



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

**(21) PI 1106509-5 A2**



(22) Data de Depósito: 25/10/2011  
(43) Data da Publicação: 19/11/2013  
(RPI 2237)

**(51) Int.Cl.:**  
**A61K 31/352**  
**A61K 31/381**  
**A61P 31/12**  
**A61P 31/14**

**(54) Título:** USO DAS PIRONOFATOQUINONA COMO ANTIVIRAL; COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO AS PIRANONAFTOQUINONAS; MEDICAMENTO CONTENDO AS PIRANONAFTOQUINONAS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR VIRUS DA DENGUE

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE - UFF, Universidade Federal do Rio de Janeiro Ufrj, Universidade Federal do Rio de Janeiro Ufrj

**(72) Inventor(es):** Amilcar Tanuri, David Rodrigues da Rocha, Emmerson Corrêa Brasil da Costa, Fernando de Carvalho da Silva, Luciana Barros de Arruda, Luciana Jesus da Costa, Raquel Amorim, Ronaldo da Silva Mohana Borges, Sabrina Baptista Ferreira, Vitor Francisco Ferreira

**(57) Resumo:** USO DAS PIRANONAFTOQUINONA COMO ANTIVIRAL; COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO AS PIRANONAFTOQUINONAS; MEDICAMENTO CONTENDO AS PIRANONAFTOQUINONAS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR VIRUS DA DENGUE Esta invenção descreve o uso das piranonaftoquinonas, assim como seus derivados, seus isômeros e seus sais como um agente antiviral, por inibir as enzimas ATPases viral. Além disso, também, faz parte desta invenção uma composição farmacêutica contendo as piranonaftoquinonas aqui descritas.

10  
5  
15

**USO DAS PIRANONAFTOQUINONA COMO ANTIVIRAL;  
COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO AS  
PIRANONAFTOQUINONAS; MEDICAMENTO CONTENDO AS  
PIRANONAFTOQUINONAS PARA TRATAMENTO DE  
INFECÇÕES CAUSADAS POR VIRUS DA DENGUE**

**Campo da Invenção**

A presente invenção refere-se ao uso de compostos piranonaftoquinônicos incluídos nas famílias de compostos das quinonas, seus sais, suas formas esteriosoméricas e suas misturas racêmicas como um agente antiviral.

A invenção destina-se a área médica por tratar-se de uma composição farmacêutica contendo os compostos piranonaftoquinônicos e o uso desta composição no tratamento de inflamações causadas por agentes virais em animais mamíferos humanos e não humanos.

15

**Antecedentes da Invenção**

As piranonaftoquinonas, um grupo de moléculas incluídas na família das quinonas, podem ser de origem natural ou sintética com múltiplas propriedades biológicas. Na natureza suas fontes mais frequentes são plantas superiores, artrópodes, fungos, líquens, bactérias, algas e vírus, conforme descrito por Thompson, R. H. (*Naturally Occuring Quinones IV: Recents Advances; Champman & Hall, Londres, 1997*), com funções biológicas múltiplas nos mais diversos ciclos metabólicos destes organismos (*Barreiro, E. J.; da Silva, J. E. M.; Fraga, C. A. M.; Noções Básicas do Metabolismo dos Fármacos; Quím. Nova 1996, 19, 641*). Um grande número de quinonas naturais possui aplicações biológicas práticas, algumas chegaram à produção industrial, como por exemplo, as vitaminas do tipo K, mitomicinas e antraciclina, entre outras conforme descrito (*M. N. da Silva, V. F. Ferreira, M. C. B. V. de Souza; Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados; Quím. Nova 2003, 26, 407*).

30

Algumas quinonas, como as do grupo da  $\beta$ -lapachona, são bons agentes bacterianos e antifúngicos como são relatadas (Guiraud, P.; Steiman, R.; Campos

Takaki, G.M.; Seigle-Murandi, E.; Simeon B.M.; *Comparison of antibacterial and Antifungal Activities of Lapachol and  $\beta$ -Lapachone*; *Planta Medica* **1994**, *60*, 373). Além disso, estudos comprovam que além de serem agentes bacterianos e antifúngicos, atuam no processo da prevenção da esquistossomose, por inibirem o processo de penetração das cercárias do *Schistosoma mansoni* em camundongos, como visto (Pinto, A. V.; Gilbert, B.; Pinto, M. C.; *In Vitro and In Vivo Evaluation of the toxicity of 1,4-Naphthoquinone and 1,2-Naphthoquinone Derivatives against Trypanosoma cruzi*; *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1978**, *72*, 523).

