



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

**(11) PI 0806461-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 11/01/2008**

**(45) Data de Concessão: 03/09/2019**

---

**(54) Título:** MONOSSAL DO ÁCIDO MALEICO, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA A PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DAS INFECÇÕES VIRAIS

**(51) Int.Cl.:** A61K 31/52.

**(30) Prioridade Unionista:** 17/01/2007 KR 10-2007-0005269.

**(73) Titular(es):** LG CHEM, LTD.

**(72) Inventor(es):** JI HYE LEE; KI SOOK PARK; JUNG MIN YUN.

**(86) Pedido PCT:** PCT KR2008000194 de 11/01/2008

**(87) Publicação PCT:** WO 2008/088147 de 24/07/2008

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 09/07/2009

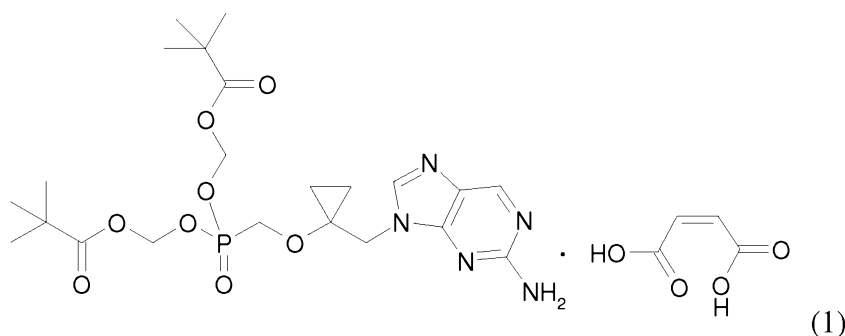
**(57) Resumo:** COMPOSTO, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA A PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DAS INFECÇÕES VIRAIS. A presente invenção diz respeito a monossal do ácido 3-[[[1- [(2-arnino-9H-purin-9-il)metil] ciclopropil }óxi)metil] -8,8 - dimetil-3 ,7-dioxo- 2,4,6-trioxa-3 5 -fosfanon-1-il-pivalato maleico e composição farmacêutica contendo o mesmo.

“MONOSSAL DO ÁCIDO MALEICO, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA A PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DAS INFECÇÕES VIRAIS”

CAMPO DA TÉCNICA

[1] A presente invenção diz respeito a monossal do ácido 3- [(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil}óxi)metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato maleico da seguinte fórmula (1), e composição farmacêutica contendo o mesmo:

**[Química 1]**



FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

[2] A base livre que corresponde ao composto acima da fórmula (1), isto é, o composto que não é combinado com um ácido, é um novo composto antivírus que foi divulgado na Patente Coreana N°. 0441638 e W002/057288. Esta base livre é correntemente sofrida por estudos clínicos. Este tem um efeito antivírus potencial, particularmente contra o vírus de Hepatite B (HBV) e o vírus de imunodeficiência humana (HIV). Entretanto, esta base livre é instável sob o calor e umidade, que apresentam problemas quando desenvolver o composto como um produto de medicamento farmacêutico.

DESCOBERTA DA INVENÇÃO

[3] Os presentes inventores têm buscado várias maneiras para resolver os problemas com uma base livre. Como um resultado de sua busca, estes tem revelado que o monossal do ácido maleico da fórmula (1) desta invenção pode ter uma característica cristalina e excelente solubilidade, não é

higroscópia, e é altamente estável sob o calor.

[4] Deste modo, o propósito da presente invenção é fornecer o monossal do ácido maleico da fórmula (1).

[5] A presente invenção ainda fornece uma composição farmacêutica que compreende o monossal do ácido maleico da fórmula (1) como um ingrediente ativo.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[6] A Figura 1 mostra o padrão de difração do raio X em pó de uma forma de realização de monossal do ácido 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil)óxi)metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato maleico da presente invenção.

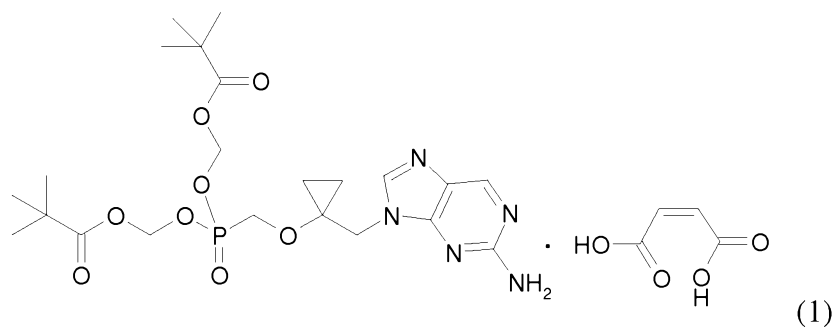
[7] A Figura 2 mostra um resultado a partir da calorimetria de varredura diferencial de uma forma de realização do monossal do ácido 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil)óxi)metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato maleico da presente invenção.

