



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

(21) BR 112020011221-6 A2



(22) Data do Depósito: 05/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 17/11/2020

(54) Título: COMPOSTOS DE DIFOSFATO FOSFORAMIDATO DE NUCLEOSÍDEOS, SEU USO NO TRATAMENTO DE CÂNCER E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO OS MESMOS

(51) Int. Cl.: C07H 19/10; C07H 19/20; A61K 31/7052; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 05/12/2017 GB 1720279.7.

(71) Depositante(es): NUCANA PLC.

(72) Inventor(es): HUGH GRIFFITH; MICHAELA SERPI; FABRIZIO PERTUSATI; MAGDALENA SLUSARCZYK.

(86) Pedido PCT: PCT GB2018053525 de 05/12/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/110991 de 13/06/2019

(85) Data da Fase Nacional: 04/06/2020

(57) Resumo: A presente invenção se refere a compostos compreendendo um sal de um difosfato fosforamidato de um fármaco nucleosídeo, por exemplo, clofarabina. Os compostos são úteis no tratamento de câncer, por exemplo, leucemia.

"COMPOSTOS DE DIFOSFATO FOSFORAMIDATO DE NUCLEOSÍDEOS, SEU USO NO TRATAMENTO DE CÂNCER E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO OS MESMOS".

[0001] A presente invenção fornece compostos úteis para o tratamento de câncer, por exemplo, leucemia. Os compostos compreendem um sal de um difosfato fosforamidato. A presente invenção também fornece formulações dos referidos compostos e usos dos mesmos.

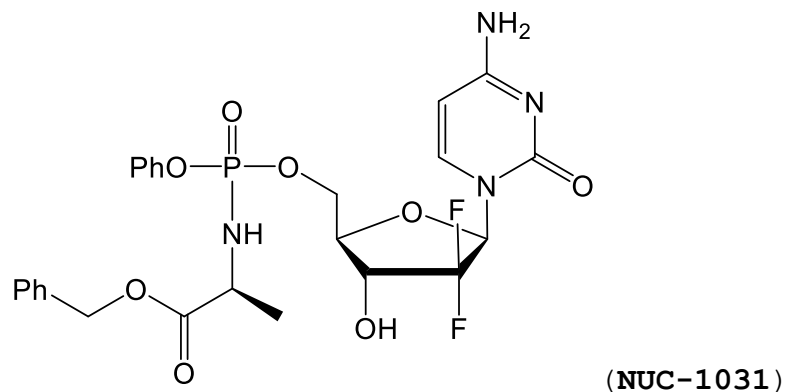
ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] Os fármacos com base em nucleosídeos se tornaram uma ferramenta poderosa no tratamento de doenças em seres humanos. O uso de fármacos de nucleosídeos, tal como gemcitabina, clofarabina, citarabina e fludarabina, é generalizado, em particular, no tratamento do câncer.

[0003] No entanto, a eficácia de todos os fármacos de nucleosídeos pode ser limitada por mecanismos de resistência inerente e adquirida.

[0004] Uma maneira pela qual a eficácia dos fármacos de nucleosídeos pode ser melhorada é através da administração como um fármaco da classe ProTide. Os fármacos da classe ProTide são pró-fármacos de nucleosídeos monofosforilados e demonstraram ser agentes terapêuticos particularmente potentes nos campos dos antivirais e da oncologia. Esses compostos parecem evitar muitos dos mecanismos de

resistência que limitam a utilização dos nucleosídeos parentais (ver, por exemplo, 'Application of ProTide Technology to Gemcitabine: A Successful Approach to Overcome the Key Cancer Resistance Mechanisms Leads to a New Agent (NUC-1031) in Clinical Development'; Slusarczyk et al.; *J. Med. Chem.*; **2014**, 57, 1531-1542; McGuigan et al.; *Phosphoramidate ProTides of the anticancer agent FUDR successfully deliver the preformed bioactive monophosphate in cells and confer advantage over the parent nucleoside*; *J. Med. Chem.*; **2011**, 54, 7247-7258; e Vande Voorde et al.; *The cytostatic activity of NUC-3073, a phosphoramidate prodrug of 5-fluoro-2'-deoxyuridine, is independent of activation by thymidine kinase and insensitive to degradation by phosphorolytic enzymes*; *Biochem. Pharmacol.*; **2011**, 82, 441-452; WO2005/012327; WO2006/100439; WO2012/117246 e WO2016/083830). Um ProTide exemplificativo é o NUC-1031, um ProTide de gemcitabina:



[0005] Embora a estratégia de ProTide tenha provado

ser muito eficaz para certos nucleosídeos, esta não é tão eficaz com outros fármacos de nucleosídeos. Consequentemente, é necessário encontrar métodos adicionais para potencializar moléculas de fármacos de nucleosídeos.

[0006] Os fármacos da classe ProTide também podem ser pouco solúveis em solventes aquosos e isso pode dificultar sua administração.

[0007] É um objetivo de certas modalidades da presente invenção fornecer um agente terapêutico que, em uso, tenha eficácia terapêutica na profilaxia ou no tratamento de câncer.

[0008] É um objetivo de certas modalidades da presente invenção fornecer um agente terapêutico que, em uso, tenha uma maior eficácia terapêutica na profilaxia ou no tratamento do câncer em comparação ao nucleotídeo parental ou ao ProTide correspondente.

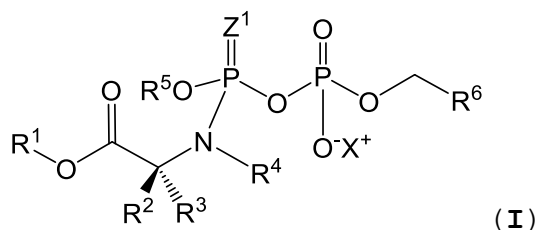
[0009] É um objetivo de certas modalidades da presente invenção fornecer um agente terapêutico que seja mais convenientemente administrado do que o ProTide correspondente.

[0010] Certas modalidades da presente invenção resolvem alguns ou todos os objetos mencionados acima.

DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

[0011] Em um primeiro aspecto da invenção, é fornecido

um composto de fórmula (I), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo:



em que:

- R¹ é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de: alquila-C₁-C₂₄, alquênica-C₃-C₂₄, alquínica-C₃-C₂₄, alquilenos-C₀-C₄-cicloalquilo-C₃-C₈ e alquilenos-aril-C₀-C₄;

- R² e R³ são, cada um independentemente em cada ocorrência, selecionados a partir de H, alquila-C₁-C₆ e alquilenos-C₁-C₃-R⁷; ou R² e R³ em conjunto com o átomo ao qual eles estão ligados formam um grupo cicloalquilo ou heterocicloalquilo com 3 a 6 membros;

- R⁴ é, independentemente em cada ocorrência, H ou alquila-C₁-C₄; ou

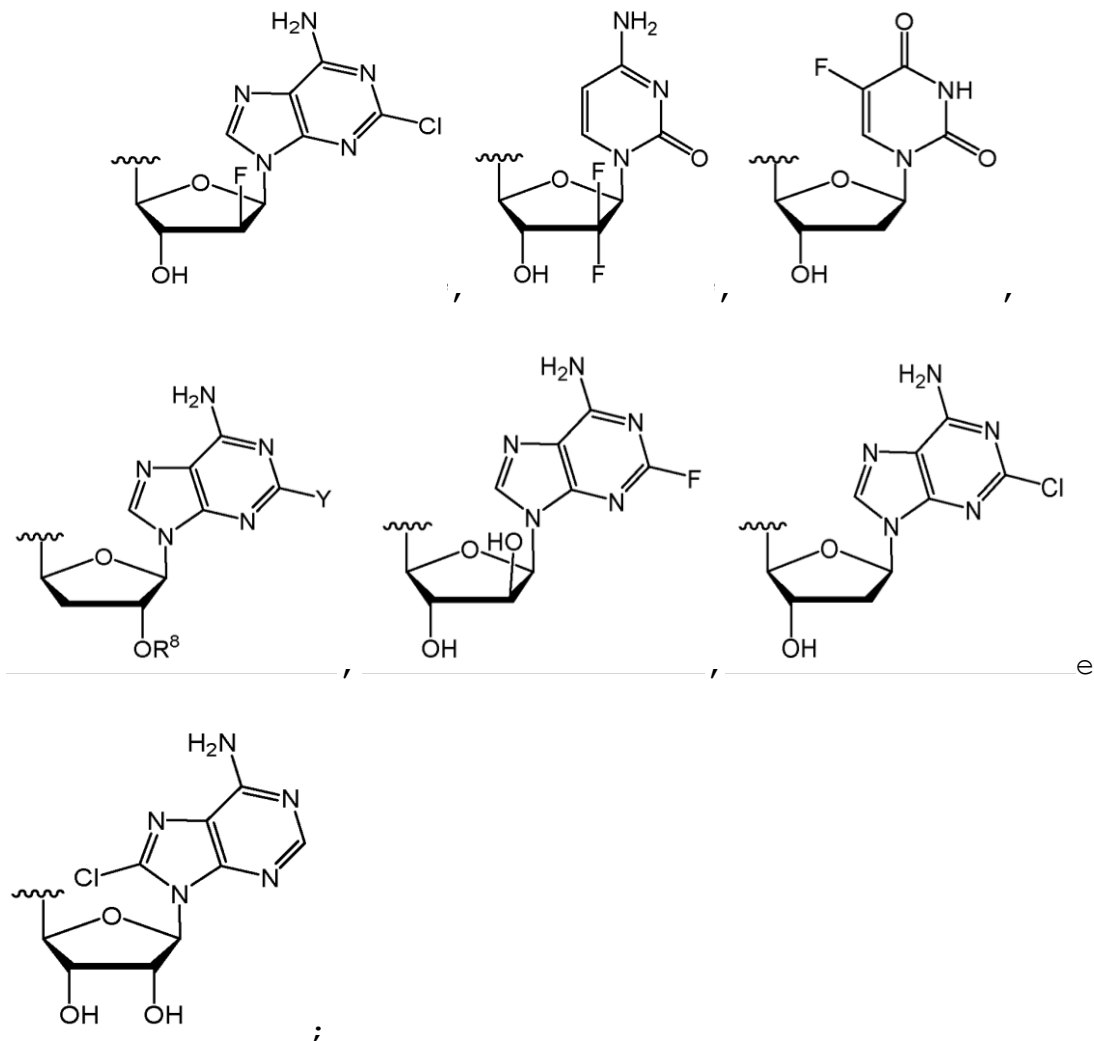
- R⁴, um grupo selecionado a partir de R² e R³ e os átomos aos quais eles estão ligados podem formar um grupo heterocicloalquilo com 3 a 6 membros;