A ação das quinonas sobre os vírus está relacionada com a inibição das enzimas da família das polimerases, mais preciso das *DNA polimerases*, e também com a inibição da enzima *transcriptase reversa*. A ação sobre esta última enzima foi demonstrada sobre os vírus da mieloblastose aviária (AMV) e da leucemia murínica de Raucher(RLV). A ação inibitória da enzima DNA polimerase foi específica, pois comparada com outros inibidores, as quinonas apresentaram característica distintas e ineditismo em comparação com outros como relatado (Schuerch, A. R; Wehrli, W.;  *$\beta$ -Lapachone, an Inhibitor of Oncornavirus Reverse Transcriptase and Eukariotic DNA Polymerase- $\alpha$ : Inhibitory Effect, Thiol Dependence and Specificity*; *Eur. J. Biochem.* **1978**, *84*, 197) ou também relatado por outro grupo de pesquisadores (Chau, Y. P.; Shiah, S. G.; Don, M. J.; M. L. Kuo; *Involvement of Hydrogen Peroxide in Topoisomerase Inhibitor beta-Lapachone-Induced Apoptosis and Differentiation in Human Leukemia Cells*, *Free Radical Biol. Med.* **1998**, *24*, 660).

Outros estudos demonstram que mesmo em baixas concentrações essas substâncias foram capazes de induzirem à morte de células cancerosas da próstata humana, com características de processo apoptótico. Este novo modo de atuação biodinâmica vem tornar esta quinona um grande potencial como droga de valor para a quimioterapia de câncer, particularmente no câncer de próstata (Li, J. C.; Wang, C.; Pardee B. A.; *Induction of Apoptosis by  $\beta$ -Lapachone in Human Prostate Cancer Cells*; *Câncer Res.* **1995**, *55*, 3712).

Muitas patentes foram concedidas para o uso das lapachonas como quimioterápicos, porém, até o presente momento nenhuma patente apresentou o uso das lapachonas como agentes antivirais do vírus da dengue. A patente internacional **WO0977797** menciona um grupo de moléculas da família das lapachonas que são

utilizadas para tratamento do câncer de próstata em mamíferos. Tais moléculas induzem, de forma seletiva, a morte das células cancerosas do epitélio da próstata de mamíferos. Outro pedido internacional **WO96033988** diz respeito ao uso de lapachonas e seus análogos sozinhos ou com quimioterapia ou radioterapia para indução da morte programada de células cancerosas. Principal fator para essa induzir a morte nas células cancerosas, está no fato dessas lapachonas e seus análogos, quando associados com um tratamento quimioterápico ou radioterápico, são inibidores irreversíveis da enzima topoisomerase freando o processo de replicação celular.

10

### Descrição das Figuras

**Figura 1-** Curva dose-resposta da replicação do vírus da Dengue (sorotipo 2) na presença do composto LVM138. A produção viral para cada concentração do composto utilizada foi medida por PCR quantitativo e apresentada como porcentagem de inibição em relação ao controle viral sem a adição do composto. Para o cálculo do IC50% foi utilizada a regressão não linear de Hill.

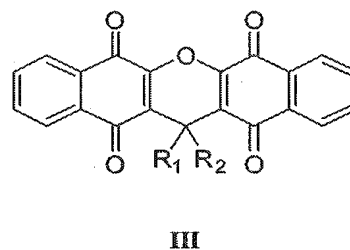
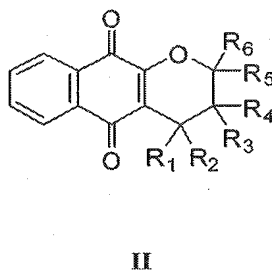
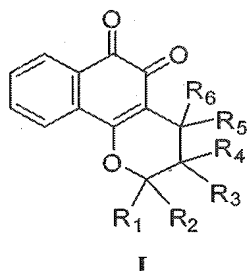
15

**Figura 2-** Curva dose-resposta da replicação do vírus da Dengue (sorotipo 2) na presença do composto LVM137. A produção viral para cada concentração do composto utilizada foi medida por PCR quantitativo e apresentada como porcentagem de inibição em relação ao controle viral sem a adição do composto. Para o cálculo do IC50% foi utilizada a regressão não linear de Hill.

