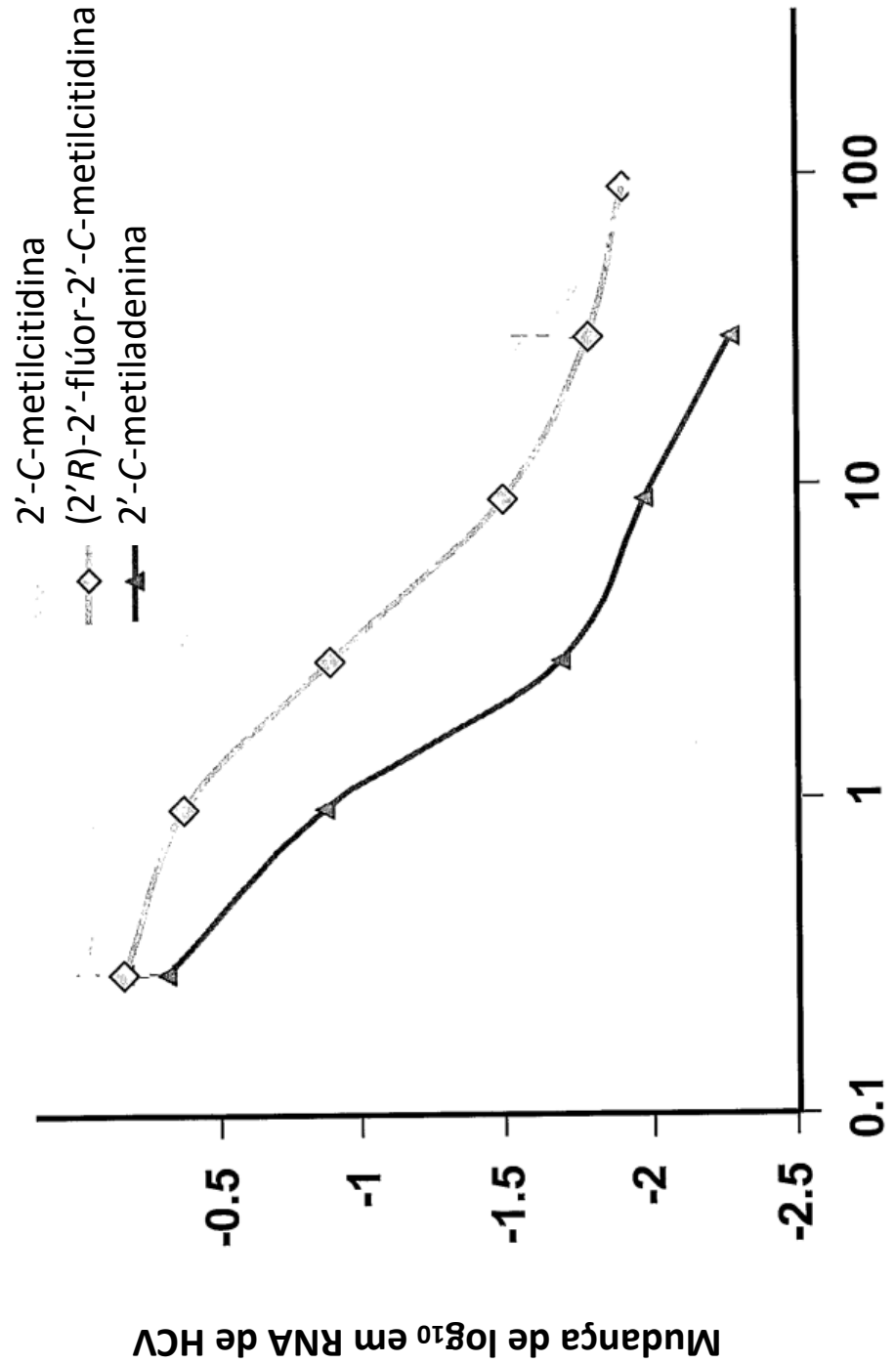

2'-C-metilcitidina
(2'R)-2'-flúor-2'-C-metilcitidina
2'-C-metiladenina
Mudança de log10 em RNA de HCV
-0.5
-1
-1.5
-2
-2.5
0.1
1
10
100
Concentração (μM)