[8] A Figura 3 mostra uma mudança de teor (%) durante o tempo e temperatura da base livre de 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil)óxi)metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato e uma forma de realização deste monossal do ácido maleico.

[9] A Figura 4 mostra uma atividade *in vitro* e resultado da citotoxicidade contra o vírus de Hepatite B da base livre de 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil)óxi)metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato e uma forma de realização deste monossal do ácido maleico.

#### MELHOR MODO PARA O REALIZAMENTO DA INVENÇÃO

[10] A presente invenção fornece o monossal do ácido 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil)óxi)metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato maleico da seguinte fórmula (1):

**[Química 2]**

[11] A não ser de outra maneira indicada na presente especificação, o termo " monossal do ácido maleico da fórmula (1)" significa um sal em que 1 equivalente da base livre correspondente [isto é, a base livre do monossal do ácido maleico da fórmula (1)] é combinado com 0,7 a 1,3 equivalente, preferivelmente 0,9 a 1,1 equivalente, mais preferivelmente 1 equivalente do ácido maleico.

[12] O monossal do ácido maleico da fórmula (1) pode ser preparado por um processo que compreende uma etapa de mistura de uma base livre e ácido maleico com um solvente orgânico, que é um processo que é bem conhecido na técnica (ver *Pharmaceutical Sais*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Donald C. Monkhouse et al, 1, 66(1), 1977 e *Sal selection for basic drugs*, *International Journal of Pharmaceutics*, Ph>hp L. Gould, 201, 33, 1986).

[13] Especificamente, o monossal do ácido maleico da fórmula (1) pode ser preparado pela dissolução da base livre em um solvente orgânico na razão a partir de 50 a 1.000 mg da base livre por ml de solvente, adicionando (preferivelmente, em gotas) ácido maleico da quantidade mencionada abaixo também, e agitação para produzir um sólido. O solvente orgânico pode ser selecionado sem restrição a partir dos solventes orgânicos convencionais que pode ser usado para a formação de um sal, mas preferivelmente selecionado a partir do grupo que consiste de acetato de etila, acetato de butila, acetonitrila, clorofórmio, acetona, metanol, etanol, propanol, isopropanol, tetraidrofurano, metil etil cetona, acetato de isopropila, dioxano, n-hexano, ciclo-hexano, éter

dietílico, éter t-butílico e misturas deste. A quantidade do ácido maleico a ser adicionado não é limitado a uma quantidade particular, mas preferivelmente a quantidade é 0,7 a 1,3 equivalente mais preferivelmente 0,9 a 1,2 equivalente e mais preferivelmente 1,0 a 1,1 equivalente com relação ao 1 equivalente da base livre. O sólido resultante sofre os processos de trabalhos convencionais tal como filtração, lavagem, secagem, etc.

[14] O monossal do ácido maleico da fórmula (1) preparado pelo processo acima é preferivelmente obtido como um sólido cristalino. Que é, o monossal do ácido maleico da presente invenção e pode ter uma estrutura cristalina característica que mostra os picos significantes a  $2\Theta = 5,6, 12,1, 17,5$  e  $20,9^\circ$  ( $2\Theta, \pm 0,2$ ) no padrão de difração do raio X em pó. Mais preferivelmente, o monossal do ácido maleico tem a estrutura cristalina que mostra os picos característicos a  $2\Theta = 5,6, 10,0, 12,1, 13,1, 17,5, 18,8, 20,9, 22,8, 24,3, 25,1$  e  $26,5^\circ$  ( $2\Theta, \pm 0,2$ ) no padrão de difração do raio X em pó (ver Figura 1). Esta forma de cristal mostra um pico de começo endotérmico do ponto de fusão a  $129^\circ\text{C}$  na calorimetria de varredura diferencial ( $10^\circ\text{C}/\text{minuto}$ ) (ver Figura 2).

[15] O monossal do ácido maleico da fórmula (1) não é higroscópica, e tem maior solubilidade e maior estabilidade sob o calor e umidade do que a base livre correspondente ou outros sais destes. Este também é na forma de sólido cristalino. Portanto, as propriedades fisicoquímicas do modelo de monossal do ácido maleico da fórmula (1) este será adequado desenvolver como um produto de medicamento farmacêutico.