20

### Sumário da Invenção

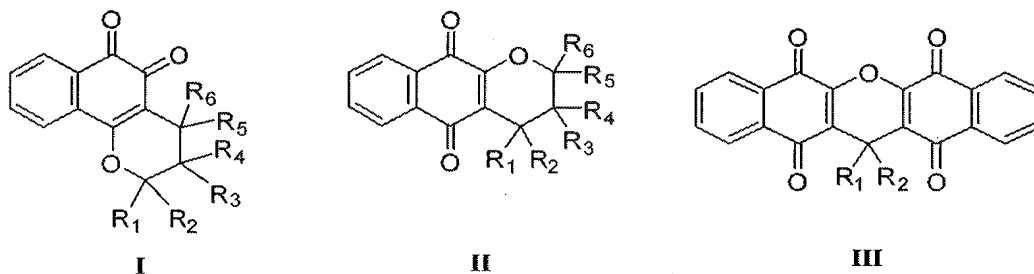
O principal objeto dessa invenção trata-se do uso das piranonaftoquinonas de fórmula geral I, II e III, assim como seus derivados, seus isômeros e seus sais como um agente antiviral,



25

O segundo objeto desta invenção trata-se da ação inibitória das pironaftoquinonas, de fórmula geral I, II e III, assim como seus derivados, seus isômeros e seus sais.

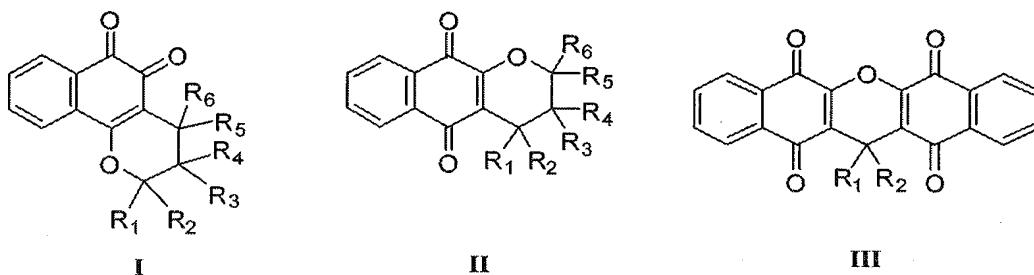
O último objeto desta invenção trata-se de uma composição farmacêutica que contém as pironaftoquinonas, de fórmula geral I, II e III, assim como seus derivados, seus isômeros e seus sais.



O último objeto desta invenção trata-se de um medicamento para tratamento das infecções causadas por vírus, em animais mamíferos humanos e não humanos.

### Descrição Detalhada da Invenção

O principal objeto desta invenção é o uso das pironaftoquinonas de fórmula geral I, II e III abaixo, assim como seus derivados, seus isômeros e sais, como agente contra infecções causadas por vírus em animais mamíferos humanos e não humanos.



Os radicais R1, R2, R3, R4, R5 e R6 das fórmulas moleculares acima, podem apresentar como substituintes grupos funcionais conjugados, ou independentes, alquílicos variados, dos tipos lineares, cíclicos, arílicos simples. Ainda podem apresentar grupos funcionalizados como amínicos, guanidínicos, sulfâmico, hidroxílicos, ésteres, éteres, tioésteres, tioéteres, halogênios, sendo preferencialmente, os grupos substituintes apresentados na tabela abaixo.

<b>R1</b>	4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> , 4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , CH <sub>3</sub> , 4CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> , 4-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , Tiofenil, H, OEt
<b>R2</b>	H, CH <sub>3</sub> , 4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , OEt
<b>R3</b>	H, Br
<b>R4</b>	H, CH <sub>3</sub> , 4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , OEt
<b>R5</b>	4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , Tiofenil, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> , H, 4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , CH <sub>3</sub>
<b>R6</b>	H, OEt, 4-F-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> , CH <sub>3</sub> , 4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> , 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , OBU, Os-Br, OCH <sub>3</sub> , 2,4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> , 4Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , 4-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>

As piranonaftoquinonas desta invenção são usadas como agentes contra infecções causadas por vírus em animais mamíferos humanos e não humanos. Para fins dessa invenção, as piranonaftoquinonas são agentes contra infecções causadas por qualquer tipo de vírus, porém, sendo preferencialmente infecções causadas por vírus da família *flaviviridae*. Sendo as piranonaftoquinonas agentes contra infecções causadas por vírus da Hepatite A, hepatite B, hepatite C, contra infecções causadas por vírus da febre amarela, vírus do Oeste do Nilo e outros causadores de encefalite, vírus da diarreia bovina, vírus da febre suína. Porém, para fins desta invenção, as piranonaftoquinonas são agentes contra infecções causadas preferencialmente por vírus da dengue e seus diferentes sorotipos.

