



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

(11) BR 112014028362-1 B1



(22) Data do Depósito: 07/05/2013

(45) Data de Concessão: 01/02/2022

(54) Título: ÁCIDOS (3R, 4R, 5S)-5-GUANIDINO-4-ACETAMIDO-3-(PENTAN-3-ILOXI)CICLOEXENO-1-CARBOXÍLICOS FLÚOR SUBSTITUÍDOS, OS SEUS ÉSTERES, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA MESMA

(51) Int.Cl.: C07C 279/16; A61K 31/155; A61P 31/16.

(30) Prioridade Unionista: 12/05/2012 RU 2012119272.

(73) Titular(es): ALEXANDRE VASILIEVICH IVACHTCHENKO; ASAVI, LLC.

(72) Inventor(es): ALEXANDRE VASILIEVICH IVACHTCHENKO.

(86) Pedido PCT: PCT RU2013000384 de 07/05/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/172741 de 21/11/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/11/2014

(57) Resumo: ÁCIDOS (3R, 4R, 5S)-5-GUANIDINO-4-ACETAMIDO-3-(PENTAN-3- ILOXI)CICLOEXENO-1-CARBOXÍLICOS FLÚOR SUBSTITUÍDOS, OS SEUS ÉSTERES, COMPONENTE ATIVO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO E USO DOS MESMOS. A presente invenção se refere a nova atividade de inibidores de neuraminidase e ao uso dos mesmos para a profilaxia e o tratamento de infecções por influenza, ou seja, a ácidos 4-acetamido-5-guan idino-3-(pentan-3- iloxi)ciclohexeno-1-carboxílico fluoro substituídos, os seus ésteres de fórmula geral 1, os sais e/ou os hidratos farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos, em que R representa hidrogênio, alquila C1-C5, alqu enila C2-C5 ou alquinila C2-C5 opcionalmente substituída; Rf representa CH2F ou CHF2. São propostos uma composição farmacêutica, um método para a sua preparação, assim como método para a profilaxia e o tratamento de doenças virais.

“ÁCIDOS (3R, 4R, 5S)-5-GUANIDINO-4-ACETAMIDO-3-(PENTAN-3-ILOXI)CICLOEXENO-1-CARBOXÍLICOS FLÚOR SUBSTITUÍDOS, OS SEUS ÉSTERES, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA MESMA”

Campo da Invenção

[001]A presente invenção se refere a novos compostos - ácidos (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-acetamido-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílicos flúor substituídos e os seus ésteres inibidores de atividade de neuraminidase.

Antecedentes da invenção

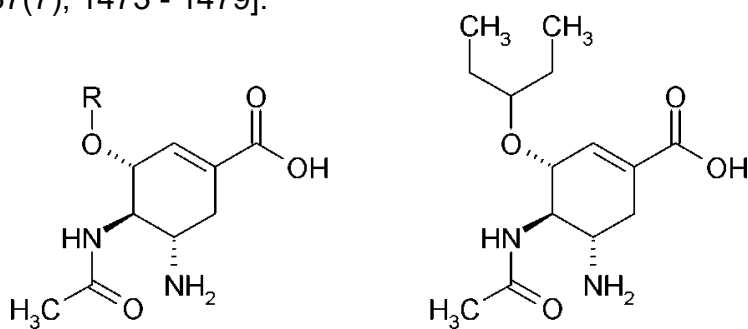
[002]Muitos micro-organismos que compreendem neuraminidase são patogênicos a seres humanos e animais tais como frango, cavalos, porcos e focas. Os referidos micro-organismos patogênicos incluem o vírus da influenza. Neuraminidase está associada com a patogenicidade do vírus da influenza.

[003]Em relação a isso novos ácidos (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-acetamido-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílicos flúor substituídos e os seus ésteres são de grande preocupação como substâncias de fármaco para medicamentos pretendidos para a profilaxia e o tratamento da influenza. Os inibidores de neuraminidase conhecidos são os ácidos (3R, 4R, 5S)-4-acetamido-5-amino-3-alquiloxi- cicloexeno-1-carboxílicos A1, dos referidos, o mais ativo dos mesmos é o ácido (3R, 4R, 5S)-4-acetamido-5-amino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico A2, o qual, como foi mostrado por dados de difração de raio X por seu complexo com neuraminidase do vírus da influenza, é efetivamente ligado ao o centro ativo da enzima (Oseltamivir Carboxilato) [C. U. Kim, W. Lew, M. A. Williams, et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 681 - 690.].

[004]Éster etílico do ácido Oseltamivir carboxílico A3, conhecido como Oseltamivir Fosfato ou Tamiflu (Oseltamivir Fosfato, Tamiflu) [J. C. Rohloff, K. M. Kent, M. J. Postich, et al. *J. Org. Chem.* 1998, 63, 4545.], é um precursor medicinal do Oseltamivir carboxilato A2.

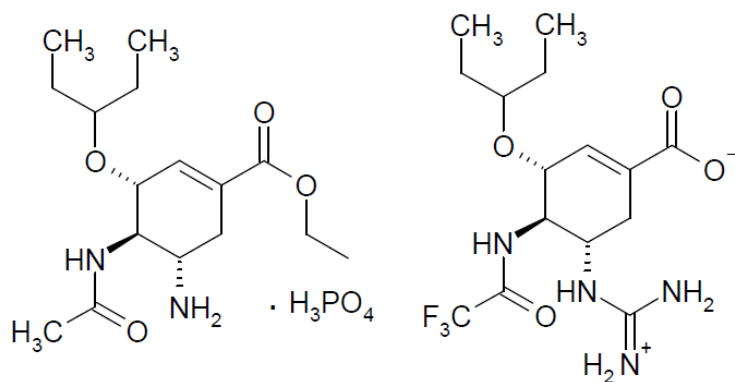
[005]É também conhecido o ácido (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-trifluoroacetamido-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico A4, que exibe atividade em direção de neuraminidase do vírus da influenza H5N1 [Q.-S. Du, R.-B. Huang, Y.-T. Wei, Z.-W. Pa, L.-Q. Du, K.-C. Chou. Fragment-Based Quantitative Structure-Activiti Relationship (FB-QSAR) for Fragment-Based Drug Design. *J. Comput. Chem.* 2008, 30(2), 295-304].

[006]O ácido (2R, 3R, 4S)-3-Acetamido-4-guanidino-2-((1R, 2R)-1,2,3-trihidroxipropil)-3,4-dihidro-2if-piran-6-carboxílico (zanamivir) é conhecido por ser ativo contra neuraminidases dos vírus da influenza A e B, e também neuraminidase do vírus da influenza H1N1 [J. M. Woods, R. C. Betell, J. A. Coatos, et al. O ácido 4-Guanidino-2,4-dideoxi-2,3-dehidro-N-acetilneurâmico é um inibidor altamente eficaz não só da sialidase (neuraminidase) mas também do desenvolvimento de uma grande gama do vírus de influenza A e B em vitro. *Antimicrob Agentes Chemoutro.* 1993, 37(7), 1473 - 1479].



A1

A2



A3

A4

[007]Pesquisando por medicamentos altamente eficazes anti-influenza, dentre outras coisas que exibem maior atividade em direção do vírus resistentes da influenza, ainda permanece uma das maiores tendências no desenvolvimento de novos remédios farmacológicos para o tratamento da influenza. Nesse contexto, a configuração de novos ingredientes, composições farmacêuticas e medicamentos anti-influenza, assim como métodos para a preparação dos mesmos e o seu uso é de atual interesse.