- R⁵ é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de arila, heteroarila com 5, 6, 9 ou 10 membros, cicloalquilo-C₃-C₈, heterocicloalquilo com 3 a 7

membros, alquilenos- $C_1-C_3-R^{5a}$ e alquila- C_1-C_8 , estando a referida arila opcionalmente fundida à cicloalquila- C_6-C_8 ;

$-R^{5a}$ é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de arila, heteroarila com 5, 6, 9 ou 10 membros, cicloalquila- C_3-C_8 , heterocicloalquila com 3 a 7 membros, estando a referida arila opcionalmente fundida à cicloalquila- C_6-C_8 ;

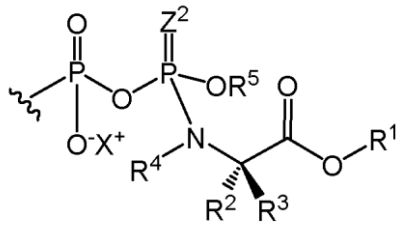
- R^6 é independentemente selecionado a partir de:



- R^7 é, independentemente em cada ocorrência,

selecionado a partir de arila, imidazol, indol, SR^a , OR^a , CO_2R^a , $CO_2NR^aR^a$, NR^aR^b e $NH(=NH)NH_2$;

- R^8 é selecionado independentemente a partir de H e



- Z^1 e Z^2 são, cada um, independentemente selecionados a partir de O e S;

- Y é independentemente selecionado a partir de H, F, Cl e OMe;

- X é, independentemente em cada ocorrência, um cátion farmacologicamente aceitável;

em que qualquer grupo arila é fenila ou naftila;

em que, quando qualquer um dentre R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 ou R^7 for uma alquila, cicloalquila, heterocicloalquila, arila ou heteroarila; o grupo alquila, cicloalquila, heterocicloalquila, arila ou heteroarila é opcionalmente substituído por 1 a 4 substituintes selecionados a partir de: halo, nitro, ciano, NR^aR^a , $NR^aS(O)_2R^a$, $NR^aC(O)R^a$, $NR^aCONR^aR^a$, $NR^aCO_2R^a$, OR^a , SR^a , SOR^a , SO_3R^a , SO_2R^a , $SO_2NR^aR^a$, CO_2R^a , $C(O)R^a$, $CONR^aR^a$, $CR^aR^aNR^aR^a$, alquila- C_1-C_4 , alquenila- C_2-C_4 , alquinila- C_2-C_4 e haloalquila- C_1-C_4 ;

em que R^a é, independentemente em cada ocorrência,

selecionado a partir de: H e alquila-C₁-C₄; e R^b é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de: H, alquila-C₁-C₄ e alquila-C₁-C₄-C(O).

[0012] Os inventores descobriram que os difosfatos fosforamidatos de fórmula (I) possuem boas atividades contra uma variedade de linhagens celulares de câncer, incluindo tumores sólidos e linhagens celulares de câncer hematológico. Em muitos casos, os difosfatos de fórmula (I) são mais ativos que o ProTide correspondente.

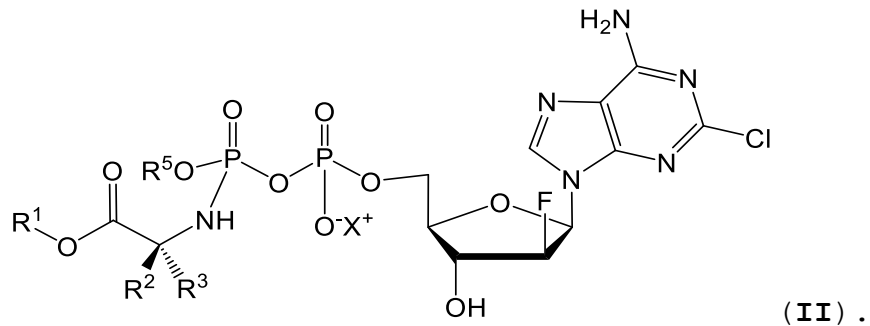
[0013] Os pró-fármacos de difosfato relatados na literatura, tais como, por exemplo, diésteres pirofosfato de nucleosídeo à base de glicerídeos (K. Y. Hostetler *et al.* *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 6112-6117; G. M. T. van Wijk, K. Y. Hostetler *et al.* *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid. Metab.* **1991**, 1084; 307-310) são conhecidos por serem instáveis devido à clivagem de uma ligação do grupo P-O-P, liberando, assim, o monofosfato nucleosídeo correspondente em vez do difosfato desejado. Os inventores descobriram, no entanto, que a desprotonação do grupo α -fosfato de difosfato fosforamidatos fornece alta estabilidade. A natureza iônica dos compostos da presente invenção também significa que eles são mais solúveis em água do que o ProTide correspondente.

[0014] São necessários vários processos enzimáticos para converter um ProTide no nucleotídeo monofosfato

correspondente, incluindo a clivagem de éster por carboxilesterases e a clivagem do aminoácido resultante das enzimas do tipo fosforamidase de nucleosídeo monofosfato. Os difosfatos fosforamidatos da presente invenção são moléculas maiores, com uma forma diferente e são iônicas, lançando dúvidas sobre se eles interagirão com as enzimas relevantes da mesma maneira para a conversão no nucleotídeo difosfato. De fato, em dados preliminares, os inventores mostraram que os difosfatos fosforamidatos de fórmula (I) são estáveis em relação às carboxipeptidases, por exemplo, carboxipeptidase Y, as enzimas que executam a etapa de clivagem de ésteres na conversão de fármacos da classe ProTide para monofosfatos. No entanto, os difosfatos fosforamidatos de fórmula (I) ainda estão ativos nas células, sugerindo que um mecanismo de ação alternativo esteja ocorrendo em comparação com os fármacos da classe ProTide. Os inventores também demonstram que, quando existe um grupo alquiloxi no fósforo do fosforamidato (OR⁵ na Fórmula I), os compostos da invenção são ativos. Em fármacos da classe ProTide, esse não é, geralmente, o caso e apenas compostos com grupos arilóxi nessa posição fornecem boa atividade. Entende-se que o grupo arilóxi atua como um grupo de saída durante a ativação de fármacos da classe ProTide. Novamente, isso indica que os difosfatos fosforamidatos da presente invenção são ativados por um

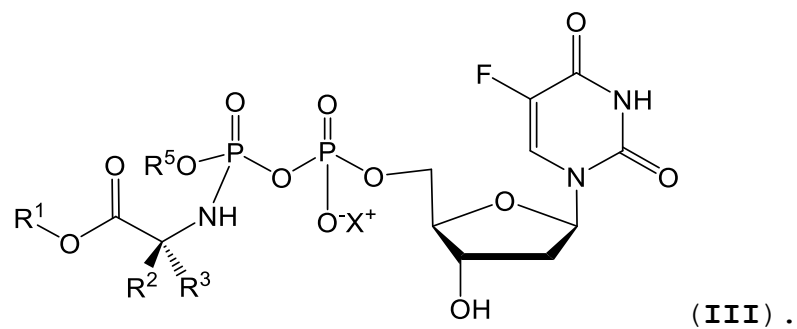
mecanismo diferente em relação aos fármacos da classe ProTide.

[0015] Nas modalidades, o composto de fórmula (I) é um composto de fórmula (II):



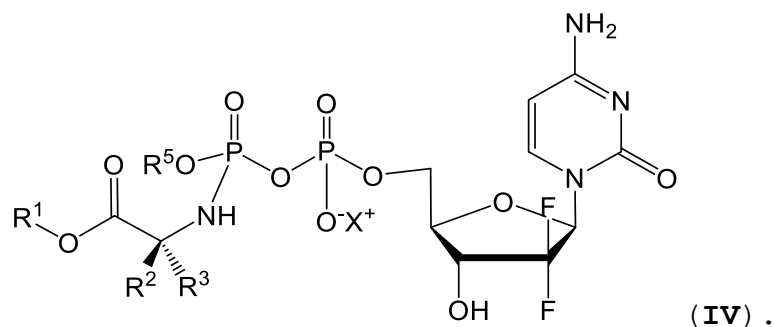
[0016] Os difosfato fosforamidatos de clofarabina, tais como os de fórmula (II), foram mais ativos que o ProTide correspondente contra várias linhagens celulares de câncer, incluindo as linhagens celulares hematológicas.