As piranonaftoquinonas, já descritas anteriormente, de fórmula geral I, II e III, assim como seus derivados, seus isômeros e sais são usadas para preparação de uma composição farmacêutica destinada para o tratamento de infecções causadas por vírus da família *flaviviridae*, principalmente, para infecções causadas por vírus da dengue e suas isoformas.

A eficácia no tratamento das pironaftoquinonas já descrita está no fato de assumirem uma ação inibitória sobre as enzimas ATPase dos vírus, principalmente sobre a enzima NS3 dos vírus da família *flaviviridae*.

5 Uma composição farmacêutica pode conter as pironaftoquinonas de fórmula geral (I), (II), (III), assim como seus derivados, seus isômeros e sais. Além dessas pironaftoquinonas, a composição farmacêutica apresenta substâncias inativas, como corantes, dispersantes, edulcorantes, emolientes, antioxidantes, conservantes, estabilizadores de pH, flavorizantes e outros conhecidos por um técnico na arte.

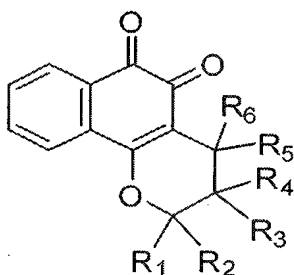
10 As substâncias ativas nessa composição são as pironaftoquinonas de fórmula geral I, II e III já descritas anteriormente, assim como seus derivados, seus isômeros e sais. Tais substâncias devem apresentar uma quantidade farmacologicamente aceitável, que para fins desta invenção compreende uma faixa 5 a 100µM, sendo preferencialmente 12 a 50µM.

15 A composição farmacêutica aqui descrita é utilizada para a preparação de um medicamento utilizado no tratamento de infecções em animais mamíferos humanos e não humanos, causadas por vírus, sendo este da família *flaviviridae*, sendo preferencialmente o vírus da dengue e seus diferentes sorotipos. Esse medicamento apresenta as pironaftoquinonas, já descritas anteriormente, pode ainda apresentar seus derivados ou seus isômeros ou seus sais.

20 O medicamento desta invenção pode estar na forma de cápsula, comprimido de liberação lenta, comprimidos de liberação controlada, pastilhas, xaropes, formas farmacêuticas encapsuladas em sistemas de nanopartículas ou micropartículas, formas farmacêuticas injetáveis.

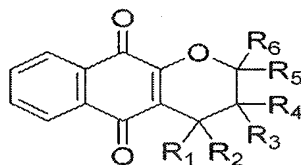
25 Os seguintes exemplos experimentais servem para ilustrar a presente invenção sem, contudo, limitar o escopo da invenção apresentada. As nomenclaturas dadas nos experimentos as pironaftoquinonas, possuem finalidade ilustrativa, todas estão compreendidas dentro das fórmulas gerais de pironaftoquinonas, que são objetos da patente, assim como seus radicais.

30



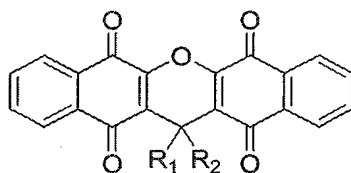
I

- LVM0139,  $R_1 = 4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = 4\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ,  $R_6 = \text{H}$   
 LVM0142,  $R_1 = 4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = 2\text{-tiofenil}$ ,  $R_6 = \text{H}$   
 LVM0144,  $R_1 = 4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = \text{C}_6\text{H}_5$ ,  $R_6 = \text{H}$   
 LVM0207,  $R_1 = 4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$   
 LVM0208,  $R_1 = \text{C}_6\text{H}_5$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$   
 LVM0209,  $R_1 = 4\text{-F-C}_6\text{H}_4$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$   
 LVM0213,  $R_1 = 4\text{-Cl-C}_6\text{H}_4$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$   
 LVM0226,  $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ ,  $R_3 = \text{Br}$ ,  $R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$   
 LVM0228,  $R_1 = \text{C}_6\text{H}_5$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$ ,  $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$   
 LVM0229,  $R_1 = 2,4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_3$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$   
 LVM0230,  $R_1 = 4\text{-OCH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$