Figura 1A

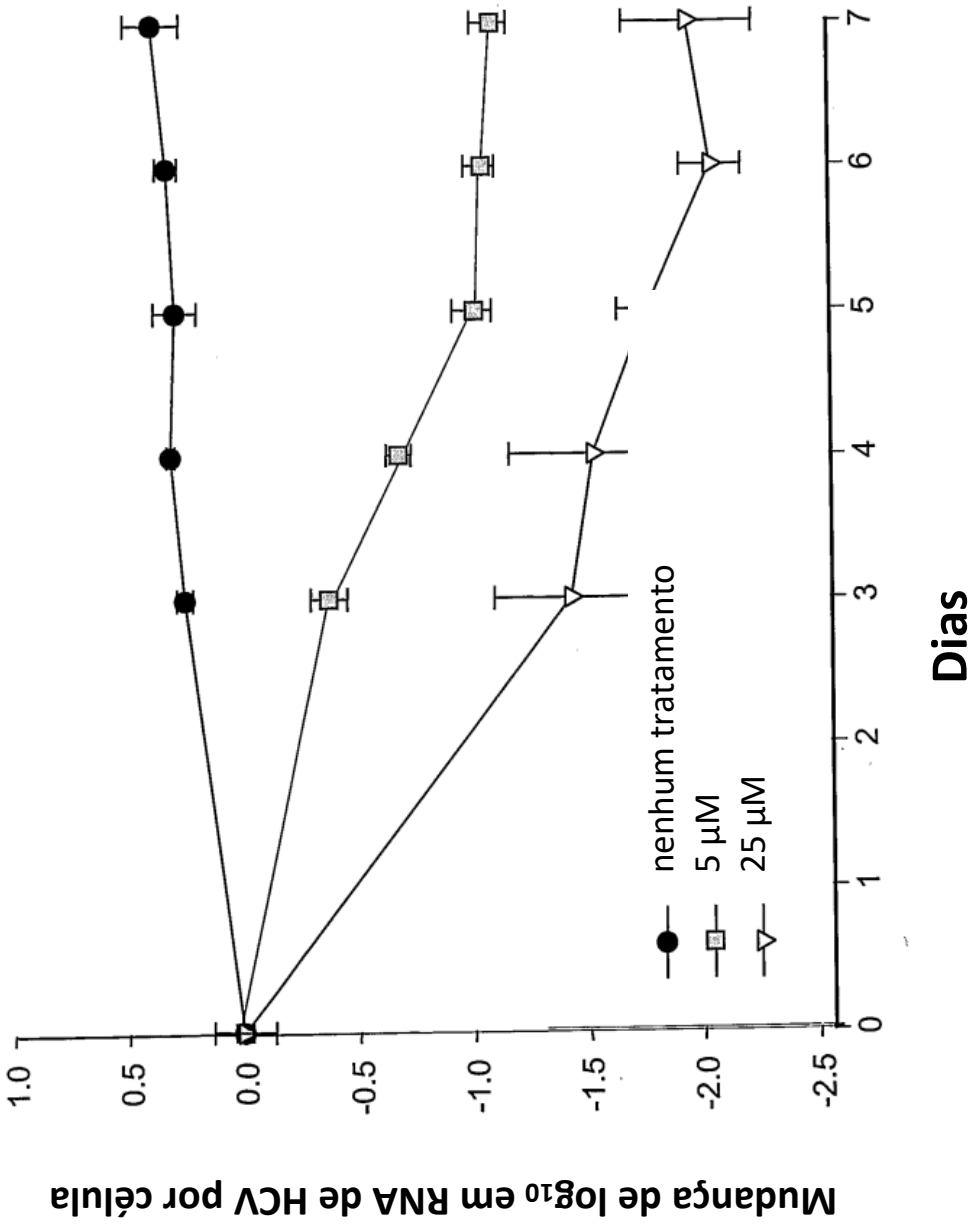

Mudança de log10 em RNA de HCV por célula
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
0
1
2
3
4
5
6
7
Dias
nenhum tratamento
5 µM
25 µM