[0017] Nas modalidades, o composto de fórmula (I) é um composto de fórmula (III):

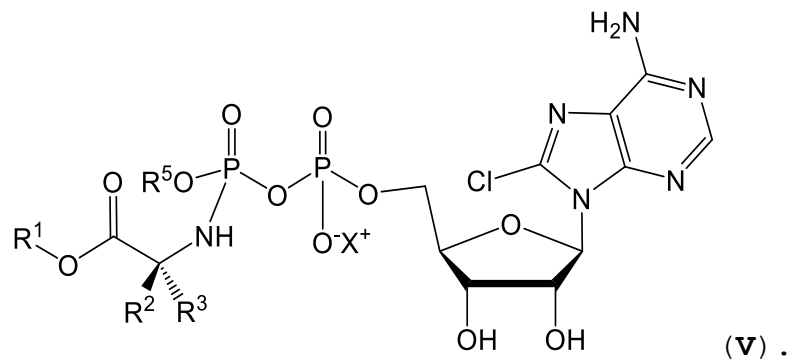


[0018] Nas modalidades, o composto de fórmula (I) é um

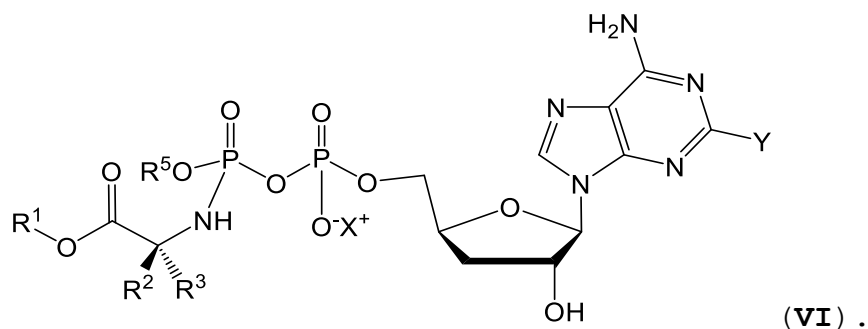
composto de fórmula (IV):



[0019] Nas modalidades, o composto de fórmula (I) é um composto de fórmula (V):

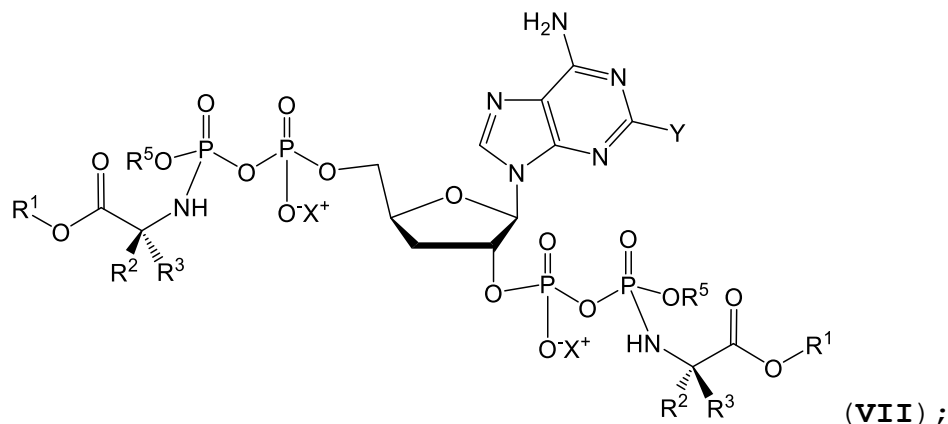


[0020] Nas modalidades, o composto de fórmula (I) é um composto de fórmula (VI):



[0021] Nas modalidades, o composto de fórmula (I) é um

composto de fórmula (VII):



nestas modalidades, pode ser que R¹, R², R³, R⁵ e X sejam os mesmos em ambas as ocorrências.

[0022] As afirmações a seguir aplicam-se aos compostos de qualquer uma das fórmulas (I) a (VII). Estas afirmações são independentes e intercambiáveis. Em outras palavras, qualquer um dos recursos descritos em qualquer uma das seguintes afirmações pode (quando quimicamente permitido) ser combinado com os recursos descritos em uma ou mais afirmações adicionais abaixo. Em particular, quando um composto é exemplificado ou ilustrado no presente relatório descritivo, quaisquer duas ou mais das afirmações abaixo que descrevem um recurso desse composto, expresso em qualquer nível de generalidade, podem ser combinadas de modo a representar o objeto contemplado como formando parte da divulgação da presente invenção neste relatório descritivo.

[0023] R¹ pode ser, independentemente em cada

ocorrência, selecionado a partir de: alquil-C₁-C₂₄, alquênil-C₃-C₂₄, alquinil-C₃-C₂₄, alquilenos-C₀-C₄-cicloalquil-C₃-C₆ e aril-alquilenos-C₀-C₄.

[0024] R¹ pode ser, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de: alquil-C₁-C₂₄, alquilenos-C₀-C₄-cicloalquil-C₃-C₈ e aril-CH₂. R¹ pode ser, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de: alquil-C₁-C₁₀, cicloalquil-C₄-C₆ e benzil. R¹ pode ser, independentemente, em cada ocorrência, selecionado a partir de: alquil-C₁-C₈, cicloalquil-C₆ e benzil.

[0025] R¹ pode ser alquil-C₁-C₈.

[0026] R¹ pode ser selecionado de tal modo que compreenda três ou mais átomos de carbono. R¹ pode ser selecionado de tal modo que compreenda cinco ou mais átomos de carbono. R¹ pode, portanto, ser selecionado de tal modo que compreenda seis ou mais átomos de carbono. R¹ é preferivelmente selecionado de tal modo que compreenda apenas átomos de carbono e hidrogênio. R¹ pode ser selecionado a partir de cicloalquil-C₅-C₇, alquil-C₅-C₈ e benzil, opcionalmente em que os referidos grupos são não substituídos. R¹ pode ser benzil não substituído. R¹ pode ser neopentil. R¹ pode ser etil.

[0027] Pode ser que R³ seja H. Pode ser que R³ seja alquil-C₁-C₄. Pode ser que R³ seja metil. Pode ser que R² seja

selecionado a partir de alquil-C₁-C₆ e alquilenos-C₁-C₃-R⁷. Pode ser que R² seja alquil-C₁-C₄. Pode ser que R² seja selecionado a partir de metil e isopropil. R² pode ser metil. R² pode ser H.

[0028] R⁴ é preferivelmente H.

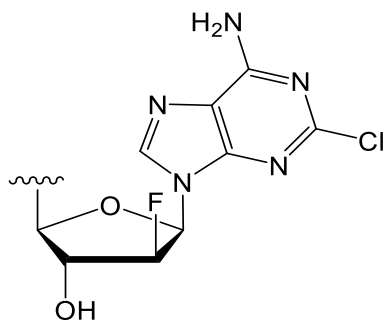
[0029] Pode ser que R⁴, um grupo selecionado a partir de R² e R³, e os átomos aos quais eles estão ligados formem um grupo heterocicloalquil com 3 a 6 membros. Pode ser que R⁴, um grupo selecionado a partir de R² e R³, e os átomos aos quais estão ligados não formem um grupo heterocicloalquil com 3 a 6 membros. Pode ser que R² e R³ sejam, cada um, independentemente em cada ocorrência, selecionados a partir de H, alquil-C₁-C₆ e alquilenos-C₁-C₃-R⁷; ou R² e R³ em conjunto com o átomo ao qual eles estão ligados formem um grupo heterocicloalquil com 3 a 6 membros; e R⁴ seja, independentemente em cada ocorrência, H ou alquil-C₁-C₄.

[0030] Pode ser que R⁵ seja fenil substituído ou não substituído, o qual pode estar opcionalmente fundido a um anel cicloalquil-C₆-C₈, por exemplo, um anel ciclohexano. Pode ser que R⁵ seja fenil substituído ou não substituído. Pode ser que R⁵ seja naftil substituído ou não substituído (por exemplo, 1-naftil). Preferivelmente, R⁵ é selecionado a partir de fenil não substituído ou naftil não substituído (por exemplo, 1-naftil). Deste modo, R⁵ pode ser fenil não

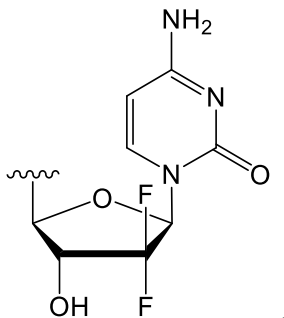
substituído. Alternativamente, R^5 pode ser naftil não

substituído (por exemplo, 1-naftil).