Descrição da invenção

[008]No contexto da presente invenção, os termos são em geral definidos como a seguir:

[009]"Alquenila" quer dizer uma cadeia de hidrocarboneto retilínea ou ramificada alifática, que compreendem 2-7 átomos de carbono e incluindo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono. Ramificado quer dizer que uma cadeia retilínea alquenila contém um ou mais grupos alquila inferiores, tais como metila, etila ou propila. Grupo alquila pode ter um ou mais substituintes, por exemplo, halogênio, alqueniloxi, cicloalquila, ciano, hidroxí, alcoxi, carboxi, alquiniloxi, aralcoxi, ariloxi, ariloxicarbonila, alquiltio, heteroaralquiloxi, heterociclila, heterociclilalquiloxi, alcóxicarbonila, aralcoxicarbonila, heteroaralquiloxicarbonila ou $R_k^a R_{k+1}^a N-$, $R_k^a R_{k+1}^a NC(=O)-$, $R_k^a R_{k+1}^a NSO_2-$, onde R_k^a e R_{k+1}^a independentemente um do outro representa "substituinte de grupo amino" os significados dos quais são definidos na presente seção, tais como hidrogênio, alquila, arila, aralquila, heteroaralquila, heterociclila ou heteroarila, ou R_k^a e R_{k+1}^a juntos com o átomo de nitrogênio os mesmos são fixados para formar através de R_k^a e R_{k+1}^a heterociclila ou heterociclenila de 4-7 membros. Os grupos alquila preferidos são metila, trifluorometila, ciclopropilmetila, ciclopentilmetila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, *terc*-butila, n-pentila, 3-pentila, metoxietila, carboximetila, metoxicarbonilmetila, benziloxicarbonilmetila e piridilmetiloxicarbonilmetila. Os grupos alquenila preferidos

são etenila, propenila, n-butenila, iso-butenila, 3-metilbut-2-enila, n-pentenila e cicloexilbutenila.

[010]"Alquila" quer dizer uma cadeia de hidrocarboneto alifática retilínea ou ramificada com 1-12 átomos de carbono. Ramificado quer dizer a cadeia alquila com pelo menos um ou mais substituintes de "alquila inferior". Grupo alquila pode ter um ou mais substituintes de mesma estrutura ou estrutura diferente ("substituinte alquila") incluindo halogênio, alqueniloxi, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila, aroila, ciano, hidroxí, alcoxi, carboxi, alquiniloxi, aralcoxi, ariloxi, ariloxicarbonila, alquiltio, heteroariltio, aralquiltio, arilsulfonila, alquilsulfonilheteroaralquiloxi, heteroarilcicloalquenila anelada, heteroarilcicloalquila anelada, heteroarilheterociclenila anelada, heteroarilheterociclila anelada, arilcicloalquenila anelada, arilcicloalquila anelada, arilheterociclenila anelada, arilheterociclila anelada, alcóxicarbonila, aralcoxicarbonila, heteroaralquiloxicarbonila ou $R_k^a R_{k+1}^a N-$, $R_k^a R_{k+1}^a NC(=O)-$, $R_k^a R_{k+1}^a NC(=S)-$, $R_k^a R_{k+1}^a NSO_2-$, onde R_k^a e R_{k+1}^a independentemente um do outro representa "substituinte de grupo amino" os significados dos quais são definidos na presente seção, por exemplo, hidrogênio, alquila, arila, aralquila, heteroaralquila, heterociclila ou heteroarila, ou R_k^a e R_{k+1}^a juntos com o N-átomo, os mesmos são fixados para formar através de R_k^a e R_{k+1}^a heterociclila ou heterociclenila de 4-7 membros. Os grupos alquila preferidos são metila, trifluorometila, ciclopropilmetila, ciclopentilmetila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, terc-butila, n-pentila, 3-pentila, metoxietila, carboximetila, metoxicarbonilmetila, etoxicarbonilmetila, benziloxicarbonilmetila e piridilmetiloxicarbonilmetila. Os "alquila substituintes" preferidos são cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila, hidroxí, alcoxi, alcóxicarbonila, aralcoxi, ariloxi, alquiltio, heteroariltio, aralquiltio, alquilsulfonila, arilsulfonila, alcóxicarbonila, aralcoxicarbonila, heteroaralquiloxicarbonila ou $R_k^a R_{k+1}^a N-$, $R_k^a R_{k+1}^a NC(=O)-$, arilheterociclenila anelada e arilheterociclila anelada.

[011]"Alquinila" quer dizer uma cadeia de hidrocarboneto alifática retilínea ou ramificada com 2-12 átomos de carbono e incluindo pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono. Ramificado quer dizer que cadeia retilínea de alquinila contém pelo menos um ou mais grupos alquila inferiores, tais como metila, etila ou propila. Grupo alquila pode ter um ou mais substituintes, por exemplo, halogênio, alqueniloxi, cicloalquila, ciano, hidroxí, alcoxi, alquiniloxi, aralcoxi, ariloxi, ariloxicarbonila, alquiltio, heteroaralquiloxi, heterociclila, heterociclilalquiloxi, alcóxicarbonila, aralcoxycarbonila, heteroaralquiloxycarbonila ou $R_k^a R_{k+1}^a N-$, $R_k^a R_{k+1}^a NC(=O)-$, $R_k^a R_{k+1}^a NSO_2-$, onde R_k^a e R_{k+1}^a independentemente um do outro representa "amino grupo substituintes", os significados dos quais são definidos na presente seção, tais como hidrogênio, alquila, arila, aralquila, heteroaralquila, heterociclila ou heteroarila, ou R_k^a e R_{k+1}^a juntos com o N-átomo os mesmos são fixados para formar através de R_k^a e R_{k+1}^a heterociclila ou heterociclenila de 4-7 membros. Os grupos alquila preferidos são metila, trifluorometila, ciclopropilmetila, ciclopentilmetila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, terc-butila, n-pentila, 3-pentila, metoxietila, carboximetila, metoxycarbonilmetila, benziloxycarbonilmetila e piridilmetiloxycarbonilmetila. Os grupos alquinila preferidos são etinila, propinila, n-butinila, iso-butinila, 3-metilbut-2-inila, n-pentinila, bute-1,3-diinila e hexa-1,3,5-triinila.

[012]"Hidrato" quer dizer composições estequiométricas ou não estequiométricas de compostos ou dos seus sais com água.

[013]"Componente ativo" (fármaco-substância) quer dizer um composto fisiologicamente ativo de origem sintética ou de outra origem (biotecnológica, vegetal, animal, micróbio e assim por diante) que exibe atividade farmacológica que é um ingrediente ativo de composição farmacêutica empregado na produção e preparação de medicamentos.

[014]"Medicamento" - é um composto (ou uma mistura de compostos como uma composição farmacêutica) na forma de tabletes, cápsulas, injeções, unguentos,

e outras formas prontas pretendidas para a restauração, aprimoramento ou modificação das funções fisiológicas em seres humanos e animais, e para o tratamento e profilaxia de doenças, para diagnósticos, anestesia, contracepção, cosmetologia e outros.

[015]"Neuraminidase" (sialidase, acilneuraminile hidrolase e EC 3.2.1.18) é uma enzima comum para animais e para um número de micro-organismos. A mesma representa glicohidrolase que cliva as ligações glicosídicas dos ácidos neurâmicos em glicoproteínas, glicolipídeos e oligossacarídeos. Muitos dos micro-organismos que compreendem neuraminidase, são patogênicos a seres humanos e animais tais como frango, cavalos, porcos e focas. Os referidos organismos patogênicos incluem vírus da influenza. Neuraminidase é associada com a patogenicidade do vírus da influenza. Presumivelmente a mesma contribui para a eluição de vírions recentemente sintetizados a partir de células infectadas e ao movimento do vírus (em virtude da sua atividade de hidrolase) através da túnica mucosa respiratória.