[16] Como explicado mais em detalhes nos experimentos seguintes, a base livre desenvolve como um agente antivírus é altamente instável sob o calor e umidade, e deste modo, este é difícil ser usado as como um material bruto para o produto do medicamento farmacêutico. Consequentemente, existe a dificuldade no desenvolvimento da base livre como uma substância de medicamento. Os presentes inventores experimentam resolver os

problemas com uma base livre pela preparação de diversos grupos de sais aceitáveis farmacologicamente. Durante as preparações, este foi descoberto que some dos sais não pode facilmente ser obtido como um sólido cristalino. Os presentes inventores sucedidos nos sais obtidos com ácido maleico, ácido p-toluenossulfônico, ácido metanossulfônico, ácido naftalenossulfônico, ou ácido etanossulfônico como sólidos cristalinos. Os inventores realizaram testes de estabilidade térmica em condição de estresse por uma base livre e diversos sais obtidos como os sólidos cristalinos. Os testes mostraram que a base livre e os sais exceto o monossal do ácido maleico são muito instáveis sob o calor. O monossal do ácido maleico permaneceu quase intacto sem a decomposição por até 8 semanas sob a alta temperatura de 60°C, considerando uma base livre decomposto inteiramente com apenas cerca de 1% de remanescente após 8 semanas. Os outros sais cristalinos quase decomposto dentro de 2 semanas. Deste modo, o monossal do ácido maleico da presente invenção exibe a estabilidade de calor superior comparado a uma base livre ou outros sais orgânicos. Ainda, este não foi fácil para obter os sólidos cristalinos a partir de outros sais, mas o sólido cristalino do monossal do ácido maleico pode ser facilmente obtido de acordo com o processo acima. Que é, o monossal do ácido maleico que deve ser rapidamente aplicado para a produção em uma escala industrial.

[17] O monossal do ácido maleico da presente invenção também exibe a solubilidade melhorada dependendo dos níveis de pH. Especificamente, a base livre mostra alta solubilidade de 36 mg/ml ou mais em um baixo pH de 2 ou menos, mas a solubilidade drasticamente diminui como o pH crescente, isto é, uma solubilidade de 1 mg/ml ou menos a pH 6 ou mais. Devido as tais características, a base livre é inteiramente dissolvido e absorvido no estômago, mas existe o risco que o composto pode se precipitar como este movimento aos órgãos internos que tem um maior nível de pH. Entretanto, o monossal do ácido maleico da presente invenção exibe a

solubilidade relativamente constante de cerca de 7 a 3 mg/ml na faixa do pH de 2 a 6,5. Em fato, a solubilidade do monossal do ácido maleico em pH 6,5 é três vezes maior do que a base livre. Esta sugere que, no aspecto da eficácia médica, o monossal do ácido maleico será absorvido mais no corpo, e o risco da precipitação após a absorção pode ser excluído ainda com a mudança de pH. Que é, o monossal do ácido maleico da presente invenção exibe solubilidade superior ainda em níveis diferentes de pH a uma base livre.

[18] Com base nas propriedades fisiológicas, físicos acima, existem grandes vantagens no uso do monossal do ácido maleico da presente invenção para a prevenção ou tratamento das infecções virais. Deste modo, a presente invenção fornece a composição farmacêutica para a prevenção ou tratamento da infecção viral, que compreende uma quantidade eficaz terapêuticamente do monossal do ácido maleico da fórmula (1) e um carreador farmacêuticamente aceitável. O vírus será mais eficazmente tratado pela presente invenção é a partir do grupo que consiste de HBV e HIV.

[19] A administração oral é a forma mais preferível da administração da composição farmacêutica que compreende o monossal do ácido maleico da fórmula (1) como o ingrediente ativo, especialmente em um tablete ou cápsula.

[20] A "quantidade terapêuticamente eficaz" do monossal do ácido maleico da fórmula (1) como um ingrediente ativo varia com sexo, idade e dita do paciente individual, a gravidade da doença a ser tratada, etc., e pode ser facilmente determinada clinicamente por uma pessoa habilitada na técnica.

[21] A Patente Coreana N°. 0441638 e WO02/057288, cada um de que divulga uma base livre correspondente e efeito deste, pode ser referido a pelo efeito farmacológico, faixa de dosagem eficaz, método da administração da composição farmacêutica que compreende o monossal do ácido maleico da fórmula (1) como um ingrediente ativo.

[22] A presente invenção é mais especificamente explicado pelos

seguintes exemplos e experimentos que são pretendidos ilustrar a presente invenção e em nenhum meio limitando o escopo da presente invenção.

#### Condições HPLC

[23] Os teores da base livre de 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil}óxi)metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il pivalato e sais deste foram medidos pela cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). As condições medias específicas são listadas abaixo:

Coluna: Waters Symmetry Shield C18 (4,6 X 250 mm, 5 μm)

Temperatura da coluna: 30°C

Taxa de fluxo: 1,0 ml/minuto

Comprimento de onda da detecção: UV 309 nm

Eluentes: A. Tetraidrofurano/água = 3/ 7

B. Tetraidrofurano/água = 8/2 (v/v, eluição de gradiente)

Razão da mistura do período total dos eluentes

<b>Período (minuto)</b>	<b>Eluente A</b>	<b>Eluente B</b>
0	100	0
16	100	0
30	0	100
32	0	100
34	100	0
45	100	0

#### Condições para a calorimetria de varredura diferencial

[24] A curva DSC foi obtida com o sistema Mettler-Toledo DSC821. O comportamento térmico foi estudado pelo aquecimento 2 a 5 mg da amostra em um cadinho de amostra de alumínio sob o fluxo do gás de nitrogênio na faixa de temperatura 25 a 250°C na taxa de aquecimento de 10°C/minuto. A cobertura de um cadinho de amostra tem um furo para evitar a formação da pressão dentro do cadinho de amostra.