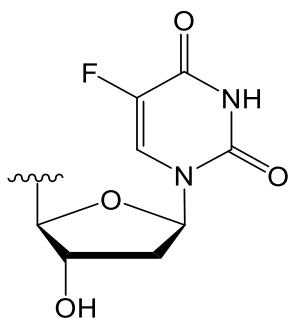
[0031] R⁶ pode ser:



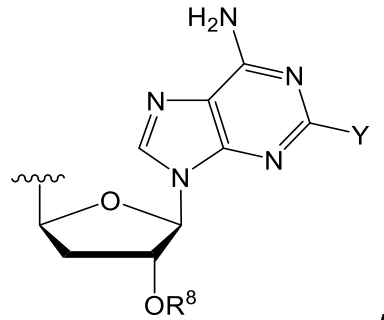
[0032] R⁶ pode ser:



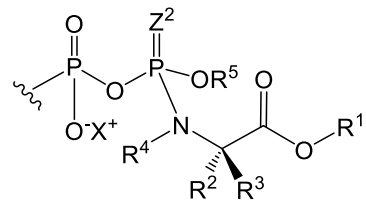
[0033] R⁶ pode ser:



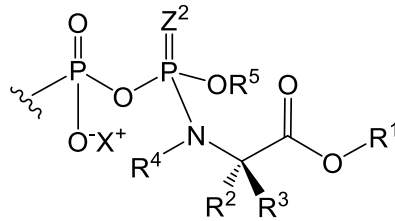
[0034] R⁶ pode ser:



Y pode ser H. Y pode ser F.



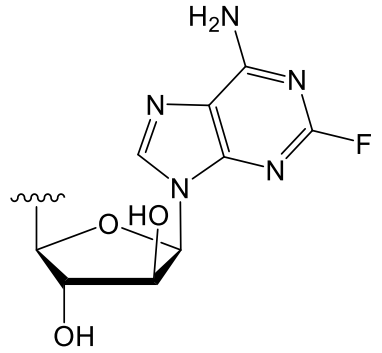
[0035] R⁸ pode ser H. R⁸ pode ser
Z² pode ser S. Z² pode ser O.



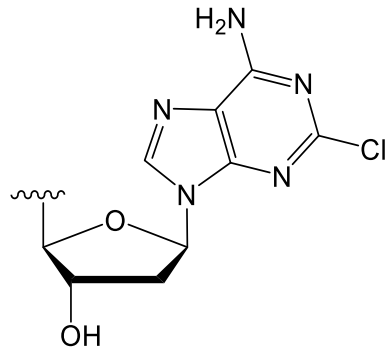
[0036] Onde R⁸ é , pode ser que

R^1 , R^2 , R^3 , R^5 , X e Z^2 sejam os mesmos em ambas as ocorrências.

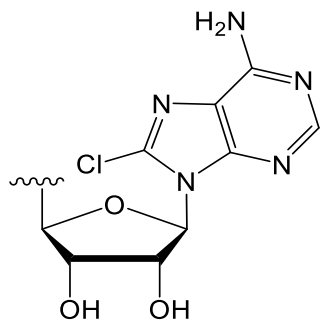
[0037] R^6 pode ser:



[0038] R^6 pode ser:

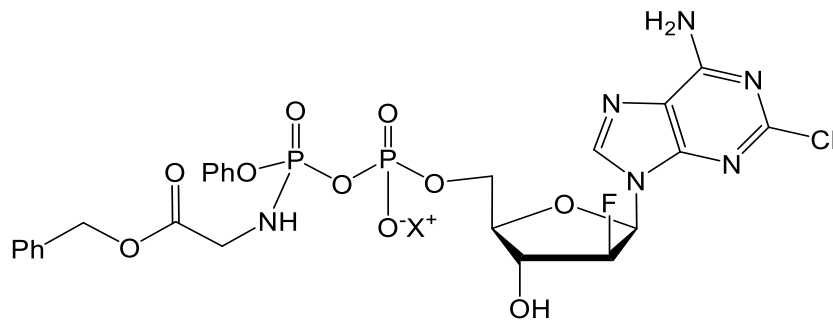
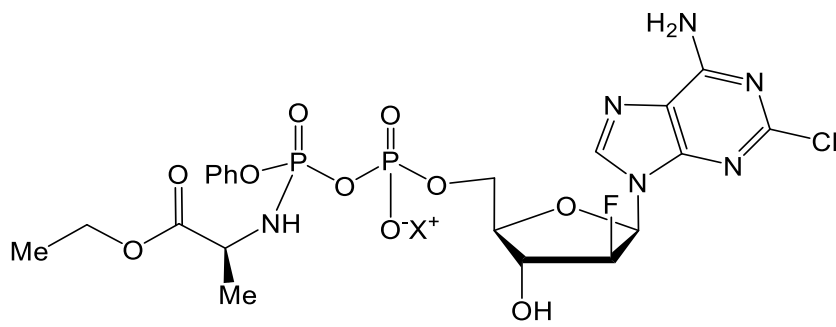
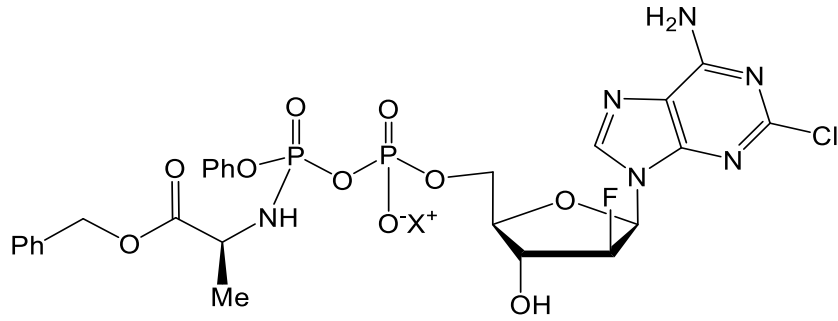


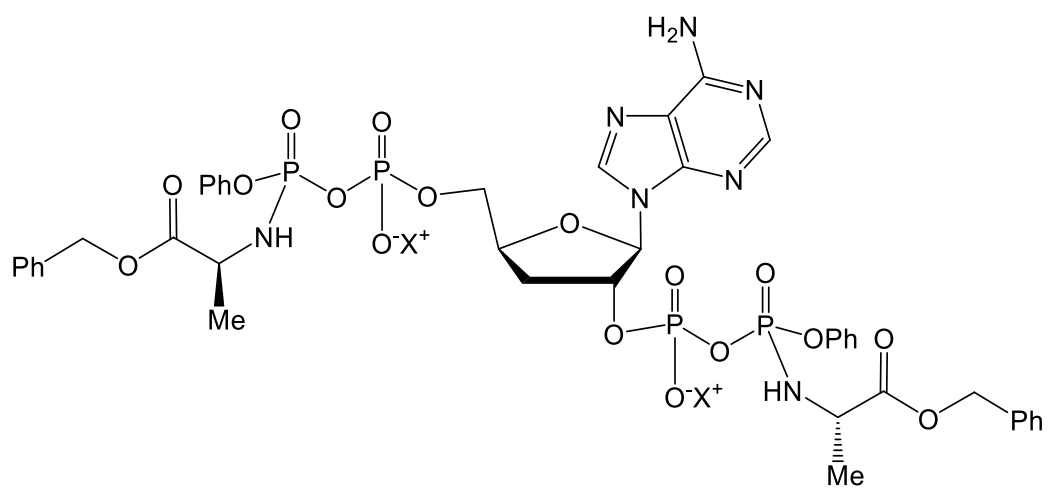
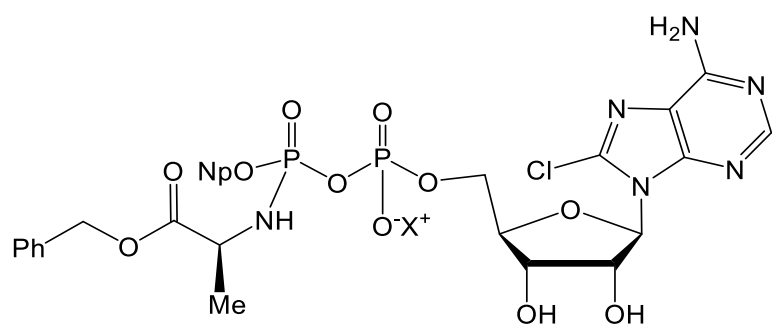
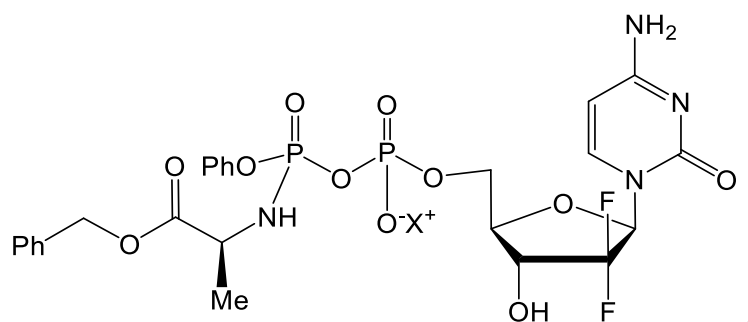
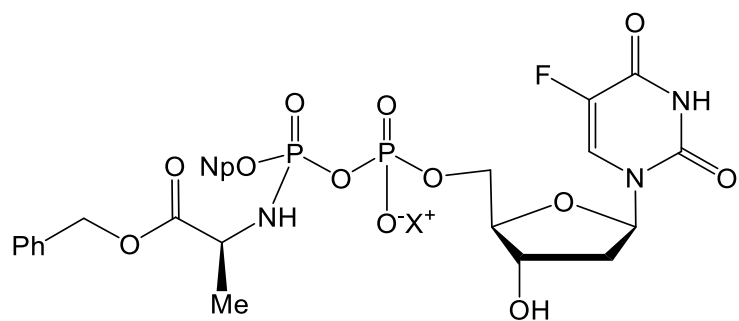
[0039] R^6 pode ser:

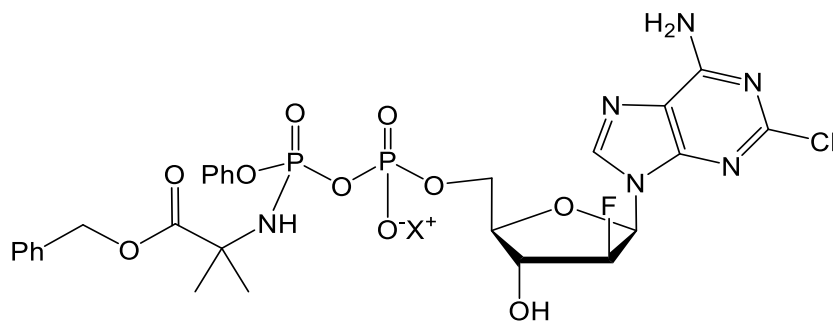
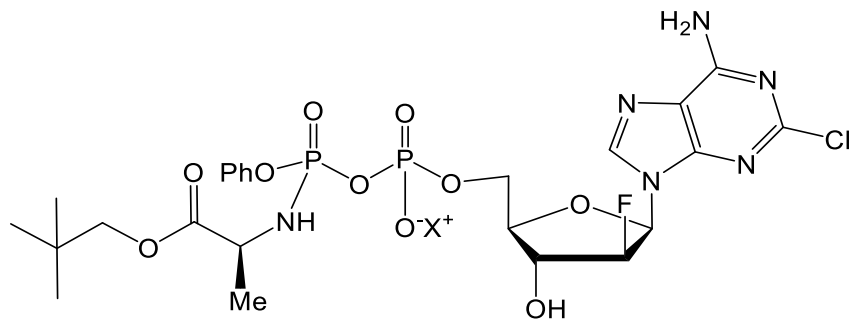
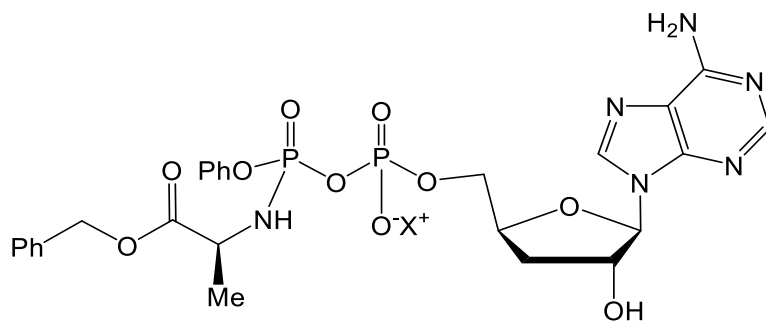
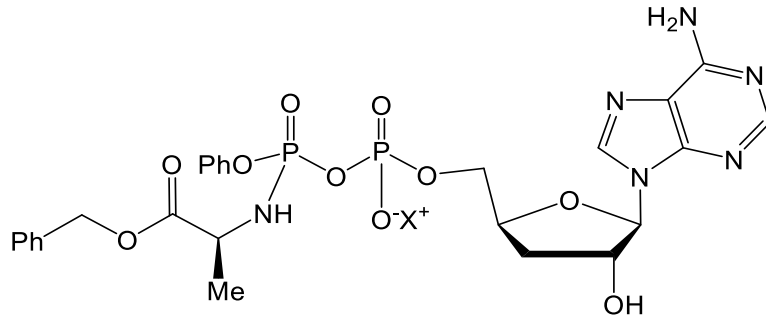


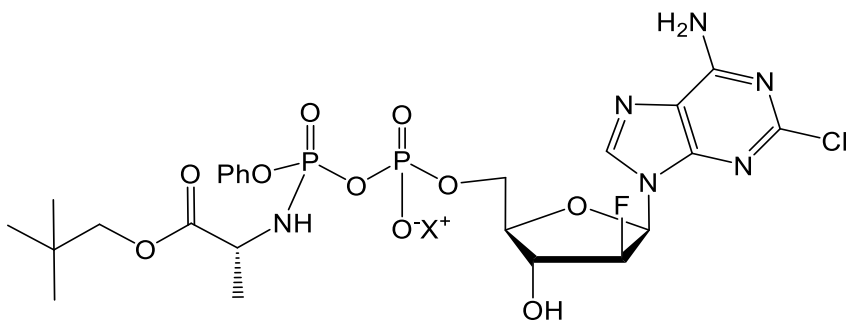
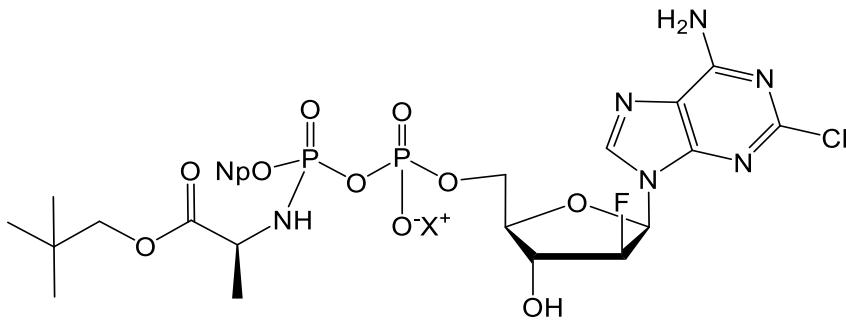
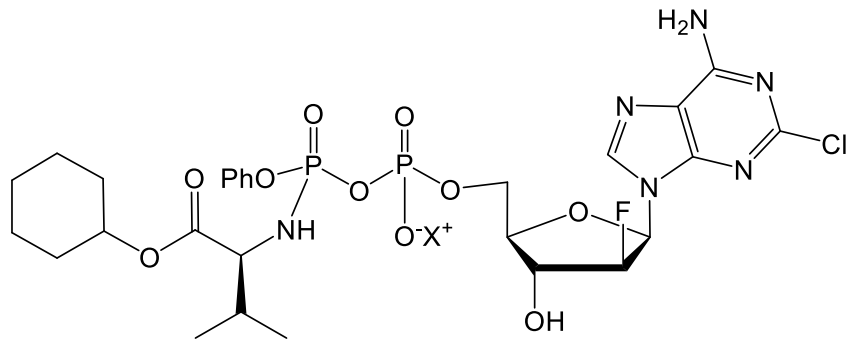
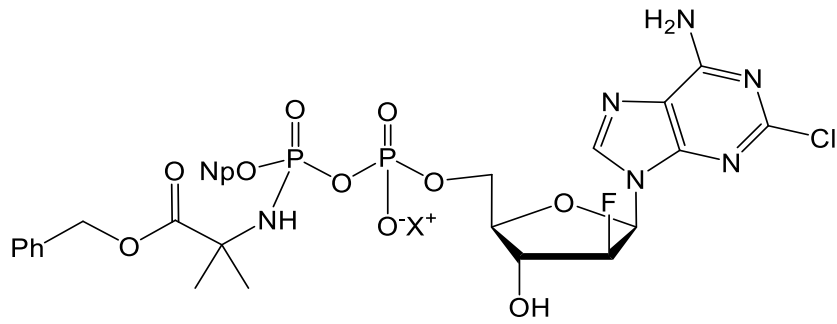
[0040] O composto de fórmula (I) pode ser selecionado

