



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

(11) BR 112013009029-4 B1



(22) Data do Depósito: 14/10/2011

(45) Data de Concessão: 29/06/2021

(54) Título: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA INIBIÇÃO DE POLIMERASE

(51) Int.Cl.: A61K 31/70.

(30) Prioridade Unionista: 01/06/2011 US 61/492,054; 15/10/2010 US 61/393,522.

(73) Titular(es): BIOCRYST PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): SHANTA BANTIA; PRAVIN L. KOTIAN; YARLAGADDA S. BABU.

(86) Pedido PCT: PCT US2011056421 de 14/10/2011

(87) Publicação PCT: WO 2012/051570 de 19/04/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/04/2013

(57) Resumo: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA INIBIÇÃO DE POLIMERASE. A presente invenção refere-se a métodos e composições para inibição de polimerases de ácido nucléico viral, tal como RNA e DNA polimerases, e métodos e composições que são úteis para o tratamento de infecções virais em sujeitos. Os métodos compreendem a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficiente de um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo, ou uma composição compreendendo um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo, e um transportador farmaceuticamente aceitável. A composição ou o método pode opcionalmente compreender um ou mais agentes antivirais adicionais.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA INIBIÇÃO DE POLIMERASE"**.

Este pedido reivindica a prioridade para o Pedido Provisório dos Estados Unidos No. 61/393.522, depositado em 15 de Outubro de 2010 e
5 Pedido Provisório dos Estados Unidos No. 61/492.054, depositado em 1 de Junho de 2011, ambos os quais são incorporados aqui por referência.

As descrições de todas as patentes, pedidos de patente e publicações citados aqui são incorporadas por meio deste documento por referência em sua totalidade.

10 Antecedentes

A presente invenção refere-se a doenças virais são responsáveis tanto por pandemias globais quanto por epidemias periódicas anuais, tais como a influenza. Os surtos podem ser caracterizados por virulência potencializada e podem ocorrer repentinamente, resultado em sérias mortalidades. De modo importante, as doenças virais não são limitadas a humanos. Por exemplo, a influenza também afeta o gado e aves, o que pode ter impacto significativo no fornecimento de alimentos, adicionalmente ao aumento do risco de transmissão a humanos. Condições exemplares relativas à infecção viral incluem, por exemplo, influenza, varíola, encefalite, doença
15 do Vírus do Oeste do Nilo, Febre Amarela, Dengue, hepatite, imunodeficiência humana, pólio e Cocksackie.

O genoma do vírus da influenza A tem uma RNA polimerase RNA-dependente, que é um complexo heterotrimétrico de três subunidades (PA, PB1 e PB2). A RNA polimerase catalisa a transcrição e a replicação de
25 RNA viral. Devido à transcrição e replicação do vírus depender da atividade da RNA polimerase, esta enzima se tornou de interesse como um alvo para o desenvolvimento de novos compostos antivirais, especialmente no seguimento da emergência recente de vírus resistentes a drogas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

30 A invenção provê métodos e composições para a inibição de polimerases de ácido nucléico viral, e métodos e composições que são úteis para o tratamento, supressão e/ou prevenção de infecções virais em sujeitos.

Os métodos compreendem a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficiente de um composto de fórmula I, ou um sal farmacologicamente aceitável ou hidrato do mesmo, ou uma composição compreendendo um composto de fórmula I, ou um sal farmacologicamente aceitável ou hidrato do mesmo, e um transportador farmacologicamente aceitável. A
5 composição ou o método pode opcionalmente compreender um ou mais agentes antivirais adicionais. Os métodos e composições são úteis para o tratamento, supressão e/ou prevenção de infecções virais em sujeitos que podem surgir de infecção por um ou mais tipos de vírus. Assim, os métodos
10 e composições são úteis para tratamento, supressão e/ou prevenção antiviral de amplo espectro.

A presente invenção é baseada, em parte, em certas descobertas que são descritas de modo mais completo na seção Exemplos do presente pedido. Por exemplo, a presente invenção é baseada, em parte, na
15 descoberta de que níveis de título viral em células foram marcadamente reduzidos mediante o tratamento com um composto de fórmula I. Assim, a presente invenção também provê métodos para a redução de título viral em um fluido corporal ou célula compreendendo o contato do referido fluido ou célula com um composto de fórmula I. A presente invenção é adicionalmente
20 baseada, em parte, na descoberta de que níveis de título viral em células para vários vírus foram marcadamente reduzidos mediante o tratamento com um composto de fórmula I, indicando atividade antiviral de amplo espectro para o composto de fórmula I contra uma variedade de cepas virais. Assim, a presente invenção também provê métodos para redução de título viral para
25 vários tipos, subtipos e/ou cepas de vírus em um fluido corporal ou célula compreendidos pelo contato do referido fluido ou célula com um composto de fórmula I.

Em algumas modalidades, a presente invenção provê um método para inibição de uma RNA ou DNA polimerase viral compreendendo o
30 contato da polimerase com uma quantidade inibitória eficiente do composto de fórmula I, ou um sal farmacologicamente aceitável, solvato ou hidrato do mesmo.

Em algumas modalidades, o método é desempenhado *in vivo*.

Em algumas modalidades, a presente invenção provê um método para tratamento de um sujeito sofrendo de uma infecção por RNA viral que compreende a administração ao referido sujeito de uma quantidade terapêuticamente eficiente de um composto de fórmula I, ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

Em algumas modalidades, o fluido corporal é sangue. Em algumas modalidades, o fluido corporal é plasma. Em algumas modalidades, o fluido corporal é soro sanguíneo.

Em algumas modalidades, o sujeito é um mamífero. Em algumas modalidades o sujeito é um humano. Em algumas modalidades, o sujeito é uma ave. Em algumas modalidades, o sujeito é um suíno ou porco.

Essas e outras modalidades da invenção são adicionalmente descritas nas seções a seguir do pedido, incluindo a Descrição Detalhada, Exemplos e Reivindicações.

Ainda outros objetivos e vantagens da invenção se tornarão evidentes para aqueles versados na técnica a partir da descrição aqui, que é meramente ilustrativa e não restritiva. Assim, outras modalidades serão reconhecidas por um artesão versado sem desviar do espírito e escopo da invenção.

RESUMO DAS FIGURAS

FIG. 1 mostra a fosforilação do composto 1 em células de carcinoma hepatocelular humanas (Huh-7).

FIG. 2 mostra a fosforilação de ^3H adenosina em células de Huh-7.

FIG. 3 mostra a fosforilação de composto 1 de ^3H em células de Huh-7.

FIG. 4 mostra incorporação de DNA genômico e RNA total de composto 1 de ^3H e ^3H adenosina em células de Huh-7 após 24h.

FIG. 5 mostra os efeitos de combinação de composto 1 e peramivir (um inibidor de neuraminidase) em influenza *in vitro*.

FIG. 6 mostra o efeito do composto 1 (intramuscular) na perda

de peso em camundongos infectados com vírus da influenza A/Victoria/3/75 H3N2.

FIG. 7 mostra o efeito do composto 1 (oral) na perda de peso em camundongos infectados com vírus da influenza A/Victoria/3/75 H3N2.

5 FIG. 8 mostra o efeito do composto 1 (intraperitoneal, intramuscular e oral) na sobrevivência de camundongos infectados com o vírus Ebola.

10 FIG. 9 mostra o efeito do composto 1 (intraperitoneal, intramuscular e oral) na perda de peso em camundongos infectados com o vírus Ebola.

FIG. 10 mostra o efeito do composto 1 (intramuscular e oral) na sobrevivência de camundongos infectados com o vírus Ebola.

FIG. 11 mostra o efeito do composto 1 (intramuscular e oral) na perda de peso em camundongos infectados com o vírus Ebola.

15 FIG. 12 mostra o efeito do composto 1 na sobrevivência de hamsters infectados com o vírus da Febre Amarela.

FIG. 13 mostra o efeito do composto 1 na perda de peso em hamsters infectados com o vírus da Febre Amarela.

20 FIG. 14 mostra a curva farmacocinética oral do composto 1 dosado em 10 mg/kg conforme medido em ratos.

DESCRIÇÃO DETALHADA

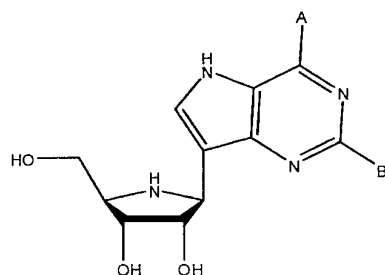
25 A invenção provê métodos e composições para a inibição de polimerases de ácido nucléico viral, tal como RNA e DNA polimerases, e métodos e composições que são úteis para o tratamento de infecções virais em sujeitos. Os métodos compreendem a administração ao sujeito de uma quantidade terapêuticamente eficiente de um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo, ou uma composição compreendendo um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo, e um transportador farmaceuticamente aceitável. A composição ou método pode opcionalmente compreender um ou mais agentes antivirais adicionais. Os métodos e composições são úteis para o tratamento, supressão e/ou prevenção de infecções virais em sujeitos

30

que podem surgir a partir da infecção por um ou mais tipos de vírus. Assim, os métodos e composições são úteis para tratamento, supressão e/ou prevenção antiviral de amplo espectro.

Em particular, a presente invenção refere-se a métodos de tratamento, supressão e/ou prevenção de doenças ou condições relativas à infecção viral compreendendo a administração de um composto de fórmula I, ou sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

Os compostos de fórmula (I) são conforme segue:



(I), em que A é OH ou NH₂, e B é H

ou NH₂.

Assim, em algumas modalidades do composto de fórmula (I), A é NH₂.

Em algumas modalidades do composto de fórmula (I), B é NH₂.

Em algumas modalidades do composto de fórmula (I), A é OH.

Em ainda algumas modalidades do composto de fórmula (I), B é H.

Em ainda algumas modalidades do composto de fórmula (I), A é NH₂ e B é H.

Em ainda algumas modalidades do composto de fórmula (I), A é OH e B é NH₂.

Em ainda algumas modalidades do composto de fórmula (I), A é NH₂ e B é NH₂.

Em ainda algumas modalidades do composto de fórmula (I), A é OH e B é H.

A presente invenção é baseada, em parte, em certas descobertas que são descritas de modo mais completo na seção Exemplos do presente pedido. Por exemplo, a presente invenção é baseada, em parte, na descoberta de que níveis de título viral em células foram marcadamente re-

duzidos mediante o tratamento com um composto de fórmula I. Assim, em algumas modalidades, a presente invenção provê métodos para redução do título viral em um fluido corporal ou célula compreendido pelo contato do referido fluido ou célula com um composto de fórmula I. A presente invenção é adicionalmente baseada, em parte, na descoberta de que níveis de título viral em células para vários vírus foram marcadamente reduzidos mediante o tratamento com um composto de fórmula I, indicando assim atividade antiviral de amplo espectro para o composto de fórmula I contra uma variedade de cepas virais. Assim, a presente invenção também provê métodos para redução do título viral para vários tipos, subtipos e/ou cepas de vírus em um fluido corporal ou célula compreendido pelo contato do referido fluido ou célula com um composto de fórmula I.

Os compostos da presente invenção são preparados em diferentes formas, tais como sais, hidratos, solvatos ou complexos, e a invenção inclui composições e métodos englobando todas as formas variantes dos compostos. Em algumas modalidades, os compostos são preparados como hidratos de sais.

Abreviações e Definições

A abreviação "PNP" refere-se à purina nucleosídeo fosforilase.

O termo "composto(s) da invenção" conforme utilizado aqui significa um composto de fórmula I, e pode incluir sais, formas tautoméricas, hidratos e/ou solvatos do mesmo. Compostos de fórmula I podem também incluir solvatos ou hidratos de sais dos mesmos.

O termo "solvato" conforme utilizado aqui significa um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que moléculas de um solvente adequado são incorporadas na treliça de cristal. Um solvente adequado é fisiologicamente tolerável na dosagem administrada. Exemplos de solventes adequados são etanol, água e similares. Quando a água é o solvente, a molécula é referida como um "hidrato".

Uma "composição farmacêutica" refere-se a uma mistura de um ou mais dos compostos descritos aqui, ou sais farmaceuticamente aceitáveis, ou hidratos dos mesmos, com outros componentes químicos, tais como

transportadores e excipientes fisiologicamente aceitáveis. O propósito de uma composição farmacêutica é facilitar a administração de um composto a um organismo.

O termo "sal farmaceuticamente aceitável" é pretendido para incluir sais derivados de ácidos inorgânicos e orgânicos, incluindo, por exemplo, ácidos hidrolórico, hidrobromico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fosfórico, fórmico, acético, láctico, maleico, fumárico, succínico, tartárico, glicólico, salicílico, cítrico, metanosulfônico, benzenosulfônico, benzoico, malônico, trifluoroacético, tricloroacético, naftaleno-2-sulfônico e outros ácidos. As formas de sal farmaceuticamente aceitável podem também incluir formas em que a razão de moléculas compreendendo o sal não é 1:1. Por exemplo, o sal pode compreender mais que uma molécula de ácido inorgânico ou orgânico por molécula de base, tais como duas moléculas de ácido hidrolórico por molécula de composto de fórmula (I). Conforme outro exemplo, o sal pode compreender menos que uma molécula de ácido inorgânico ou orgânico por molécula de base, tal como duas moléculas de composto de fórmula (I) por molécula de ácido tartárico. Os sais podem também existir como solvatos ou hidratos.

O termo "ácido" contempla todos os ácidos inorgânicos ou orgânicos farmaceuticamente aceitáveis. Ácidos inorgânicos incluem ácidos minerais, tais como ácidos hidrohálicos, tais como ácidos hidrobromicos e hidrolóricos, ácidos sulfúricos, ácidos fosfóricos e ácidos nítricos. Ácidos orgânicos incluem todos os ácidos carboxílicos alifáticos, alicílicos e aromáticos farmaceuticamente aceitáveis, ácidos dicarboxílicos, ácidos tricarboxílicos e ácidos graxos. Ácidos preferenciais são ácidos carboxílicos alifáticos C1-C20 saturados ou insaturados, de cadeia linear ou ramificada, que são opcionalmente substituídos por halogênio ou por grupos hidroxila, ou ácidos carboxílicos aromáticos C6-C12. Exemplos de tais ácidos são ácido carbônico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido acético, ácido propiônico, ácido isopropiônico, ácido valérico, ácidos alfa-hidróxi, tais como ácido glicólico e láctico, ácido cloroacético, ácido benzoico, ácido metanosulfônico e ácido salicílico. Exemplos de ácidos dicarboxílicos incluem ácido oxálico, ácido málico,

ácido succínico, ácido tartárico e ácido maleico. Um exemplo de um ácido tricarboxílico é o ácido cítrico. Ácidos graxos incluem todos os ácidos carboxílicos alifáticos ou aromáticos farmacologicamente aceitáveis tendo de 4 a 24 átomos de carbono. Exemplos incluem ácido butírico, ácido isobutírico, ácido sec-butírico, ácido láurico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolênico e ácido fenilacético. Outros ácidos incluem ácido glucônico, ácido glicoheptônico e lactobiónico.

Conforme utilizado aqui o termo "cerca de" é utilizado aqui para significar aproximadamente, grosso modo, em torno de ou na região de. Quando o termo "cerca de" é utilizado em conjunto com uma faixa numérica, ele modifica aquela faixa estendendo as fronteiras acima e abaixo dos valores numéricos estabelecidos. Em geral, o termo "cerca de" é utilizado aqui para modificar um valor numérico acima e abaixo do valor afirmado em uma variação de 20 por cento para mais ou para menos (superior ou inferior).

Uma "quantidade eficiente", "quantidade suficiente" ou "quantidade terapeuticamente eficiente" conforme utilizado aqui é quantidade de um composto que é suficiente para efetuar os resultados benéficos e desejados, incluindo resultados clínicos. Como tal, a quantidade eficiente pode ser suficiente, por exemplo, para reduzir ou melhorar a gravidade e/ou duração da infecção viral, ou um ou mais sintomas da mesma, prevenir o avanço da infecção viral, prevenir a recorrência, desenvolvimento ou início de um ou mais sintomas associados à infecção viral, prevenir ou reduzir a replicação ou multiplicação de um vírus, prevenir ou reduzir a produção e/ou liberação de uma partícula viral, aprimorar ou aumentar de outro modo o(s) efeito(s) profilático(s) ou terapêutico(s) de outra terapia. Uma quantidade eficiente também inclui a quantidade do composto de fórmula I que evita ou atenua substancialmente efeitos colaterais indesejáveis.

Conforme utilizado aqui e conforme bem compreendido na técnica, "tratamento" é uma abordagem para a obtenção de resultados benéficos e desejados, incluindo resultados clínicos. Resultados clínicos benéficos ou desejados podem incluir, mas não se limitam a, alívio e melhoria de um ou mais sintomas ou condições, diminuição da extensão da doença, um estado

estável (ou seja, sem piorar) da doença, prevenção da propagação da doença, atraso ou retardamento da progressão da doença, melhoria ou palição do estado da doença e remissão (caso parcial ou total), caso detectável ou não. "Tratamento" pode também significar o prolongamento da sobrevivência em comparação com a sobrevivência esperada caso não receba o tratamento.

O termo "transportador" refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo com o qual um composto é administrado. Exemplos não limitantes de tais transportadores farmacêuticos incluem líquidos, tais como água e óleos, incluindo aqueles de petróleo, animal, vegetal ou de origem sintética, tais como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e similares. Os transportadores farmacêuticos podem também ser salina, goma acácia, gelatina, pasta de amido, talco, queratina, sílica coloidal, ureia e similares. Adicionalmente, agentes auxiliares, estabilizantes, espessantes, lubrificantes e corantes podem ser utilizados. Outros exemplos de transportadores farmacêuticos adequados são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin; incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Os termos "animal," "sujeito" e "paciente" conforme utilizados aqui incluem todos os membros do reino animal, incluindo, mas não limitados a, mamíferos, animais (por exemplo, gatos, cães, cavalos, suínos, etc.) e humanos.

Descrição

A presente invenção provê métodos e composições para a inibição de polimerases de ácido nucléico viral, tais como DNA e/ou RNA polimerases virais, e métodos e composições que são úteis para o tratamento de infecções virais em sujeitos. Os métodos compreendem a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficiente de um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, ou uma composição compreendendo um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo, e um transportador farmaceuticamente aceitável. A composição ou método pode opcionalmente compreen-

der um ou mais agentes antivirais adicionais. Os métodos e composições são úteis para o tratamento, supressão e/ou prevenção de infecções virais em sujeitos que podem surgir a partir da infecção por uma ou mais famílias, gênero, subtipo, serotipo ou cepa de vírus.

5 Os compostos de fórmula I são derivados de 9-deazaadenina, geralmente conhecidos como imucilinas, a síntese dos quais são descritas, por exemplo, em WO 03/80620, e de Evans *et al.*, em *Tetrahedron* 2000, 56, 3053 e *J. Org. Chem.* 2001, 66(17), 5723 (cada um estando incorporado aqui por referência em sua totalidade). As sínteses de estruturas semelhantes
10 são discutidas, por exemplo, na Patente dos Estados Unidos Nos. 5,985,848; 6,066,722; 6,228,741 e Publicações de PCT WO 2003/080620 e 2008/030119 (cada uma estando incorporado aqui por referência em sua totalidade). Derivados de imucilina foram estudados como inibidores de PNP (Vide, Kicska *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 3219-3225, e Kicska *et al.*, *J.*
15 *Biol. Chem.* 2002, 277, 3226-3231 cada um estando incorporado aqui por referência em sua totalidade). Algumas imucilinas foram também estudadas como inibidores de 5'-metiltioadenosina fosforilase (MTAP) ou 5'-metiltioadenosina nucleosidase (MTAN). Tais mecanismos foram implicados no tratamento de câncer e infecções bacterianas (Vide, WO 03/080620, incorporada
20 aqui por referência em sua totalidade).

Os compostos de fórmula I podem exibir propriedades tautoméricas. Assim, a presente invenção também engloba formas tautoméricas de compostos de fórmula I, e misturas das mesmas. Será adicionalmente apreciado que alguns compostos existem como sais farmaceuticamente aceitá-
25 veis, solvatos, e/ou hidratos, cada um dos quais estando dentro das modalidades da invenção.

Em algumas modalidades, o composto de fórmula I existe como um sal farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a forma de sal está em uma razão de 1:1 de ácido e composto de fórmula I. Em algumas modalidades, a forma de sal é maior que cerca de uma razão de 1:1 de
30 ácido e composto de fórmula I. Em algumas modalidades, a forma de sal é cerca de uma razão de 2:1 de ácido e composto de fórmula I. Em algumas

modalidades, a forma de sal existe como um hidrato.

Em algumas modalidades, o composto de fórmula I existe como um hidrato ou solvato.

Os compostos da descrição, portanto, são úteis no tratamento e/ou prevenção de infecções virais em um hospedeiro ou sujeito. Os métodos da invenção podem ser utilizados no tratamento e/ou prevenção de estados de doença condições causados por e/ou relativos a tais infecções virais. Exemplos de tais infecções virais incluem, mas não se limitam a, adenovírus, rinovírus, hepatite, vírus da imunodeficiência, pólio, sarampo, Ebola, Cocksackie, Rino, Vírus do Oeste do Nilo, varíola, encefalite, Febre Amarela, Dengue, influenza (incluindo humana, aviária e suína), lassa, coriomeningitis linfocítica, junin, machupo, guanarito, hantavírus, Febre do Vale do Rift, La Crosse, encefalite da Califórnia, Crimean-Congo, Marburg, Encefalite Japonesa, Doença da Floresta de Kyasanur, Encefalite equina venezuelana, Encefalite equina oriental, Encefalite equina ocidental, síndrome respiratória aguda grave (SARS), parainfluenza, sincicial respiratório, Punta Toro, Tacaribe e pachindae.

Em algumas modalidades, os compostos da invenção são utilizados para tratar ou prevenir uma infecção viral associada a um vírus. Em algumas modalidades, a infecção viral compreende infecção por um ou mais tipos de vírus. Em algumas modalidades, a infecção viral compreende infecção por um ou mais vírus selecionados a partir do grupo consistindo em vírus *orthomyxoviridae*, *paramyxoviridae*, *arenaviridae*, *bunyaviridae*, *flaviviridae*, *filoviridae*, *togaviridae*, *picornaviridae*, e *coronaviridae*. Em algumas modalidades, a infecção viral compreende infecção por um ou mais vírus selecionados a partir do grupo consistindo em adenovírus, rinovírus, hepatite, vírus da imunodeficiência, pólio, sarampo, Ebola, Cocksackie, Rino, Vírus do Oeste do Nilo, varíola, encefalite, Febre Amarela, Dengue, influenza (incluindo humana, aviária e suína), lassa, coriomeningitis linfocítica, junin, machupo, guanarito, hantavírus, Febre do Vale do Rift, La Crosse, encefalite da Califórnia, Crimean-Congo, Marburg, Encefalite Japonesa, Doença da Floresta de Kyasanur, Encefalite equina venezuelana, Encefalite equina oriental, En-

cefalite equina ocidental, síndrome respiratória aguda grave (SARS), parainfluenza, sincicial respiratório, Punta Toro, Tacaribe e vírus pachindae.