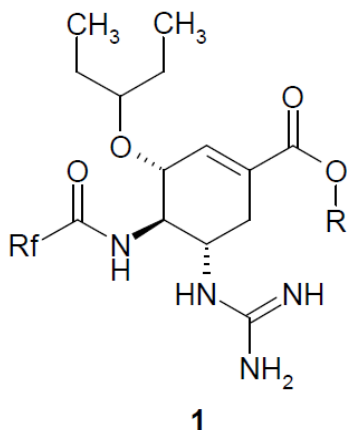
[016]"Composição farmacêutica" quer dizer uma composição que compreende um composto de fórmula geral I e pelo menos um dos componentes selecionados a partir do grupo que consiste de elementos farmaceuticamente aceitáveis e farmacologicamente compatíveis tais como cargas, solventes, diluentes, veículos, agentes auxiliares, de distribuição e excipientes, agentes de envio, tais como conservantes, estabilizantes, cargas, desintegrantes, umectantes, emulsificantes, agentes de suspensão, espessantes, adoçantes, agentes flavorizantes, agentes aromatizantes, agentes antibacterianos, fungicidas, lubrificantes, e controladores de envio prolongado, a escolha e as proporções adequadas dos quais depende do tipo e da via de administração e da dosagem. Exemplos de agentes de suspensão adequados são álcool de isoestearila etoxilado, polioxieteno, sorbitol e éter de sorbitol, celulose microcristalina, metahidróxido de

alumínio, bentonita, agar-agar e tragacanto e as suas misturas também. Proteção contra a ação de micro-organismos pode ser proporcionada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, tais como, por exemplo, parabenos, clorobutanola, ácido sórbico, e compostos similares. A composição pode também compreender agentes isotônicos, tais como, por exemplo, açúcar, cloreto de sódio, e compostos similares. A ação prolongada da composição pode ser alcançada por agentes que diminuem a absorção de ingrediente ativo, por exemplo, monostearato de alumínio e gelatina. Exemplos de veículos, solventes, diluentes e agentes de envio adequados incluem água, etanol, poliálcoois e as suas misturas, óleos naturais (tais como óleo de oliva) e ésteres orgânicos injetáveis (tais como oleato de etila). Exemplos de cargas são lactose, açúcar do leite, citrato de sódio, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio e semelhante. Exemplos de desintegrantes e distribuidores são amido, ácido algínico, os seus sais, e silicatos. Exemplos de lubrificantes adequados são estearato de magnésio, lauril sulfato de sódio, talco e polietileno glicol de alto peso molecular. A composição farmacêutica para a administração peroral, sublingual, transdermal, intramuscular, intravenosa, subcutânea, local ou retal de ingrediente ativo, isoladamente ou em combinação com outro composto ativo, pode ser administrada a seres humanos e animais em uma forma de administração padrão, ou em uma mistura com veículos farmacêuticos tradicionais. Formas de administração padrão adequadas incluem as formas perorais tais como tabletes, cápsulas de gelatina, pílulas, pós, grânulos, gomas de mascar e soluções e suspensões perorais; formas de administração sublingual e transbucal; aerossóis; implantes; formas locais, transdérmicas, subcutânea, intramuscular, intravenosa, intranasal ou intraocular e as formas de administração retais.

[017]"Sais farmaceuticamente aceitáveis" querem dizer os sais relativamente não tóxicos seja orgânico e inorgânico de ácidos e bases descritos na presente invenção. Os referidos sais podem ser preparados em situ nos processos de síntese,

isolamento ou purificação dos compostos ou os mesmos podem ser preparados especialmente. Em particular, os sais de bases podem ser preparados a partir de uma base purificada do composto descrito e ácido orgânico ou mineral adequados. Exemplos de sais preparados desse modo incluem hidrocloreto, hidrobrometo, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, oxalato, valeriato, oleato, palmitato, stearato, laurato, borato, benzoato, lactato, p-toluenesulfonato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, metano sulfonato, malonato, salicilato, propionato, etano sulfonato, benzeno sulfonato, sulfamato e semelhante (A descrição detalhada das referidas propriedades dos sais é dada em: Berge S.M., et al., "Pharmaceutical Salts " J.Pharm.Sci., 1977, 66: 1-19). Os sais dos ácidos descritos podem também ser preparados pela reação de ácidos purificados especialmente com bases adequadas; ademais, os sais de metal e sais de amina podem ser sintetizados também. Os sais de metal são os sais de sódio, potássio, cálcio, bário, zinco, magnésio, lítio e alumínio; os sais de sódio e potássio sendo os preferidos. Bases inorgânicas adequadas a partir das quais os sais de metal podem ser preparados são hidróxido de sódio, carbonato, bicarbonato e hidreto; hidróxido de potássio, carbonato e bicarbonato; hidróxido de lítio, hidróxido de cálcio, hidróxido de magnésio, hidróxido de zinco. Bases orgânicas adequadas para a preparação dos sais de ácido descritos são as aminas e amino ácidos de base de resistência suficiente para produzir um sal estável que é adequado para uso de fim médico (em particular, os mesmos devem ser de baixa toxicidade). As referidas aminas incluem amônia, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, dietilamina, trietilamina, benzilamina, dibenzilamina, dícicloexilamina, piperazina, etilpiperidina, tris(hidroximetil)aminometano e semelhante. Além disso, os sais podem ser preparados usando algum hidróxido de tetraalquilamônia, tais como holina, tetrametilamônia, tetraetilamônia, e semelhante. Lisina, ornitina e arginina podem ser usadas como os aminoácidos altamente básicos.

[018]Os autores observaram novos inibidores de neuraminidase que representam os desconhecidos anteriormente ácidos (3R, 4R, 5S)-4-acetamido-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico e os seus ésteres de fórmula geral 1 e sais farmacologicamente aceitáveis e/ou os hidratos dos mesmos,



em que:

R representa hidrogênio, opcionalmente substituída alquila C1-C5, alquenila C2-C5 ou alquinila C2-C5; Rf representa CH₂F ou CHF₂.

[019]Em comparação com a eficácia de Oseltamivir carboxilato A2 os novos compostos de fórmula geral 1, como os autores observaram inesperadamente, são inibidores muito mais eficientes de neuraminidase de algumas outras cepas de influenza por fator de 5-259 (Tabela 1).

[020]Tabela 1. Atividade de anti-neuraminidase do ácido (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-fluoroacetamido-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.1 e Oseltamivir carboxilato A2 em um painel de cepas do vírus da influenza.

Vírus	Inibidor N°		IC ^{A2} ₅₀ / IC ^{1.1} ₅₀
	A2	1.1	
	IC ₅₀ , nM (número de experimentos)		
A/California /07/09 (H1N1)	0,86 ± 0,42 (8)	0,18 ± 0,08 (6)	5
A/Chicken/Rostov on Don /35/07/ (H5N1)	1,78 ± 0,09 (2)	0,20 ± 0,00 (2)	9
A/Pert/261/2009 (H1N1 pdm09; 275Y)	360 ± 87 (4)	1,39 ± 0,38 (4)	259
B/Brisbane/60/2008	25,42 ± 0,51 (2)	1,27 ± 0,14 (2)	20
B/Pert/211/2001 (197D)	39,24 ± 2,44 (4)	2,08 ± 0,71 (4)	19
B/Pert/211/2001 (197E)	230,2 ± 62,6 (4)	6,65 ± 0,90 (4)	35

[021] Os novos compostos da fórmula geral, conforme os autores observaram, acabaram sendo inibidores mais eficazes de neuraminidase do vírus da influenza, em comparação com o Zanamivir (Zan) conhecido (Tabela 2).

[022] Tabela 2. Atividade de anti-neuraminidase de ácido (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-fluoroacetamido-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.1 e Zanamivir (Zan) em um painel de cepas do vírus da influenza.