#### Condições para a Difração de raio X

[25] A amostra (cerca de 20 mg) foi embalada em um recipiente de amostra, que foi então colocado em um gerador de raio x Philips (PW1710).

O padrão de difração da amostra foi atingido na faixa de  $3 \sim 40^\circ / 2 \theta$ . Os detalhes das condições de análise são listadas abaixo:

Tempo por etapa: 0,5  
 Tamanho da etapa: 0,03  
 Modo de Varredura: etapa  
 Voltagem / Corrente: 40 kV / 30 mA  
 $2 \theta / \theta$  Reflexão  
 Alvo de Cu (filtro de Ni)  
 Sedimento da Fonte: 1,0 mm  
 Fendas de Detecção: 0,15 mm, 1,0 mm

**Exemplo Comparativo 1: Base livre de  
 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil)óxi)metil]-8,8-dimetil-  
 3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato**

[26] O composto do título foi preparado de acordo com o processo descrito na Patente Coreana N° 0441638 e WO 02/057288.

**Exemplo:**

**Monossal de ácido 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil] ciclopropil)óxi)metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato maleico**

[27] A base livre obtida no Exemplo Comparativo 1 (100 mg) foi dissolvida em acetato de etila (1 ml). O ácido maleico (1 eq) foi adicionado e a mistura foi agitada por 1 hora para produzir um sólido. O sólido resultante foi filtrado, lavado com acetato de etila e secado para produzir 111,4 mg (Rendimento 91,3%) do monossal de ácido maleico como um sólido cristalino.

Teor: 99,3%

Calorimetria de Varredura Diferencial: 129°C (Endotérmico:  
 111 J/g)

$^1 \text{H RMN (CD}_3\text{OD): } \delta$  8,64 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 6,30 (s, 2H),

5,62 (m, 4H), 4,37 (s, 2H), 4,17 (d, 2H), 1,20 (s, 18H), 0,99 (m, 4H)

Espectro de difração de raio X no pó:  $2\Theta = 5,6, 10,0, 12,1, 13,1, 17,5, 18,8, 20,9, 22,8, 24,3, 25,1$  e  $26,5^\circ$  ( $2\Theta, \pm 0,2$ )

### **Exemplo Comparativo 2:**

**Trissal do ácido 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil)óxi metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3A5-fosfanon-1-il-pivalato maleico**

[28] A base livre obtida no Exemplo Comparativo 1 (5 g) foi dissolvida em acetato de etila (50 ml). O ácido maleico (3 eq) foi adicionado. A mistura foi agitada por 12 horas e n-hexano (20 ml) foi adicionado a este para produzir um sólido. O sólido resultante foi filtrado, lavado com n-hexano e secado para produzir 6,52 g (Rendimento 78,6%) do trissal de ácido maleico.

Teor: 98,7%

$^1\text{H RMN (CD}_3\text{OD): } \delta 8,70$  (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 6,31 (s, 6H), 5,62 (m, 4H), 4,38 (s, 2H), 4,17 (d, 2H), 1,20 (s, 18H), 0,99 (m, 4H)

### **Exemplo Comparativo 3:**

**Monossal do ácido 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil)óxi metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato p-toluenossulfônico**

[29] A base livre obtida no Exemplo Comparativo 1 (100 mg) foi dissolvida em acetato de etila (1 ml). O ácido p-toluenossulfônico (1 eq) foi adicionado e a mistura foi agitada por 1 h para produzir um sólido. O sólido resultante foi filtrado, lavado com acetato de etila e secado para produzir 106,4 mg (Rendimento 78,2%) do monossal do ácido p-toluenossulfônico.

Teor: 99,43%

$^1\text{H RMN (CD}_3\text{OD): } \delta 8,74$  (s, 1H), 8,57(s, 1H), 7,68 (d, 2H), 7,20 (d, 2H), 5,59 (m, 4H), 4,37 (s, 2H), 4,14 (d, 2H), 2,34 (s, 3H), 1,13 (s, 18H), 0,98 (m, 4H)

**Exemplo Comparativo 4:**

**Dissal do ácido 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil)-óxi]metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato p-toluenossulfônico**

[30] A base livre obtida no Exemplo Comparativo 1 (5 g) foi dissolvida em acetato de etila (50 ml). O ácido p-toluenossulfônico (2 eq) foi adicionado e a mistura foi agitada por 1 h para produzir um sólido. O sólido resultante foi filtrado, lavado com acetato de etila e secado para produzir 7,01 g (Rendimento 81,5%) do dissal do ácido p-toluenossulfônico.