Em algumas modalidades, a infecção viral compreende infecção por um ou mais vírus selecionados a partir do grupo consistindo em adenovírus, Dengue, influenza A e influenza B (incluindo humana, aviária e suína), junin, sarampo, parainfluenza, Pichinde, punta toro, sincicial respiratório, rinovírus, Febre do Vale do Rift, síndrome respiratória aguda grave (SARS), Tacaribe, Encefalite equina venezuelana, Vírus do Oeste do Nilo e vírus da Febre Amarela.

Em algumas modalidades, o vírus é Ebola, Marburg, Febre Amarela, influenza A ou influenza B. Em algumas modalidades, o vírus é Ebola. Em algumas modalidades, o vírus é Marburg. Em algumas modalidades, o vírus é Febre Amarela. Em algumas modalidades, o vírus é influenza A ou influenza B.

Em algumas modalidades, o vírus é Vírus do Oeste do Nilo ou Dengue. Em algumas modalidades o vírus é Vírus do Oeste do Nilo. Em algumas modalidades, o vírus é Dengue.

Em algumas modalidades, os compostos da invenção são utilizados para inibir a replicação ou possibilidade de infecção de um vírus. Em algumas modalidades, os compostos da invenção são utilizados para inibir o crescimento de uma célula infectada por um vírus. Exemplos dos referidos vírus incluem, mas não se limitam a, vírus da família *orthmyxoviridae*, *paramyxoviridae*, *arenaviridae*, *bunyaviridae*, *flaviviridae*, *filoviridae*, *togaviridae*, *picornaviridae*, e *coronaviridae*. Exemplos específicos de vírus incluem, mas não se limitam a, adenovírus, rinovírus, hepatite, vírus da imunodeficiência, pólio, sarampo, Ebola, Coxsackie, Rino, Vírus do Oeste do Nilo, varíola, encefalite, Febre Amarela, Dengue, influenza (incluindo humana, aviária e suína), lassa, coriomeningitis linfocítica, junin, machupo, guanarito, hantavírus, Febre do Vale do Rift, La Crosse, encefalite da Califórnia, Crimean-Congo, Marburg, Encefalite Japonesa, Doença da Floresta de Kyasanur, Encefalite equina venezuelana, Encefalite equina oriental, Encefalite equina ocidental, síndrome respiratória aguda grave (SARS), parainfluenza, sincicial

respiratório, Punta Toro, Tacaribe e pachindae.

Assim, em algumas modalidades, o vírus é selecionado a partir do grupo consistindo em vírus da família *orthmyxoviridae*, *paramyxoviridae*, *arenaviridae*, *bunyaviridae*, *flaviviridae*, *filoviridae*, *togaviridae*, *picornaviridae* e *coronaviridae*. Em algumas modalidades, a infecção viral compreende um vírus selecionado a partir do grupo consistindo em hepatite, vírus da imunodeficiência, pólio, sarampo, Ebola, Coxsackie, Rino, Vírus do Oeste do Nilo, varíola, encefalite, Febre Amarela, Dengue, influenza (incluindo humana, aviária e suína), lassa, coriomeningitis linfocítica, junin, machupo, guanarito, hantavírus, Febre do Vale do Rift, La Crosse, encefalite da Califórnia, Crimean-Congo, Marburg, Encefalite Japonesa, Doença da Floresta de Kyasanur, Encefalite equina venezuelana, Encefalite equina oriental, Encefalite equina ocidental, síndrome respiratória aguda grave (SARS), parainfluenza, sincicial respiratório, Punta Toro, Tacaribe e vírus pachindae.

Em algumas modalidades, a infecção viral compreende um vírus selecionado a partir do grupo consistindo em adenovírus, Dengue, influenza A e influenza B (incluindo humana, aviária e suína), junin, sarampo, parainfluenza, Pichinde, punta toro, sincicial respiratório, rinovírus, Febre do Vale do Rift, síndrome respiratória aguda grave (SARS), Tacaribe, Encefalite equina venezuelana, Vírus do Oeste do Nilo e vírus da Febre Amarela.

Em algumas modalidades, o vírus é Ebola, Marburg, Febre Amarela, influenza A ou influenza B. Em algumas modalidades, o vírus é Ebola. Em algumas modalidades, o vírus é Marburg. Em algumas modalidades, o vírus é Febre Amarela. Em algumas modalidades, o vírus é influenza A ou influenza B.

Em algumas modalidades, o vírus é Vírus do Oeste do Nilo ou Dengue. Em algumas modalidades o vírus é Vírus do Oeste do Nilo. Em algumas modalidades, o vírus é Dengue.

Em algumas modalidades, a presente invenção provê um método para inibir uma RNA ou DNA polimerase viral em um sujeito compreendendo administração ao referido sujeito de uma quantidade terapêuticamente eficiente de um composto de fórmula I, ou um sal farmacologicamente acei-

tável ou hidrato do mesmo.

De acordo com o sistema de classificação de Baltimore, vírus de RNA polimerase podem ser classificados em grupos tais como, por exemplo, vírus de fita dupla, vírus de fita única senso positivo e vírus de fita única senso negativo. Famílias de fita única senso positivo incluem, por exemplo, *coronaviridae*, *picornaviridae*, *togaviridae*, *flaviviridae* e similares. Famílias de fita única senso negativo incluem, por exemplo, *paramyxoviridae*, *arenaviridae*, *bunyaviridae*, *orthomyxoviridae*, *filoviridae* e similares. Cada uma das famílias de vírus pode adicionalmente ser classificada em gênero, espécie e serotipo (ou subtipo). Outras designações para designações taxonômicas de vírus são estabelecidas pelos direcionamentos de classificação de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus.

Em algumas modalidades, a RNA polimerase é de fita dupla. Em algumas modalidades, a RNA polimerase é de fita única. Em algumas modalidades, a RNA polimerase é de fita única senso positivo. Em algumas modalidades, a RNA polimerase é de fita única senso negativo.

Em algumas modalidades, os métodos da presente invenção proveem a inibição de amplo espectro de vírus e/ou RNA polimerases a partir de uma família, gênero, subtipo, cepa e/ou serotipo de vírus. Em algumas modalidades, os métodos proveem o tratamento, supressão ou prevenção de infecção de amplo espectro a partir de uma ou mais famílias, gêneros, subtipos, cepas ou serotipos de vírus. Em algumas modalidades, o amplo espectro engloba mais que duas famílias, gêneros, subtipos, cepas e/ou serotipos de vírus.

Em algumas modalidades, a presente invenção provê um método para inibir polimerases virais a partir de uma ou mais famílias, gêneros, subtipos, serotipos ou cepas de vírus. Em algumas modalidades, a presente invenção provê um método para tratamento, supressão e/ou prevenção de uma infecção viral em que a infecção viral é um resultado de infecção por um ou mais famílias, gêneros, subtipos, serotipos ou cepas de vírus.

Em algumas modalidades, as polimerases virais ou vírus são a partir de um ou mais gêneros de vírus. Em algumas modalidades, as polime-

rases virais ou vírus são a partir de uma ou mais espécies de vírus. Em algumas modalidades, as polimerases virais ou vírus são selecionados a partir de um ou mais subtipos ou serotipos. Em algumas modalidades, as polimerases virais ou vírus são selecionados a partir de uma ou mais cepas.

5 Em algumas modalidades, a RNA polimerase viral é selecionada a partir do grupo consistindo em polimerases das famílias *orthmyxoviridae*, *paramyxoviridae*, *arenaviridae*, *bunyaviridae*, *flaviviridae*, *filoviridae*, *togaviridae*, *picornaviridae* e *coronaviridae*. Em algumas modalidades, a RNA polimerase viral é selecionada a partir do grupo consistindo em polimerases das

10 famílias *orthmyxoviridae*, *paramyxoviridae*, *arenaviridae*, *bunyaviridae*, *flaviviridae* e *coronaviridae*. Em algumas modalidades, a RNA polimerase viral compreende a polimerase selecionada a partir do grupo consistindo em polimerase viral de hepatite, vírus da imunodeficiência, pólio, sarampo, Ebola, Coxsackie, Rino, Vírus do Oeste do Nilo, varíola, encefalite, Febre Amarela,

15 Dengue, influenza (incluindo humana, aviária e suína), lassa, coriomeningitis linfocítica, junin, machupo, guanarito, hantavírus, Febre do Vale do Rift, La Crosse, encefalite da Califórnia, Crimean-Congo, Marburg, Encefalite Japonesa, Doença da Floresta de Kyasanur, Encefalite equina venezuelana, Encefalite equina oriental, Encefalite equina ocidental, síndrome respiratória aguda grave (SARS), parainfluenza, sincicial respiratório, Punta Toro, Tacaribe e pachindae.

20

Em algumas modalidades, a RNA polimerase viral é selecionada a partir do grupo consistindo em adenovírus, Dengue, influenza A e influenza B (incluindo humana, aviária e suína), junin, sarampo, parainfluenza, Pichinde, punta toro, sincicial respiratório, rinovírus, Febre do Vale do Rift, síndrome respiratória aguda grave (SARS), Tacaribe, Encefalite equina venezuelana, Vírus do Oeste do Nilo e polimerase viral de Febre Amarela.

25

Em algumas modalidades, a RNA polimerase viral é polimerase viral de Ebola, Marburg, Febre Amarela, influenza A ou influenza B. Em algumas modalidades, a RNA polimerase viral é polimerase viral de Ebola. Em

30 algumas modalidades, a RNA polimerase viral é polimerase viral de Marburg. Em algumas modalidades, a RNA polimerase viral é polimerase viral

de Febre Amarela. Em algumas modalidades, a RNA polimerase viral é polimerase viral de influenza A ou polimerase viral de influenza B. Em algumas modalidades, a polimerase viral é polimerase viral de Vírus do Oeste do Nilo ou Dengue. Em algumas modalidades a polimerase viral é polimerase viral de Vírus do Oeste do Nilo. Em algumas modalidades, a polimerase viral é polimerase viral de Dengue.

Em algumas modalidades, os vírus são selecionados a partir do grupo consistindo em famílias *orthmyxoviridae*, *paramyxoviridae*, *arenaviridae*, *bunyaviridae*, *flaviviridae*, *filoviridae*, *togaviridae*, *picornaviridae* e *coronaviridae*. Em algumas modalidades, os vírus são selecionados a partir do grupo consistindo em hepatite, vírus da imunodeficiência, pólio, sarampo, Ebola, Coxsackie, Rino, Vírus do Oeste do Nilo, varíola, encefalite, Febre Amarela, Dengue, influenza (incluindo humana, aviária e suína), lassa, coriomeningitis linfocítica, junin, machupo, guanarito, hantavírus, Febre do Vale do Rift, La Crosse, encefalite da Califórnia, Crimean-Congo, Marburg, Encefalite Japonesa, Doença da Floresta de Kyasanur, Encefalite equina venezuelana, Encefalite equina oriental, Encefalite equina ocidental, síndrome respiratória aguda grave (SARS), parainfluenza, sincicial respiratório, Punta Toro, Tacaribe e pachindae.

Em algumas modalidades, os vírus são selecionados a partir do grupo consistindo em adenovírus, Dengue, influenza A e influenza B (incluindo humana, aviária e suína), junin, sarampo, parainfluenza, Pichinde, punta toro, sincicial respiratório, rinovírus, Febre do Vale do Rift, síndrome respiratória aguda grave (SARS), Tacaribe, Encefalite equina venezuelana, Vírus do Oeste do Nilo e vírus da Febre Amarela.

Em algumas modalidades, o vírus é Ebola, Marburg, Febre Amarela, influenza A ou influenza B. Em algumas modalidades, o vírus é Ebola. Em algumas modalidades, o vírus é Marburg. Em algumas modalidades, o vírus é Febre Amarela. Em algumas modalidades, o vírus é influenza A ou influenza B.

Em algumas modalidades, o vírus é Vírus do Oeste do Nilo ou Dengue. Em algumas modalidades o vírus é Vírus do Oeste do Nilo. Em al-

gumas modalidades, o vírus é Dengue.

O genoma do vírus da influenza A tem uma RNA polimerase RNA-dependente, que catalisa a transcrição e replicação de RNA viral. Devido à transcrição e replicação do vírus depender da atividade da RNA polimerase, essa enzima se tornou de interesse como um alvo para o desenvolvimento de novos compostos antivirais no seguimento da recente emergência de vírus resistentes a drogas. Os vírus podem desenvolver resistência a uma droga mediante o tratamento, reduzindo assim a eficiência da droga e requerendo que o sujeito seja tratado com outra droga antiviral. Uma droga ou tratamento que exibe eficiência simultânea contra um amplo espectro de cepas virais seria assim útil.

Adicionalmente, a composição ou método pode adicionalmente compreender um ou mais agentes antivirais adicionais em combinação com um composto de fórmula I. Exemplos de tais agentes antivirais incluem, mas não se limitam a, Citovene, Ganciclovir, fosfonoformato trissódico, ribavirina, interferon, d4T, ddI, AZT e Amantadina, Rimantadina e outros agentes antiinfluenza; Aciclovir e agentes relacionados, Foscarnet e outros agentes antiherpesvírus. Exemplos não limitantes de inibidor de neuraminidases incluem laninamivir, oseltamivir, zanamivir e peramivir.

Compostos que se relacionam à inibição de polimerase de influenza são descritos, por exemplo, na Patente dos Estados Unidos Nos. 7,388,002; 7,560,434; e no Pedido de Patente dos Estados Unidos Nos. 12/440,697 (publicado como Publicação de Patente dos Estados Unidos No. 20100129317); e 12/398,866 (publicado como Publicação de Patente dos Estados Unidos No. 20090227524), cada um estando incorporado aqui por referência em sua totalidade. Atualmente, há um inibidor de polimerase de influenza em testes clínicos, conhecido como T-705 (favipiravir; 6-fluoro-3-hidróxi-2-pirazinacarboxamida). T-705 possui atividade antiviral de amplo espectro e potente contra cepas múltiplas de infecção por vírus influenza *in vitro* e *in vivo* (Kiso *et al.*, *PNAS* 2010, 107, 882-887; incorporado aqui por referência em sua totalidade). T-705 é caracterizado por um mecanismo de ação que é diferente da maioria das drogas virais antiinfluenza.

Outra classe de compostos utilizados como antivirais são inibidores M2 (Vide, Pielak, R., Schnell, J., & Chou, J. (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (18), 7379-7384 (incorporado aqui por referência em sua totalidade). Membros exemplares desta classe incluem

5 amantadina rimantadina.

Assim, em algumas modalidades, os métodos da invenção adicionalmente compreendem a administração de um ou mais agentes antivirais adicionais.

Em algumas modalidades, um agente antiviral adicional é selecionado a partir do grupo consistindo em Citovene, Ganciclovir, fosfonofornato trissódico, ribavirina, interferon, d4T, ddl, AZT e amantadina, rimantadina, T-705 e outros agentes antiinfluenza; Aciclovir, e agentes relacionados, Foscarnet e outros agentes anti-herpesvírus.

10

Em algumas modalidades, um agente antiviral adicional é um agente antiinfluenza. Em algumas modalidades, um agente antiviral adicional é um inibidor de neuraminidase. Em algumas modalidades, um agente antiviral adicional é selecionado a partir do grupo consistindo em laninamivir, oseltamivir, zanamivir e peramivir. Em algumas modalidades, um agente antiviral adicional is paramivir. Em algumas modalidades, um agente antiviral adicional é laninamivir. Em algumas modalidades, um agente antiviral adicional é oseltamivir. Em algumas modalidades, um agente antiviral adicional é zanamivir.

15

20

Em algumas modalidades, um agente antiviral adicional é um inibidor de M2. Em algumas modalidades, um agente antiviral adicional é selecionado a partir do grupo consistindo em amantadina e rimantadina.

25

Em algumas modalidades, os métodos da invenção compreendem a administração de dois agentes antivirais adicionais. Em algumas modalidades, os agentes antivirais adicionais são um inibidor de neuraminidase e um inibidor de M2. Em algumas modalidades, os agentes antivirais adicionais são selecionados a partir dos grupos consistindo em 1) laninamivir, oseltamivir, zanamivir e peramivir; e 2) amantadina e rimantadina. Em algumas modalidades, os agentes antivirais adicionais são peramivir e amanta-

30

dina. Em algumas modalidades, os agentes antivirais adicionais são peramivir e rimantadina.

A presente invenção provê métodos para a inibição de uma RNA ou DNA polimerase viral compreendendo o contato da polimerase com uma
5 quantidade inibitória eficiente do composto de fórmula I, ou um sal farmacêuticamente aceitável ou solvato do mesmo.

Em algumas modalidades, a presente invenção provê um método para tratamento de um sujeito sofrendo de uma infecção viral compreendendo administração ao referido sujeito de uma quantidade terapêuticamente
10 eficiente de um composto de fórmula I, ou sal farmacêuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

Em algumas modalidades, a presente invenção provê um método para supressão de uma infecção viral em um sujeito compreendendo administração ao sujeito de uma quantidade terapêuticamente eficiente de um
15 composto de fórmula I, ou sal farmacêuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

Em algumas modalidades, a presente invenção provê um método para tratamento de um sujeito sofrendo de uma infecção por RNA viral que compreende a administração ao referido sujeito de uma quantidade terapêuticamente eficiente de um composto de fórmula I, ou sal farmacêuticamente
20 aceitável ou solvato do mesmo.

Em algumas modalidades, a infecção viral compreende a infecção por um ou mais vírus.

Em algumas modalidades, as infecções virais são infecções selecionadas a partir de vírus das famílias *orthmyxoviridae*, *paramyxoviridae*,
25 *arenaviridae*, *bunyaviridae*, *flaviviridae*, *filoviridae*, *togaviridae*, *picornaviridae* ou *coronaviridae*, ou qualquer combinação das mesmas. Em algumas modalidades, as infecções virais são infecções selecionadas a partir dos vírus da hepatite, vírus da imunodeficiência, pólio, sarampo, Ebola, Cocksackie, Rino,
30 Vírus do Oeste do Nilo, varíola, encefalite, Febre Amarela, Dengue, influenza (incluindo humana, aviária e suína), lassa, coriomeningitis linfocítica, junin, machupo, guanarito, hantavírus, Febre do Vale do Rift, La Crosse, encefalite

da Califórnia, Crimean-Congo, Marburg, Encefalite Japonesa, Doença da Floresta de Kyasanur, Encefalite equina venezuelana, Encefalite equina oriental, Encefalite equina ocidental, síndrome respiratória aguda grave (SARS), parainfluenza, sincicial respiratório, Punta Toro, Tacaribe e pachin-
 5 dae, ou qualquer combinação dos mesmos.

Em algumas modalidades, a infecção viral compreende infecção por um ou mais vírus selecionados a partir do grupo consistindo em adenovírus, Dengue, influenza A e influenza B (incluindo humana, aviária e suína),
 10 junin, sarampo, parainfluenza, Pichinde, punta toro, sincicial respiratório, rinovírus, Febre do Vale do Rift, síndrome respiratória aguda grave (SARS), Tacaribe, Encefalite equina venezuelana, Vírus do Oeste do Nilo e vírus da Febre Amarela.

Em algumas modalidades, o vírus é Ebola, Marburg, Febre Amarela, influenza A ou influenza B. Em algumas modalidades, o vírus é Ebola.
 15 Em algumas modalidades, o vírus é Marburg. Em algumas modalidades, o vírus é Febre Amarela. Em algumas modalidades, o vírus é influenza A ou influenza B.

Em algumas modalidades, o vírus é Vírus do Oeste do Nilo ou Dengue. Em algumas modalidades o vírus é Vírus do Oeste do Nilo. Em al-
 20 gumas modalidades, o vírus é Dengue.

Em algumas modalidades, as infecções virais são infecções selecionadas a partir dos vírus da influenza A, influenza B, PIV, RSV, Junin, Pichinde, Febre do Vale do Rift, Dengue, sarampo, Febre Amarela e SARS-CoV, ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, as
 25 infecções virais são infecções selecionadas a partir influenza A e B, subtipos dos mesmos, cepas dos mesmos, ou qualquer combinação d. Em algumas modalidades, as infecções virais são infecções selecionadas a partir Ebola, Marburg ou Febre Amarela. Em algumas modalidades, a infecção viral é Ebola. Em algumas modalidades, a infecção viral é Marburg. Em algumas
 30 modalidades, a infecção viral é Febre Amarela. Em algumas modalidades, a infecção viral é Vírus do Oeste do Nilo ou Dengue. Em algumas modalidades a infecção viral é Vírus do Oeste do Nilo. Em algumas modalidades, a infec-

ção viral é Dengue.

Em algumas modalidades, a descrição provê o uso de composições farmacêuticas e/ou medicamentos compreendidos pelo composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo, em
5 um método de tratamento de uma infecção viral, e/ou estado de doença, e/ou condição causada por ou relativa a tal infecção viral.

Em algumas modalidades, o método de tratamento compreende as etapas de: i) identificar um sujeito necessitando de tal tratamento; (ii) provimento de um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo, ou uma composição compreendendo um composto
10 de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo; e (iii) administração do referido composto ou composição em uma quantidade terapeuticamente eficiente para tratar a infecção viral no sujeito ou para inibir a atividade da DNA ou RNA polimerase viral em um sujeito necessitando de
15 tal tratamento.

Em algumas modalidades, a eficiência do tratamento resulta da inibição de uma DNA ou RNA polimerase viral. Em algumas modalidades, a eficiência do tratamento resulta da inibição de polimerases virais a partir de uma ou mais famílias de vírus.

20 Em algumas modalidades, as polimerases virais ou vírus são a partir de um ou mais gênero de vírus. Em algumas modalidades, as polimerases virais ou vírus são a partir de uma ou mais espécies de vírus. Em algumas modalidades, as polimerases virais ou vírus são selecionados a partir de um ou mais subtipos, serotipos ou cepas.

25 Em algumas modalidades, o método é desempenhado *in vivo*.

Em algumas modalidades, o sujeito é um mamífero. Em algumas modalidades, o sujeito é um humano. Em algumas modalidades, o sujeito é uma ave. Em algumas modalidades, o sujeito é um suíno ou porco.

Em algumas modalidades, o fluido corporal é sangue. Em algumas modalidades, o fluido corporal é plasma. Em algumas modalidades, o
30 fluido corporal é soro sanguíneo.

Em algumas modalidades, o composto ou composição é admi-

nistrado de modo intravenoso, interperitoneal, por via intramuscular ou oralmente.