Figura 1B

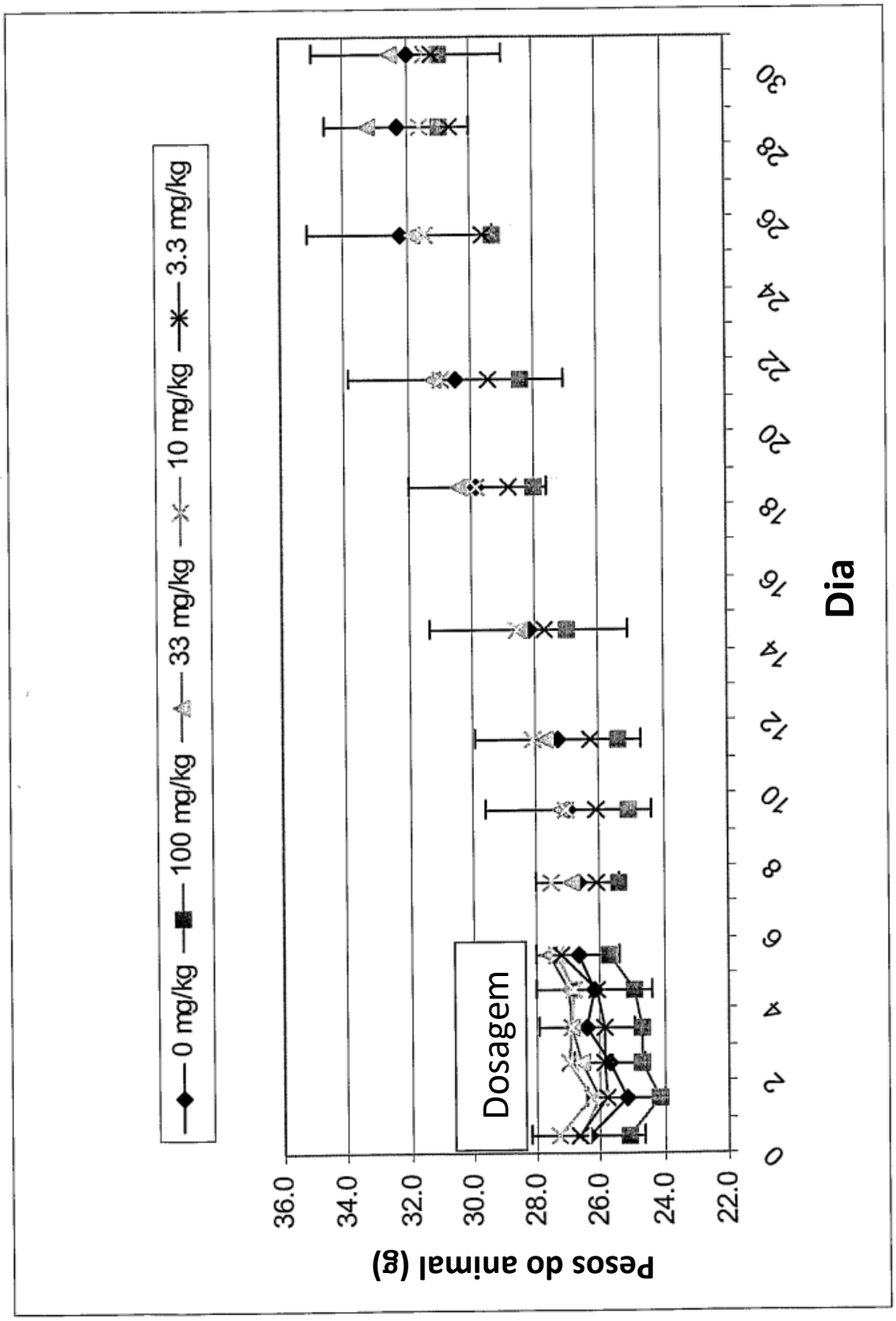

Pesos do animal (g)
36.0
34.0
32.0
30.0
28.0
26.0
24.0
22.0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
Dia
Dosagem
0 mg/kg
100 mg/kg
33 mg/kg
10 mg/kg
3.3 mg/kg