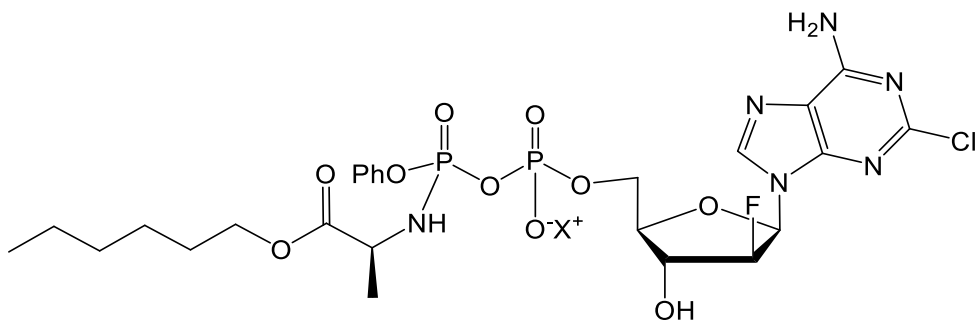
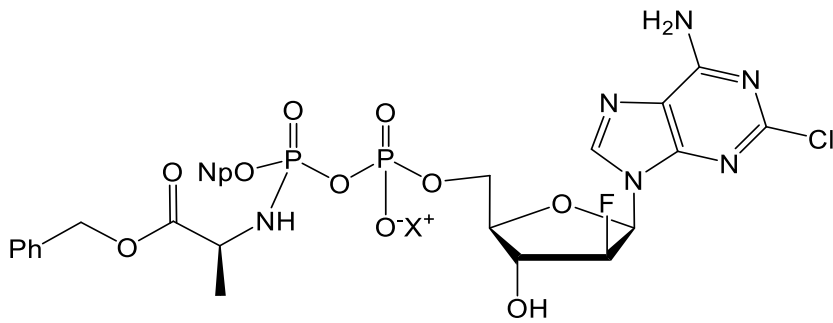
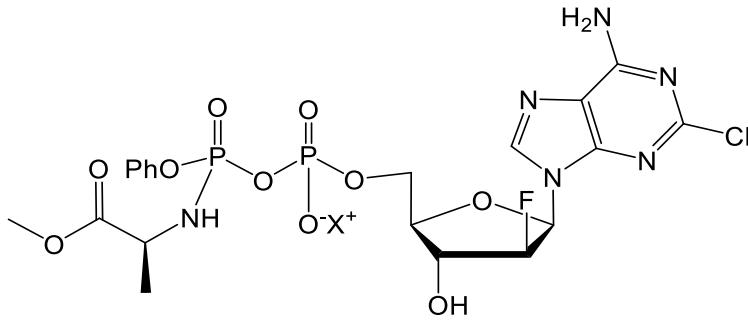
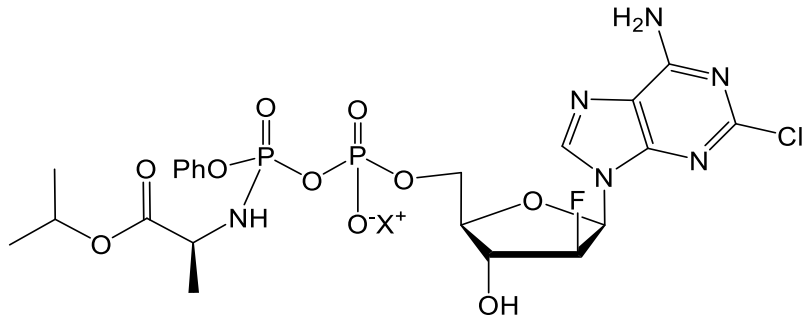
a partir de:

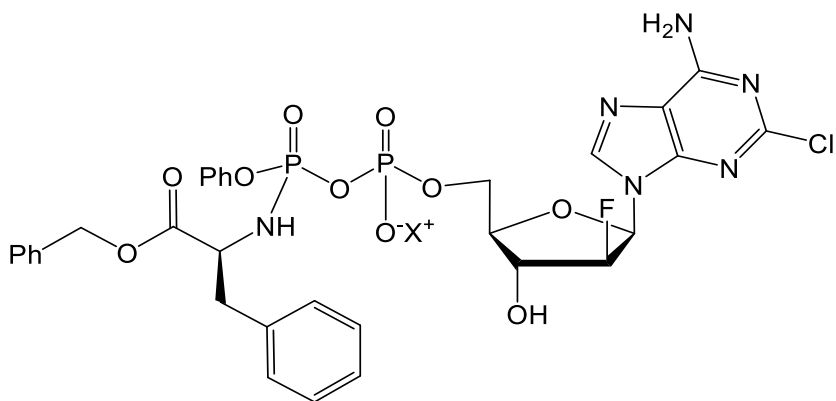
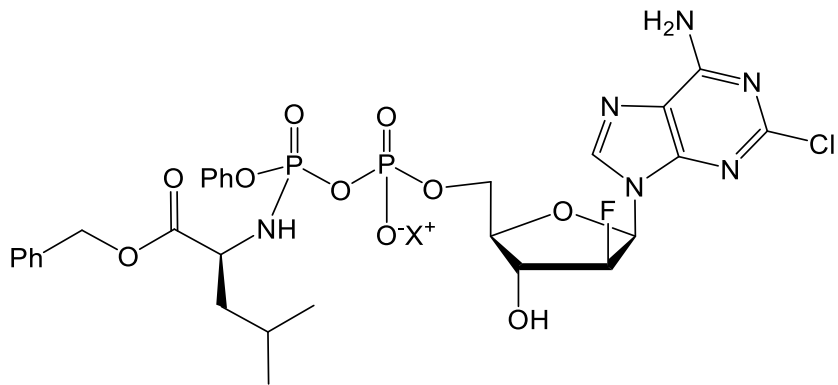
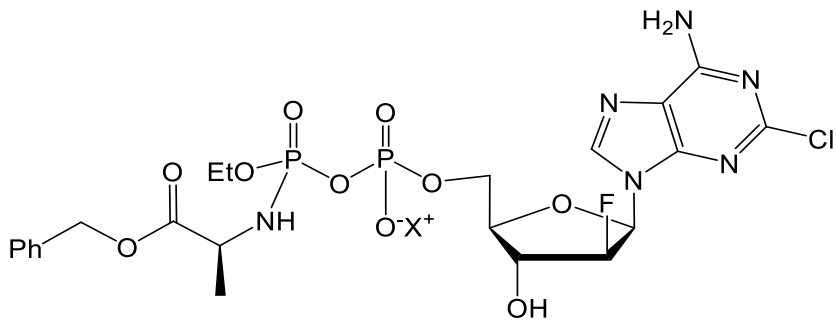
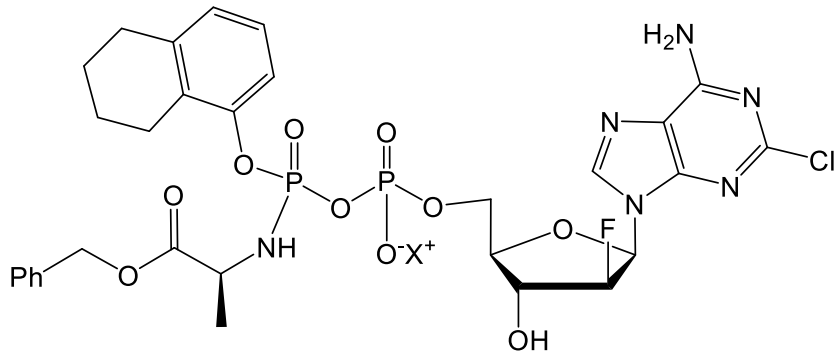


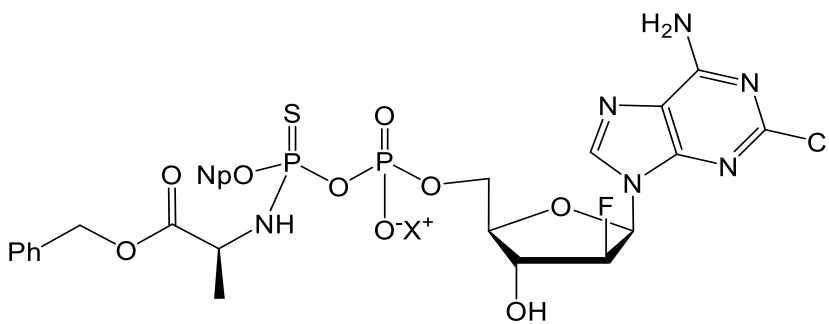
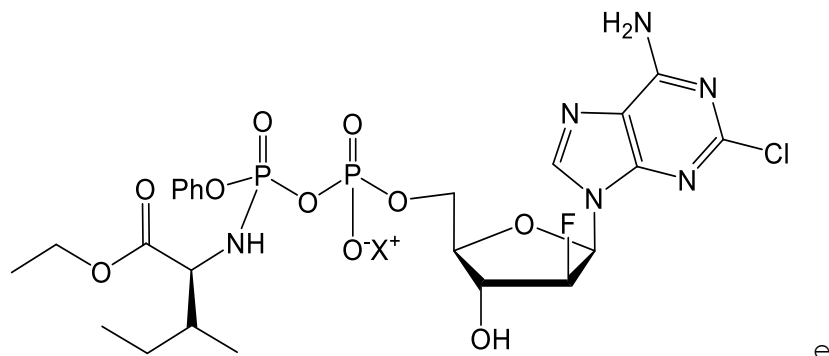
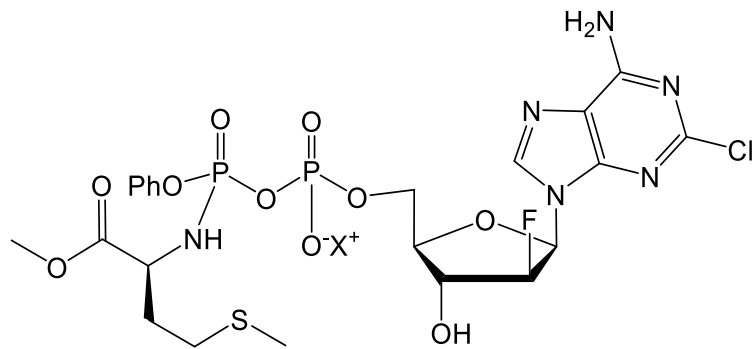
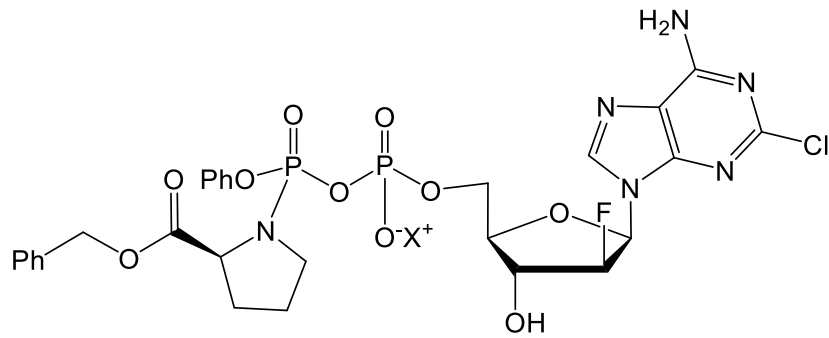












[0041] X⁺ pode ser um cátion metálico ou um cátion amônio. X⁺ pode ser um cátion metálico, por exemplo, um

cátion de um metal alcalino ou alcalino terroso. X⁺ pode ser um cátion amônio, por exemplo, um cátion trialquilamônio ou um cátion amônio de um heterociclo de nitrogênio. Cátions ilustrativos incluem aqueles derivados de cátions de alumínio, arginina, benzetina, cálcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnésio, meglumina, olamina, potássio, sódio, trometamina, trietilamina e zinco. X⁺ pode ser um cátion de trietilamina.