Em algumas modalidades, o composto ou composição é administrado de modo intravenoso.

5 Em algumas modalidades, o composto ou composição é administrado por via intraperitoneal.

Em algumas modalidades, o composto ou composição é administrada por via intramuscular.

10 Em algumas modalidades, o composto ou composição é administrado oralmente.

Os métodos compreendem a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficiente de um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, ou uma composição compreendendo um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma, e um transportador farmaceuticamente aceitável. Os transportadores farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos por aqueles versados na técnica, e incluem, por exemplo, adjuvantes, diluentes, excipientes, preenchimentos, lubrificantes e veículos. Frequentemente, o transportador farmaceuticamente aceitável é quimicamente inerte em direção a compostos ativos e é não tóxico sob as condições de uso. Exemplos de transportadores farmaceuticamente aceitáveis podem incluir, por exemplo, água ou solução salina, polímeros, tais como polietilenoglicol, carboidratos e derivados dos mesmos, óleos, ácidos graxos ou alcoóis. Em algumas modalidades, o transportador é salina ou água. Em algumas modalidades, o transportador é salina. Em algumas modalidades, o transportador é água.

15
20
25

Em algumas modalidades, o método de prevenção ou supressão da infecção viral ou estado de doença compreende as etapas de: i) identificação de um sujeito necessitando de tal tratamento; (ii) provimento de um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo, ou uma composição compreendendo um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo; e (iii) administração do referido composto ou composição em uma quantidade terapêutica-

30

mente eficiente para evitar ou suprimir a infecção viral ou estado de doença no sujeito ou para inibir a atividade de DNA ou RNA polimerase viral em um sujeito necessitando de tal tratamento.

Os compostos da presente invenção são preparados em formas diferentes, tais como sais, hidratos, solvatos, tautômeros ou complexos, e a invenção inclui métodos englobando todas as formas variantes dos compostos.

Em algumas modalidades, os métodos da invenção compreendem sais farmaceuticamente aceitáveis do composto de fórmula I. Um composto de fórmula I pode também ser formulado como um sal farmaceuticamente aceitável, por exemplo, sal de adição de ácido, e complexos dos mesmos. A preparação de tais sais pode facilitar o uso farmacológico através da alteração das características físicas do agente sem prevenção de seu efeito fisiológico. Exemplos de alterações úteis em propriedades físicas incluem, mas não se limitam a, diminuição do ponto de fusão para facilitar a administração transmucosal e aumento da solubilidade para facilitar a administração de concentrações mais altas da droga.

Os sujeitos da invenção são sistemas *in vitro* e *in vivo*, incluindo, por exemplo, células ou tecidos isolados ou cultivados, sistemas de análise não celular *in vitro* e animais (por exemplo, um anfíbio, uma ave, um peixe, um mamífero, um marsupial, um humano, um animal doméstico, tal como, por exemplo, um gato, cão, macaco, camundongo ou rato; ou um animal comercial tal como, por exemplo, uma vaca ou porco).

Os compostos da invenção podem ser formulados em composições farmacêuticas para administração a sujeitos em uma forma biologicamente compatível adequada para administração *in vivo*. De acordo com outros aspectos, a presente invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo compostos de fórmula I em mistura com um diluente e/ou transportador farmaceuticamente aceitável. O transportador farmaceuticamente aceitável deve ser "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da composição e não deletério ao recipiente da mesma. Os transportadores farmaceuticamente aceitáveis empregados aqui podem

ser selecionados a partir de vários materiais orgânicos ou inorgânicos que são utilizados como materiais para formulações farmacêuticas e que são incorporados como agentes analgésicos, tampões, ligantes, desintegrantes, diluentes, emulsificantes, excipientes, extensores, deslizantes, solubilizantes, estabilizadores, agentes de suspensão, agentes de tonicidade, veículos e agentes que aumentam a viscosidade. Aditivos farmacêuticos, tais como antioxidantes, aromatizantes, corantes, agentes que melhoram o sabor, conservantes e adoçantes, podem também ser adicionados. Exemplos de transportadores farmacêuticos aceitáveis incluem carboximetilcelulose, celulose cristalina, glicerina, goma arábica, lactose, estearato de magnésio, metilcelulose, pós, salina, alginato de sódio, sacarose, amido, talco e água, dentre outros. Em algumas modalidades, o termo "farmaceuticamente aceitável" significa aprovado por uma agência reguladora do governo federal ou estadual ou listado na Farmacopeia dos Estados Unidos ou outra farmacopeia geralmente reconhecida para uso em animais e, mais particularmente, em humanos.

Surfactantes, tais como, por exemplo, detergentes, são também adequados para uso nas formulações. Exemplos específicos de surfactantes incluem polivinilpirrolidona, alcoóis polivinílicos, copolímeros de acetato de vinila e de vinilpirrolidona, polietilenoglicóis, álcool benzílico, manitol, glicerol, sorbitol ou ésteres polioxietilenados de sorbitan; lecitina ou carboximetilcelulose de sódio; ou derivados acrílicos, tais como metacrilatos e outros, surfactantes aniônicos, tais como estearatos alcalinos, em particular estearato de sódio, potássio ou amônio; estearato de cálcio ou estearato de trietanolamina; sulfatos de alquila, em particular lauril sulfato de sódio e cetil sulfato de sódio; dodecilbenzenosulfonato de sódio ou dioctil sulfosuccinato de sódio; ou ácidos graxos, em particular aqueles derivados de óleo de coco, surfactantes catiônicos, tais como sais de amônio quaternário solúvel em água de fórmula $N^+R'R''R'''Y^-$, em que os R radicais são radicais de hidrocarboneto hidroxilado opcionalmente idênticos ou diferentes e Y^- é um ânion de um ácido forte, tal como ânions de haleto, sulfato e sulfonato; brometo de cetiltrimetilamônio é um dos surfactantes catiônicos que podem ser utilizados, sais

de amina de fórmula $N^+R'R''R'''$, em que os R radicais são radicais de hidrocarboneto hidroxilado opcionalmente idênticos ou diferentes; cloridrato de octadecilamina é um dos surfactantes catiônicos que podem ser utilizados, surfactantes não iônicos, tais como ésteres de sorbitan opcionalmente polioxietilenados, em particular Polisorbato 80, ou alquil éteres polioxietilenados; 5 estearato de polietilenoglicol, derivados polioxietilenados de óleo de rícino, ésteres de poliglicerol, alcoóis graxos polioxietilenados, ácidos graxos polioxietilenados ou copolímeros de óxido de etileno e de óxido de propileno, surfactantes anfotéricos, tais como compostos de betaína substituídos de 10 lauril.

Quando administrado a um sujeito, os compostos de fórmula I e transportadores farmacêuticamente aceitáveis podem ser estéreis. Em algumas modalidades, a água é um transportador quando o composto de fórmula I é administrado de modo intravenoso. Em algumas modalidades, o 15 transportador é uma solução salina quando o composto de fórmula I é administrado de modo intravenoso. Soluções de dextrose e glicerol aquosas podem também ser empregadas como transportadores líquidos, particularmente para soluções injetáveis. Transportadores farmacêuticos adequados também incluem excipientes tais como amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, sílica-gel, estearato de sódio, monoestearato 20 de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado em pó, glicerol, propileno, glicol, polietilenoglicol 300, água, etanol, polisorbato 20 e similares. As presentes composições, caso desejado, podem conter quantidades minoritárias de agentes umidificantes ou emulsificantes, ou agentes de tamponamento 25 de pH.

As formulações farmacêuticas da presente invenção são preparadas através de métodos bem conhecidos nas técnicas farmacêuticas. Por exemplo, os compostos de fórmula I são trazidos para associação com um transportador e/ou diluente, como uma suspensão ou solução. Opcionalmente, 30 um ou mais ingredientes acessórios (por exemplo, tampões, agentes flavorizantes, agentes ativos de superfície e similares) também são adicionados. A escolha do transportador é determinada pela solubilidade e natureza

química dos compostos, via de administração escolhida e prática farmacêutica padrão. Em algumas modalidades, a formulação compreende um composto de fórmula I e água. Em algumas modalidades, a formulação compreende um composto de fórmula I e salina.

5 Adicionalmente, os compostos da presente invenção são administrados a um sujeito humano ou animal através de procedimentos conhecidos incluindo, sem limitação, administração oral, administração sublingual ou bucal, administração parenteral, administração transdermal, via inalação ou por via intranasal, por via vaginal, por via retal e por via intramuscular. Os
10 compostos da invenção são administrados por via parenteral, por injeção epifascial, intracapsular, intracraniana, intracutânea, intratecal, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraespinhal, intraesternal, intravascular, intravenosa, parenquimatosa, subcutânea ou sublingual, ou por meio de cateter. Em algumas modalidades, o composto é administrado ao sujeito por
15 meio de entrega intramuscular. Em algumas modalidades, o composto é administrado ao sujeito por meio de entrega intraperitoneal. Em algumas modalidades, o composto é administrado ao sujeito por meio de entrega intravenosa. Em algumas modalidades, o composto é administrado oralmente.

 Para administração oral, uma formulação dos compostos da invenção pode ser apresentada como cápsulas, comprimidos, pós, grânulos, ou como uma suspensão ou solução. Formulações em cápsulas podem ser
20 gelatina, cápsulas em gel ou sólido. Comprimidos e formulações em cápsula podem adicionalmente conter um ou mais adjuvantes, ligantes, diluentes, desintegrantes, excipientes, preenchimentos ou lubrificantes, cada um dos
25 quais são de conhecimento na técnica. Exemplos de tais incluem carboidratos, tais como lactose ou sacarose, fosfato de cálcio dibásico anidro, amido de milho, manitol, xilitol, celulose ou derivados dos mesmos, celulose microcristalina, gelatina, estearatos, dióxido de silício, talco, amido glicolato de sódio, acácia, agentes flavorizantes, conservantes, agentes de tamponamento, desintegrantes e corantes. Composições administradas oralmente
30 podem conter um ou mais agentes opcionais, tais como, por exemplo, agentes adoçantes, tais como frutose, aspartame ou sacarina; agentes flavorizan-

tes, tais como hortelã, óleo de *wintergreen*, ou cereja; agentes corantes; e agentes conservantes, para prover uma preparação farmacêuticamente palatável.

Para administração parenteral (ou seja, administração por injeção através de uma via outra que não seja o canal alimentar), os compostos da invenção podem ser combinados com uma solução aquosa estéril que é isotônica com o sangue do sujeito. Uma formulação tal é preparada através da dissolução de um ingrediente ativo sólido em água contendo substâncias fisiologicamente compatíveis, tais como cloreto de sódio, glicina e similares, e tendo um pH tamponado compatível com condições fisiológicas, de modo a produzir uma solução aquosa, tornando então a referida solução estéril. A formulação pode ser apresentada em unidade ou recipientes de dosagem múltiplas, tais como ampolas ou frascos vedados. A formulação pode ser entregue através de qualquer modo de injeção, incluindo, sem limitação, epifascial, intracapsular, intracraniana, intracutânea, intratecal, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraespinhal, intraesternal, intravascular, intravenosa, parenquimatosa, subcutânea ou sublingual ou por meio de cateter para dentro do corpo do sujeito.

A administração parenteral inclui soluções de base aquosa e não aquosa. Exemplos das quais incluem, por exemplo, água, salina, soluções de açúcares alcoólicos ou açúcar aquoso, alcoólicos (tais como álcool etílico, isopropanol, glicóis), éteres, óleos, glicerídeos, ácidos graxos e ésteres de ácido graxo. Em algumas modalidades, a água é utilizada para administração parenteral. Em algumas modalidades, a salina é utilizada para administração parenteral. Óleos para injeção parenteral incluem óleos de base animal, vegetal, sintética ou petróleo. Exemplos de açúcares para solução incluem sacarose, lactose, dextrose, manose e similares. Exemplos de óleos incluem óleo mineral, petrolato, de soja, de milho, de semente de algodão, de amendoim e similares. Exemplos de ácidos graxos e ésteres incluem ácido oleico, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido isoesteárico e ésteres dos mesmos.

Para administração transdermal, os compostos da invenção são

combinados com aprimoradores de penetração da pele, tais como propilenoglicol, polietilenoglicol, isopropanol, etanol, ácido oleico, N-metilpirrolidona e similares, que aumenta a permeabilidade da pele aos compostos da invenção e permitem que compostos penetrem através a pele e para dentro da corrente sanguínea. O composto/composições aprimoradoras também podem adicionalmente ser combinadas com uma substância polimérica, tal como etilcelulose, hidroxipropilcelulose, etileno/vinilacetato, polivinilpirrolidona e similares, para prover a composição na forma de gel, que são dissolvidos em um solvente, tal como cloridrato de metileno, evaporados até a viscosidade desejada e então aplicados ao material de suporte para prover uma atadura.

Em algumas modalidades, a composição está em forma de dosagem unitária, tal como um comprimido, cápsula ou frasco de dose única. Doses unitárias adequadas, ou seja, quantidades terapeuticamente eficientes podem ser determinadas durante testes clínicos projetados apropriadamente para cada uma das condições para as quais a administração de um composto escolhido é indicada e obviamente variará dependendo do ponto final clínico desejado.

A presente invenção também provê artigos de manufatura para o tratamento e prevenção de distúrbios, tais como distúrbios virais, em um sujeito. Os artigos da manufatura compreendem uma composição farmacêutica dos compostos de fórmula I, opcionalmente adicionalmente contendo pelo menos um composto antiviral adicional, conforme descrito aqui. Os artigos da manufatura são embalados com indicações para vários distúrbios que as composições farmacêuticas são capazes de tratar e/ou prevenir. Por exemplo, os artigos da manufatura compreendem uma dose unitária de um composto descrito aqui que é capaz de tratar ou prevenir certo distúrbio, e uma indicação de que a dose unitária é capaz de tratar ou prevenir certo distúrbio, por exemplo, uma infecção viral.

De acordo com um método da presente invenção, os compostos de fórmula I são administrados ao sujeito (ou são contatados com células do sujeito) em uma quantidade eficiente para limitar ou prevenir um decréscimo

no nível de vírus no sujeito, particularmente em células do sujeito. Essa quantidade é prontamente determinada pelo artesão versado, com base em procedimentos conhecidos, incluindo a análise de curvas de titulação estabelecida *in vivo* e métodos e análises descritas aqui. Em algumas modalidades, uma quantidade adequada dos compostos da invenção eficiente para limitar ou prevenir um aumento no nível de partículas virais no sujeito varia de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 1000 mg/kg/dia, e/ou é uma quantidade suficiente para obter níveis de plasma variando de cerca de 300 ng/ml a cerca de 1000 ng/ml ou superior. Em algumas modalidades, a quantidade de compostos a partir de uma invenção varia de cerca de 5 mg/kg/dia a cerca de 1000 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, a partir de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 500 mg/kg/dia é administrada. Em algumas modalidades, a partir de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 300 mg/kg/dia é administrada. Em algumas modalidades, a partir de cerca de 0,01 mg/kg/dia a cerca de 200 mg/kg/dia é administrada. Em algumas modalidades, a partir de cerca de 0,05 mg/kg/dia a cerca de 100 mg/kg/dia é administrada. Em algumas modalidades, a partir de cerca de 0,05 mg/kg/dia a cerca de 50 mg/kg/dia é administrada. Em algumas modalidades, a partir de cerca de 0,05 mg/kg/dia a cerca de 30 mg/kg/dia é administrada. Em algumas modalidades, a partir de cerca de 0,05 mg/kg/dia a cerca de 10 mg/kg/dia é administrada.

A dose precisa a ser empregada nas composições também dependerá da via de administração, e da gravidade da infecção ou distúrbio, e deve ser decidida de acordo com o julgamento do praticante e cada uma das circunstâncias do paciente. No entanto, variações eficientes de dosagem adequadas para administração intramuscular são de geralmente cerca de 0,5 a cerca de 1000 mg do composto de fórmula I por quilograma de peso corporal. Em modalidades específicas, a dose via i.m. é de cerca de 500 a cerca de 1000 mg/kg, cerca de 300 a cerca de 500 mg/kg, cerca de 200 a cerca de 300 mg/kg, cerca de 100 a cerca de 200 mg/kg, cerca de 50 a cerca de 100 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 50 mg/kg, ou cerca de 5 a cerca de 10 mg/kg (ou as doses equivalentes expressas por metro quadrado de área de superfície corporal). Alternativamente, uma variação de dosagem ade-

quada para administração via i.v. pode ser obtida utilizando-se doses de cerca de 5 a cerca de 1000 mg, sem ajuste para um peso corporal ou área de superfície corporal do paciente. Alternativamente, uma variação de dosagem adequada para administração via i.p. pode ser obtida utilizando-se doses de

5 cerca de 5 a cerca de 1000 mg, sem ajuste para um peso corporal ou área de superfície corporal do paciente. Composições orais podem conter cerca de 10% a cerca de 95% em peso de um ou mais compostos de fórmula I isolado ou em combinação com outro agente terapêutico. Em algumas modalidades da invenção, as variações de dosagem adequadas para administração

10 tração via oral, i.p. ou i.m. são geralmente cerca de 5 a cerca de 1000 mg, preferencialmente cerca de 5 a cerca de 500 mg de composto por quilograma de peso corporal ou suas doses equivalentes expressas por metro quadrado de área de superfície corporal. Em algumas modalidades a dose via oral, i.p. ou i.m. é de cerca de 5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 50 a cerca de

15 80 mg/kg, cerca de 80 a cerca de 150 mg/kg, cerca de 150 a cerca de 250 mg/kg, cerca de 250 a cerca de 350 mg/kg, cerca de 350 a cerca de 450 mg/kg, cerca de 450 a cerca de 550 mg/kg, cerca de 550 a cerca de 700 mg/kg, cerca de 700 a cerca de 1000 mg/kg (ou as doses equivalentes expressas por metro quadrado de área de superfície corporal). Em algumas

20 modalidades, a variação de dosagem adequada para administração via oral, i.p. ou i.m. administração é a partir de cerca de 5 a cerca de 2000 mg, sem ajuste para um peso corporal ou área de superfície corporal do paciente. Outras doses eficientes podem ser extrapoladas a partir das curvas de resposta à dosagem derivadas de sistemas de teste de modelo animal ou *in*

25 *vitro*. Tais modelos animais e sistemas são bem conhecidos na técnica.

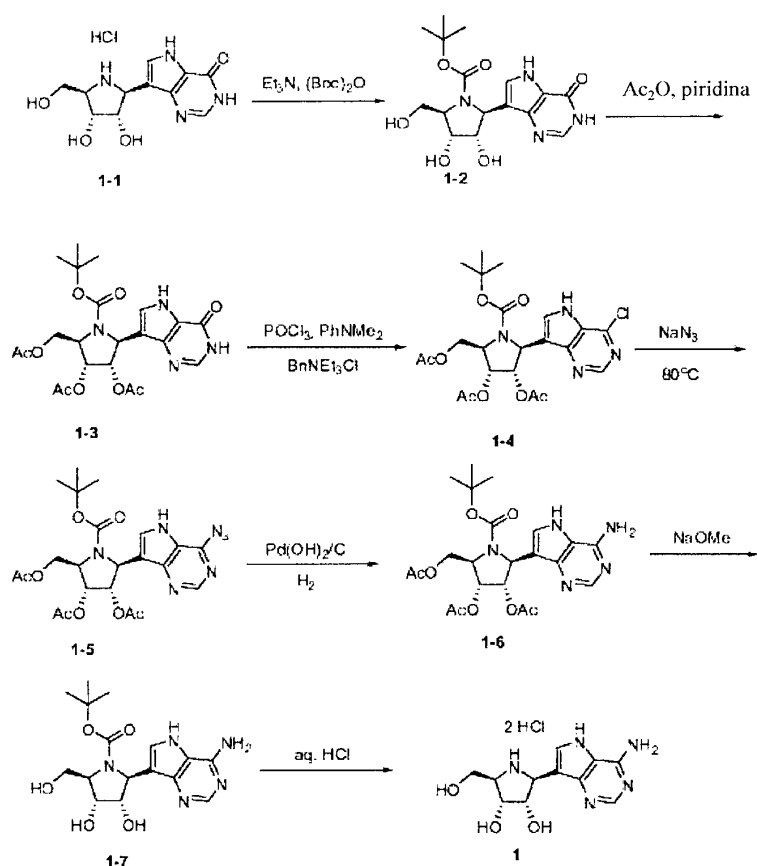
Em certos aspectos, uma "quantidade eficiente" de um composto no contexto de uma infecção viral é uma quantidade suficiente para reduzir uma ou mais das seguintes etapas do ciclo de vida de um vírus: a ancoragem da particular de vírus a uma célula, a introdução de informação genética

30 viral em uma célula, a expressão de proteínas virais, a produção de novas partículas de vírus e a liberação de partículas de vírus a partir de uma célula em pelo menos 5%, preferencialmente pelo menos 10%, pelo menos 15%,

- pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100%. Em
- 5 algumas modalidades, uma quantidade eficiente de um composto no contexto de uma infecção viral reduz a replicação, multiplicação ou espalhamento de um vírus em pelo menos 5%, preferencialmente pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos
- 10 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100%. Em algumas modalidades, uma quantidade eficiente de um composto no contexto de uma infecção viral aumenta a taxa de sobrevivência de sujeitos infectados em pelo menos 5%, preferencialmente pelo menos
- 15 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100%.
- 20 Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de assegurar o uso de não mais que a experimentação rotineira, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção descrita aqui. Tais equivalentes são pretendidos equivalentes para estarem dentro do escopo da presente invenção.
- 25 A invenção é adicionalmente descrita através dos exemplos não limitantes a seguir.

EXEMPLOS

- Exemplo 1: Síntese de (2S,3S,4R,5R)-2-(4-Amino-5H-pirrolo [3,2-d]pirimidin-7-il)-5-(hidroximetil)pirrolidina-3,4-diol** [composto 1 (fórmula I, em que A = NH₂ e B = H) como o sal de HCl].
- 30



Etapas 1:

Para uma solução de 7-((2S,3S,4R,5R)-3,4-di-hidróxi-5-(hidroximetil) pirrolidin-2-il)-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4(5H)-ona (**1-1**) [(preparada de acordo com o procedimento relatado por Evans, Gary B.; Furneaux, Richard H.; Hutchison, Tracy L.; Kezar, Hollis S.; Morris, Philip E., Jr.; Schramm, Vern L.; Tyler, Peter C em *Journal of Organic Chemistry* (2001), 66(17), 5723-5730; incorporado aqui por referência em sua totalidade) 115 g, 390 mmol] em água e metanol (1:1, 2,4 L) foi adicionado trietilamina (113 ml, 1,12 mol) à temperatura ambiente seguido por $(\text{Boc})_2\text{O}$ (227 g, 1,04 mol). A

5 mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. O produto sólido foi coletado por filtração, lavado com água, e secado a vácuo para suprir (2R,3R,4S,5S)-terc-butil 3,4-di-hidróxi-2-(hidroximetil)-5-(4-oxo-4,5-di-hidro-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidina-1-carboxilato (**1-2**) (100%)

10 como um sólido branco. ^1H RMN (300 MHz, DMSO) δ 7.85 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 4.73 - 4.53 (m, 1H), 4.29 (s, 1H), 4.03 (s, 1H), 3.97 (s, 1H), 3.70 - 3.53

15

(m, 2H), 1.36 e 1.04 (s, 3H, 6H para rotômeros).