Teor: 97,8%

<sup>1</sup> H RMN (CD<sub>3</sub>OD): δ 8,77 (s, 1H), 8,61 (s, 1H), 7,71 (d, 4H), 7,23 (d, 4H), 5,62 (m, 4H), 4,40 (s, 2H), 4,17 (d, 2H), 2,37 (s, 6H), 1,20 (s, 18H), 0,99 (m, 4H)

**Exemplo Comparativo 5:**

**Monossal do ácido 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil] ciclopropil) óxi]metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato metanossulfônico**

[31] A base livre obtida no Exemplo Comparativo 1 (100 mg) foi dissolvida em acetato de etila (1 ml). Ácido metanossulfônico (1 eq) foi adicionado em gotas e a mistura foi agitada por 1 h para produzir um sólido. O sólido resultante foi filtrado, lavado com acetato de etila e secado para produzir 95,2 mg (Rendimento 80,6%) do monossal do ácido metanossulfônico.

Teor: 97,6%

<sup>1</sup> H RMN (CD<sub>3</sub>OD): δ 8,79 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 5,60 (m, 4H), 4,38 (s, 2H), 4,14 (d, 2H), 2,70 (s, 3H), 1,17 (s, 18H), 1,01 (m, 4H)

**Exemplo Comparativo 6:**

**Monossal do ácido 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil) óxi]metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato**

**naftalenossulfônico**

[32] A base livre obtida no Exemplo Comparativo 1 (5 g) foi dissolvida em acetato de etila (30 ml). O ácido naftalenossulfônico (1 eq, 1,97 g) foi dissolvido em água (5 ml), que foi então adicionado às gotas. Após agitar a mistura por 15 h, o solvente foi completamente removido sob pressão reduzida. O etanol e o éter dietílico foram adicionados ao resíduo para precipitar um cristal branco. O sólido resultante foi filtrado, lavado com uma mistura de solvente de etanol e éter dietílico e secado para produzir 6,2 g (Rendimento 90,0%) do monossal do ácido naftalenossulfônico.

Teor: 91,4%

<sup>1</sup> H RMN (CD<sub>3</sub>OD): δ 8,48 (s, 2H), 8,44 (s, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,83 (m, 3H), 7,50 (m, 2H), 5,63 (m, 4H), 4,23 (s, 2H), 3,95 (d, 2H), 1,18 (s, 18H), 1,01 (m, 4H)

**Exemplo Comparativo 7:****Monossal do ácido 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil]óxi)metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato etanossulfônico**

[33] A base livre obtida no Exemplo Comparativo 1 (5 g) foi dissolvida em acetato de etila (30 ml). Ácido etanossulfônico (1 eq, 1,05 g) foi adicionado a este e totalmente dissolvido. Após agitar a mistura por 1 h, o solvente foi completamente removido sob pressão reduzida. Etanol, éter dietílico e n-hexano foram adicionados ao resíduo para precipitar um cristal branco. O sólido resultante foi filtrado, lavado com uma mistura de solvente de etanol e éter dietílico e secado para produzir 5,0 g (Rendimento 82,8%) do monossal do ácido etanossulfônico.

Teor: 90,0%

<sup>1</sup> H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,60 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 5,63 (m, 4H), 4,32 (s, 2H), 4,00 (d, 2H), 2,92 (m, 2H), 1,29 (m, 3H), 1,19 (s, 18H), 1,01 (m, 4H)

### **Experimento 1: Teste comparativo 1 quanto à estabilidade sob calor e umidade**

[34] 30 a 70 mg de cada um de monossal de ácido maleico do exemplo, base livre e sais dos Exemplos Comparativos 1 a 5 foi introduzido em um frasco de vidro e armazenado sob  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $75 \pm 5\%$  de RH. Após 1, 4 e 8 semanas, 5 mg de cada amostra foram retirados, dissolvidos em uma mistura de solvente de tetraidrofurano/água (1/1, v/v), e analisado por HPLC. Os resultados são resumidos na seguinte tabela 1.

#### **Tabela 1**

[35] Resultados do teste de estabilidade para o monossal do ácido maleico da fórmula (1), sua base livre e os outros sais sob  $40^\circ\text{C}/75\%$  de RH (teor residual, %).