Vírus	Inibidor		IC ^{Zan} ₅₀ / IC ^{1.150}
	Zan	1.1	
	IC ₅₀ , nM (número de experimentos)		
A/California /07/09 (H1N1)	0,26 ± 0,32 (6)	0,18 ± 0,08 (6)	1,4
A/Aichi/2/69 (H3N2)	0,60 ± 0,45 (6)	0,69 ± 0,19 (6)	0,9
A/Chicken/Rostov on Don/35/07/ (H5N1)	0,59 ± 0,07 (2)	0,20 ± 0,00 (2)	3
A/Pert/265/2009 (H1N1; 275H)	0,46 ± 0,07 (4)	0,07 ± 0,05 (4)	6,6
B/Brisbane/60/2008	1,87 ± 0,02 (2)	1,27 ± 0,14 (2)	1,4
B/Pert/211/2001 (197D)	3,67 ± 0,20 (4)	2,08 ± 0,71 (4)	1,8
B/Pert/211/2001 (197E)	21,98 ± 5,88 (4)	6,65 ± 0,90 (4)	3,2

[023] Finalmente, os autores observaram que a comparação não só com Oseltamivir carboxilato mas também com Zanamivir os novos compostos são mais eficazes em cultura de células MDCK em direção do vírus das cepas de influenza la/Califórnia/07/09 (H1N1) e cepas altamente patogênicas la/pato/MN/1525/81 (H5N1) (Tabela 3). Em particular, o ácido (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-fluoroacetamido-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.1 é mais ativo do que o Oseltamivir carboxilato (A2) por um fator de 13 e Zanamivir (Zan) por um fator de 20 em direção da cepa la/Califórnia/07/09 (H1N1), e em direção da cepa altamente patogênica la/pato/MN/1525/81(H5N1) a sua atividade é maior do que aquela de Oseltamivir carboxilato e Zanamivir (Zan) em 24 e 16 vezes, respectivamente.

[024] O ácido (3R, 4R, 5S)-5-Guanidino-4-(2-trifluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico A4 mostrou atividade de neuraminidase em direção do vírus A/Califórnia/04/09 IC₅₀ = 80 nM, e em direção do vírus A/Vladivostok/16/09 - IC₅₀ > 1000 nM. O ácido (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-fluoroacetamido-3-(pentan-3-

iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.1 anteriormente desconhecido tem atividade de neuraminidase em direção do vírus A/Califórnia/04/09 de 400 vezes maior do que a atividade de A4, e em direção do vírus A/Vladivostok/16/09 - os novos ácidos 1.1 têm $IC_{50} = 4$ nM, ou seja, os mesmos são mais ativos do que o seu análogo conhecido 4-(2-trifluoroacetamido) por um fator de 250. O ácido (3R, 4R, 5S)-5-Guanidino-4-(2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.4 é também mais ativo do que o seu análogo A4: a sua atividade de neuraminidase em direção do vírus A/Califórnia/04/09 corresponde a $IC_{50} = 0.3$ nM, (ou seja, é 2.7 vezes mais ativo do que A2 e 267 vezes mais ativo do que A4); em direção do vírus A/Vladivostok/16/09 - os novos ácidos 1.4 exibem uma $IC_{50} = 7$ nM (em outras palavras, é mais ativo do que A2 por um fator de 118 e por um fator de 140 do que A4).

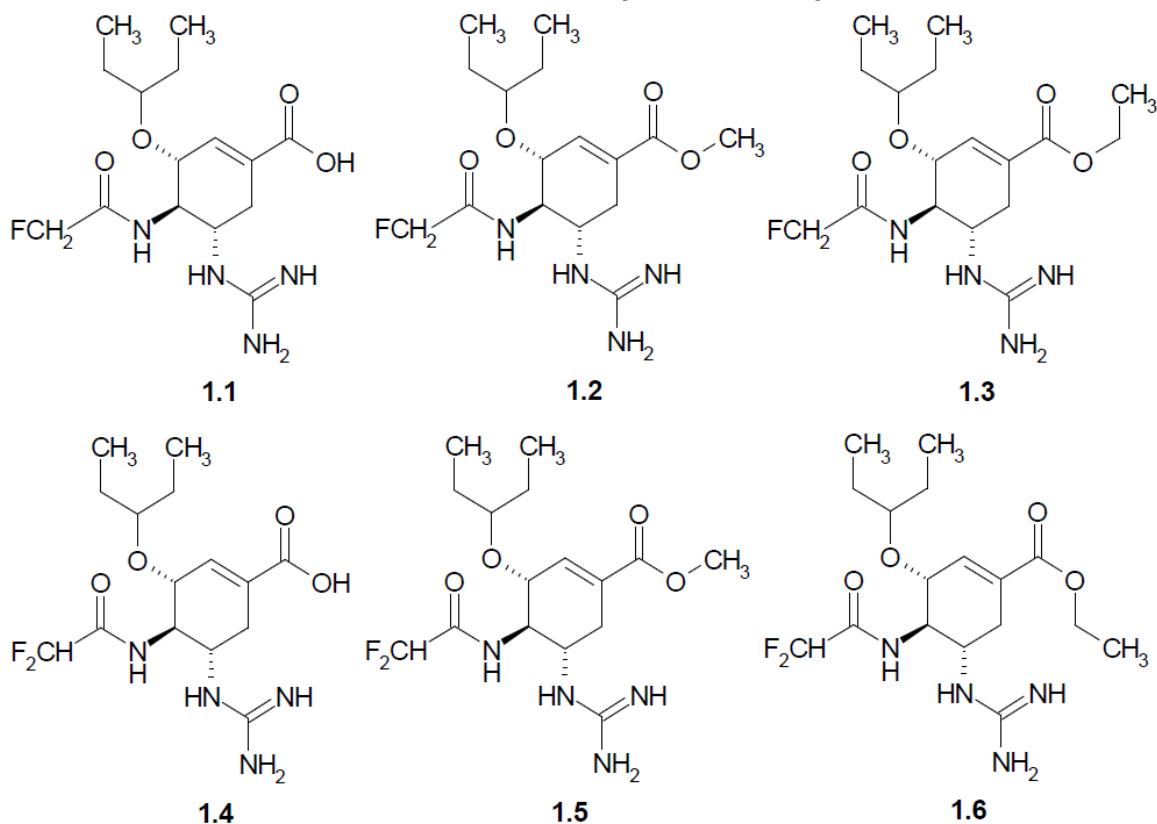
[025]Tabela 3. Atividade específica do ácido (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-fluoroacetamido-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.1 em cultura celular MDCK em direção do vírus das cepas Ia/Califórnia/07/09 (H1N1) e da cepa altamente patogênica Ia/pato/MN/1525/81 (H5N1) em comparação com Oseltamivir carboxilato (A2) e Zanamivir (Zan).

Composto	Cepa do vírus da influenza			
	H1N1 Ia/California/07/09		H5N1 Ia/pato/MN/1525/81	
	Atividade			
	IC50, pM	IC50 / IC ^{1.150}	IC50, pM	IC ^{Zan} 50 / IC ^{L150}
A2	9.9	16.3	77.5	24.2
Zan	16.0	20.5	51.2	16.0
1.1	0.78		3.2	

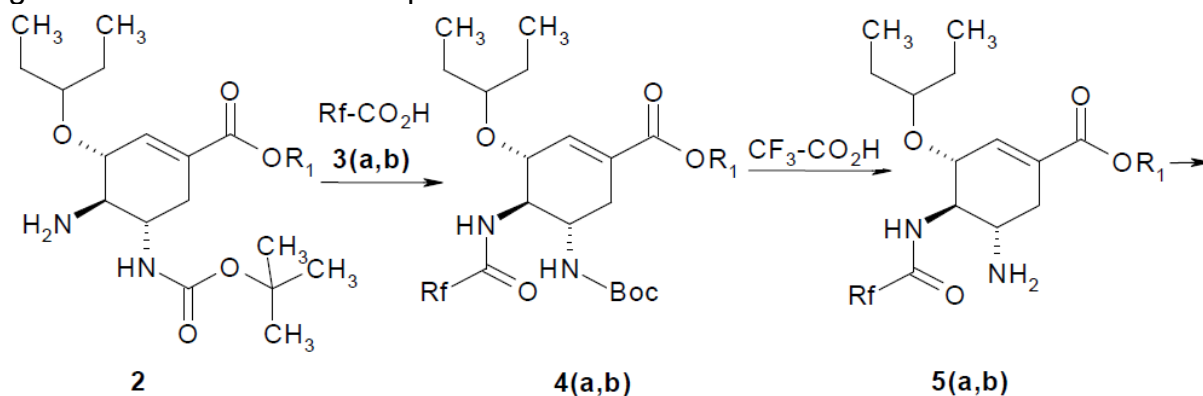
[026]De acordo com a presente invenção os compostos preferidos são os compostos de fórmula geral 1, em que R representa hidrogênio, metila ou etila.