Etapa 2:

Para uma solução de (2R,3R,4S,5S)-terc-butil 3,4-di-hidróxi-2-(hidroximetil)-5-(4-oxo-4,5-di-hidro-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidina-l-carboxilato (1-2) em piridina (184 mmol, 2,26 mol) foi adicionado DMAP (0,79 g, 6,46 mmol) e anidrido acético (107 ml, 1131 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. A mistura de reação foi diluída com clorofórmio e lavada com água, HCl aquoso, água, e bicarbonato de sódio saturado aquoso. A camada orgânica foi secada, filtrada e concentrada a vácuo, para to suprir (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(terc-butoxicarbonil)-5-(4-oxo-4,5-di-hidro-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-3) (150 g), que era puro o suficiente para ser utilizado como tal para a próxima etapa. MS (ES⁺) 493.1 (M+1), 515.1 (M+Na); (ES⁻) 491.4 (M-1).

Etapa 3:

Para uma solução de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(terc-butoxicarbonil)-5-(4-oxo-4,5-di-hidro-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-3) (150 g, 300 mmol) em acetonitrila (660 ml) foi adicionado cloreto de benziltriethylamônio (137 g, 600 mmol), dimetilalanilina (57 ml, 450 mmol), seguido por POCl₃ (164 ml, 1800 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação foi aquecida a 80°C durante 1h. A mistura de reação foi resfriada para a temperatura ambiente e concentrada para secagem a vácuo. O resíduo obtido foi dissolvido em clorofórmio e lavado com bicarbonato de sódio saturado aquoso, salmoura, secado, filtrado e concentrado para secagem. O resíduo de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(terc-butoxicarbonil)-5-(4-cloro-5H-pirrolo [3,2-d]pirimidin-7-il) pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-4) foi utilizado como tal na próxima etapa sem purificação. ¹H RMN (300 MHz, DMSO) δ 12.54 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 5.85 (m, 1H), 5.45 (m, 1H), 5.10 (m, 1H), 4.49 (m, 2H), 4.07 (m, 1H), 2.07 - 1.99 (m, 9H), 1.19 (2 bs, 9H, rotômeros).

Etapa 4:

Para uma solução de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(terc-

butoxicarbonil)-5-(4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-4) (300 mmol) em DMF (540 ml) foi adicionado azida (97,5 g, 1500 mmol) e aquecido a 80°C durante a noite. A mistura de reação foi concentrada a vácuo e o resíduo obtido foi dissolvido em clorofórmio. A camada de clorofórmio foi lavada com água, secada, filtrada e concentrada a vácuo. A purificação por cristalização a partir de (acetona: hexano = 1:2) forneceu (2R,3R,4S,5 S)-2-(acetoximetil)-5-(4-azido-5H-pirrolo [3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-5). ¹H RMN (300 MHz, DMSO) δ 13,56 - 13,00 (bs, 1H), 9,86 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 5,78 (m, 1H), 5,40 (m, 1H), 5,26 - 5,14 (m, 1H), 4,54 (m, 1H), 4,42 (m, 1H), 4,16 - 4,03 (m, 1H), 2,06 (s, 3H), 2,02 (s, 6H), 1,14 (bs, 9H); MS (ES⁺) 540,0 (M+1); (ES⁻) 515,9 (M-1).

Etapas 5:

Para uma solução de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-azido-5H-pirrolo [3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-5) (300 mmol) em metanol (1L) foi adicionado Pd(OH)₂ (30 g). A mistura de reação foi hidrogenada a (160 psi) durante a noite, e filtrada para remover o catalisador através de celita. O filtrato foi concentrado a vácuo para fornecer (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-6) (113 g). ¹H RMN (300 MHz, DMSO) δ 12,47 -11,92 (m, 1H), 8,84 - 8,03 (m, 3H), 7,90 - 7,68 (m, 1H), 5,70 - 5,51 (m, 1H), 5,38 (m, 1H), 5,12 (m, 1H), 4,42 (m, 2H), 4,17 - 4,00 (m, 1H), 2,07 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,14 (s, 9H); MS (ES⁺) 492,1 (M+1), (ES⁻) 490,0 (M-1).

Etapas 6:

Para uma solução de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-6) (111 g, 226 mmol) em metanol (500 ml) foi adicionado NaOMe (25% p/p em metanol, 4,88g, 22,6 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 3h e concentrada a vácuo para prover (2S,3S,4R,5R)-terc-butyl 2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-3,4-di-hidróxi-5-(hidroximetil)pirrolidina-l-carboxilato (1-7). ¹H RMN

(300 MHz, DMSO) δ 11,40 -10,73 (bs, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,39 (2s, 1H), 6,90 (s, 2H), 4,83 (m, 2H), 4,45 (m, 2H), 3,96 (s, 2H), 3,58 (m, 3H), 1,31 e 0,99 (s, 3H, 6H, rotômeros); MS (ES^+) 366,0 ($M+1$), 388,0 ($M+Na$); (ES^-) 363,8 ($M-1$).

Etapa 7:

5 Uma solução de (2S,3S,4R,5R)-terc-butil 2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d] pirimidin-7-il)-3,4-di-hidróxi-5-(hidroximetil)pirrolidina-l-carboxilato (1-7) de HCl aquoso (160 ml de conc. de HCl e 400 ml de água) foi agitada à temperatura ambiente durante 30 min e então concentrada a vácuo para secagem. O resíduo obtido foi dissolvido em água, tratado com carvão vegetal
10 ativado e refluxado durante 30 min. A solução foi filtrada através de celita e concentrada para obter um produto semissólido, que foi recristalizado a partir de água e etanol para fornecer (2S,3S,4R,5R)-2-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-5-(hidroximetil) pirrolidina-3,4-diol (1) (50 g, rendimento total para 7 etapas: 42.6%) como cristal branco. 1H RMN (300 MHz, D_2O) δ 8,41
15 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 4,99 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 4,78 (m, 1H), 4,45 (dd, $J = 3, 1,5$ Hz, 1H), 3,97 (m, 2H), 3,90 (m, 1H); MS (ES^+) 266,2 ($M+1$), (ES^-) 264,0 ($M-1$); Análise: Calculado para $C_{11}H_{15}N_5O_3 \cdot 2$ HCl: C, 39,07; H, 5,07; N, 20,71; Cl, 20,97; Encontrado: C, 39,09; H, 5,10; N, 20,49; Cl, 20,84.

Exemplo 2: Síntese em larga escala de (2S,3S,4R,5R)-2-(4-Amino-5H-pirrolo [3,2-d] pirimidin-7-il)-5-(hidroximetil) pirrolidina-3,4-diol [composto 1 (fórmula I, em que A = NH_2 e B = H) como o sal de HCl].

Etapa 1:

Para uma suspensão de 7-((2S,3S,4R,5R)-3,4-di-hidróxi-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il)-3H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4(5H)-ona (1-1) [(preparado de acordo como o procedimento relatado por Evans, Gary B.; Furneaux, Richard H.; Hutchison, Tracy L.; Kezar, Hollis S.; Morris, Philip E., Jr.; Schramm, Vern L.; Tyler, Peter C em *Journal of Organic Chemistry* (2001), 66(17), 5723-5730), 500,0 g, 1,474 mol, 1 eq)] em uma mistura água: metanol (1:1, 10,4L) foi adicionado trietilamina (621 ml, 4.422 mol, 3,0 eq) à temperatura ambiente seguido por (Boc)20 (987 g, 4,53 mol, 3,1 eq). A mistura de reação se tornou claramente colorida após a adição de (Boc) 20 com leve aumento da temperatura interna de 28°C a 33°C. A solução iniciou mostran-

do alguma turbidez após 1 hora de agitação. A solução foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. O produto sólido foi coletado por filtração e lavado com água (5,0L), secado a alto vácuo a 50°C para fornecer (2R,3R,4S,5S)-terc-butil3,4-di-hidróxi-2-(hidroximetil)-5-(4-oxo-4,5-di-hidro-3H-pirrólo [3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidina-l-carboxilato (1-2) (482 g, 89%).

¹H RMN (300 MHz, DMSO) δ 11,92 (s, 2H), 7,81 (s, 1H), 7,32 (d, J= 22,7 Hz, 1H), 5,73 - 5,20 (m, 1H), 5,05 - 4,91 (m, 1H), 4,87 - 4,76 (m, 1H), 4,74 - 4,49 (m, 1H), 4,33 - 4,17 (m, 1H), 4,09 - 3,86 (m, 2H), 3,64 - 3,48 (m, 2H), 1,39 - 1,00 (m, 9H); MS (ES⁺) 755,1 (2M+Na), (ES⁻) 731,7 (2M-1); Análise; Calculado para C₁₆H₂₂N₄O₆: C, 52,45; H, 6,05; N, 15,29; Encontrado: C, 52,24; H, 6,02; N, 15,05.

Etapas 2:

Para uma suspensão de (2R,3R,4S,5S)-terc-butil 3,4-di-hidróxi-2-(hidroximetil)-5-(4-oxo-4,5-di-hidro-3H-pirrólo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidina-l-carboxilato (1-2) (482 g, 1,32 mol, 1.0 equiv.) em piridina (740 ml, 9,21 mol, 7 equiv.) foi adicionado DMAP (3,22 g, 26,32 mmol, 0,2 equiv.) e anidrido acético (435 ml, 4,61 mmol, 3,5 eq) à temperatura ambiente. A temperatura interna começou a subir com a adição do anidrido acético, portanto, o resfriamento por banho de água e gelo foi desempenhado. Com a adição total do anidrido, a temperatura aumentou para 67°C, então diminuiu para a temperatura ambiente. O banho de água e gelo foi removido após a reação ter alcançado 25°C. A suspensão não proveu uma solução clara, mas uma suspensão mais leve foi observada. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 14h para render uma solução não clara. Uma alíquota estimulada mostrou que não havia mais material inicial e dois pontos importantes pelo TLC (9:1 clorofórmio: metanol), MS mostra dois pontos importantes em (493,0, M+1) para produto e provido tetra-acetilado (M+1= 535). A mistura de reação foi diluída com 3,0L de clorofórmio, agitado durante 10 minutos, então se adicionou 2,0L de água deionizada. Um produto branco ceráceo foi formado na interface de fase orgânica aquosa. Esse produto permaneceu na fase aquosa após a realização da partição. A fase orgânica foi separada e lavada novamente com 2,0L de água. As lavagens com água

combinadas foram de volta extraídas com 1,0 de clorofórmio. As fases orgânicas combinadas foram lavadas com HCl 2.0 N aquoso (2 x 1,0L), água (2 x 1,0L), bicarbonato de sódio saturado (2 x 1,0L) e salmoura (2 x 1,0L). A camada orgânica foi secada ao longo de MgSO_4 , filtrada e concentrada para secagem a vácuo e banho de água de 50-55°C. O vácuo foi alterado para uma bomba de óleo a alto vácuo até que nenhum destilado tenha sido observado para fornecer um produto adocicado denso. O produto foi deixado em bomba de óleo de alto vácuo durante 14h para minimizar a piridina residual. Uma combinação de espuma sólida que se transformou em um sólido branco bom e um resíduo denso de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(terc-butoxicarbonil)-5-(4-oxo-4,5-di-hidro-3H-pirrólo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-3) foi obtido (715, 110% de rendimento). Esta porcentagem reflete a quantidade de composto tetra-acetilado. O produto era puro o suficiente para ser utilizado como está para a próxima etapa. Uma amostra analítica foi preparada para a purificação da mistura utilizando cromatografia de coluna *flash* [sílica-gel, eluindo com 0-100% (9:1) acetato de etila/metanol em hexano] para fornecer (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(terc-butoxicarbonil)-5-(4-oxo-4,5-di-hidro-3H-pirrólo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-3) como um sólido branco; $^1\text{HRMN}$ (300 MHz, DMSO) δ 12,13 (s, 1H, D_2O Permutável), 11,98 (s, 1H, D_2O permutável), 7,82 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 5,76 (s, 1H), 5,37 (t, J = 4,5 Hz, 1H), 4,99 (s, 1H), 4,55 (dd, J = 11,3, 6,6 Hz, 1H), 4,34 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 4,03 (q, J = 7,1 Hz, 1H), 2,01 (d, J = 12,6 Hz, 9H), 1,23 (dd, J = 39,9, 32,8 Hz, 9H); MS (ES^+) 493,0 (M+1); (ES^-) 526,7 (M+C1); Análise: Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_9$: C, 53,65; H, 5,73; N, 11,38; Encontrado: C, 53,18; H, 5,89; N, 11,10

Etapa 3:

Para uma solução de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(terc-butoxicarbonil)-5-(4-oxo-4,5-di-hidro-3H-pirrólo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-3) (622 g, 1,26 mol, 1,0 eq) em acetonitrila (2,75L) foi adicionado cloreto de benziltriethylamônio (575 g, 2,5 mol, 2,0 eq), dimetilanilina (240 ml, 1,9 mol, 1,5 eq), seguido por POCl_3 (706 ml, 7,58 mol, 6,0 eq) à temperatura ambiente. Uma solução de coloração amarela clara foi obtida. A

mistura de reação foi lentamente aquecida até 80°C e mantida a essa temperatura durante 10 minutos. TLC em 9:1 clorofórmio:metanol mostra que a reação está >98% completa. A solução homogênea preta foi resfriada até 50,0°C e concentrada a vácuo (banho de água 70-73°C) para remover o

5 POCl₃, o resíduo colocado sob o alto vácuo da bomba de óleo até que nenhum destilado fosse observado. O resíduo foi dissolvido em 3,0L de clorofórmio e rapidamente lavado cuidadosamente com bicarbonato de sódio saturado aquoso até que um pH neutro fosse obtido. A camada orgânica foi lavada separadamente com água (2L), salmoura (2L), secada ao longo de

10 MgSO₄, filtrada e concentrada a vácuo para secagem (banho de água a 50-53°C). O produto preto de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(terc-butoxicarbonil)-5-(4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-4) foi utilizado como está na próxima etapa sem purificação.

Etapa 4:

15 Para uma solução de (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-1-(terc-butoxicarbonil)-5-(4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-4) (622g, 1,26 mol, 1 eq) em DMF (1,5 L) foi adicionado azida de sódio (411 g, 6,32 mol, 5 equiv.) e aquecido com agitação a 60°C durante 10 horas, em cujo tempo a reação foi completada (TLC em 9:1 clorofórmio:metanol e 1:1 hexano:acetato de etila). A reação foi resfriada a 25°C,

20 despejada em gelo (2L) e extraída com clorofórmio (2 x 1L). As camadas de clorofórmio foram combinadas e lavadas com água (2 x 2L), salmoura (2L), secadas, filtradas e concentradas a vácuo (banho de água de 70-80°C) para render uma lama preta. A purificação da lama foi obtida por cromatografia de

25 coluna (987 g de lama preta, 8x30 polegadas de coluna, 1/2 cheia de sílica-gel, perfil de eluição hexano:acetato de etila; 9:1 (40,0L); 7:3 (20,0L); 6:4 (20,0L); 1:1 (20L); 4:6 (20,0L) e 2:8 (20,0L); As frações apropriadas foram empoadas e concentradas a vácuo (banho de água de 50,0°C) para fornecer (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-azido-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-

30 1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-5) (407,05 g, 62,3% de rendimento para duas etapas) como um produto semelhante a mel de coloração avermelhada. Uma amostra analítica foi preparada para purificação da

mistura por cromatografia de coluna *flash* [0-100% acetato de etila em hexano] para fornecer (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-azido-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-5) como um sólido alaranjado. ¹HRMN (300 MHz, DMSO) δ 13.08 (d, J = 155.6 Hz, 1H, D₂O permutável), 9.86 (s, 1H), 7.61 (d, J = 76.8 Hz, 1H), 5.78 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 5.41 (t, J = 4.3 Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.55 (dd, J = 11.4, 6.4 Hz, 1H), 4.41 (dd, J = 11.4, 3.9 Hz, 1H), 4.07 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.01 (d, J = 9.9 Hz, 6H), 1.23 (dd, J = 39.8, 32.7 Hz, 9H); MS (ES⁺) 518.0 (M+1), 540 (M+23); (ES⁻) 516.4 (M-1); Análise: Calculado para C₂₂H₂₇N₇O₈: C, 51.06; H, 5.26; N, 18.95 Encontrado: C, 50.97; H, 5.30; N, 18.62.

Etapa 5:

(2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-azido-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-5) foi reduzido em três lotes diferentes conforme segue

Lote 1: Para um hidrogenador Parr de 2,0L, acréscimo de Teflon foi adicionado (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-azido-5H-pirrolo[3,2-d] pirimidin-7-il)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-5) (108,01g, 300 mmol em metanol, 800 ml), Pd(OH)₂ (21,6 g, 20% p/p).

Lote 2: Para um hidrogenador Parr de 2,0L, acréscimo de Teflon foi adicionado (1-5) (140,70g, 271,9 mmol em metanol, 1,0L), Pd(OH)₂ (28,14 g, 20% p/p).

Lote 3: Para um hidrogenador Parr de 2,0L, acréscimo de Teflon foi adicionado (1-5) (140,7 g, 271,9 mmol em metanol, 1,0L), Pd(OH)₂ (28,14 g, 20% p/p).

As misturas de reação foram hidrogenadas em 150 psi durante 15-18 horas. A mistura de reação foi filtrada para remover o catalisador através da celita. O filtrato foi concentrado a vácuo (banho de água de 60-70°C) até o peso constante para fornecer um produto colorido escuro (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-amino-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(terc-butoxicarbonil) pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-6) (328.8 g, 89%). O produto era puro o suficiente para ser utilizado como está para a próxima etapa. Uma amostra analítica foi preparada para a da mistura utilizando cromatografia de

coluna *flash* (0-10% metanol em clorofórmio). ^1H RMN (300 MHz, DMSO) δ 11.06 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 6.94 (s, 2H), 5.86 (s, 1H), 5.44 (t, J = 4.2 Hz, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.56 (dd, J = 11.3, 6.9 Hz, 1H), 4.40 (dd, J = 11.3, 4.2 Hz, 1H), 4.16 - 3.98 (m, 1H), 2.09 - 1.94 (m, 9H), 1.48 - 1.14 (m, 9H); MS (ES⁺) 492.1 (M+1); (ES⁻) 526.4 (M+C1); Análise: Calculado para C₂₂H₂₉N₅O₈•1.25H₂O: C, 51.41; H, 6.18; N, 13.62; Encontrado: C, 51.24; H, 5.92; N, 13.33.

Etapas 6:

Lote 1. Para (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-amino-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-6) (81,5g, 165,8 mmol), foram adicionados metanol anidro (370 ml) seguidos pela adição de NaOMe (metóxido de sódio, 25% em peso solução em metanol, 4,49g, 20,76 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente até TLC (clorofórmio: metanol 9:1) mostrar que todo o material inicial reagiu.

Lote 2. Para (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-amino-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-6) (117,8 g, 239,6 mmol), foram adicionados metanol anidro (530 ml) seguidos pela adição de NaOMe (metóxido de sódio, 25% em peso solução em metanol, 6,58g, 30,45 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente até TLC (clorofórmio:metanol 9:1) mostrar que todo o material inicial reagiram;

Lote 3. Para (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoximetil)-5-(4-amino-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-7-il)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil diacetato (1-6) (129,5 g, 263,5 mmol) foram adicionados metanol anidro (584 ml) seguidos pela adição de NaOMe (metóxido de sódio, 25% em peso solução em metanol, 6,99g, 32,35 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente até TLC (clorofórmio:metanol 9:1) mostrar que todo o material inicial reagiu (7-8 horas).

As soluções acima foram concentradas (banho de água de 65-75°C) para fornecer (2S,3S,4R,5R)-terc-butil 2-(4-amino-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-7-il)-3,4-di-hidróxi-5-(hidroximetil)pirrolidina-l-carboxilato (1-7) que

era pura o suficiente para ser utilizada como está para a próxima etapa. Uma amostra analítica foi preparada por purificação da mistura utilizando cromatografia de coluna flash (0-10% metanol em clorofórmio). ^1H RMN (300 MHz, DMSO) δ 10.77 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.82 (s, 3H), 5.04 - 4.91 (m, 1H), 4.87 - 4.74 (m, 1H), 4.56 - 4.35 (m, 2H), 4.04 - 3.90 (m, 2H), 3.72 - 3.63 (m, 1H), 3.59 - 3.41 (m, 1H), 1.15 (2s, 9H); MS (ES^+) 366.1 ($\text{M}+1$); (ES^-) 400.3 ($\text{M}+\text{C}1$); Análise: Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_5 \cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$: C, 51.33; H, 6.46; N, 18.71; Encontrado: C, 51.04; H, 6.43; N, 18.48.

Etapas 7:

(2S,3S,4R,5R)-terc-butil 2-(4-amino-5H-pirrólo[3,2-d]pirimidin-7-il)-3,4-di-hidróxi-5-(hidroximetil)pirrolidina-l-carboxilato (1-7) foram tratados como segue em três lotes.

Lote 1. (1-7) foi dissolvido em HCl aq. (118 ml de conc. de HCl e 293 ml de água);

Lote 2. (1-7) foi dissolvido em HCl aq. (169 ml de conc. de HCl e 421 ml de água).

Lote 3. (1-7) foi dissolvido em HCl aq. (186 ml de conc. de HCl e 468 ml de água).