Composto de teste		Semana 1	Semana 4	Semana 8
Exemplo	Monossal de ácido maleico	99,4	99,3	98,3
Exemplo Comparativo 1	Base livre	99,0	91,3	8,4
Exemplo Comparativo 2	Trissal de ácido maleico	84,4	0,0	0,0
Exemplo Comparativo 3	Monossal do ácido P-toluenossulfônico	96,5	71,0	-
Exemplo Comparativo 4	Dissal do ácido P-toluenossulfônico	0,0	0,0	0,0
Exemplo Comparativo 5	Monossal do ácido metanossulfônico	50,7	0,0	0,0

[36] Como visto a partir dos resultados da Tabela 1, o monossal de ácido maleico da fórmula (1) apresenta estabilidade ao calor superior à base livre e a outros sais. Os resultados de estabilidade para o monossal do ácido maleico e da base livre são descritos na Figura 3.

### **Experimento 2: Teste comparativo 2 quanto à estabilidade sob calor e umidade**

[37] Cerca de 5 a 6 mg de cada um de monossal de ácido maleico do Exemplo, a base livre e os sais dos Exemplos Comparativos 6 a 7 foi introduzido em um frasco de vidro e armazenado em uma temperatura de  $60^\circ\text{C}$ . Após 1 ou 2, 4 e 8 semanas, cada amostra no frasco de vidro foi retirada, dissolvida em uma mistura de solvente de tetraidrofurano/água (1/1,

v/v) e analisada por HPLC. Os resultados são resumidos na seguinte Tabela 2.

### Tabela 2

[38] Resultados do teste de estabilidade para o monossal do ácido maleico da fórmula (1), sua base livre e os outros sais a 60°C (teor residual, %).

Composto de teste		60°C (cerca de 4% de RH)			
		Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 8
Exemplo	Monossal de ácido maleico	99,4	-	99,2	98,2
Exemplo Comparativo 1	Base livre	98,2	-	79,2	1,2
Exemplo Comparativo 6	Monossal do ácido naftalenossulfônico	-	74,7	-	-
Exemplo Comparativo 7	Monossal do ácido etanossulfônico	0,4	-	-	-

[39] Os resultados da Tabela 2 mostram que o monossal de ácido maleico da fórmula (1) apresenta estabilidade ao calor maior com relação à base livre correspondente e os outros sais sob temperatura alta.

### Experimento 3: Teste de solubilidade em vários pH

[40] De 5 a 23 mg de cada um de monossal de ácido maleico do Exemplo e a base livre do Exemplo Comparativo 1 foi colocado em uma garrafa de vidro. 500 µl de cada uma das várias soluções de tampão de fosfato e soluções de ácido fosfórico tendo um valor de pH específico foi adicionado a este. A garrafa de vidro foi colocada em vidro para manter uma temperatura constante de 25°C e a mistura foi agitada por 1,5 h. Após a filtração, o teor no filtrado foi analisado por HPLC e o pH da solução foi medido. Os valores de pH medidos e as solubilidades do monossal de ácido maleico e a base livre são representadas na Tabela 3 seguinte.

### Tabela 3

[41] Solubilidade dependente do pH do monossal de ácido maleico da fórmula (1) e a base livre (mg/ml)

pH da solução	Exemplo (monossal do ácido maleico)	Exemplo Comparativo 1 (base livre)
2,0	5,6	36,5
3,2	7,0	8,3
4,0	4,2	1,7
6,5	2,9	0,8

#### **Experimento 4: Efeito farmacológico e citotoxicidade do monossal de ácido maleico e base livre**

##### 1) Cultura celular e tratamento de composto

[42] A linhagem de células produtora de vírus da hepatite B, HepG 2<sub>2.2.15</sub> (M. A. Shells, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1005 (1987)), foi cultivado em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media; Life Technologies) contendo 10% de FBS (Soro Fetal Bovino), 1% de ABAM (Antibiótico-Antimicótico) e Geneticina cuja concentração final foi medida como 400 µg/ml. As células foram cultivadas para a confluência, tratadas com tripsina e distribuída na microplaca de 96 reservatórios em uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/reservatório. Após 24 h, o meio foi substituído e o tratamento do composto foi realizado em intervalos de 2 dias diluindo-se serialmente a base livre do Exemplo Comparativo 1 e o monossal de ácido maleico do Exemplo por três vezes de modo que a concentração final foi de 50 µM a 8nM em 200 µl do meio. Cada uma das amostras de teste foi duplicada. Após 8 dias do primeiro tratamento de medicamento, o meio de cultura foi coletado e as células foram lisadas pelo aquecimento das células a 100°C por 10 minutos. A fim de minimizar as substâncias que interferem com a reação da amplificação de DNA, o meio de cultura foi diluído por dez vezes usando-se água. O grupo de controle, o meio de cultura celular que não foi tratado com o medicamento, foi tratado da mesma maneira como acima.

##### 2) Determinação do efeito farmacológico: análise quantitativa usando-se reação de PCR em tempo real

[43] O meio de cultura (6 µl), que foi pré-tratado como acima, foi adicionado à mistura de polimerase/solução tamponada [10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 200 µM de dNTP, 200 nM de iniciadores, 200 nM de sonda, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidade de DNA polimerase AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA)]. Usando-se a máquina de PCR em tempo real (Rotor-gene 2000 Real-time Cycler: CORBETT Research.), A reação a 95°C

foi realizada por 3 minutos e depois a reação a 95°C/20 segundos-56°C/30 segundos-85°C/20 segundos foi repetida 45 vezes. A fluorescência foi detectada na reação de polimerização a 85°C.