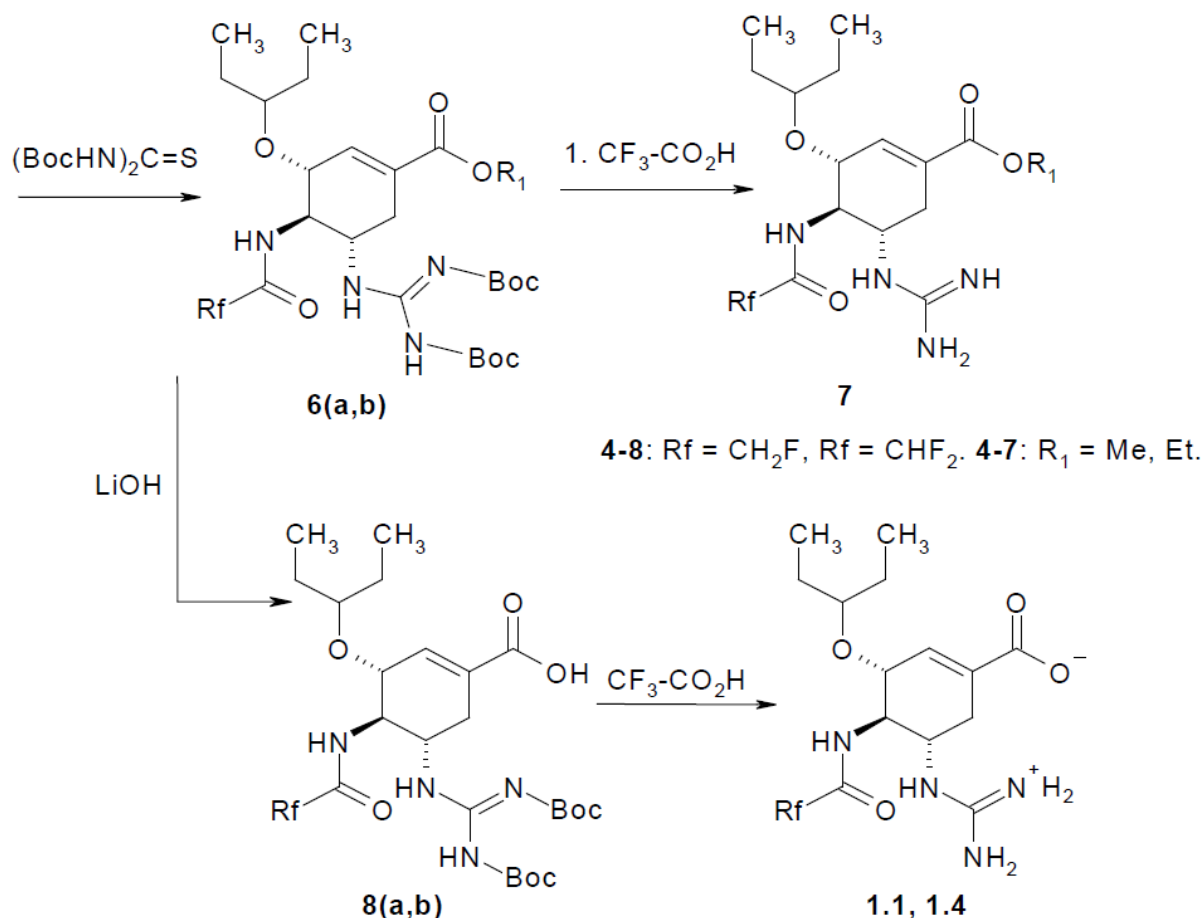
[027]De acordo com a presente invenção os compostos mais preferidos de fórmula geral 1 são: ácido (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-fluoroacetamido-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.1 e os seus ésteres de metila 1.2 e de etila 1.3; o ácido (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-difluoroacetamido-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-

carboxílico 1.4 e os seus ésteres de metila 1.5 e de etila 1.6.



[028] Os inibidores de neuraminidases dos vírus da influenza de fórmula geral 1 podem ser preparados iniciando a partir de 4-amino-5-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de alquila de fórmula geral 2 de acordo com o esquema mostrado abaixo:





[029] Os novos inibidores de neuraminidases dos vírus da influenza que representam os anteriormente desconhecidos ácidos (3R, 4R, 5S)-4-(2-fluoroacetamido)- e ácidos (3R, 4R, 5S)-4-(2,2-difluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico e os seus ésteres de fórmula geral 1 e sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos também mostrou alta atividade anti-influenza em modelos de animais do vírus da influenza pneumonia.

[030] A atividade anti-neuraminidase dos compostos descritos foi determinada de acordo com o método descrito em [Who Collaborating Centre for Reference & Research on Influenza, Australia, Standard Operating Procedure WHO - 025. Reviewed by: Aeron Hurt, Senior Scientist Review Date: 13/3/2009].

[031] De acordo com a presente invenção os novos compostos de fórmula geral 1 representam um componente ativo para a preparação de composições farmacêuticas e formas de dosagem finais para a profilaxia e o tratamento de

influenza em animais de sangue quente e em seres humanos.

[032]O objetivo da presente invenção é uma composição farmacêutica que compreende como componente ativo os compostos de fórmula geral 1 ou os sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos em uma quantidade terapeuticamente eficaz.

[033]As composições farmacêuticas podem incluir excipientes farmaceuticamente aceitáveis. Excipientes farmaceuticamente aceitáveis quer dizer aplicado na esfera dos diluentes, auxiliares agentes e/ou veículos farmacêuticos. De acordo com a presente invenção a composição farmacêutica junta com um composto de fórmula geral 1 ou sal e/ou hidrato farmaceuticamente aceitável dos mesmos pode envolver outros componentes ativos incluindo os com atividade anti-influenza, desde que os mesmos não causem efeitos indesejáveis.

[034]Se necessário, de acordo com a presente invenção a composição farmacêutica pode ser usada na prática clínica em várias formas preparadas pela mistura das referidas composições com veículos farmacêuticos tradicionais.

[035]De acordo com a presente invenção os veículos usados em composições farmacêuticas representam os veículos que são usados na esfera de produtos farmacêuticos para a preparação das formas comumente usadas: agentes de ligação, agentes lubrificantes, desintegrantes, solventes, diluentes, estabilizantes, agentes de suspensão, agentes incolores, aromatizantes de sabor são usados para as formas perorais; agentes antissépticos, solubilizantes, estabilizantes são usados em formas para injeções; materiais de base, diluentes, agentes lubrificantes, agentes antissépticos são usados em formas locais.

[036]O objetivo da presente invenção é um método para a preparação da composição farmacêutica ao se misturar a quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos um componente ativo de fórmula geral 1 ou do seu sal farmaceuticamente aceitável com uma carga inerte e/ou solvente.

[037]O objetivo da presente invenção é também um medicamento que exibe atividade anti-influenza na forma de tabletes, cápsulas ou injeções dispostas em uma embalagem farmaceuticamente aceitável e pretendida para a profilaxia e tratamento de influenza em seres humanos e animais de sangue quente e que compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz dos novos componentes ativos de fórmula geral 1 ou uma composição farmacêutica que compreendem os novos componentes ativos de fórmula geral 1.