II

- LVM0137,  $R_1 = 4\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = 4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ ,  $R_6 = \text{H}$ . Isômero *Syn*  
 LVM0138,  $R_1 = 4\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = 4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ ,  $R_6 = \text{H}$ . Isômero *Anti*  
 LVM0140,  $R_1 = 2\text{-tiofenil}$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = 4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ ,  $R_6 = \text{H}$ . Isômero *Syn*  
 LVM0141,  $R_1 = 2\text{-tiofenil}$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = 4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ ,  $R_6 = \text{H}$ . Isômero *Anti*  
 LVM0143,  $R_1 = \text{C}_6\text{H}_5$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = 4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ ,  $R_6 = \text{H}$   
 LVM0201,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ ,  $R_6 = \text{OEt}$   
 LVM0202,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ ,  $R_6 = 4\text{-F-C}_6\text{H}_4$   
 LVM0203,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = \text{CH}_3$ ,  $R_6 = \text{C}_6\text{H}_5$   
 LVM0204,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = R_6 = \text{CH}_3$   
 LVM0205,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ ,  $R_6 = 4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$   
 LVM0210,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ ,  $R_6 = 4\text{-Cl-C}_6\text{H}_4$   
 LVM0211,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ ,  $R_6 = \text{OBu}$   
 LVM0212,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ ,  $R_6 = \text{Os-Bu}$   
 LVM0215,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ,  $R_5 = \text{CH}_3$ ,  $R_6 = \text{OCH}_3$   
 LVM0219,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ ,  $R_6 = 2,4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_3$   
 LVM0220,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ ,  $R_6 = 4\text{-Br-C}_6\text{H}_4$   
 LVM0224,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ ,  $R_6 = 4\text{-OCH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$   
 LVM0225,  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ ,  $R_6 = \text{C}_6\text{H}_5$



III

LVM0145,  $R_1 = C_6H_5$ ,  $R_2 = H$   
 LVM0146,  $R_1 = 4-NO_2C_6H_4$ ,  $R_2 = H$

5

### Exemplo 1) Ensaaios Inibidores do Vírus da Dengue

10 Para realização dos testes das substâncias I a III frente ao vírus da dengue, comparativos com a Ribavirina, se utilizou um método de triagem onde células VERO eram colocadas em contato com estoques do vírus da dengue, em uma proporção de uma partícula viral infecciosa para 10 células por uma hora para a adsorção e entrada das partículas virais nas células. Após este tempo as células eram lavadas com solução

15 salina e meio de cultura contendo 100  $\mu M$  de cada um dos compostos e 200  $\mu M$  de Ribavirina como controle positivo. Estas culturas eram incubadas a 37 °C por 72 h. Após este tempo uma alíquota do meio livre de células (sobrenadante) era coletada e processado para extração de RNA, seguido de transcrição reversa e reação de PCR em Tempo-Real utilizando iniciadores e sonda específicos para dengue do tipo 2. Aqueles

20 compostos que mostravam inibição de pelo menos 10X na quantidade de RNA viral (progênie viral liberada no sobrenadante) em relação ao controle sem droga, seguiam para um ensaio de dose-resposta. Para este ensaio o procedimento era equivalente ao descrito acima, sendo que eram adicionadas diferentes concentrações dos compostos. Os resultados deste ensaio serviram para calcular a maior e menor porcentagem de inibição

25 para cada composto. Desta forma, para as naftoquinonas do tipo II, LVM0137 e LVM0138 obteve-se, respectivamente 99 > 99,99% (nas concentrações de 25 e 12,5  $\mu M$ , respectivamente).

**Exemplo2) Ensaio de replicação viral.**

5

Afim de confirmar o resultado do exemplo 1, outros dois ensaios de medida da replicação viral foram realizados (TCID<sub>50</sub> % e Ensaio de redução de plaque viral). No ensaio de TCID<sub>50</sub> %, células VERO eram colocadas em contato com estoques do vírus da dengue. Após este tempo as células eram lavadas e meio de cultura contendo 50 µM de cada um dos compostos e 200 µM de Ribavirina era adicionado como controle positivo do ensaio. Estas culturas eram incubadas a 37 °C por 72 h. Após este tempo o sobrenadante era coletado e utilizado para infecção de nova cultura de células VERO em sextuplicata. O efeito citopático viral era observado diariamente e anotados os poços que apresentavam 50 % de efeito em relação ao controle sem vírus. Estes dados eram utilizados para o cálculo do título viral conforme descrito por Reed e Munch. Observou-se inibição de mais de 99 % do título viral para ambos os compostos, conforme descrito (tabela abaixo). O ensaio de redução de plaque viral é realizado a partir da infecção de monocamadas de células Vero em Placas de 6 poços, com cerca de 50 unidades infecciosas virais. Após a etapa de adsorção as monocamadas são lavadas e é acrescentado meio semi-sólido acrescido de diferentes concentrações dos compostos. As células são cultivadas por sete dias. Após este período as células são fixadas e coradas com o corante cristal violeta. As plaques virais são contadas manualmente. Calcula-se a porcentagem de inibição em relação ao controle de vírus. Para o composto **LVM0137** houve inibição de 50 % do número de plaques na concentração de 6,2 µM e para o composto **LVM0138** houve inibição de mais de 50 % na concentração de 3,1 µM, conforme demonstrado na tabela abaixo.