[44] 5'-TCAGCTCTGTATCGGGAAGC-3' e 5'-CACCCACCCAGGTAGCTAGA-3' (Genotech) foram usados como o iniciador 5' e iniciador 3', respectivamente e 5'-6-FAM-CCTCACCATACTGCACTCAGGCAA-BHQ-1-3' (Priigo) foi usado como a sonda de fluorescência.

[45] A quantidade automaticamente calculada de HBV DNA em uma amostra foi analisada pelo cálculo do valor relativo da amostra do paciente com respeito ao valor da amostra não tratada com o medicamento e usando-se o programa estatístico PRISM (GraphPad Software, Inc.).

### 3) Determinação de Citotoxicidade

[46] O valor  $CC_{50}$  do medicamento foi determinado pela remoção do meio, adicionar 100  $\mu$ l de 0,1 mg/ml de MTT (Brometo de Tiazolil Blue Tetrazólio: Sigma) ao resíduo, tingindo o resíduo por 2 h a 37°C, adicionar 100  $\mu$ l de DMSO (Sulfóxido de Dimetila: Sigma), dissolver a mistura resultante agitando-se por 2 h em temperatura ambiente e medindo a absorbância a 540 nm.

[47] Os valores  $EC_{50}$  e  $CC_{50}$  para a base livre do Exemplo Comparativo 1 e o monossal de ácido maleico do Exemplo obtido a partir do experimento acima são representados na Tabela 4 seguinte.

**Tabela 4**

Composto de teste	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$CC_{50}$ ( $\mu$ M)
Base livre do Exemplo Comparativo 1	1,1 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 3,0
Monossal do ácido maleico do Exemplo	1,2 $\pm$ 0,3	6,8 $\pm$ 2,4

[48] Como pode ser visto a partir dos resultados da Tabela 4, o teste *in vitro* de atividade farmacológica intracelular mostrou que tanto a base livre do Exemplo Comparativo 1 quanto o monossal de ácido maleico do Exemplo apresentam atividade similar (cerca de 1 mM) e citotoxicidade (cerca de 7

mM).

#### APLICABILIDADE INDUSTRIAL

[49] O monossal do ácido 3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-il)metil]ciclopropil)óxi]metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il pivalato maleico da presente invenção mostra excelente estabilidade sob umidade e calor e mantém uma solubilidade constante em níveis de pH diferentes. Portanto, a presente invenção pode manter a qualidade alta do ingrediente ativo da composição farmacêutica para a prevenção ou tratamento de infecções virais, tais como infecção por HBV ou HIV, por um período longo de tempo.

## REIVINDICAÇÕES

1. Monossal do ácido (3-[(1-[(2-amino-9H-purin-9-yl)metil]ciclopropil)óxi]metil]-8,8-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6-trioxa-3λ5-fosfanon-1-il-pivalato maleico, caracterizado pelo fato de que está na forma do sólido cristalino e tem picos de  $2\Theta = 5,6, 12,1, 17,5$  e  $20,9^\circ$  no seu padrão de difração do raio X em pó.

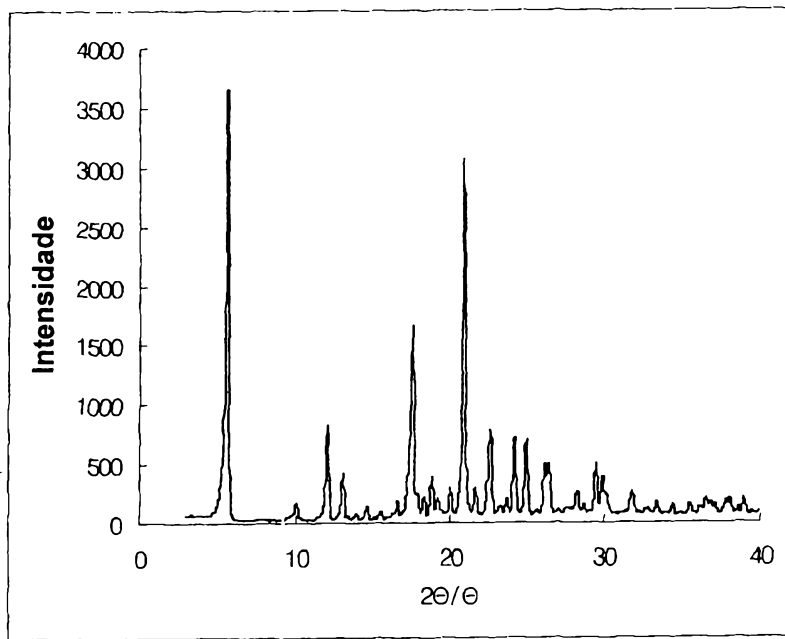
2. Monossal do ácido maleico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que tem picos de  $2\Theta = 5,6, 10,0, 12,1, 13,1, 17,5, 18,8, 20,9, 22,8, 24,3, 25,1$  e  $26,5^\circ$  no seu padrão de difração do raio X em pó.