[038]O objetivo da presente invenção é também kits terapêuticos para o tratamento de influenza incluindo como um dos componentes os novos medicamentos ou as novas composições farmacêuticas que compreendem como um componente ativo, pelo menos um composto de fórmula geral 1 ou sal e/ou hidrato farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

[039]De acordo com a presente invenção, junto com os novos medicamentos o kit terapêutico para o tratamento influenza pode incluir outros medicamentos conhecidos pretendidos para o tratamento de influenza ou medicamentos que reforçam o sistema imune do paciente.

[040]De acordo com a presente invenção o método para a profilaxia e tratamento de influenza em seres humanos e animais consiste na administração dos novos medicamentos, a nova composição farmacêutica ou do novo kit terapêutico a um paciente.

[041]Os medicamentos descritos podem ser administrados por via peroral ou por via parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal ou local) ou por meio de inalador. A dose clínica de um componente ativo de fórmula geral 1 pode ser corrida dependendo de: eficiência terapêutica e da biodisponibilidade dos ingredientes ativos no organismo do paciente, do coeficiente de sua troca e de sua remoção a partir do organismo, e da idade, do gênero, e da gravidade dos sintomas do paciente. Assim, a ingesta diária para adultos normalmente é de 10~500 mg,

preferivelmente 50~300 mg. Embora a preparação de um medicamento como uma unidade de dosagem a partir da composição farmacêutica a dose eficaz acima deve ser levada em consideração, ou seja, cada unidade de dosagem do medicamento deve conter 10~500 mg, preferivelmente - 50 ~ 300 mg. Seguindo as instruções do médico ou farmacêutico, os medicamentos podem ser tomados diversas vezes em períodos de tempo especificados (preferivelmente, a partir de uma a seis vezes).

[042]O objetivo da presente invenção é também um método para a inibição da atividade de neuraminidase em vivo, incluindo neuraminidase do vírus da influenza, que compreende o estágio de contato da neuraminidase com um composto de fórmula geral 1.

[043]Abaixo a presente invenção é descrita por meio de exemplos específicos que ilustram, mas não limitam o âmbito da presente invenção.

[044]Exemplo 1. Preparação de (3R, 4R, 5S)-4-(2,2-difluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato mesilato de etila 1.6. $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$. ácido 2,2-Difluoroacético 3b (0,624 g, 0,0065 mol, 1.2 eq) foi adicionado gota a gota a uma solução de (3R, 4R, 5S)-4-amino-5-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de etila (2 g, 0,0054 mol, 1 eq.), 1H-benzo[d][1,2,3]tnazol-1-ol (0,867 g, 0,0065 mol, 1.2 eq.), A¹-((etilimino)metileno)-A²,A²-dimetiletano-1,2-diamina hidrocloreto (1,239 g, 0,0065 mol, 1.2 eq.) e diisopropiletilamina (2,212 g, 0,0178 mol, 3,3 eq.) em THF (20 mL). A mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente por 4 h. Então solventes foram evaporados em *vácuo*, o óleo residual foi dissolvido em acetato de etila, lavado com 5% de solução de NaHCO₃, seco sobre Na₂SO₄, filtrado e evaporado em *vácuo*. Rendimento de (3R, 4R, 5S)-5-(terc-butoxicarbonilamino)-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de etila 4b é 89% (2,15 g). LCMS (M+H): encontrado 449; calculado 448.51. O produto preparado 4b (2,15 g, 0,0048 mol) foi dissolvido em 10% de solução de ácido trifluoroacético em cloreto de metileno (20

ml) e agitada a temperatura ambiente por 12 h. Então os solventes foram evaporados em *vácuo*, o óleo residual foi dissolvido em acetato de etila, lavado com 5% de solução de NaHCO₃, seco sobre Na₂SO₄, filtrado e evaporado em *vácuo*. Rendimento do produto é 96% (1,605 g). A purificação adicional foi realizada por meio de coluna de cromatografia com acetato de etila/THF como eluente, ou por recristalização do produto a partir de hexano. Foi proporcionado (3R, 4R, 5S)-5-amino-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de etila 5b, que foi dissolvido em cloreto de metileno e quantidade equivalente de ácido metanosulfônico foi adicionado. Em 10 min o solvente foi evaporado, o produto obtido foi lavado com hexano e seco em *vácuo*. O rendimento de mesilato 5b.CH₃SO₃H é 90%. LCMS (M+H): encontrado 349; calculado 348.39. ¹H NMR (DMSO-A), 400 MHz: 8.91 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 7.83 (br, 3H), 6.74 (s, 1H), 6.22 (t, *J* = 54 Hz, 1H), 4.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.16 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.45 (m, 1H), 3.15 (dd, *J*₁ = 11.2 Hz, *J*₂ = 8.8 Hz, 1H), 2.59 (dd, *J*₁ = 18 Hz, *J*₂ = 6 Hz, 1H), 2.38 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 1.66 (m, 1H), 1.57 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.39 (m, 1H), 1.22 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.891 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.842 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). A uma solução de (3R, 4R, 5S)-5-amino-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de etila 5b (1,6 g; 0,004598 mol; 1eq.) em DMF (16 mL) resfriada em banho de gelo foram subsequentemente adicionados trietilamina (2.57 g; 0,0253 mol; 5.5 eq.), *N,N*-di-boc-tiourea (0,00505 mol; 1.35 g; 1.1eq.) e cloreto (II) de mercúrio (0,0055 mol; 1.49 g; 1.2 eq.). A mistura obtida foi agitada com resfriamento em banho de gelo por 1,5 h. após a reação ser concluída o sólido foi filtrado através de celite, DMF foi evaporado em *vácuo*, o óleo residual foi dissolvido em acetato de etila, lavado com 5% de solução de NaHCO₃, seco sobre Na₂SO₄, filtrado e evaporado em *vácuo*. O mesmo proporcionou 1,82 g (67%) de (3R, 4R, 5S)-5-((*Z*)-2,3-bis(terc-butoxicarbonil)guanidino)-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de etila 6b. LCMS (M+H): encontrado 591; calculado 590,67. A solução

de (3R, 4R, 5S)-5-((Z)-2,3-bis(terc-butoxicarbonil)guanidino)-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de etila 6b (1,82 g; 0,00308 mol) em 10% de solução de ácido trifluoroacético em cloreto de metileno (20 ml) foi agitada a temperatura ambiente por 12 h. Então os solventes foram evaporados em *vácuo*, o óleo residual foi dissolvido em acetato de etila, lavado com 5% de solução de NaHCO₃, seco sobre Na₂SO₄, filtrado e evaporado em *vácuo*. O mesmo proporciona 1,1 g (92%) de (3R, 4R, 5S)-4-(2,2-difluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de etila 1.6. A uma solução do produto preparado em cloreto de metileno em quantidade equivalente de ácido metanosulfônico foi adicionado. Em 10 min o solvente foi evaporado, o produto foi lavado com hexano e seco em *vácuo*. O mesmo proporciona (3R,4R,5S)-4-(2,2-difluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato mesilato de etila 1.6-CH₃SO₃H, rendimento é 95%. LCMS (M+H): encontrado 391; calculado 390.43. ¹H NMR (DMSO-A), 400 MHz: 8.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.27 (t, *J* = 53.6 Hz, 1H), 4.14 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.12 (m, 7H), 3.54 (m, 1H), 3.41 (m, 1H), 2.6 (m, 1H), 2.36 (s, 3H), 1.66 (m, 1H), 1.44 (m, 4H), 1.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.856 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.795 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H).

[045] Em um modo similar ao composto 1.7 - (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de alila (LCMS (M+H): encontrado 354; calculado 353.44, (em direção de A/Califórnia/04/09 vírus IC₅₀ <1 nM) e composto 1.8 - prop-2-inila (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato (LCMS (M+H): encontrado 352; calculado 351,42, (em direção de A/Califórnia/04/09 vírus IC₅₀ <1 nM), foram preparados quando como materiais de partida (como o composto 2) (3R,4R,5E)-4-amino-5-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de alila e prop-2-inila (3R, 4R, 5S)-4-amino-5-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato foram usados, respectivamente.