30

<b>Piranoftoquinon a</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>TCID50% (Vero)</b>	<b>Formação de plaque</b>
<b>LVM0137</b>	<b>99 (25 µM) 90 (6,2 µM)</b>	<b>99,83 (50 µM)</b>	<b>50 (6,2 µM)</b>
<b>LVM0138</b>	<b>&gt; 99,99 (12,5 µM) 90 (3,1 µM)</b>	<b>&gt; 99,99 (50 µM)</b>	<b>50 (&lt;3,1 µM)</b>
<b>LVM0140</b>	<b>Citotóxica</b>	<b>NT</b>	<b>NT</b>
<b>LVM0141</b>	<b>Citotóxica</b>	<b>NT</b>	<b>NT</b>
<b>LVM0142</b>	<b>Citotóxica</b>	<b>NT</b>	<b>NT</b>
<b>LVM0143</b>	<b>Citotóxica</b>	<b>NT</b>	<b>NT</b>
<b>LVM0144</b>	<b>0</b>	<b>NT</b>	<b>NT</b>
<b>LVM0145</b>	<b>0</b>	<b>NT</b>	<b>NT</b>
<b>LVM0146</b>	<b>0</b>	<b>NT</b>	<b>NT*</b>

**NT- Compostos não testados em células Vero por causa da alta citotoxicidade.**

5

10

15

**Exemplo 3 ) teste de inibição das enzimas ATPases**

Para a realização da triagem dos compostos contra a atividade ATPásica, foi utilizado o ensaio colorimétrico de Fiske, C. H.; Subbarow, Y.; “The Nature of the inorganic phosphate in voluntary muscle”; *Science* 1927, 65, 401-403, que mede a extensão de hidrólise do ATP para ADP, à partir da quantidade de Pi (fosfato inorgânico) liberada na reação. A triagem dos compostos foi realizada utilizando 0,6  $\mu$ M de NS3 íntegra em reações contendo 40 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM de DTT, 100 mM de KCl, 5 mM de  $MgCl_2$  e 1 mM de ATP. A enzima foi pré-incubada com os compostos por 10 minutos a 30 °C, e a atividade cinética foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP seguido de incubação a 30 °C por 15 minutos. As densidades óticas das amostras foram medidas a 660 nm no EspectraMax M2e (Molecular Devices). Os parâmetros cinéticos de velocidade inicial ( $V_i$ ), foram calculados por regressões linear e/ou polinomial de 3ª ordem utilizando-se o programa SigmaPlot versão 10.0 e Excel 2007, respectivamente, sendo os valores de  $V_i$  convertidos em atividade relativa (%). Os compostos que apresentaram a média da atividade relativa <90% foram convertidos para percentual de inibição e selecionados para a testagem *in vivo*.

Foram testados as piranonaftoquinonas abaixo contra a atividade ATPase da NS3 íntegra do DENV-2. Nessa triagem inicial foram identificados 14 compostos capazes de inibir a atividade ATPásica da NS3 íntegra, sendo o composto 2TIOPMeB (LVM142) o que apresentou maior efeito inibitório.