As misturas de reação foram agitadas à temperatura ambiente durante 30 min (forte evolução de gás CO_2) e então cada lote foi concentrado a vácuo para secagem (80-90°C). Os lotes 2 e 3 foram empoçados para prover 226g de produto amarelo claro úmido. O lote 1 proveu 91,4 de um produto acinzentado escuro. A cristalização foi realizada conforme segue: Para o produto úmido dos lotes 2 e 3: 226 ml de água foram adicionados ao produto então aquecidos 50°C em cujo ponto o etanol quente foi lentamente adicionado até que a cristalização se iniciou. A mistura foi mantida a 50°C durante 10 minutos, então, permitiu-se que alcançasse 25°C com forte agitação antes da filtração para prover pó de coloração amarelada clara de (2S,3S,4R,5R)-2-(4-amino-5H-pirrólo[3,2-d]pirimidin-7-il)-5-(hidroximetil)pirrolidina-3,4-diol (1) (88g). O lote um foi purificado do mesmo modo para prover 33,0g de produto de coloração cinzenta clara. O rendimento total é 121,0g após a secagem a 55°C em alto vácuo. O licor-mãe da

recristalização dos lotes 1 e 2 foi reprocessado para prover 15,0g de produto em pó amarelado leve (1). ^1H RMN (300 MHz, DMSO) δ 14.60 (s, 1H), 13.25 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 9.13 (s, 2H), 8.84 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.11 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 5.55 (s, 2H), 4.78 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.44 (dd, J = 8.8, 5.0 Hz, 1H), 4.14 - 4.02 (m, 1H), 3.73 (d, J = 5.1 Hz, 2H), 3.52 (s, 1H); ^1H RMN (300 MHz, D₂O) δ 8.33 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 4.90 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 4.65 (s, 1H), 4.37 (dd, J = 4.8, 3.4 Hz, 1H), 3.89 (s, 1H), 3.88 (s, 1H), 3.81 (dd, J = 8.1, 4.5 Hz, 1H); MS (ES⁺) 266.3 (M+1); Rotação óptica -52.69; (H₂O, C=1.15); MP: 238°C; Análise: Calculado para C₁₁H₁₅N₅O₃.2HCl.0.25H₂O: C, 38.55; H, 5.15; Cl, 20.44; N, 20.69; Encontrado: C, 38.67; H, 5.05; Cl, 20.45; N, 20.42.

Exemplo 3: Fosforilação do composto 1 (fórmula I, em que A = NH₂ e B = H) e Estudos de Incorporação de DNA/RNA.

Células de carcinoma hepatocelular humanas (Huh-7) foram incubadas com ^3H -composto 1 durante 24h, seguido por extração de metanol e análise de HPLC utilizando coluna de SAX e detector radioativo. FIG. 1 mostra a fosforilação do composto 1 em células de Huh-7, indicando a fosforilação eficiente em células.

As figuras 2-4 mostram que o composto 1 é fosforilado, mas não incorporado em RNA ou DNA mamífero (DP designa difosfato e TP designa trifosfato). FIG. 2 mostra a fosforilação de adenosina em células de Huh-7. FIG. 3 mostra fosforilação do composto 1 em células de Huh-7. FIG. 4 mostra a incorporação de DNA genômico e RNA total do composto 1 e adenosina em células de Huh-7.

Exemplo 4: Efeitos do inibidor de RNA polimerase viral (fórmula I, em que A = NH₂ e B = H: composto 1) na replicação de Vírus do sarampo em Células de rim de macaco-verde africano.

Materiais e Métodos: células Vero 76 (células de rim de macaco-verde africano) foram obtidas a partir de coleta de cultura do Tipo Americano (ATCC, Manassas, VA). As células foram rotineiramente passadas em meio essencial mínimo (MEM com 0,15% de NaHCO₃; Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) suplementadas com 5% de soro bovino fetal (FBS, Hyclone). Quando da avaliação de compostos, o soro foi reduzido a uma concentração

final de 2,5%, e gentamicina é adicionada para testar o meio para uma concentração final de 50 µg/ml. O vírus do sarampo (MV), cepa Chicago, foi obtido a partir dos Centros para Controle de Doença (Atlanta, GA).

Procedimentos de Teste Antiviral:

5 Análise de Inibição de Efeito Citopático (Análise Visual)

As células foram semeadas em placas de cultura de tecido de fundo plano de 96 poços (Corning Glass Works, Corning, NY), 0,2 ml/poço, na concentração celular apropriada, e incubadas durante a noite a 37°C a fim de estabelecer uma monocamada celular. Quando a monocamada foi estabelecida, o meio de crescimento foi decantado e várias diluições de composto de teste foram adicionada a cada poço (3 poços/diluição, 0,1 ml/poço). O meio diluente de composto foi adicionado aos poços de controle de vírus e célula (0,1 ml/poço). O vírus, diluído no meio de teste, foi adicionado aos poços de teste de composto (3 poços/diluição de composto) e aos poços de controle de vírus (6 poços) em 0,1 ml/poço. O vírus (MOI viral = 0,001) foi adicionado aproximadamente 5 min após o composto. O meio de teste sem vírus foi adicionado a todos os poços de controle de toxidade (2 poços/diluição de cada composto de teste) e aos poços de controle de célula (6 poços) em 0,1 ml/poço. As placas foram incubadas a 37°C em um incubador umidificado com 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico até que os poços de controle de vírus tivessem leituras de efeito citopático adequadas (CPE) (80-100% de destruição celular). Isso foi obtido a partir de 4-11 dias após a exposição do vírus às células, dependendo do vírus. As células foram então examinadas microscopicamente para CPE, isso sendo pontuado a partir de 0 (células normais) a 4 (máximo, 100%, CPE). As células nos poços de controle de toxidade foram observadas microscopicamente para alterações morfológicas atribuídas à citotoxicidade. Essa citotoxicidade (destruição celular e/ou alteração de morfologia) foi também graduada em 100% de toxicidade, 80% de citotoxicidade, 60% de citotoxicidade, 40% de citotoxicidade, 20% de citotoxicidade, e 0 (células normais). A dose eficiente de 50% (EC₅₀) e a dose citotóxica de 50% (IC₅₀) foram calculadas por análise de regressão de CPE dos dados do vírus e os dados de controle de toxicidade, respectiva-

mente. O índice seletivo (SI) para cada composto testado foi calculado utilizando a fórmula: $SI = CC50 - EC50$.

Análise de Absorção do Vermelho Neutro (NR) de Inibição de Inibição de CPE

5 O vermelho NR foi escolhido como o método de quantificação por tingimento para avaliação de drogas antivirais com base nas descobertas de Smee *et al* (*J. Virol. Methods* 2002, 106: 71-79; incorporado aqui por referência em sua totalidade). Essa análise foi realizada nas mesmas placas de teste de inibição de CPE descritas acima para verificar a atividade inibitória e a citotoxicidade observada por observação visual. A análise de NR foi
10 desempenhada utilizando um método modificado de Cavanaugh *et al.* (*Invest. New Drugs* 1990, 8:347-354; incorporado aqui por referência em sua totalidade) conforme descrito por Barnard *et al.* (*Antiviral Chem. Chemother.* 2001, 12:220-231; incorporado aqui por referência em sua totalidade). Resumidamente, o meio foi removido de cada poço de uma placa pontuada para CPE a partir de uma análise de inibição de CPE, 0,034% de NR foi adicionado a cada poço da placa e a placa incubada durante 2h a 37°C no escuro. A solução de NR foi então removida a partir dos poços. Após a edulcoração (por vezes células atolavam a partir da placa causando uma redução
15 errônea do vermelho neutro) e aspiração para secagem, a tintura remanescente foi extraída durante 30 min à temperatura ambiente no escuro a partir das células utilizando etanol absoluto tamponado com tampão de citrato de Sörenson. Absorções em 540 nm/405 nm são lidas are com um leitor de microplaca (Opsys MRTM, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). Os valores de absorção foram expressos como porcentagens de controles não tratados e valores de EC50, CC50 e SI foram calculados conforme descrito acima.
20
25

Análise de Redução de Rendimento de Vírus

30 Análises de redução de rendimento de vírus foram desempenhadas utilizando análise de dose infecciosa de 50% de cultura celular (CCID50) essencialmente conforme descrito anteriormente (*Antimicrob. Agents Chemother.* 1992, 3:1837-1842; incorporado aqui por referência em

sua totalidade). Resumidamente, sobrenadantes a partir de cada poço foram diluídos em série em poços triplicados de placas de 96 poços contendo células Vero 76. As placas foram incubadas durante 6 dias e então checadas para CPE induzido por vírus. A quantificação de titulações de rendimento de vírus foi através do método de ponto final de Reed e Muench (*Am. J. Hyg.* 1938, 27:493-498; incorporado aqui por referência em sua totalidade). O valor de EC90 foi calculado utilizando regressão linear para estimar a concentração necessária para inibir o rendimento de vírus em 90% ou em um decréscimo de log10 em titulação de vírus.

10 Resultados e Discussão

Vírus do sarampo foi potencialmente inibido pelo composto 1 (Tabela 1). Valores de EC50 contra o vírus do sarampo foram 0,6 e 1,4 µg/ml por análise visual e análise de NR, respectivamente. O composto não teve nenhuma citotoxicidade em nenhuma das análises de NR e visual (IC50 >100). Portanto, os índices seletivos por ambas as análises sugeriram que o composto 1 era altamente ativo contra o vírus do sarampo (MV). A potente atividade inibitória contra MV foi confirmada por uma análise de redução de rendimento de vírus com um EC90=0,36 µg/ml, representando uma queda de log10 no vírus produzido em células infectadas.

20 Conclusões

O composto 1 demonstrou atividade inibitória seletiva e potente. Por análise de redução de rendimento de vírus, o composto 1 foi também um inibidor potente de MV (EC90 = 0,37 µg/ml). Assim, o composto 1 mostrou ser um inibidor potente de muitos vírus de RNA e sugere que o composto 1 assegura adicionalmente a avaliação *in vitro* e *in vivo* como um inibidor de amplo espectro de vírus de RNA selecionado.

Exemplo 5: Efeitos de inibidor de RNA polimerase viral (fórmula I, em que A = NH₂ e B = H: composto 1) em replicação de vários vírus de RNA.

30 Materiais e Métodos

Células e vírus

Célula de rim de macaco-verde africano (MA-104) foram obtidas

a partir de Whitaker MA Bioproducts, Walkersville, MD, USA). Todas as células Vero (Células de rim de macaco-verde africano, carcinoma humano das células da laringe (A-549), e células de rim canino Madin-Darby foram obtidas a partir da Coleção de Cultura do Tipo Americano (ATCC, Manassas, VA). Células A-549 foram cultivadas em meio essencial mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado com 0,15% NaHCO_3 (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) e com 10% de soro bovino fetal (FBS, Hyclone). As células remanescente foram rotineiramente passadas por um meio essencial mínimo (MEM com 0,15% NaHCO_3 ; Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) suplementado com 5% de soro bovino fetal (FBS, Hyclone).

Quando da avaliação de compostos, o soro foi reduzido a uma concentração final de 2,5%, e gentamicina é adicionada ao meio de teste para uma concentração final de 50 $\mu\text{g/ml}$. O meio de teste para análises de influenza consistiram em MEM sem soro, 0,18% NaHCO_3 , 20 μg de tripsina/ml, 2,0 μg de EDTA/ml, e 50 μg de gentamicina/ml.

Para avaliação da toxicidade em células crescendo ativamente, a citotoxicidade foi avaliada pela determinação do número total de células conforme refletido por uma análise de absorção de NR após uma exposição de 3 dias a várias concentrações de composto. Para quantificar o crescimento celular em 72h na presença ou ausência de droga, as placas foram semeadas com 1×10^3 células MDCK, e após 4h (permitiu que todas as células se anexassem aos poços das placas) foram expostas para selecionar concentrações de droga em MEM ou MEM. Após 72h, as placas foram tratadas conforme descrito acima para a análise de NR. Os valores de absorção foram expressos como porcentagem de controles não tratados e valores de CC50 foram calculados por análise de regressão.

Vírus da dengue 2 (DV-2), cepa Nova Guiné C, vírus de Sincicial respiratório (RSV) A2, Rinovírus 2 (RV-2), cepa HGP, Tacaribe (TCV), cepa TRVL 11573, vírus da Encefalite equina venezuelana (VEE), e vírus da Febre Amarela (YFV), cepa 17D foram todos adquiridos a partir da Coleção de Cultura do Tipo Americano (ATCC; Manassas, VA). Todos os vírus da influenza, Vírus do sarampo (MV), cepa Chicago, coronavírus SARS (SARS-

CoV), cepa Urbani, e vírus do Oeste do Nilo (WNV), cepa designada isolada Nova Iorque 1999 prototípica 996625, foram obtidos a partir dos Centros para Controle de Doença (Atlanta, GA). O vírus Punta Toro (PTV), cepa Adames, foi obtido a partir do Dr. Dominique Pifat do Instituto de Pesquisas Médicas do Exército dos EUA para Doença infecciosas, Ft. Detrick (Frederick, MD). A cepa da vacina do vírus da Febre do Vale do Rift (RVFV), MP- 12, e a cepa da vacina do vírus de Junin (JUNV), Candid 1, foram gentilmente providas pelo Dr. Robert Tesh (Centro de Referência Mundial para Emergência e Vírus e Arbovírus (*World Reference Center for Emerging and Viruses and Arboviruses*), Departamento Médico da Universidade do Texas, Galveston, TX). O vírus de Pichinde (PICV), cepa An 4763, foi provido pelo Dr. David Gangemi (Clemson University, Clemson, South Carolina). O vírus da parainfluenza tipo 3 (PIV-3), cepa 14702/5/95, foi obtido a partir de Jacqueline Boivin (Hospital St. Justin, Montreal, Canadá). O adenovírus (AV-1) tipo 1, cepa Chicago/95, foi isolado a partir de lavagens traqueais de um paciente pediátrico e foi provido por M.F. Smaron (Departamento de Medicina, Universidade de Chicago, Chicago IL).

Procedimento de Teste Antiviral

Análise de inibição de efeito citopático (Análise visual)

As células foram semeadas em placas de cultura de tecido de fundo plano de 96 poços (Corning Glass Works, Corning, NY), 0,2 ml/poço, na concentração celular apropriada, e incubadas durante a noite a 37°C a fim de estabelecer uma monocamada celular. Quando a monocamada foi estabelecida, o meio de crescimento foi decantado e as várias diluições de composto de teste foram adicionadas em cada poço (3 poços/diluição, 0,1 ml/poço). O meio de composto diluente foi adicionado a poços de controle de vírus e célula (0,1 ml/poço). O vírus, diluído no meio de teste, foi adicionado a poços de teste de composto (3 poços/diluição de composto) e a poços de controle de vírus (6 poços) em 0,1 ml/poço. O vírus (MOI viral = 0,001) foi adicionado aproximadamente 5 min após o composto. O meio de teste sem vírus foi adicionado a todos os poços de controle de toxicidade (2 poços/diluição de cada composto de teste) e a poços de controle de célula (6

poços) em 0,1 ml/poço. As placas foram incubadas a 37°C em um incubador umidificado com 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico até que poços de controle de vírus tiveram leituras de efeito citopático adequadas (CPE) (80-100% de destruição celular). Isso foi obtido de 4-11 dias após a exposição do vírus a células, dependendo do vírus. As células foram então examinadas microscopicamente para CPE, isso sendo pontuado a partir de 0 (células normais) a 4 (máximo, 100%, CPE). As células nos poços de controle de toxicidade foram observadas microscopicamente para alterações morfológicas atribuídas para citotoxicidade. Essa citotoxicidade (destruição celular e/ou alteração de morfologia) foi também graduada em 100% de toxicidade, 80% de citotoxicidade, 60% de citotoxicidade, 40% de citotoxicidade, 20% de citotoxicidade e 0 (células normais). A dose eficiente de 50% (EC50) e a dose citotóxica de 50% (IC50) foram calculadas por análise de regressão do CPE dos dados do vírus e dos dados de controle de toxicidade, respectivamente. O índice seletivo (SI) para cada composto testado foi calculado utilizando a fórmula: $SI = CC50 - EC50$.

Análise de Absorção de Vermelho Neutro (NR) de Inibição de CPE e Citotoxicidade do Composto

Vermelho de NR foi escolhido como o método de quantificação por tingimento para avaliação de drogas antivirais com base nas descobertas de Smee *et al.* (supra). Essa análise foi realizada nas mesmas placas de teste de inibição de CPE descritas acima para verificar a atividade inibitória e a citotoxicidade observada na observação visual. A análise de NR foi desempenhada utilizando um método modificado de Cavanaugh *et al.* (supra) conforme descrito por Barnard *et al.* (supra). Resumidamente, o meio foi removido a partir de cada poço de uma placa pontuada para CPE a partir de uma análise de inibição de CPE, 0,034% de NR foi adicionado a cada poço da placa e a placa incubada durante 2h a 37°C no escuro. A solução de NR foi então removida a partir dos poços. Após a edulcoração (por vezes as células atolaram a partir da placa causando a redução errônea de vermelho neutro) e a aspiração para secagem, a tintura remanescente foi extraída durante 30 min à temperatura ambiente no escuro a partir das células utilizan-

do etanol absoluto tamponado com tampão de citrato de Sörenson. Absorções em 540 nm/405 nm são lidas com um leitor de microplaca (Opsys MRTM, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). Os valores de absorção foram expressos como porcentagens de controles não tratados e valores de EC50, CC50 e SI foram calculados conforme descrito acima.

Tabela 1. Efeitos de um inibidor de polimerase (composto 1)

na replicação de vários vírus.

Vírus	Análise Visual de CPE (µg/ml)			Análise de Absorção de Vermelho Neutro (µg/ml)		
	EC50	IC50	SI	EC50	IC50	SI
Adenovírus tipo 165089/Chicago (Células A-549)	39	>100	>2,6	43	>100	>2,3
Dengue 2 Nova Guiné C (Células Vero)	15	360	25	13	340	26
Influenza A H1N1 CA/04/2009 (H1N1 Pandêmica)	1,8	210	120	1,8	210	120
Influenza A H3N2 Brisbane/10/2007	1,8	260	140	5,6	440	79
Influenza A H5N1 VN/1203/2004 Híbrida (em cadeia principal de H1N1)	0,63	>1000	>1600	0,99	130	130
Influenza B da Flórida	1,8	530	290	1,8	50	38
Candid 1 de Junin (Células Vero)	29	>520	>17	16	240	14
Sarampo	0,6	>100	>180	1,4	>100	>71
Parainfluenza 3 14702 (células MA-104)	14	100	7,1	10	52	52
Pichinde (Células Vero)	61	>500	>8,2	28	190	6,7
Punta Toro A2 (Células Vero 76)	310	>500	>1,6	>250	250	0
Sincicial respiratório A2 (células MA-104)	>100	>100	0	>100	>100	0
Rinovírus 2 HGP (células HeLa Ohio-1)	57	>100	>1,8	56	>100	>1,8
Febre do Vale do Rift MP-12 (Células Vero 76)	75	680	9,1	64	420	6,6
SARS-CoV Urbani (células Vero 76)	14	>100	>7,1	16	>100	>6,3
Tacaribe TRVL 11573 (Células Vero)	29	320	4,2	2	200	2
Encefalite equina venezuelana TC83 (Células Vero 76)	280	610	2,2	170	230	1,2
Vírus do Oeste do Nilo (Células Vero)	>100	>100	0	36	>100	2,8
Febre Amarela 17D (células Vero 76)	8,3	360	43	8,3	320	38

Outros vírus que foram considerados significativamente inibidos pelo composto 1 (SI >10) foram DV-2 (EC50 = 15, 13 µg/ml), JUNV (EC50 = 29, 16 µg/ml), YFV (EC50 = 8,3, 8,3 µg/ml) (Tabela 1). Os seguintes vírus foram levemente inibidos pelo composto 1 (10<SI<3): PIV-3 (EC50 = 7,1, 10 µg/ml), SARS-CoV (EC50 = 14, 16 µg/ml), PICV (EC50 = 61, 28 µg/ml), e RVFV (EC50 = 75, 64 µg/ml). O composto 1 foi testado contra um subconjunto de cepas virais de influenza (Tabela 2), e exibiu amplo espectro de atividade antiinfluenza contra cepas múltiplas.

Tabela 2. Amplo espectro de Atividade Antiinfluenza do composto 1.

Vírus	EC50 (µg/ml)
A/CA/04/2009 (Pandêmico H1N1)	1,8
A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	5,6
A/VN/1203/2004 (H5N1)	0,99
B/Florida	1,8
A/CA/27/2007 (H1N1)	0,66
A/NJ/15/2007 (H1N1 - H274Y)	1,39
A/Vic/3/75 (H3N2)	4,0

Conclusões

O composto 1 demonstrou potente atividade contra todos os vírus da influenza testados. O composto 1 mostrou-se um inibidor potente de replicação do vírus da influenza e sugere que o composto 1 é eficiente como um inibidor de amplo espectro do vírus de RNA selecionado, incluindo todos os vírus da influenza.

Exemplo 6: Atividade antiviral *in vitro* do composto 1.

A atividade antiviral do composto 1 foi avaliada *in vitro* em vários vírus para atividade antiviral. Os valores de EC50 variaram a partir de cerca de 10 µg/ml a cerca de >300 µg/ml contra Marburg (*filoviridae*), Candid 1 de Junin (*arenaviridae*), Pichinde (*arenaviridae*), Chikungunya 181/25 (*togaviridae*) e Vacina NYCBH (*poxviridae*).

Exemplo 7: Atividade antiviral sinérgica do composto 1 e inibidor de neuraminidase em células MDCK.

Células de Rim Canino Madin Darby (MDCK) foram infectadas com o vírus da influenza H3N2 (A/Victoria/3/75) e tratadas com várias combinações do composto 1 e peramivir durante 72h. O efeito citopático foi determinado utilizando análise de absorção de tingimento por vermelho neutro. Os dados são mostrados na tabela 3.

Tabela 3: Porcentagem de Inibição de Efeito Citopático em Células infectadas por Influenza.

Composto 1	Peramivir		
	0,0 μ M	0,0 μ M	0,0 μ M
0,0 μ M	0	3,6 \pm 9	10,8 \pm 11
1,8 μ M	1,6 \pm 6,1	22,7 \pm 6,1	21,5 \pm 4,6
7,8 μ M	25,8 \pm 4,8	50,4 \pm 7,9	70,3 \pm 4,9

Os dados experimentais foram avaliados por análise tridimensional utilizando o software do programa Mac Synergy II® (Prichard e Shipman, 1990; incorporado aqui por referência em sua totalidade). O software calcula as interações aditivas teóricas a partir de curvas de resposta à dose das drogas individuais. A superfície aditiva calculada, que representa as interações aditivas previstas, é então subtraída a partir da superfície experimental para revelar regiões de interações maiores (sinergia) ou menores (antagonismo) que as esperadas. A combinação de peramivir e composto 1 em estudos de cultura de célula demonstraram um efeito antiviral sinérgico com um volume de sinergia igual a 92 μ M² por % de unidade (FIG. 5).

Exemplo 8: Eficiência da injeção intramuscular (IM) de composto em modelo de influenza murina.

Camundongos Balb/C entre 6-8 semanas de idade foram adaptados para vírus H3N2 (A/Victoria/3/75). Doses de 0, 30, 100 e 300 mg/kg/d qd foram providos por injeção intramuscular (IM) durante 5 dias iniciando 1h antes da infecção. N = 50 animais. Todos os animais foram acompanhados durante 16 dias. Pontos finais incluíram letalidade, dias médios de morte e perda de peso. Os efeitos são mostrados na Figura 6.

Os resultados para o composto 1 (IM) em vírus de modelo de influenza de camundongo são mostrados na tabela 4. O composto 1 provido via IM aumenta a sobrevivência e a perda de peso em camundongos infectados com vírus da influenza.