[0042] Os compostos da presente invenção compreendem um centro quiral no átomo de fósforo (β -fósforo) que está ligado a OR⁵. O composto pode estar presente como uma mistura de diastereoisômeros de fosfato, tal como o epímero-(S) no átomo de fósforo na forma substancialmente diastereoisomericamente pura ou como o epímero-(R) no átomo de fósforo na forma substancialmente diastereoisomericamente pura. "Substancialmente diastereoisomericamente puro" é definido para os fins da presente invenção como uma pureza diastereoisomérica superior a cerca de 90%. Se presente como uma forma substancialmente diastereoisomericamente pura, o composto pode possuir uma pureza diastereoisomérica superior a 95%, 98%, 99% ou mesmo 99,5%. Alternativamente, o composto pode estar presente como uma mistura de diastereoisômeros de fosfato.

[0043] Os epímeros-(R) e/ou -(S) do composto podem ser

obtidos em forma substancialmente diastereoisomericamente pura por cromatografia, por exemplo, HPLC opcionalmente usando uma coluna quiral. Alternativamente, os epímeros-(R) e/ou -(S) do composto podem ser obtidos na forma substancialmente diastereoisomericamente pura por cristalização a partir de um solvente ou sistema de solventes apropriado.

[0044] De acordo com um segundo aspecto da presente invenção, proporciona-se um composto de fórmula (I), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para uso em um método de tratamento.

[0045] De acordo com um terceiro aspecto da presente invenção, proporciona-se um composto de fórmula (I), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para uso na profilaxia ou no tratamento de câncer.

[0046] De acordo com um quarto aspecto da presente invenção, proporciona-se o uso de um composto de fórmula (I), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, na fabricação de um medicamento para a profilaxia ou tratamento de câncer.

[0047] De acordo com um quinto aspecto da presente invenção, proporciona-se um método de profilaxia ou tratamento de câncer que compreende a administração, a um paciente em necessidade de tal tratamento, de uma dose eficaz

de um composto de fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0048] Com relação a cada um dentre o terceiro, quarto e quinto aspectos da presente invenção, as modalidades da invenção compreendem um câncer selecionado, mas não restrito, ao grupo que consiste em: câncer de pâncreas, câncer de bexiga, outros cânceres uroteliais (por exemplo, câncer do ureter e da pelve renal), cânceres gastrointestinais (também conhecidos como câncer do trato digestivo, incluindo: câncer esofágico, câncer gástrico, câncer do estômago, câncer de intestino, câncer de intestino delgado, câncer de cólon, câncer colorretal, apêndice mucinoso, carcinoide de células caliciformes, câncer de fígado, câncer biliar, câncer de vesícula biliar, câncer anal e câncer retal), câncer de pulmão, câncer renal, câncer biliar, câncer de próstata, colangiocarcinoma, câncer neuroendócrino, sarcoma, linfoma, câncer tímico, glioblastoma multiforme, câncer de origem primária desconhecida, mesotelioma, câncer adrenal, câncer de testículo, câncer do sistema nervoso central, carcinoma basocelular, doença de Bowens, outros tipos de câncer de pele (tal como, melanoma maligno, tumor de células de Merckel e tumores raros do apêndice), neoplasia escamosa da superfície ocular, tumores de células germinativas,

leucemia, mieloma múltiplo, câncer de pulmão, câncer de fígado, câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço, neuroblastoma, carcinoma de tireoide, carcinoma de células escamosas orais, câncer de bexiga urinária, tumor de células de Leydig e cânceres ginecológicos (incluindo câncer de ovário, câncer da trompa de Falópio, câncer peritoneal, câncer endometrial, câncer uterino e câncer cervical, incluindo carcinoma epitelial do colo do útero).

[0049] Em certas modalidades, o câncer é uma leucemia ou um linfoma.

[0050] O câncer pode ser uma leucemia.

[0051] Existem quatro tipos principais de leucemia, dependendo se eles sejam crônicos ou agudos, e de origem mieloide ou linfoide. São eles: leucemia mieloblástica aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide crônica (LMC) e leucemia linfocítica crônica (LLC).

[0052] As misturas destes são também conhecidas; por exemplo, leucemia bifenotípica aguda (LBA; que é uma mistura de LMA e LLA).

[0053] Em modalidades particulares, a leucemia é selecionada a partir do grupo que consiste em: leucemia mieloblástica aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica crônica (LLC) e leucemia bifenotípica aguda (LBA; que é uma

mistura de LMA e LLA).

[0054] A leucemia linfocítica crônica (LLC) inclui os subtipos: LLC de células B (LLC-B), leucemia prolinfocítica de células B (LPL-B) e leucemia prolinfocítica crônica de células T (LPL-T) e vários subtipos que diferem no nível genético.

[0055] A leucemia linfoblástica aguda (LLA) inclui os subtipos: LLA de célula B precursora (LLA-B), LLA de célula T precursora (LLA-T), LLA tipo Burkitt e LLA cromossomo Filadélfia positivo (fusão BCR-ABL).

[0056] A leucemia mieloblástica aguda (LMA) inclui os subtipos: leucemia mieloide, leucemia monocítica e leucemia promielocítica aguda (LPA).

[0057] A leucemia mieloide crônica (LMC) inclui os subtipos: leucemia granulocítica crônica (LGC), LMC juvenil (JCML), leucemia neutrofílica crônica (LNC), leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) e LMC atípica (aCML).

[0058] Em modalidades particulares, qualquer um dos subtipos acima de LLC, LLA, LMA e LMC é adequado para tratamento com os compostos da presente invenção ou composições farmacêuticas contendo os mesmos.

[0059] Outras formas de leucemia que podem ser consideradas incluem: eritroleucemia, resultante de precursores de glóbulos vermelhos; e um linfoma que tenha

entrado no sangue.

[0060] O câncer pode ser um linfoma, por exemplo, um linfoma sólido.

[0061] Existem dois tipos principais de linfoma: linfoma de Hodgkin e linfoma não Hodgkin. Dentro de cada um desses existem vários subtipos.

[0062] Em modalidades particulares, o linfoma é selecionado a partir do grupo que consiste em: linfoma de Hodgkin e linfoma não Hodgkin.

[0063] Em modalidades particulares, o linfoma é selecionado a partir do grupo que consiste em: linfoma de Burkitt (LB), linfoma de células do manto (LCM), linfoma folicular (LF), linfoma linfocítico pequeno (LLP), linfoma indolente não Hodgkin de células B, linfoma histiocítico (também conhecido como linfoma imunoblástico - LIB) e linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), incluindo linfoma difuso de grandes células B de células ativadas (LDGCB-CBA) e linfoma difuso de grandes células B do centro germinativo (LDGCB-CG).

[0064] Em certas modalidades, o câncer é um câncer gastrointestinal e pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: câncer esofágico, câncer gástrico, câncer de estômago, câncer de intestino, câncer do intestino delgado, câncer de cólon, câncer colorretal, apêndice

mucinoso, carcinoide de células caliciformes, câncer de fígado, câncer biliar, câncer de vesícula biliar, câncer anal e câncer retal.

[0065] Em certas modalidades, o câncer é de origem ginecológica e pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: um câncer de útero, câncer de trompa de falópio, câncer de endométrio, câncer de ovário, câncer peritoneal e câncer de colo do útero. De forma apropriada, o câncer de ovário pode ser câncer epitelial de ovário. Adequadamente, o câncer peritoneal pode ser câncer peritoneal primário.

[0066] Em particular, o câncer pode ser selecionado a partir de, mas não limitado a, câncer do pâncreas, câncer do pulmão, câncer da bexiga, câncer de mama, câncer biliar, linfoma, leucemia, câncer gastrointestinal e câncer ginecológico.

[0067] Verificou-se que os compostos da presente invenção retêm atividade mesmo sob condições hipóxicas. Os cânceres particularmente associados à hipóxia são cânceres pancreático e renal.

[0068] O câncer pode ser recidivante. O câncer pode ser metastático. O câncer pode não ter sido tratado anteriormente.