[046]Ao se usar o correspondente (3R, 4R, 5S)-4-amino-5-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato como o material de partida (composto 2) os compostos a seguir foram preparados:

2-cicloexila (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato 1.9 (LCMS (M+H): encontrado 460; calculado 459.55, IC50 <1 nM em direção de A/Califórnia/04/09 vírus;

2-feniletila (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato 1.10 (LCMS (M+H): encontrado 454; calculado 453.51, IC50 <1 nM em direção de A/Califórnia/04/09 vírus;

2-piridin-3-iletila (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato 1,11 (LCMS (M+H): encontrado 455; calculado 454.49, IC50 <1 nM em direção de A/Califórnia/04/09 vírus);

2-metoxietila (3R, 4R, 5S)-5-guanidino-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato 1,12 (LCMS (M+H): encontrado 422; calculado 421.46, IC50 <1 nM em direção de A/Califórnia/04/09 vírus).

[047]Exemplo 2. Mesilato de etila (3R, 4R, 5S)-4-(2-fluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato 1.3.CH₃SO₃H foi preparado de acordo com o procedimento dado no exemplo 1 usando ácido monofluoroacético como agente de acilação. LCMS (M+H): encontrado 373; calculado 372.44.

[048]Exemplo 3. Ácido (3R, 4R, 5S)-4-(2,2-difluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.4. 5% de solução de hidróxido de lítio (2,5 mL) foi adicionado a uma solução de (3R, 4R, 5S)-5-((Z)-2,3-bis(terc-butoxicarbonil)guanidino-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de etila 6b (250 mg) em dioxano (5 mL) e a mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente por 45 min. Então hidróxido de lítio foi passivado ao se adicionar ácido acético (300 mcl), e os solventes foram evaporados em *vácuo*. O sólido obtido foi extraído com álcool isopropílico, o extrato foi seco sobre Na₂SO₄ e

evaporado em *vácuo*. O mesmo proporciona o ácido (3R,4R,5S)-5-((Z)-2,3-bis(terc-butoxicarbonil)guanidino)-4-(2,2-difluoroacetamido)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 8b (200 mg, 84%). LCMS (M+H): encontrado 563; calculado 562.62. o ácido obtido 8b (200 mg) foi dissolvido em 10% de solução de ácido trifluoroacético em cloreto de metileno (2 ml) e agitado a temperatura ambiente por 12 h. Então os solventes foram evaporados em *vácuo*. O ácido (3R, 4R, 5S)-4-(2,2-Difluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.4 foi separado por método HPLC. LCMS (M+H): encontrado 363; calculado 362.28. ¹H NMR (DMSOA), 400 MHz: 8.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.6 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 7.26 (br, 2H), 6.91 (br, 2H), 6.63 (s, 1H), 6.27 (t, *J* = 53.6 Hz, 1H), 4.18 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 4.09 (m, 1H), 3.54 (q, *J* = 10 Hz, 1H), 3.39 (m, 2H), 2.57 (dd, *J*₁ = 18 Hz, *J*₂ = 6 Hz, 1H), 2.31 (m, 1H), 1.44 (m, 4H), 0.85 (t, *J* = 8 Hz, 3H), 0.795(t, *J* = 7.6 Hz, 3H).

[049]Exemplo 4. O ácido (3R, 4R, 5S)-4-(2-fluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.1 foi preparado de acordo com o procedimento dado no exemplo 3. LCMS (M+H): encontrado 345; calculado 345. ¹H NMR (DMSOA), 400 MHz: 8.16 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.64 (s, 1H), 4.80 (d, *J* = 47.3 Hz, 2H), 4.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.89 (q, *J* = 10.4 Hz, 1H), 3.71 (m, 1H), 2.67 (m, 1H), 2.25 (m, 1H), 1.42 (m, 4H), 0.85 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.78 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

[050]Exemplo 5. Mesilato de metila (3R, 4R, 5S)-4-(2-fluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato 1.2.CH₃SO₃H foi preparado de acordo com o procedimento dado no exemplo 1 usando m(3R, 4R, 5S)-4-amino-5-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de etila como o material de partida e ácido monofluoroacético como o agente de acilação. LCMS (M+H): encontrado 359; calculado 358.42.

[051]Exemplo 6. Mesilato de m(3R, 4R, 5S)-4-(2,2-difluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de etila 1.5.CH₃SO₃H foi

preparado de acordo com o procedimento dado no exemplo 1 usando m(3R, 4R, 5S)-4-amino-5-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxilato de etila como o material de partida e ácido difluoroacético como o agente de acilação. LCMS (M+H): encontrado 373; calculado 372.44.

[052]Exemplo 7. Preparação de composição farmacêutica na forma de tabletes.

[053]Amido (1600 mg), lactose triturada (1600 mg), talco (400 mg) e ácido (3R, 4R, 5S)-4-(2-fluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.1 (1000 mg) foram cuidadosamente misturados juntos e prensados em um tijolo. O tijolo preparado foi triturado em grânulos e passado através de peneiras, capturando grânulos de 14-16 de tamanho de malha. Os grânulos obtidos foram granulados em tabletes de forma adequados de 560 mg por peso cada.

[054]Exemplo 8. Preparação de composição farmacêutica em forma de cápsula.

[055]O ácido (3R, 4R, 5S)-4-(2-fluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.1 foi cuidadosamente misturado com um pó de lactose em uma proporção de 2:1^a mistura em pó preparada foi embalada em cápsulas gelatinosas de tamanho adequado por 300 mg cada .

[056]Exemplo 9. Preparação de composição farmacêutica em forma de injeção para injeções intramusculares, intraperitoneais ou subcutâneas. O ácido (3R, 4R, 5S)-4-(2-fluoroacetamido)-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)cicloexeno-1-carboxílico 1.1 (500 mg) foi misturado com clorobutanol (300 mg), propileno glicol (2 ml) e água injetável (100 mL). A solução resultante foi filtrada e disposta em ampolas de 1 mL que foram seladas.

[057]Exemplo 10. Determinação da atividade em direção de neuraminidase do vírus da influenza para os compostos de fórmula geral 1. Em experimentos preliminares diluições para as cepas de vírus alantóicos de influenza

A/Califórnia/07/09 (H1N1) e A/Aichi/2/69 (H3N2) assim como para os vírus resistentes da influenza A/Vladivostok/16/09 (H1N1) que foi preparado em cultura celular oseltamivir foram determinados. Para esse propósito em uma placa de 96 cavidades com um fundo arredondado por 60 µl de cada vírus diluído 2 vezes na mistura de tampão de reação (RBM, 50 mM MES, 5 mM CaCl₂, pH 6.5) foram preparados. A partir da referida placa por 50 µl de vírus diluído 2 vezes foi transferida em placas de 96 cavidades com fundo arredondado para medição de fluorescência (FluoroNunc, black, kat. No. 237105), então, um volume igual de tampão de substrato (SB, 12,5 mM de ácido 2'-(4-metilumbelliferil)-α-D-N-acetilneurâmico, Sigma, 40 mM de tampão de acetato pH = 5,8) foi adicionado aos mesmos. Como controle, foram usadas as cavidades de cada um dos quais por 50 µl de RBM foi adicionado em vez do vírus. Após a incubação da placa em agitação suave por 1 h a 37°, 100 µl de solução de interrupção (2.225 mL de 0.824M NaOH em 11,0 mL de etanol) foi adicionado a cada cavidade, que foi seguido por medição de fluorescência a $A_{ex} = 360$ nm e $A_{em} = 448$ nm usando o instrumento Varioskan Flach (Thermo Scientific). Para experimentos adicionais foram escolhidas as diluições de vírus, que corresponderam ao meio da seção linear da curva de influência: diluição de vírus contra valor de fluorescência. Para a determinação de atividade de anti-neuraminidase diluições dos compostos descritos e de seus análogos das fórmulas A2 e A4 (por 50 µl, preparados com RBM) foram adicionadas às cavidades de fileiras a partir de B a H (concentrações usadas - 0,03; 0.3; 3; 30; 300; 3000; 30000 nM - cada concentração em uma fileira) em placas de 96 cavidades com fundo chato para a medição de fluorescência (FluoroNunc, black, kat. No. 237105). As cavidades da fileria A foram usadas como o controle de vírus a qual em vez do vírus o volume igual (50 µl) de RBM foi adicionado. Então às cavidades correspondentes foram adicionadas por 50 µl das diluições de trabalho escolhidas (RBM) de cada vírus. Como o controle as cavidades foram usadas às quais em vez