Tabela 4: Composto 1 (IM) em vírus de modelo de influenza de camundongo - H3N2 A/Vic/3/75

Tratamento	Nível de Dose-gem (mg/kg/d)	Número de mortes	Média de dias para morte (Média \pm SEM)	Média de alteração de peso (gramas \pm SEM) Dia 8
Veículo, não infectado	0	0	>16	0,58 \pm 0,23
Veículo, infectado	0	7/15	10,3 \pm 0,3	-4,98 \pm 0,14
composto 1	30	10/10*	>16	-3,27 \pm 0,37**
composto 1	100	10/10*	>16	0,78 \pm 0,17**
composto 1	300	10/10*	>16	0,60 \pm 0,17**

*P<0,001 em comparação com o grupo de veículo infectado (teste de classificação de log)

**P<0,001 em comparação com o grupo de veículo infectado (teste t)

Exemplo 9: Eficiência da administração oral do composto 1 em modelo de influenza murina.

- 5 Camundongos Balb/C entre 6-8 semanas de idade foram adaptadas para o vírus H3N2 (A/Victoria/3/75). Doses de 0, 30, 100 e 300 mg/kg/d qd e 100 mg/kg/d bid foram providos oralmente. N = 60 animais. Todos os animais foram acompanhados durante 16 dias. Pontos finais incluíram letalidade, média de dias para a morte e perda de peso. Os efeitos do
- 10 composto 1 administrado oralmente na perda de peso em camundongos infectados com vírus da influenza H3N2 A/Vic/3/75 são mostrados na Figura 7.

- Os resultados da administração oral de composto 1 em vírus de modelo de influenza de camundongo são também mostrados na tabela 5. O composto 1 fornecido oralmente aumenta a sobrevivência e a perda de peso
- 15 em camundongos infectados com vírus da influenza.

Tabela 5: Composto 1 (Oral) em vírus de modelo de influenza de camundongo - H3N2 A/Vic/3/75

Tratamento	Nível de Dosagem (mg/kg/d) qd	Sobrevivência/Total	Média de dias para morte (Média \pm SEM)	Média de alteração de peso(gramas \pm SEM) Day 9
Veículo, não infectado	0	0	>16	1,36 \pm 0,96
Veículo, infectado	0	7/15	10,5 \pm 0,3	-3,74 \pm 0,23
composto 1	30	10/10*	>16	-1,58 \pm 0,32**
composto 1	100	10/10*	>16	1,03 \pm 0,22**
composto 1	100 (bid)	10/10*	>16	0,01 \pm 0,27**
composto 1	300	10/10*	>16	0,66 \pm 0,23**

*P<0,001 em comparação com o grupo de veículo infectado (teste de classificação de log)

**P<0,001 em comparação com o grupo de veículo infectado (teste t)

Exemplo 10: Estudos de farmacocinética em camundongos.

Camundongos fêmeas Balb/c (N = 30) foram dosados oralmente com o composto 1 em 100 mg/kg. Os camundongos foram sangrados através do seno retroorbital em t = 0,17, 0,5, 1,0, 3, 6 e 24h (5 camundongos cada por ponto de tempo), centrifugados e o plasma foi armazenado a - 80°C. Os níveis de droga do plasma foram medidos através da análise de LC/MS/MS.

Os níveis de plasma do camundongo para o composto 1 após a administração oral são mostrados na tabela 6.

Tabela 6: Níveis de plasma do composto 1 em camundongos seguindo a administração oral

Ponto de Tempo (h)	Níveis de droga do plasma (ng/ml) (Média ± SEM)
0,17	607,1 ± 61,0
0,5	910,0 ± 121,9
1	341,6 ± 121,9
3	89,7 ± 8,5
5	94,2 ± 6,4
24	50,5 ± 8,9

Exemplo 11: Estudo de profilaxia de Camundongo com Vírus Ebola.

O composto 1 foi administrado via i.p., i.m. e oralmente (300 mg/kg/dia, BID) para camundongos C57Bl/6 com 8-12 semanas de idade (N = 10 por grupo, 4 grupos - uma salina e 3 grupos tratados com droga). Oito dias de tratamento iniciando 4h antes da infecção. O desafio do Vírus Ebola adaptado para camundongo (Zaire) foi administrado por via intraperitoneal. A mortalidade e o peso foram monitorados durante 14 dias pós-infecção.

A porcentagem de sobrevivência dos camundongos é indicada na Figura 8. Os camundongos infectados com o vírus Ebola tratados com salina morreram todos por volta do dia 8. Todos os camundongos tratados por via intraperitoneal ou por via intramuscular com composto 1 sobreviveram no ponto final do estudo (dia 14). Oitenta por cento dos camundongos tratados oralmente com o composto 1 sobreviveram no ponto final do estudo (dia 14).

A alteração de peso dos camundongos é indicada na Figura 9.

Os camundongos infectados com o vírus Ebola tratados com salina exibiram perda de peso geral até o dia 8 (todos os camundongos de controle estavam mortos por volta do dia 8). Os camundongos tratados por via intraperitoneal ou por via intramuscular com composto 1 retiveram mais de 95% do peso inicial no dia 12. Os camundongos tratados oralmente com o composto 1 retiveram mais de 80% do peso inicial no dia 12. Todos os camundongos tratados continuaram a ganhar peso por volta do dia 12.

Exemplo 12: Estudo de profilaxia de Camundongo com Vírus Ebola.

O composto 1 foi administrado por via i.m. e oralmente a camundongos C57Bl/6 de 8-12 semanas de idade. Os sujeitos do estudo foram divididos em 6 grupos (N = 10 por grupo). O grupo 1 foi um controle de salina, o grupo 2 foi dosado com 150 mg/kg de composto 1 (PO, BID); o grupo 3 foi dosado com 250 mg/kg de composto 1 (PO, BID); o grupo 4 foi dosado com 150 mg/kg de composto 1 (IM, BID). O grupo 5 era camundongos não infectados tratados com salina (PO, BID), e o grupo 6 era camundongos não infectados tratados com 250 mg/kg de composto 1 (PO, BID). O tratamento durou nove dias, iniciando 4h antes da infecção. O desafio do Vírus Ebola adaptado a Camundongo (Zaire) foi administrado por via intraperitoneal (1,000 pfu). A mortalidade e o peso foram monitorados durante 14 dias pós-infecção.

A porcentagem de sobrevivência de camundongos é indicada na Figura 10. Todos os camundongos infectados com o vírus Ebola tratados com salina morreram por volta do dia 8. Todos os camundongos tratados por via intramuscular com o composto 1 sobreviveram no ponto final do estudo, indicando que a dosagem via IM do composto 1 foi completamente protetora. Oitenta por cento ou mais dos camundongos tratados oralmente com o composto 1 sobreviveram no ponto final do estudo.

A alteração de peso dos camundongos é indicada na Figura 11. Os camundongos infectados com o vírus Ebola tratados com salina exibiram overall perda de peso até o dia 7 (todos os camundongos de controle estavam mortos por volta do dia 8). Os camundongos tratados por via intramus-

cular com o composto 1 exibiram ganho de peso semelhante ao grupo de controle não infectado no dia 11. Os camundongos tratados oralmente com o composto 1 exibiram perda de peso reversível, e retiveram mais de 100% do peso inicial no dia 11.

5 **Exemplo 13: Estudo de Hamster Golden de Janela de Tempo do Vírus da Febre Amarela (YFV).**

Vírus da Febre Amarela (cepa Jimenez) foi injetado via IP a hamsters golden sírios (99 g) em 20 CCID₅₀ por hamster ($\sim 6.25 \times \text{LD}_{50}$). Os grupos foram divididos conforme segue: 1) o composto 1 foi administrado iniciando -4h (N = 15); 2) o composto 1 administrado iniciando 1 dpi (dias pós-infecção) (N = 10); 3) o composto 1 administrado iniciando 2 dpi (N = 10); 4) composto 1 administrado 3 dpi (N = 10); 5) composto 1 administrado 4 dpi (N = 10); 6) ribavirina administrado iniciando -4h (N = 10); 7) veículo de salina iniciando -4h (N = 16); 8) hamsters não infectados administrados com composto 1 iniciando -4h (N = 3); 9) hamsters não infectados administrados com veículo de salina iniciando -4h (N = 3); e 10) controles normais, não tratados, não infectados (N = 3). A dose de tratamento foi 100 mg/kg IP, BID durante 7 dias. O ponto final dos estudos foi a mortalidade em 21 dias, o peso medido nos dias 0, 3, 5 e 6; titulações de vírus de soro e fígado (dia 4, composto 1 em -4h, e veículo em -4h), e ALT e AST no dia 6.

O estudo mostrou sobrevivência melhorada para o composto 1 com atraso no tratamento em comparação com o placebo (Figura 12). A sobrevivência de hamsters infectados com YFV e tratados com composto 1 duas vezes diariamente durante 7 dias iniciando com vários tempos após o desafio é indicada ($***P < 0,001$, $**P < 0,1$, em comparação com o placebo). A taxa de sobrevivência foi de 100% para o composto 1 iniciando pré-infecção, e tratamento tardio em até 3 dias pós-infecção. A taxa de sobrevivência foi de 80% para o composto iniciando 4 dias pós-infecção, indicando um aumento significativo sobre o placebo em grupos com tratamento tardio. Em contraste, a ribavarina proveu 90% de sobrevivência iniciando pré-infecção e o veículo proveu 12,5% de sobrevivência iniciando pré-infecção. A maioria das mortes ocorreu dentro de 10 dias de infecção. Os animais sobreviventes

serão redesafiados com YFV em 21 dias pós-infecção.

A alteração de peso de hamsters é indicada na Figura 13. Os hamsters infectados com YFV e tratados com composto 1 a partir da pré-infecção 4 dias pós-infecção mostraram ganho de peso sobre o placebo e ribavirina administrados pré-infecção. A porcentagem de alteração de peso de hamsters infectados com YFV e tratados com composto 1 duas vezes diariamente durante 7 dias iniciando vários tempos antes e depois do desafio de vírus é mostrada.

Exemplo 14: Biodisponibilidade oral do composto 1 em Ratos.

O composto 1 foi dosado em 10 mg/kg, PO em ratos. A curva farmacocinética medindo a concentração do composto 1 em plasma de rato em até 6 horas é mostrada na Figura 14.

Exemplo 15: Estudo de Vírus de Marburg para o Composto 1.

O composto 1 foi dosado via IM em camundongos BALB/c de 10-12 semanas de idade desafiados (por via interperitoneal) com 1000 pfu de MARV-Ravn adaptada para camundongo. O estudo foi dividido em 10 grupos (N=10 por grupo). Os regimes de dosagem, vias e doses são mostrados na Tabela 7. O composto 1 foi dissolvido em 0,9% de salina antes da administração, e a saúde e peso foram monitorados durante 14 dias pós-infecção.

Tabela 7: Projeto de Estudo para Profilaxia e Tratamento com o Composto 1 para a Infecção por Marburg

Grupo	N	Tratamento	Dose de Cmpd 1 (mg/kg)	Dose de Cmpd 1 (mg/kg/d)	Via	Regime
1	10	0,9%- salina		-	IM	BID; Dias 0-8 PI
2	10	Cmpd 1	150	300	IM	BID; Dias 0-8 PI
3	10	Cmpd 1	50	100	IM	BID; Dias 0-8 PI
4	10	Cmpd 1	15	30	IM	BID; Dias 0-8 PI
5	10	Cmpd 1	5	10	IM	BID; Dias 0-8 PI
6	10	Cmpd 1	150	300	IM	BID; + 4h, Dias 1-8 PI
7	10	Cmpd 1	150	300	IM	BID; Dias 1-8 PI
8	10	Cmpd 1	150	300	IM	BID; Dias 2-8 PI
9	10	Cmpd 1	150	300	IM	BID; Dias 3-8 PI
10	10	Cmpd 1	150	300	IM	BID; Dias 4-8 PI

*Dia 0 de tratamento iniciado 4h antes da infecção, exceto para o grupo 6. O tratamento do grupo 6 iniciou em 4h pós-infecção no dia 0.

PI = pós-infecção

A porcentagem de sobrevivência para os 10 grupos nesse estudo para o dia 12 está inclusa na Tabela 8. A taxa de sobrevivência para camundongos tratados com veículo apenas (0,9% de salina) foi de 60% no dia 7 e 30% nos dias 8-12. O composto 1 foi mostrado para aumentar a sobrevivência em pelo menos 90% no dia 7, e pelo menos 80% nos dias 8-12 em todas as doses.

Tabela 8: Porcentagem da Taxa de Sobrevivência para Profilaxia e Tratamento com Composto 1 para Infecção de Marburg

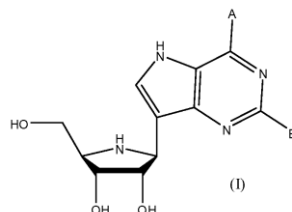
Grp	Tratamento	Porcentual de Sobrevivência												
		Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12
1	0,9% de salina	100	100	100	100	100	100	100	60	30	30	30	30	30
2	Cmpd. 1 (150 mg/kg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	Cmpd. 1 (50 mg/kg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	Cmpd. 1 (15 mg/kg)	100	100	100	100	100	90	90	90	90	90	90	90	90
5	Cmpd. (5 mg/kg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	Cmpd. 1 (150 mg/kg) +4h	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90	90	90	90
7	Cmpd. 1 (150 mg/kg) + 24 h	100	100	100	90	90	90	90	80	80	80	80	80	80
8	Cmpd. 1 (150 mg/kg) +48 h	100	100	100	100	100	100	100	90	90	90	90	90	90
9	Cmpd. 1 (150 mg/kg) + 72 h	100	100	100	100	90	90	90	90	80	80	80	80	80
10	Cmpd. 1 (150 mg/kg) + 96 h	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90	90	90	90

10 ***

Embora a invenção tenha sido descrita e ilustrada nas modalidades ilustrativas acima, compreende-se que a presente descrição foi feita apenas para vias de exemplo, e que inúmeras alterações nos detalhes de implementação da invenção podem ser feitas sem desviar do espírito e escopo da invenção, que está limitada apenas pelas reivindicações que seguem. As características das modalidades descritas podem ser combinadas e redispostas de vários modos dentro do escopo e espírito da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficiente de um composto de fórmula I:



em que A é NH₂; e B é H; ou sal farmaceuticamente aceitável ou
 5 hidrato do mesmo, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de
 uma composição farmacêutica para o tratamento de infecção, supressão ou
 prevenção viral em um sujeito.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato
 de que a referida infecção viral compreende a infecção por um ou mais vírus.

10 3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado
 pelo fato de que a infecção viral compreende um vírus selecionado a partir
 do grupo consistindo em famílias *orthomyxoviridae*, *paramyxoviridae*,
arenaviridae, *bunyaviridae*, *flaviviridae*, *filoviridae*, *togaviridae*,
picornaviridae, e *coronaviridae*; ou

15 em que a infecção viral é selecionada a partir do grupo
 consistindo em adenovírus, rinovírus, hepatite, vírus da imunodeficiência,
 pólio, sarampo, Ebola, Coxsackie, Rino, Vírus do Oeste do Nilo, varíola,
 encefalite, Febre Amarela, Dengue, influenza A, influenza B, lassa,
 coriomeningitis linfocítica, junin, machupo, guanarito, hantavírus, Febre do
 20 Vale do Rift, La Crosse, encefalite da Califórnia, Crimean-Congo, Marburg,
 Encefalite Japonesa, Doença da Floresta de Kyasanur, Encefalite equina
 venezuelana, Encefalite equina oriental, Encefalite equina ocidental,
 síndrome respiratória aguda grave (SARS), parainfluenza, sincicial
 respiratório, Punta Toro, Tacaribe e vírus pachindae; ou

25 em que a infecção viral é selecionada a partir do grupo
 consistindo em adenovírus, Dengue, influenza A, influenza B, Junin,
 sarampo, parainfluenza, Pichinde, punta toro, sincicial respiratório, rinovírus,
 Febre do Vale do Rift, SARS-CoV, tacaribe, Encefalite equina venezuelana,

Vírus do Oeste do Nilo e vírus da Febre Amarela; ou

em que a infecção viral é selecionada a partir do grupo consistindo em vírus Ebola, Febre Amarela, Marburg, influenza A e influenza B.

5 4. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a infecção viral compreende um vírus selecionado do grupo consistindo em famílias *orthomyxoviridae*, *paramyxoviridae*, *arenaviridae*, *bunyaviridae*, *flaviviridae*, *filoviridae*, *togaviridae*, *picornaviridae*, e *coronaviridae*.

10 5. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a infecção viral é vírus Oeste do Nilo.

6. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a infecção viral é vírus da Dengue.

15 7. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a infecção viral é vírus da Febre do Vale do Rift.

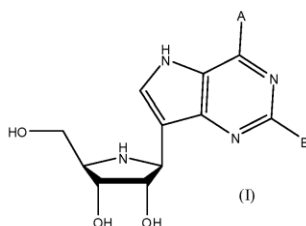
8. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a infecção viral é vírus Ebola.

9. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a infecção viral é vírus Marburg.

20 10. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a infecção viral é vírus da febre amarela.

11. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a infecção viral é vírus influenza A ou influenza B.

25 12. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficiente de um composto de fórmula I:



em que A é NH₂ ou ; e B é H; ou sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo, caracterizado pelo fato de que é na preparação de uma composição farmacêutica para inibição de RNA

polimerase viral em um sujeito; em que a RNA polimerase viral é selecionada do grupo que consiste em polimerases virais de *orthomyxoviridae*, *paramyxoviridae*, *arenaviridae*, *bunyaviridae*, *flaviviridae*, *filoviridae*, *togaviridae*, *picornaviridae*, e *coronaviridae*.

5 13. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a segunda RNA polimerase viral é inibida.

 14. Uso de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a segunda RNA polimerase viral é selecionada o grupo que consiste em polimerases virais de *orthomyxoviridae*, *paramyxoviridae*,
10 *arenaviridae*, *bunyaviridae*, *flaviviridae*, *filoviridae*, *togaviridae*, *picornaviridae*, e *coronaviridae*.

 15. Uso de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que a segunda RNA polimerase é selecionada de polimerases virais de influenza A, influenza B, parainfluenza, rinovírus sincicial
15 respiratório, Junin, Pichinde, Febre do Vale do Rift, Dengue, sarampo, febre amarela, tacaribe, Encefalite equina venezuelana, Vírus do Oeste do Nilo e SARS-CoV.

 16. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 15, caracterizado pelo fato de que a RNA polimerase viral é selecionada do
20 grupo que consiste em polimerases virais de rinovírus, pólio, sarampo, Ebola, Coxsackie, Febre do Oeste do Nilo, Dengue, influenza A, influenza B, lassa, coriomeningitis linfocítica, junin, machupo, guanarito, hantavírus, Febre do Vale do Rift, La Crosse, encefalite da Califórnia, Crimean-Congo, Marburg, Encefalite Japonesa, Doença da Floresta de Kyasanur, Encefalite
25 equina venezuelana, Encefalite equina oriental, Encefalite equina ocidental, síndrome respiratória aguda grave (SARS), parainfluenza, sincicial respiratório, Punta Toro, Tacaribe e vírus pichinde/ ou

 em que a RNA polimerase viral é uma polimerase selecionada do grupo que consiste em polimerases virais da dengue, influenza A,
30 influenza B, Junin, sarampo, parainfluenza, Pichinde, Punta Toro, sincicial respiratório, Febre do Vale do Rift, febre do oeste do Nilo e febre amarela/ ou

em que a RNA polimerase viral é uma polimerase selecionada do grupo que consiste em polimerases virais de Ebola, febre amarela, sarampo, influenza A e influenza B.

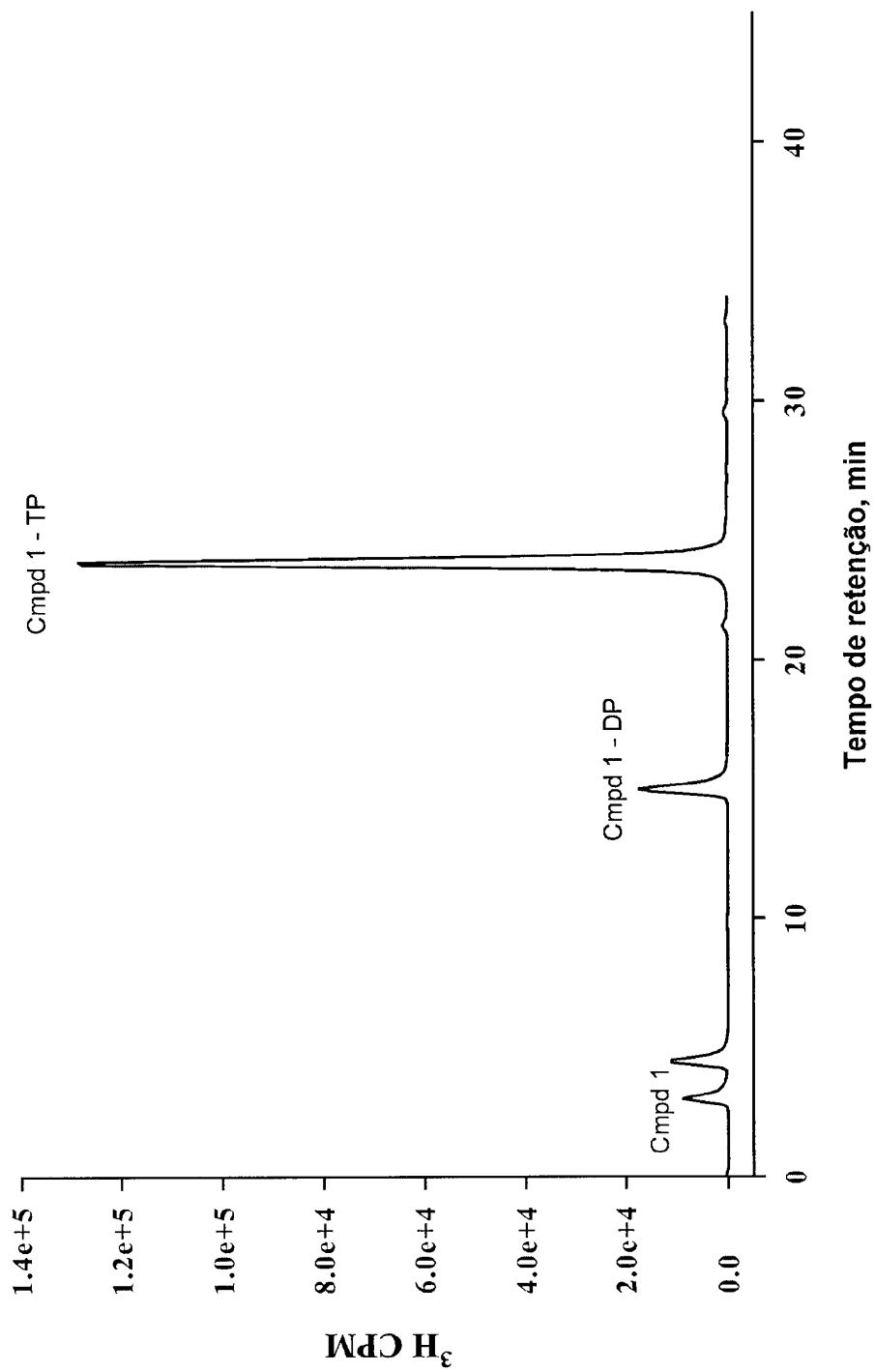
5 17. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que ainda compreende administração de um agente antiviral adicional.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o agente antiviral é selecionado do grupo que consiste em laninamivir, oseltamivir, zanamivir e peramivir.