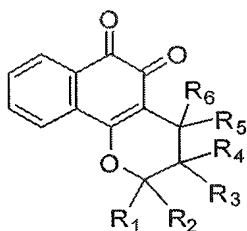
25

30

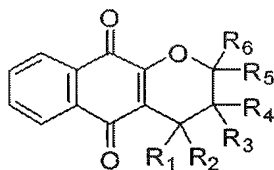
<b>Código</b>	<b>Nome do inibidor</b>	<b>Concentração testada (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Percentual de inibição (média <math>\pm</math> DP)</b>
LVM0137	PNO2PMeSA	50	<b>19<math>\pm</math>10%</b>
LVM0138	PNO2PMeAA	50	<b>20<math>\pm</math>6%</b>
LVM0139	PNO2PMeB	50	<b>33<math>\pm</math>10%</b>
LVM0140	2TIOPMeSA	50	<b>14<math>\pm</math>4%</b>
LVM0141	2TIOPMeAA	50	<b>17<math>\pm</math>7%</b>
LVM0142	2TIOPMeB	50	<b>52<math>\pm</math>6%</b>
LVM0143	PhPMeA	50	<b>16<math>\pm</math>6%</b>
LVM0144	PhPMeB	50	<b>22<math>\pm</math>14%</b>
LVM0145	PhXANT	50	<b>38<math>\pm</math>26%</b>
LVM0146	PNO2XANT	50	<b>18<math>\pm</math>10%</b>
LVM0201	$\alpha$ -PETOXIR	50	Não inibiu
LVM0202	$\alpha$ -PFXIR	50	Não inibiu
LVM0203	$\alpha$ -MESTIR	50	Não inibiu
LVM0204	$\alpha$ -LAP	50	Não inibiu
LVM0205	$\alpha$ -PMEXIR	50	Não inibiu
LVM0206	$\alpha$ -CICLOHEX	50	Não inibiu
LVM0207	$\alpha$ -PMEXIR	50	Não inibiu
LVM0208	$\beta$ -XIRENO	50	Não inibiu
LVM0209	$\alpha$ -PFXIR	50	Não inibiu
LVM0210	$\alpha$ -PCLXIR	50	Não inibiu
LVM0211	$\alpha$ -PROP	50	Não inibiu
LVM0212	$\alpha$ -ISOPXIR	50	Não inibiu
LVM0213	CLBELA	50	Não inibiu
LVM0214	$\alpha$ -CICLOHEX	50	Não inibiu
LVM0215	METOPROPE	50	Não inibiu
LVM0216	PAMEBE	50	Não inibiu
LVM0217	$\alpha$ -FURANO	50	Não inibiu
LVM0219	LAUS24EA	50	Não inibiu
LVM0250	$\alpha$ -PBRESTIR	50	Não inibiu
LVM0221	LAUS23FB	50	<b>19<math>\pm</math>5%</b>
LVM0222	DIIDPIR	50	Não inibiu
LVM0223	LAUSFACETI	50	Não inibiu
LVM0224	$\alpha$ -POMEESTI	50	Não inibiu
LVM0225	$\alpha$ -PXIRE	50	Não inibiu
LVM0226	$\beta$ -BRLAPAC	50	Não inibiu
LVM0227	DIIDETOPIR	50	<b>30<math>\pm</math>28%</b>
LVM0228	$\alpha$ -MEESTBET	50	Não inibiu
LVM0229	LAUS24EB	50	<b>27<math>\pm</math>20%</b>
LVM0230	$\beta$ -POMEESTIR	50	<b>19<math>\pm</math>11%</b>

## REIVINDICAÇÕES

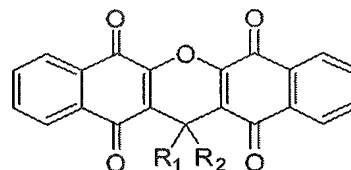
- 1) Uso das piranonaftoquinonas de fórmula geral I, II e III, assim como seus derivados, seus isômeros, seus sais são caracterizados por serem agentes contra infecções causadas por vírus em animais mamíferos humanos e não humanos.



I



II



III

5

10

- 2) Uso das piranonaftoquinonas de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por apresentarem como substituintes nos radicais R1, R2, R3, R4, R5 e R6 grupos alquílicos variados, dos tipos lineares, cíclicos, arílicos simples. Ainda podem apresentar grupos funcionalizados como amínicos, guanidínicos, sulfâmico, hidroxílicos, ésteres, éteres, tioésteres, tioéteres e halogênios.

15

- 3) Uso das piranonaftoquinonas de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelos radicais R1, R2, R3, R4, R5 e R6, serem preferencialmente

R1	4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> , 4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , CH <sub>3</sub> , 4CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> , 4-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , 4-NO <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , Tiofenil, H, OEt
R2	H, CH <sub>3</sub> , 4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , OEt
R3	H, Br
R4	H, CH <sub>3</sub> , 4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , OEt
R5	4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , Tiofenil, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> , H, 4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , CH <sub>3</sub>

R6	H, OEt, 4-F-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> , CH <sub>3</sub> , 4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> , 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , OBU, Os-Br, OCH <sub>3</sub> , 2,4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> , 4Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , 4-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
----	---