3. Composição farmacêutica para a prevenção ou tratamento das infecções virais, caracterizada pelo fato de que compreende o monossal do ácido maleico como definido na reivindicação 1 ou 2, e carreador farmacêuticamente aceitável.

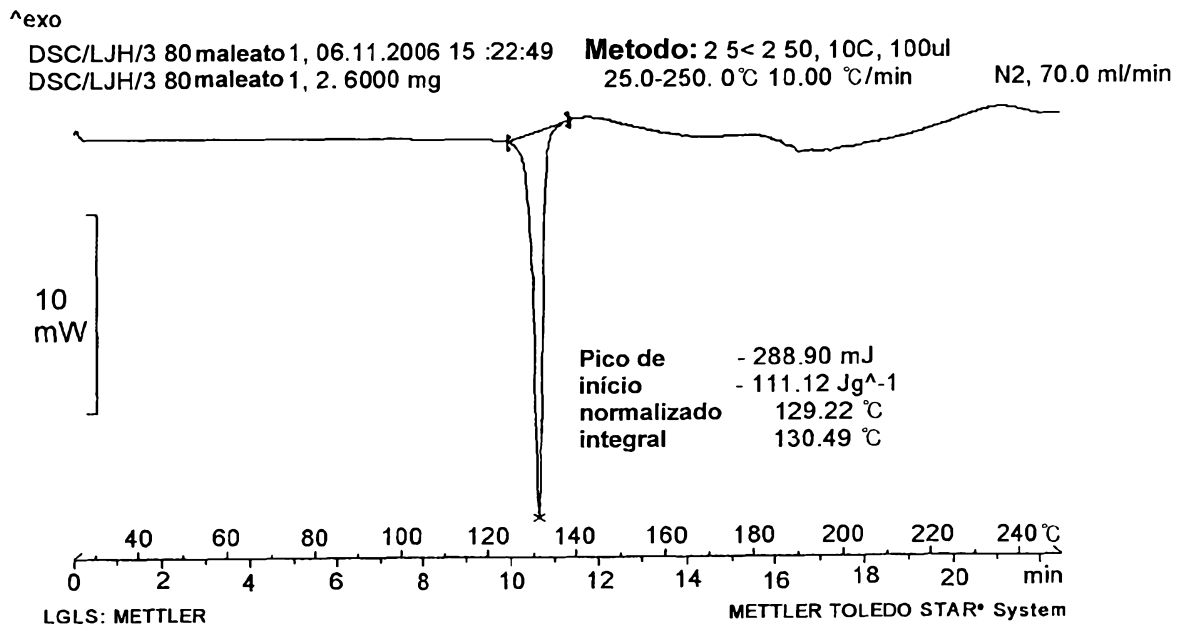
4. Composição de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o vírus é HBV.

5. Composição de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o vírus é HIV.

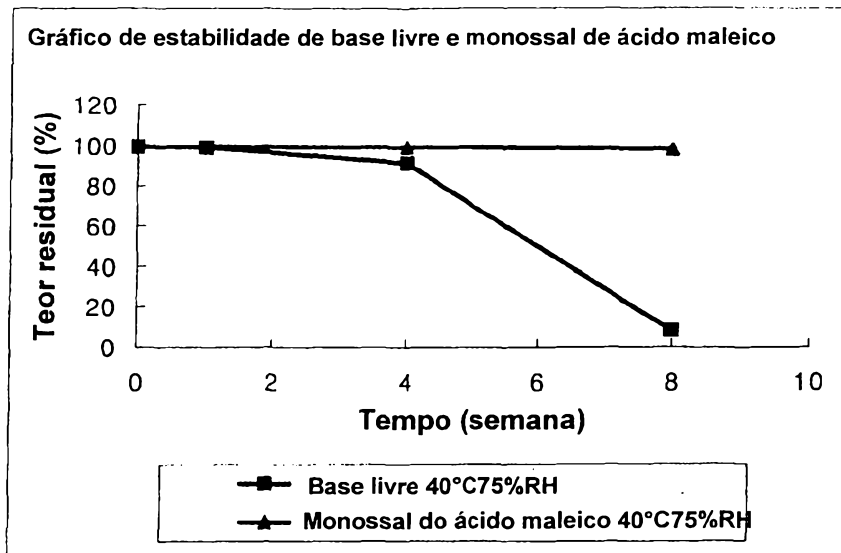
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