10 19. Uso de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que o agente antiviral adicional é peramivir.

20. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que a administração é selecionada do grupo que consiste em intravenosa, intraperitoneal, intramuscular e oral.

15 21. Invenção, em quaisquer formas de suas concretizações ou em qualquer categoria aplicável de reivindicação, por exemplo, de produto ou de processo ou uso englobadas pela matéria inicialmente descrita, revelada ou ilustrada no pedido de patente.

**Figura 1**

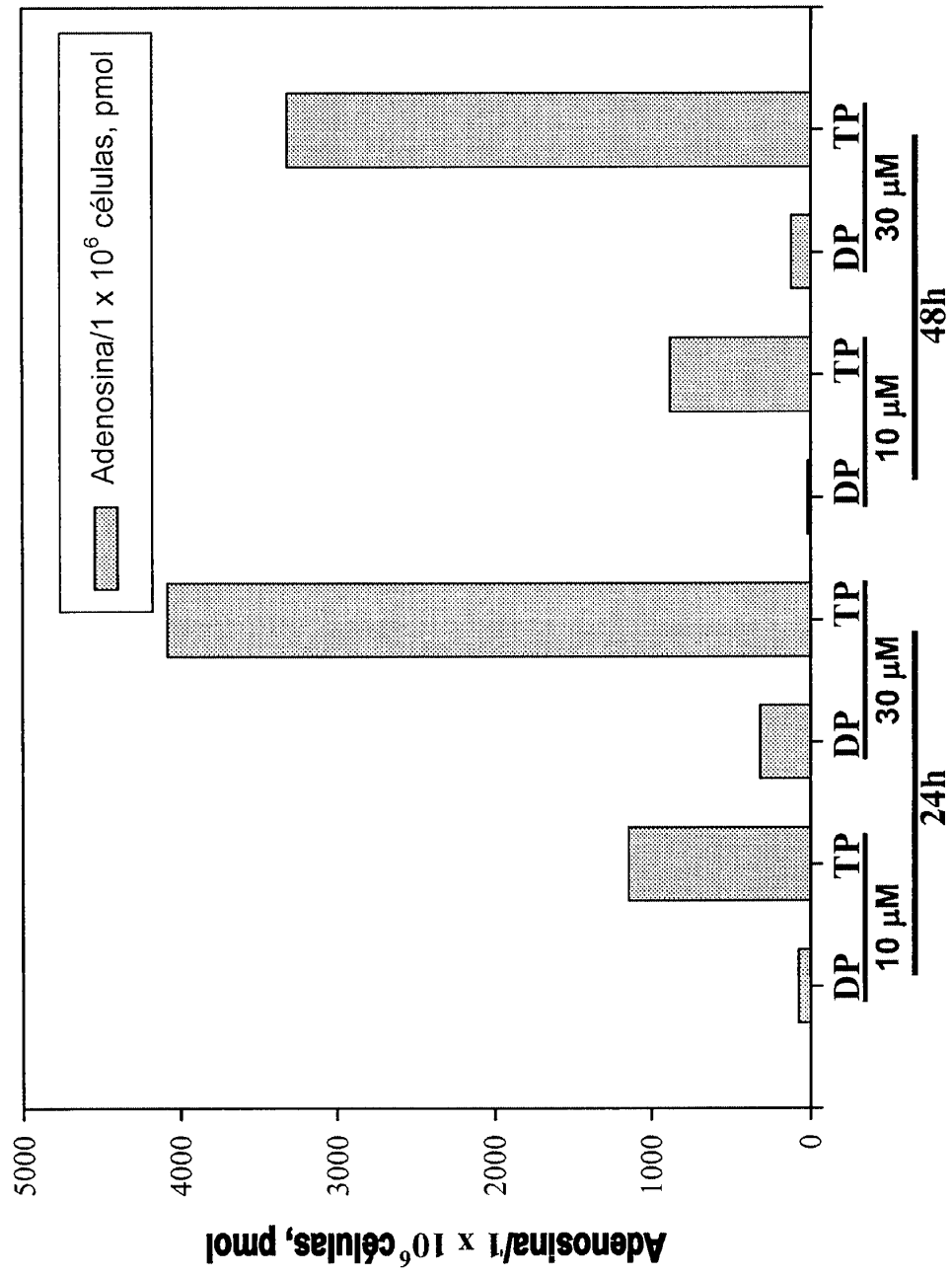


Figure 2