do vírus o volume igual de RBM foi adicionado. Após agitação e incubação a temperatura ambiente por 45 min a todas as cavidades o volume igual de RBM foi adicionado. Após agitação e incubação repetida a placa a 37° por 1h solução de interrupção em uma quantidade de 100 pl foi adicionada a cada cavidade. Medição de fluorescências foi feita a $A_{ex} = 360$ nm e $A_{em} = 448$ nm com o uso do instrumento Varioskan Flach (Thermo Scientific). Todas as determinações foram realizadas pelo menos em duplicata (duas cavidades da placa). O percentual de inibição da atividade de neuraminidase por composto testado de fórmula geral 1 foi calculado pela fórmula: inibição % = $100 - (\text{SUF}_{\text{experimento}} - \text{SUF}_{\text{controle}} / \text{SUF}_{\text{controle de vírus na ausência do composto}} - \text{SUF}_{\text{controle}})$, onde SUF é uma unidade padrão de fluorescência). A concentração de um composto no qual o valor SUF foi reduzido por 50% foi tido como a concentração de inibição 50 (IC_{50}).

[058]Exemplo 11. Investigação de atividade anti-influenza de compostos de fórmula geral 1 (1.1., 1.3., 1.4 e 1.6) no modelo de influenza pneumonia em camundongos. Camundongos pré-pesados (fêmea não linear, peso médio 12-15 g) foram infectados com vírus da influenza A/Aichi/2/69 (H3N2) (10 LD_{50} em 50 pl) por meio de introdução intranasal sob anestesia leve com éter. A determinação de LD_{50} foi realizada em um experimento preliminar por meio da titulação do vírus alontóico usando o mesmo camundongo que o posteriormente foram usados no experimento principal. O esquema de tratamento a seguir foi usado: os animais foram injetados duas vezes: 24 h e 1 h antes da infecção, em 24 h após a infecção e então 1 vez ao dia durante os próximos 5 dias. Para a administração oral lima seringa de insulina descartável com uma agulha especial (lavagem) foi usada; o efeito das doses a seguir foi investigado: 25 mg/kg/dia de cada composto em um volume de 100 pl. como um composto de referência foi usado Tamiflu em doses que variaram a partir de 5 mg/kg/dia a 30 mg/kg/dia. Houveram 10 animais no grupo de "controle de vírus", assim como em cada grupo de animais "tratados com os compostos" de

fórmula geral 1 ou Tamiflu de formula A3. Os animais "tratados" e de controle foram observados diariamente; durante os primeiros 5 dias após a infecção os mesmos foram pesados a cada dia, e posteriormente - em um dia. A atividade quimioterapêutica dos compostos no modelo de influenza pneumonia em camundongos foi estimada pelo índice de proteção contra infecção viral letal e por perda de peso nos grupos de animais tratados com os compostos testados em comparação com o peso dos animais no grupo de controle. A redução ou o aumento de peso foi calculado para cada camundongo individualmente e expressos em percentual. O peso dos animais antes a infecção foi tido como 100%. Para todos os animais de um grupo o percentual médio de perda de peso assim como o ganho de peso foi determinado.

[059]Em um experimento preliminar a dose do vírus contendo 10 LD₅₀ em volume de 100 µl foi determinada. Então todos os animais do grupo foram infectados com a referida dose. A eficácia dos compostos de fórmula geral 1 no modelo de influenza pneumonia em camundongos foi estimada pelo número de animais que sobreviveram após a infecção por vírus, pelo tempo de vida médio e pelas mudanças de peso dos animais infectados.

[060]Foi observado que no 7 dia de observação todos os camundongos infectados com vírus e não tratados com os compostos testados (grupo de "controle de vírus") morreram.

[061]Os experimentos mostraram que na ocasião em que o último animal do grupo de "controle de vírus" morreu os animais tratados com compostos de fórmula geral 1 e Tamiflu ("tratado com os compostos") foram completamente prevenidos.

[062]A ação anti-influenza dos compostos testados de fórmula geral 1 e Tamiflu de formula A3 consiste em reduzir a perda de peso em grupos de "camundongos tratados " em comparação com o grupo de "controle de vírus". A perda de peso do animal é uma das implicações clínicas de influenza pneumonia. O

curso mais severo da doença é sempre acompanhado por perda de peso preponderante do animal. A pesagem foi realizada nos dias 1, 2, 3, 4 e 5 após a infecção, então a cada dia sim dia não até o 15 dia de observação. Foi observado que os animais do grupo de "controle de vírus" a maior parte da perda de peso foi observada no 5 dia após a infecção (cerca de 10%). De modo diferente com os animais do grupo de "controle de vírus" os animais tratados com os compostos de fórmula geral 1 e Tamiflu, em média, não tiveram perda de peso. Todos os animais do "grupo tratado" extensivamente e uniformemente ganharam peso iniciando a partir do 9 dia.

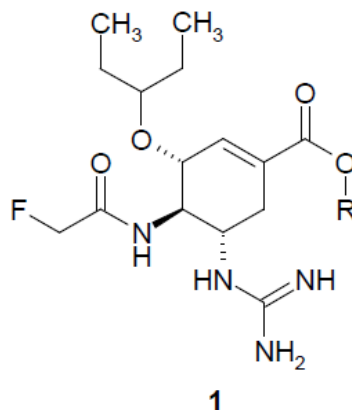
[063]Assim, a alta eficiência dos compostos de formulas 1.1, 1.3, 1.4, e 1.6 no tratamento de influenza pneumonia em camundongos foi mostrada.

Aplicabilidade Industrial

[064]A presente invenção pode ser usada na medicina e em veterinária.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto **CARACTERIZADO** pelo fato de que é ácido (3R,4R,5S)-4-fluoroacetamido-5-guanidino-3-(pentan-3-iloxi)ciclohexeno-1-carboxílico e ésteres do mesmo de fórmula geral 1 e sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos,



em que:

R representa hidrogênio, alquila C₁-C₃.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que representa:

ácido (3R,4R,5S)-5-guanidino-4-fluoroacetamido-3-(pentan-3-iloxi)ciclohexeno-1-carboxílico (1.1),

(3R,4R,5S)-5-guanidino-4-fluoroacetamido-3-(pentan-3-iloxi)ciclohexeno-1-carboxilato de metila (1.2),

(3R,4R,5S)-5-guanidino-4-fluoroacetamido-3-(pentan-3-iloxi)ciclohexeno-1-carboxilato de etila (1.3).

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que exibe atividade para a neuraminidase do vírus influenza.

4. Composição farmacêutica que exibe atividade antiviral e é pretendida para o tratamento de influenza e doenças causadas pelo vírus influenza, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto como definido na reivindicação 3 e pelo menos um excipiente farmaceuticamente aceitável.

5. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é na forma de tabletes, cápsulas, ou injeções dispostas em uma embalagem farmaceuticamente aceitável.

6. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para tratamento de pneumonia causada por vírus influenza.

7. Uso da composição farmacêutica, como definida na reivindicação 4 ou 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para profilaxia e tratamento de influenza e doenças causadas pelo vírus influenza.

8. Uso da composição farmacêutica, como definida na reivindicação 4 ou 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para o tratamento de pneumonia causada pelo vírus influenza.