- 5 4) Composição farmacêutica caracterizada por conter as piranonaftoquinonas de fórmula geral (I), (II), (III), assim como seus derivados, seus isômeros e sais, destinada para o tratamento de infecções causadas por vírus da família *flaviviridae*, principalmente, para infecções causadas por vírus da dengue e suas isoformas.
- 10 5) Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por conter além das piranonaftoquinonas, outras substâncias inativas como corantes, dispersantes, edulcorantes, emolientes, antioxidantes, conservantes, estabilizadores de pH, flavorizantes e outros conhecidos por um técnico na arte.
- 15 6) Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por conter uma quantidade farmacêuticamente aceitável das piranonaftoquinonas entre 5 a 100µM, sendo preferencialmente 12 a 50µM.
- 20 7) Medicamento que contém as piranonaftoquinonas de fórmula geral (I), (II), (III) caracterizado por ser usado no tratamento de infecções em animais mamíferos humanos e não humanos, causados por vírus, sendo este da família *flaviviridae*, sendo preferencialmente o vírus da dengue e seus diferentes sorotipos.
- 25 8) Medicamento de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por estar nas seguintes fórmulas farmacêuticas cápsula, comprimido de liberação lenta, comprimidos de liberação controlada, pastilhas, xaropes, formas farmacêuticas encapsuladas em sistemas de nanopartículas ou micropartículas, formas farmacêuticas injetáveis.

FIGURAS

FIGURA 1

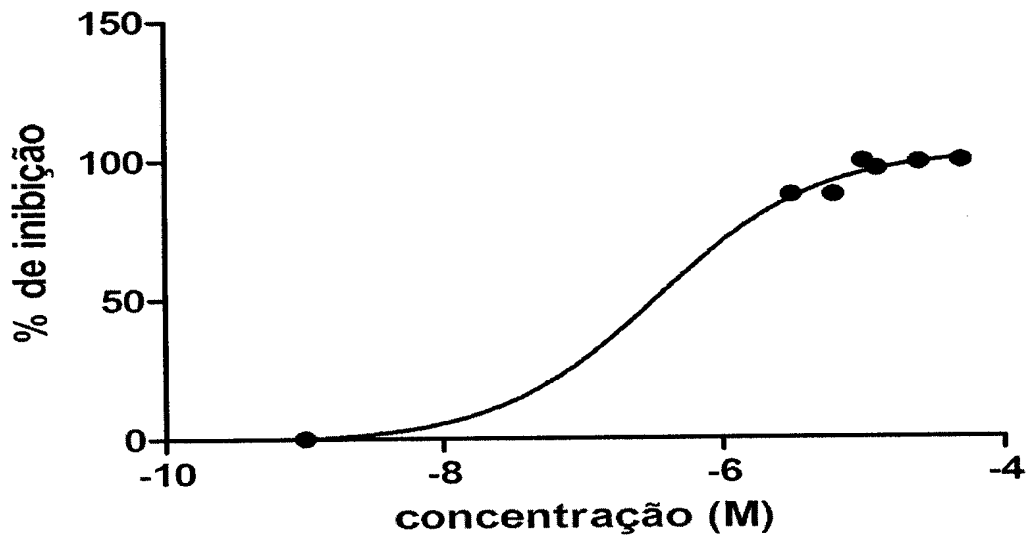
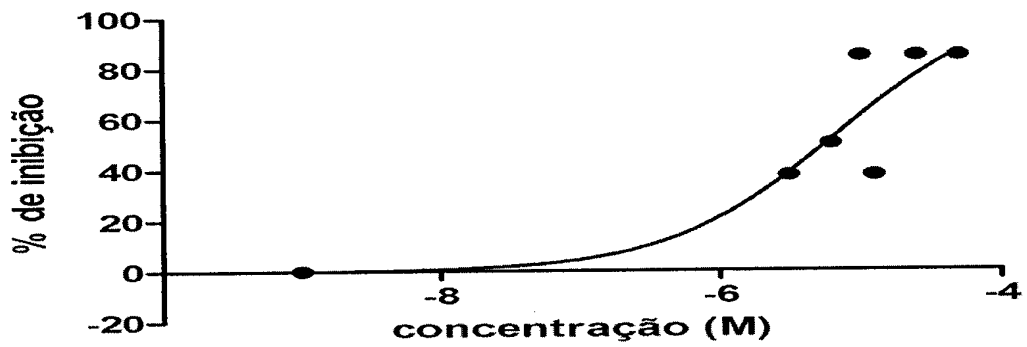


FIGURA 2



**RESUMO**

**USO DAS PIRANONAFTOQUINONA COMO ANTIVIRAL; COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO AS PIRANONAFTOQUINONAS; MEDICAMENTO CONTENDO AS PIRANONAFTOQUINONAS PARA**  
5 **TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR VIRUS DA DENGUE**

Esta invenção descreve o uso das piranonaftoquinonas, assim como seus derivados, seus isômeros e seus sais como um agente antiviral, por inibir as enzimas ATPases viral. Além disso, também, faz parte desta  
10 invenção uma composição farmacêutica contendo as piranonaftoquinonas aqui descritas.