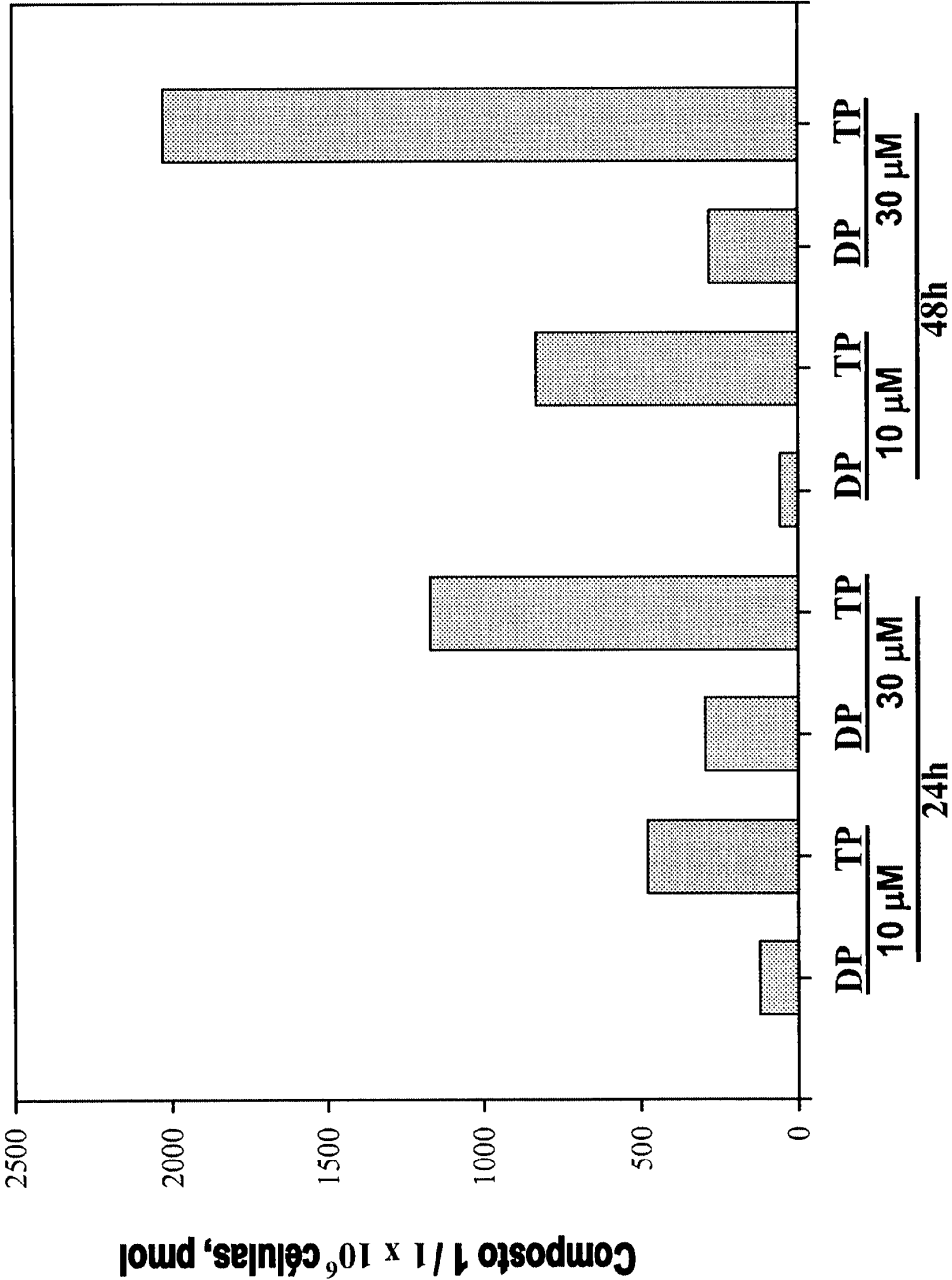


Figura 3

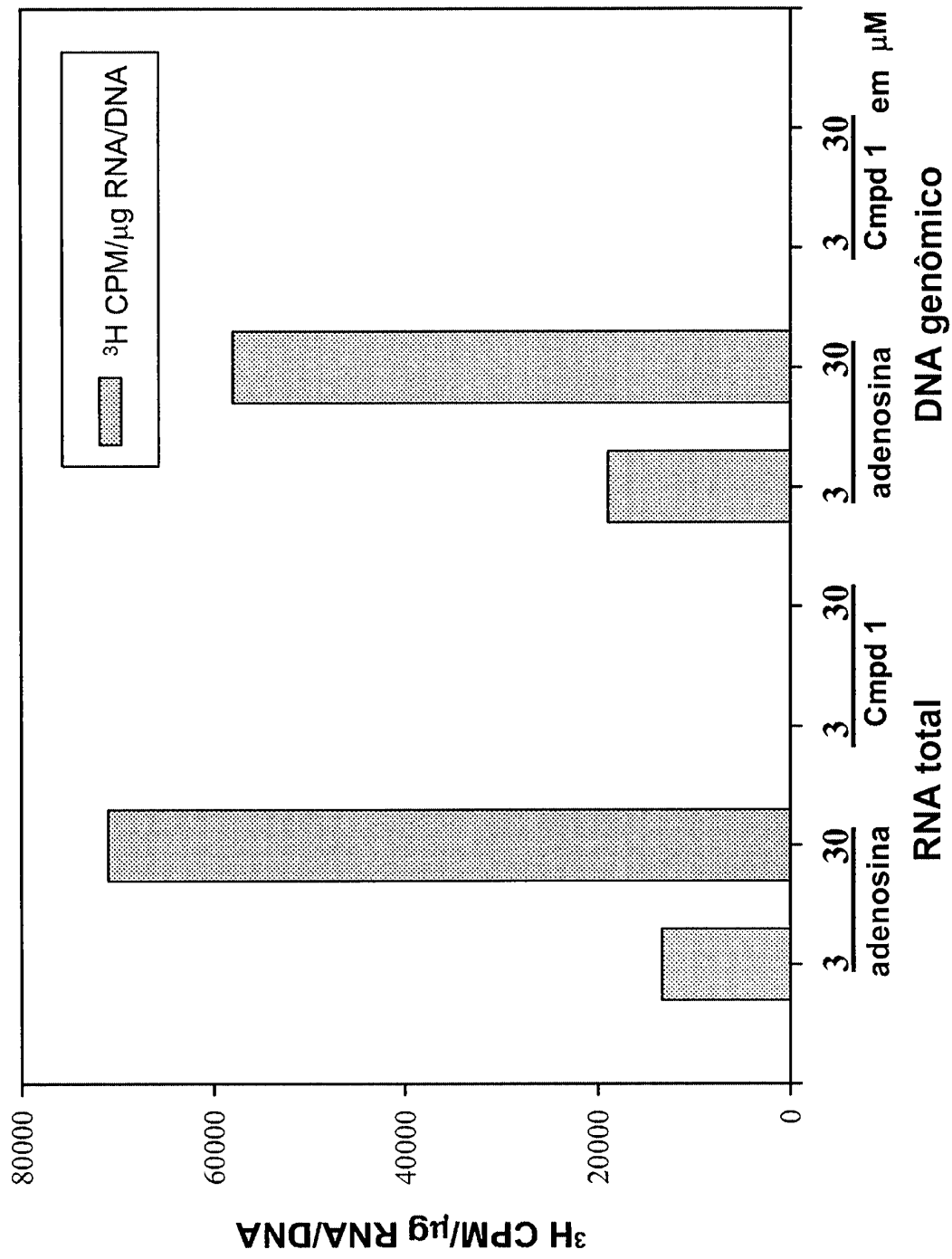


Figura 4

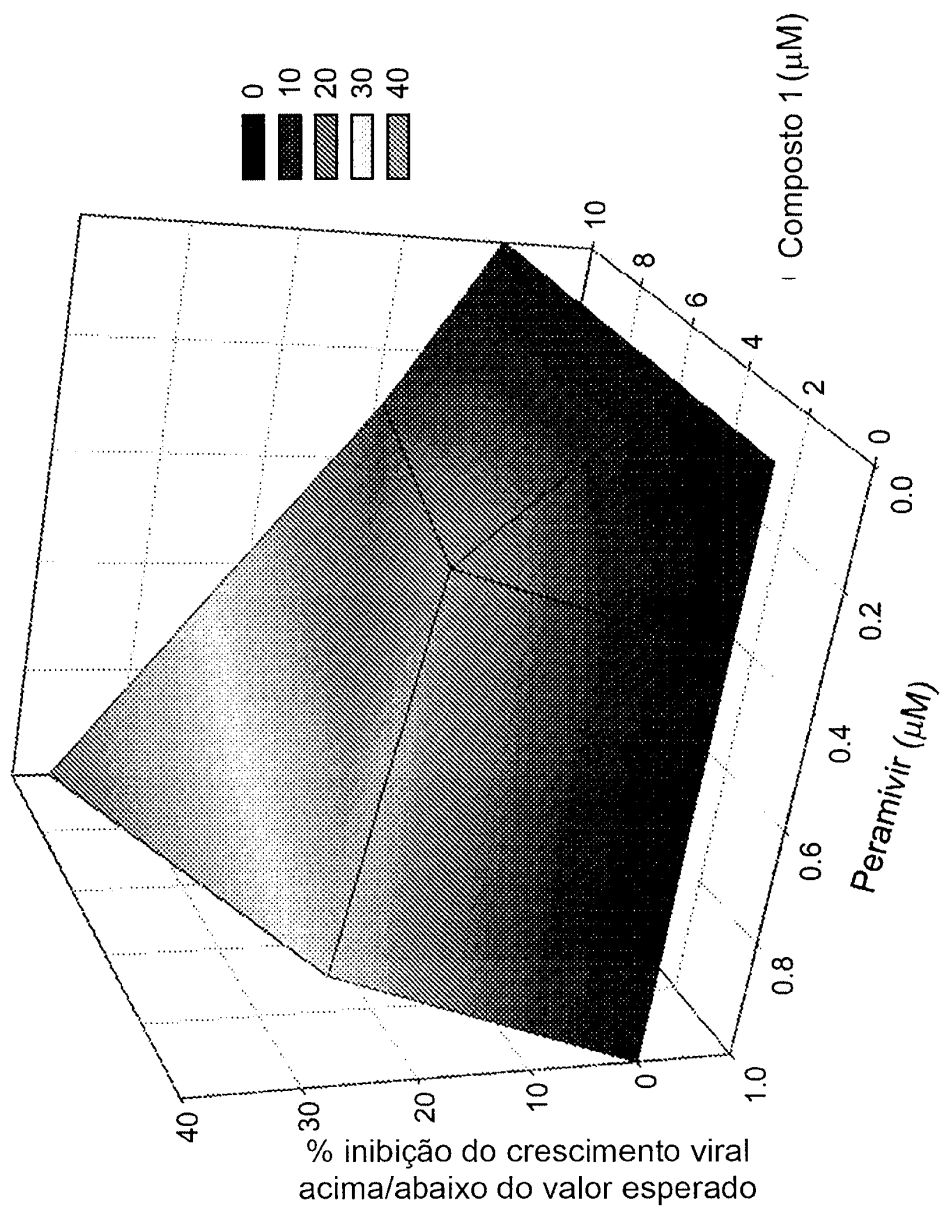


Figura 5

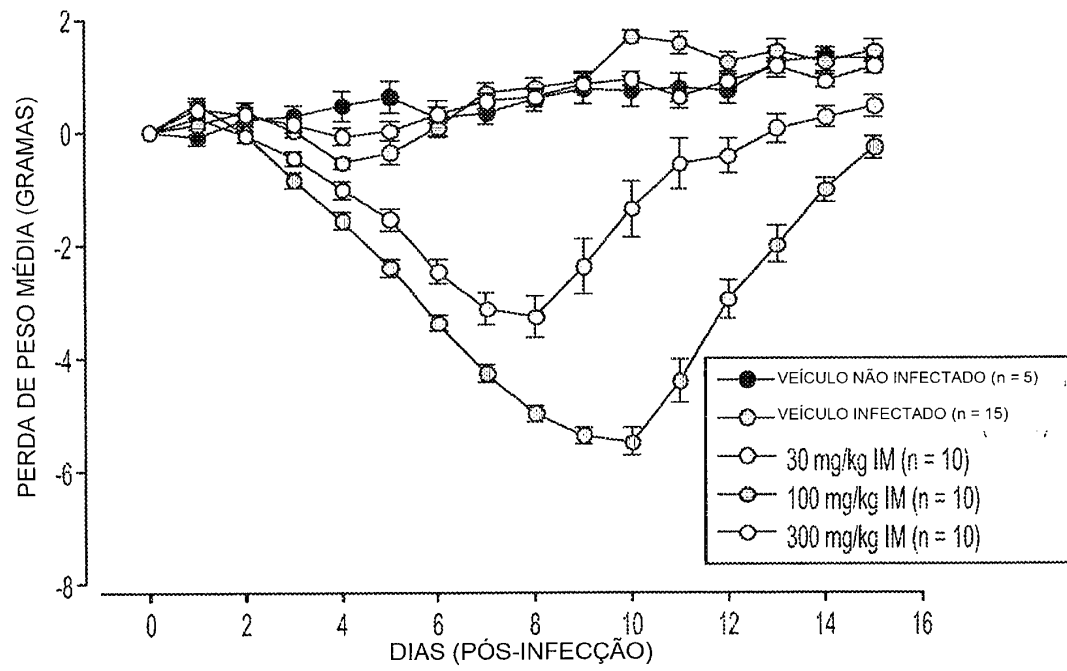


FIG. 6

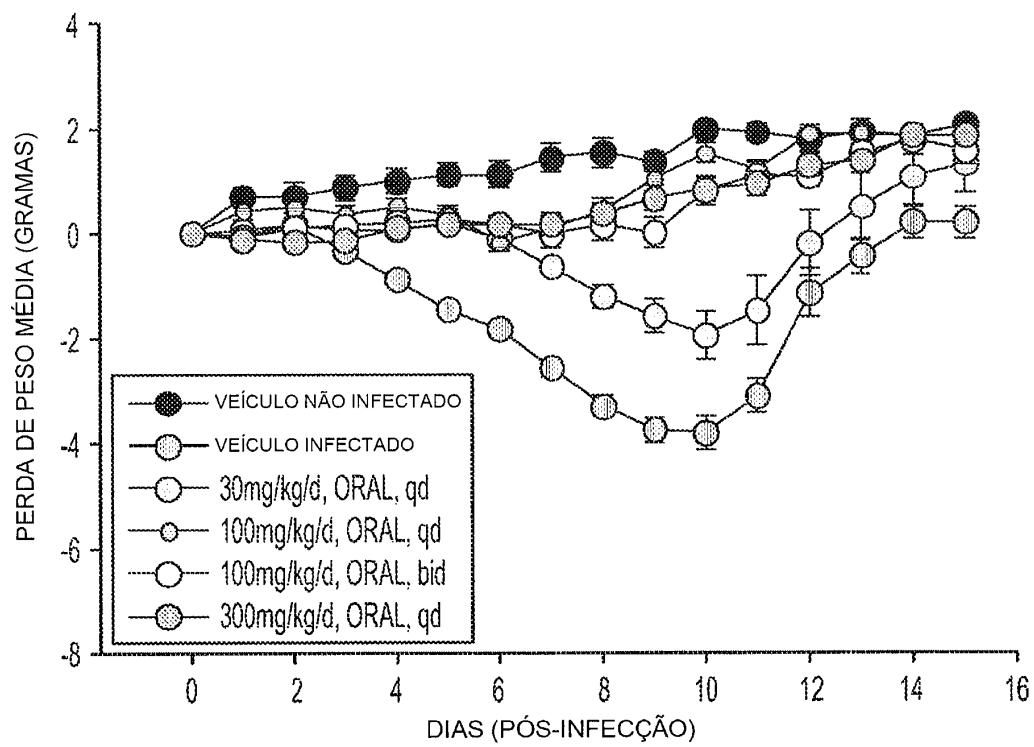


FIG. 7

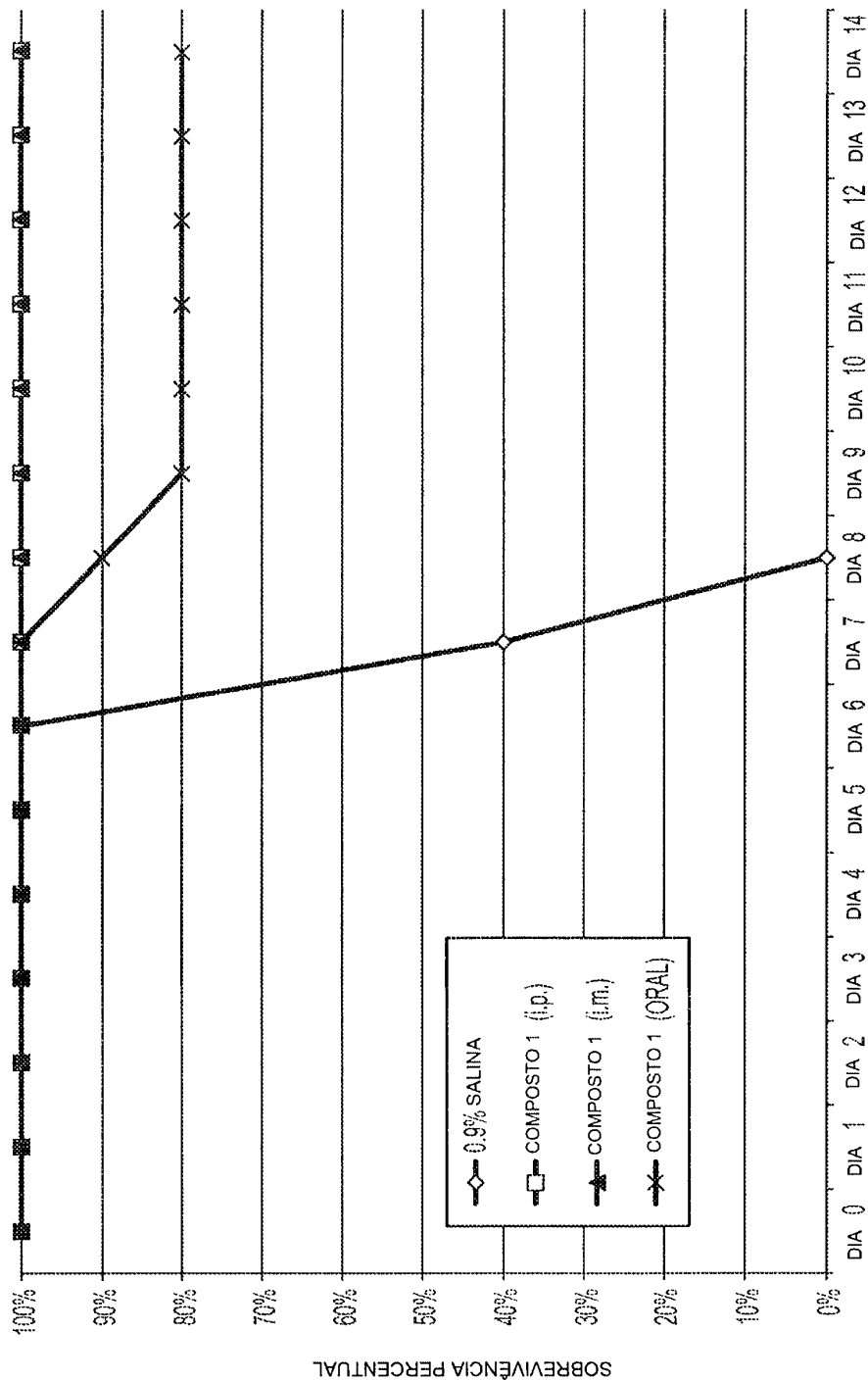


FIG. 8

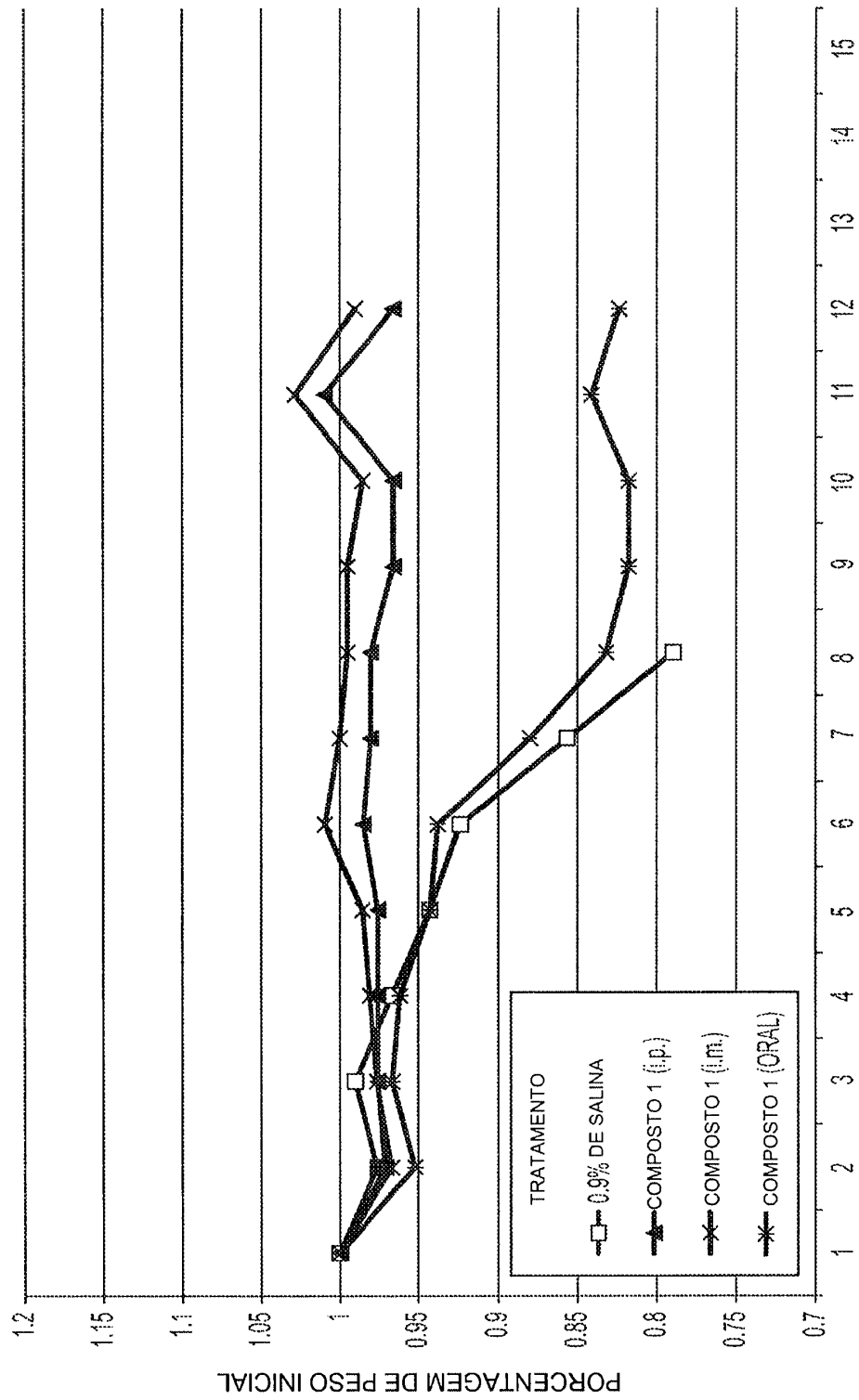


FIG. 9

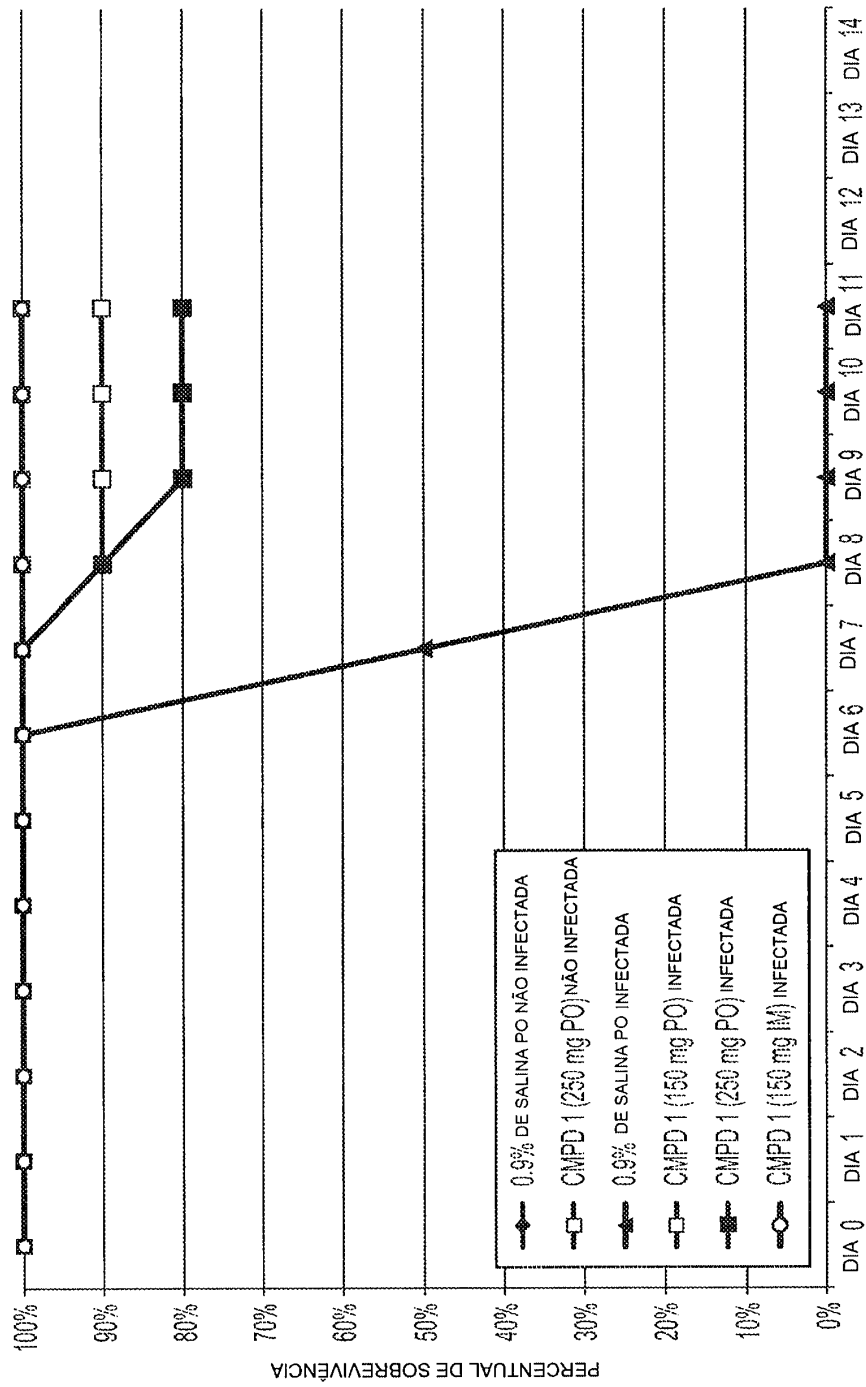


FIG. 10

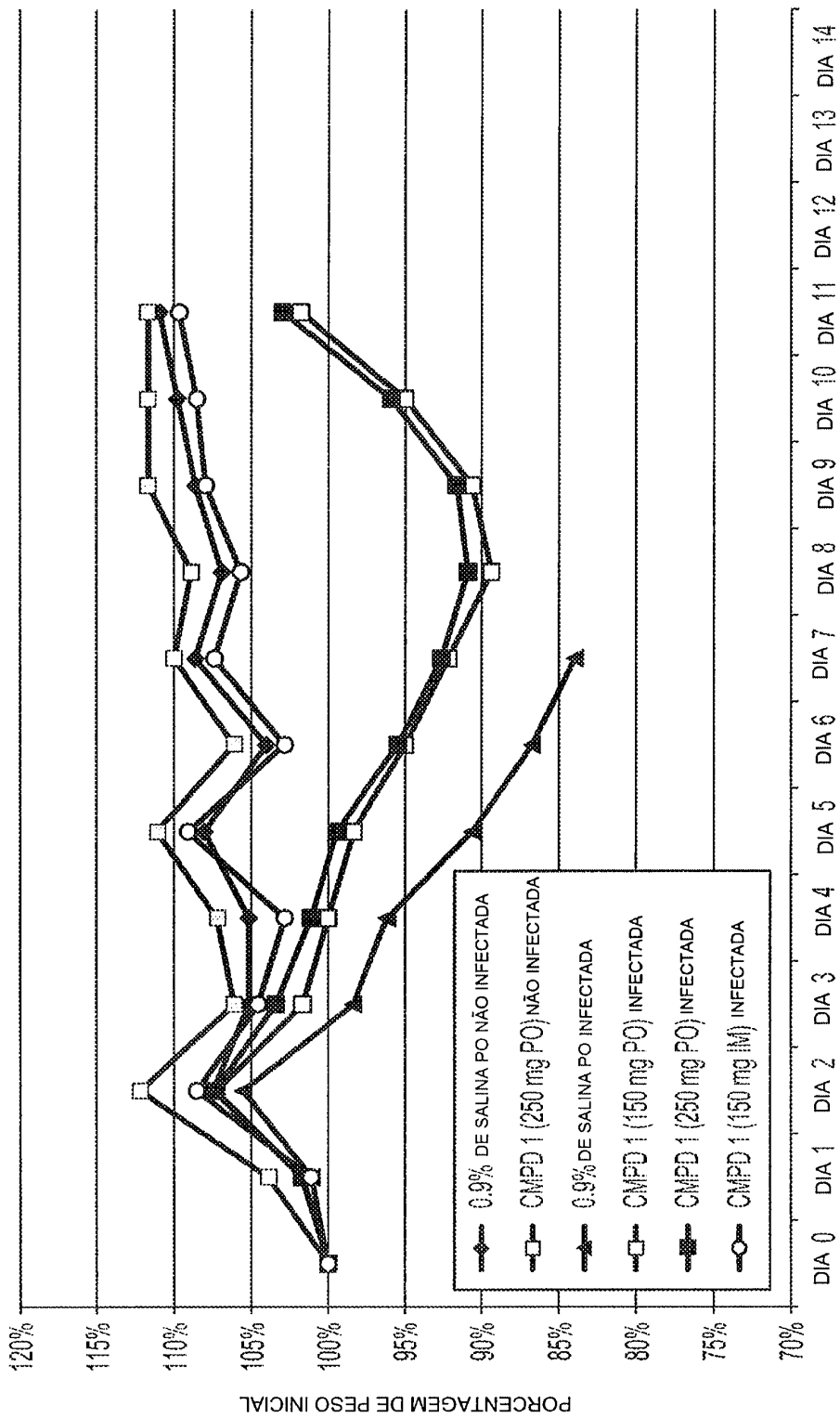


FIG. 11

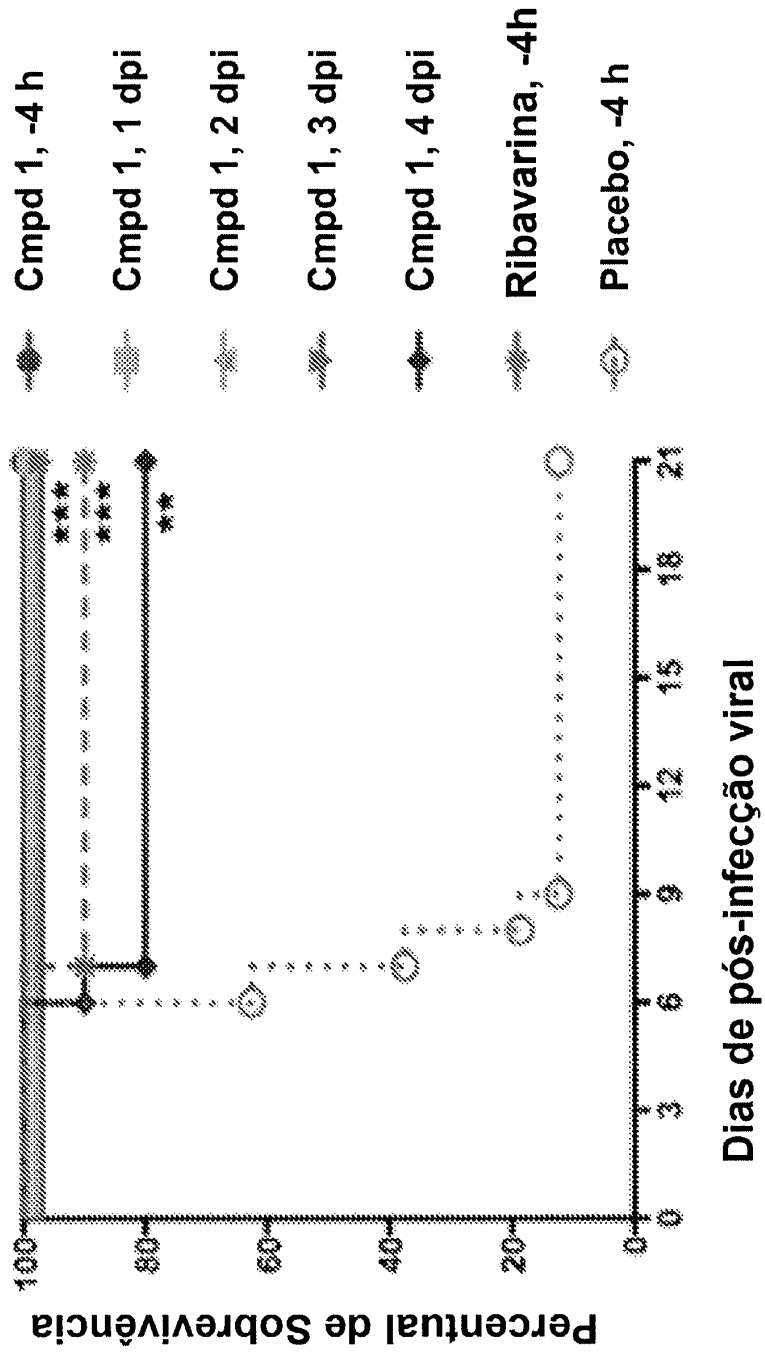


Figura 12

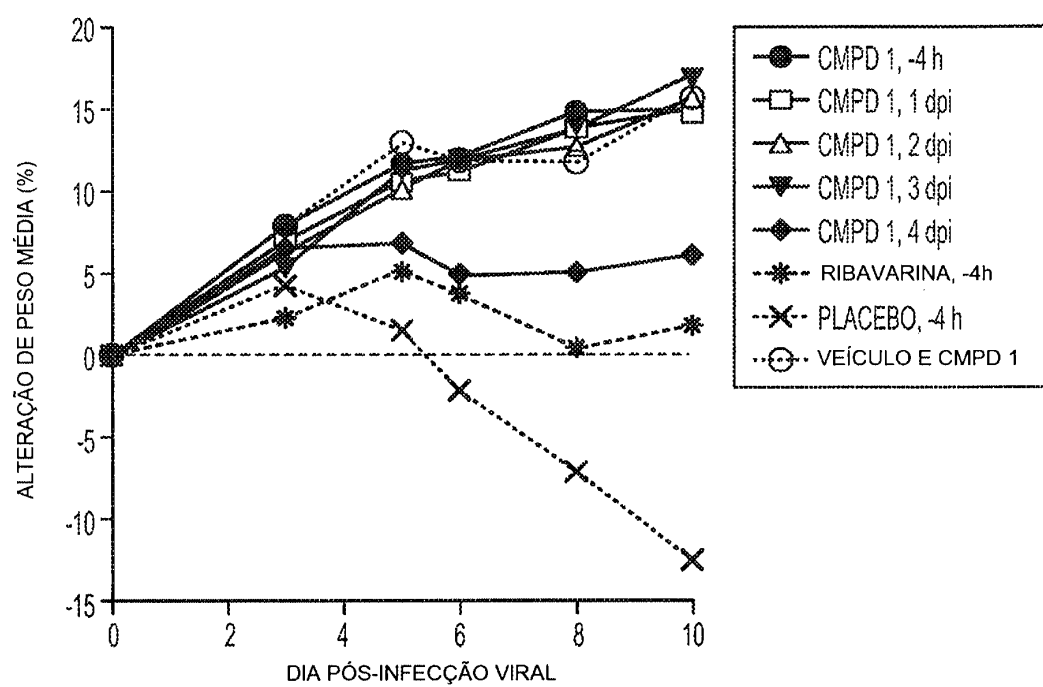


FIG. 13

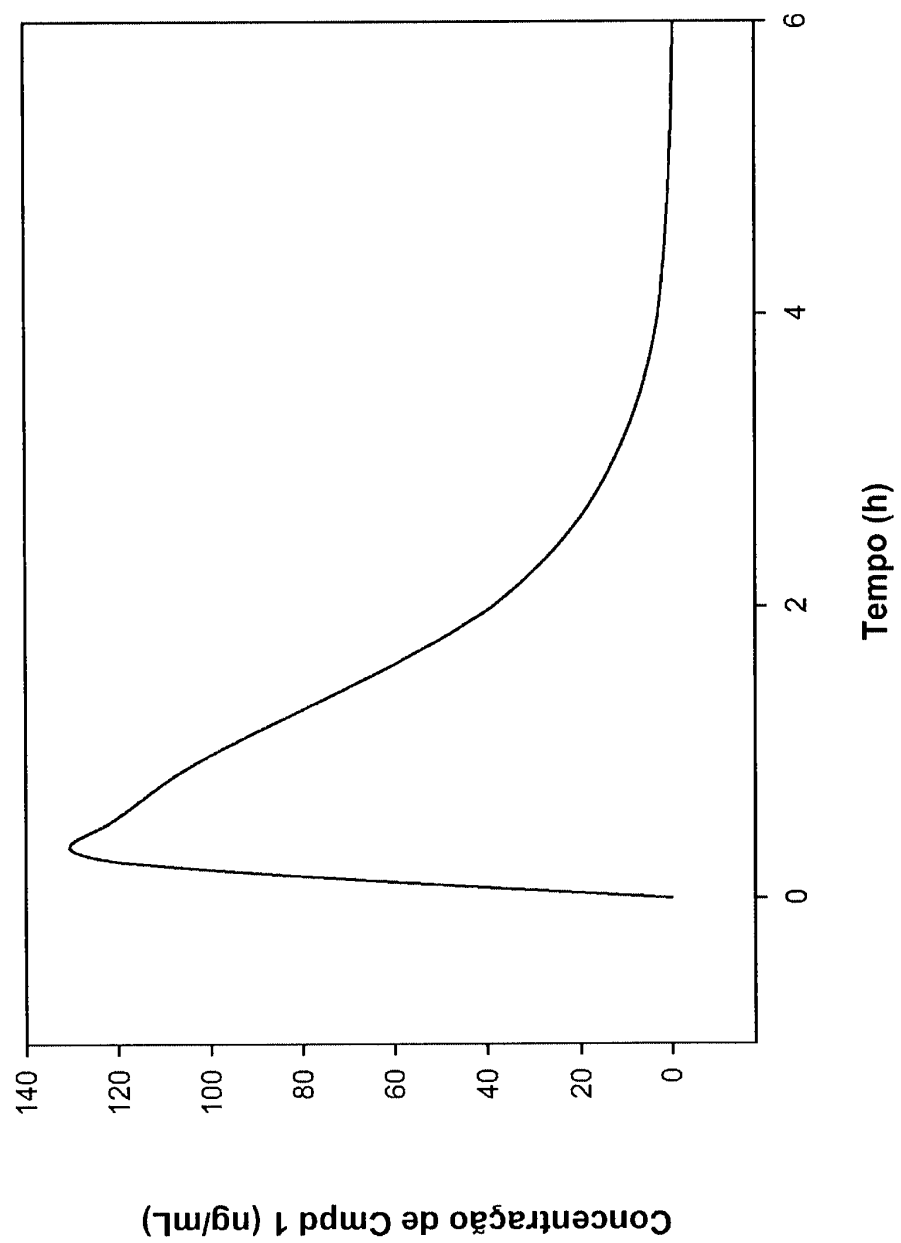


Figura 14