Figura 2

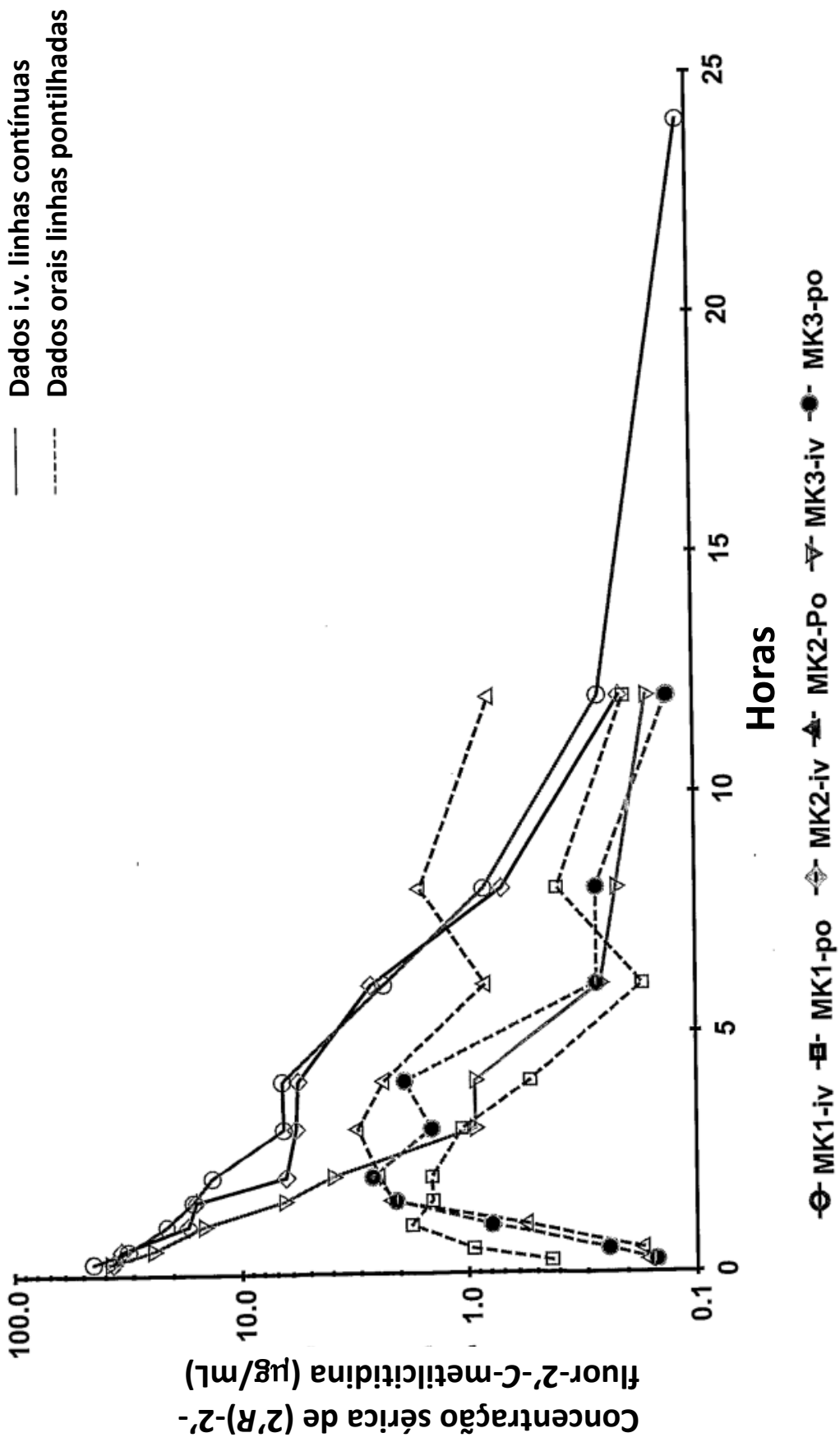

Dados i.v. linhas contínuas
Dados orais linhas pontilhadas
Concentração sérica de (2'R)-2'-fluor-2'-C-metilcitidina (µg/mL)
100.0
10.0
1.0
0.1
0
5
10
15
20
25
Horas
MK1-iv
MK1-po
MK2-iv
MK2-Po
MK3-iv
MK3-po

Figura 3