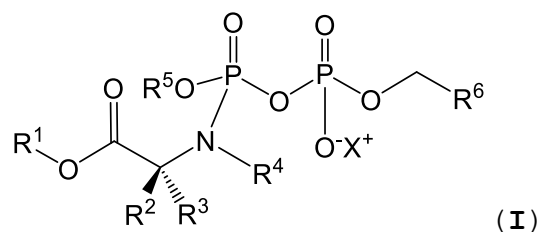
[0069] O câncer pode ser um câncer refratário que foi tratado anteriormente, mas provou não responder ao

tratamento anterior. Alternativamente, o paciente com câncer pode ser intolerante a uma terapia anterior, por exemplo, pode desenvolver efeitos colaterais que tornam o paciente intolerante ao tratamento adicional com o agente a ser administrado.

[0070] De acordo com um sexto aspecto da presente invenção, é fornecida uma composição farmacêutica compreendendo um composto de fórmula (I), ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, e pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável. A composição farmacêutica pode ser para uso na profilaxia ou no tratamento de câncer, por exemplo, um câncer ou grupo de cânceres mencionados acima.

[0071] O composto de fórmula (I) pode ser como descrito nos seguintes parágrafos numerados:

1. Em um primeiro aspecto da invenção, é fornecido um composto de fórmula (I), ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo:



em que:

- R¹ é, independentemente em cada ocorrência,

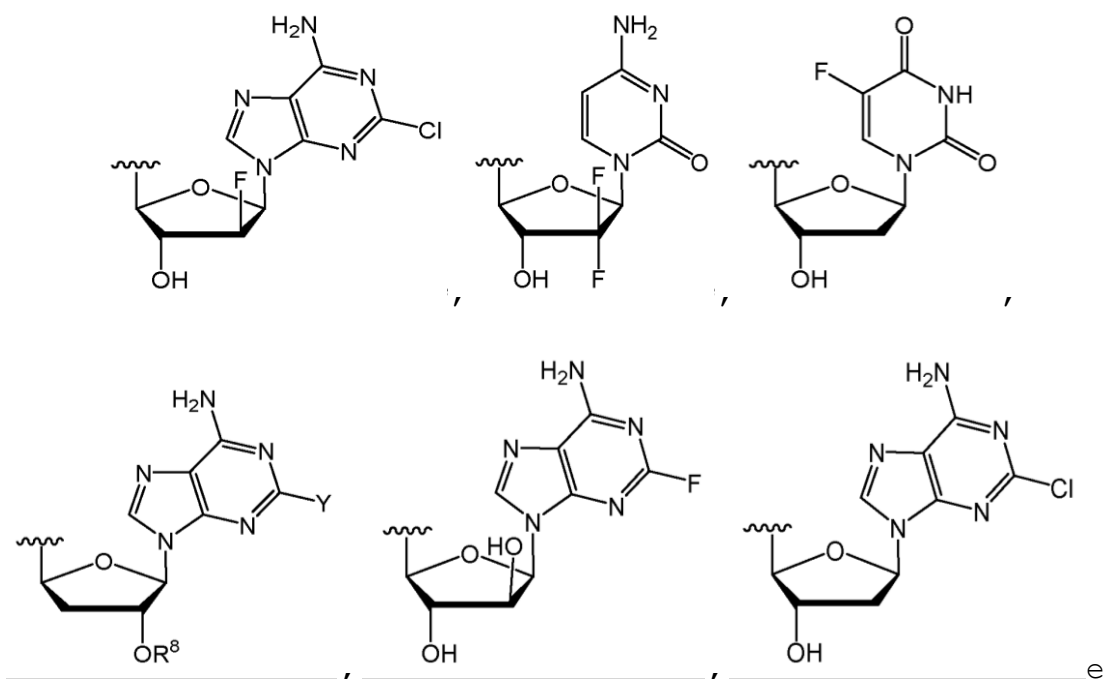
selecionado a partir de: alquil-C₁-C₂₄, alquenil-C₃-C₂₄, alquinil-C₃-C₂₄, alquilenos-C₀-C₄-cicloalquil-C₃-C₈ ou aril-alquilenos-C₀-C₄;

- R² e R³ são cada um, independentemente em cada ocorrência, selecionados a partir de H, alquil-C₁-C₆ e alquilenos-C₁-C₃-R⁷; ou R² e R³ em conjunto com o átomo ao qual eles estão ligados formam um grupo cicloalquil ou heterocicloalquil com 3 a 6 membros;

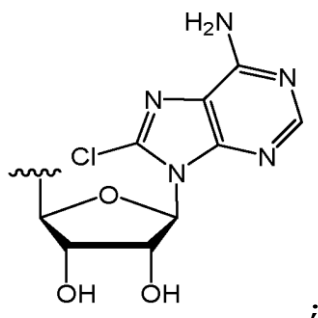
- R⁴ é, independentemente em cada ocorrência, H ou alquil-C₁-C₄;

- R⁵ é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de aril e heteroaril com 5, 6, 9 ou 10 membros;

- R⁶ é independentemente selecionado a partir de:

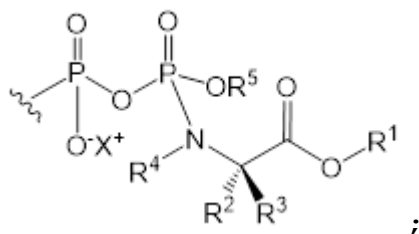


e



- R^7 é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de aril, imidazol, indol, SR^a , OR^a , CO_2R^a , $CO_2NR^aR^a$, NR^aR^b e $NH(=NH)NH_2$;

- R^8 é independentemente selecionado a partir de H e



- Y é selecionado independentemente dentre H, F, Cl e OMe;

- X é, independentemente em cada ocorrência, um cátion farmacologicamente aceitável;

em que qualquer grupo aril é fenil ou naftil;

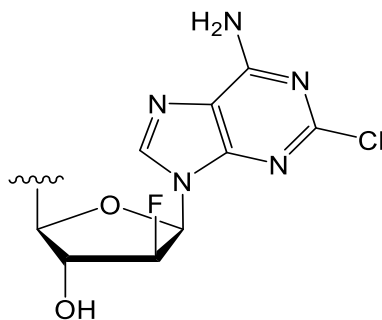
em que quando qualquer um de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 ou R^7 é um alquil, cicloalquil, heterocicloalquil, aril ou heteroaril; o grupo alquil, cicloalquil, heterocicloalquil, aril ou heteroaril é opcionalmente substituído com 1 a 4 substituintes selecionados a partir de: halo, nitro, ciano, NR^aR^a , $NR^aS(O)_2R^a$, $NR^aC(O)R^a$, $NR^aCONR^aR^a$, $NR^aCO_2R^a$, OR^a , SR^a ,

SOR^a, SO₃R^a, SO₂R^a, SO₂NR^aR^a, CO₂R^a, C(O)R^a, CONR^aR^a, CR^aR^aNR^aR^a,
 alquil-C₁-C₄, alquenil-C₂-C₄, alquinil-C₂-C₄ e haloalquil-C₁-
 C₄;

em que R^a é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de: H e alquil-C₁-C₄; e R^b é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de: H, e alquil-C₁-C₄ e alquil-C₁-C₄-C(O).

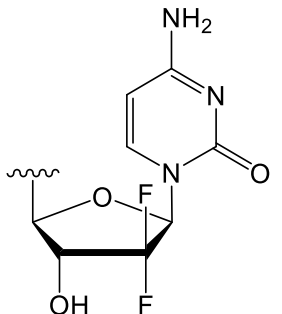
2. Um composto do parágrafo 1, em que R⁴ é H.

3. Um composto do parágrafo 1 ou parágrafo 2, em que R⁶ é



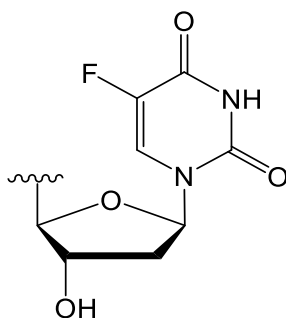
4. Um composto do parágrafo 1 ou parágrafo 2, em que R⁶

é



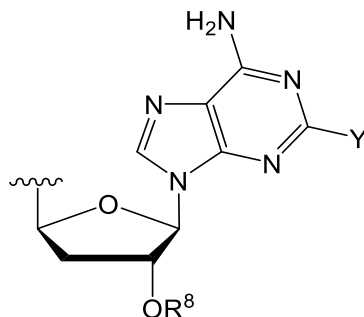
5. Um composto do parágrafo 1 ou parágrafo 2, em que R⁶

é



6. Um composto do parágrafo 1 ou parágrafo 2, em que R⁶

é

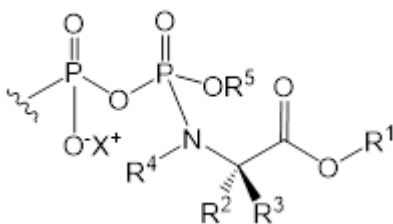


7. Um composto do parágrafo 6, em que Y é H.

8. Um composto do parágrafo 6, em que Y é F.

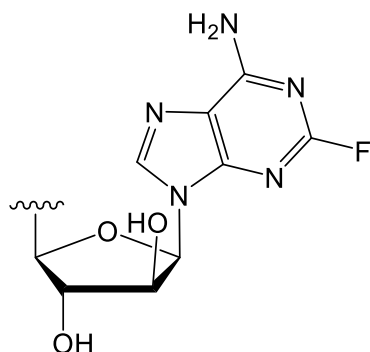
9. Um composto de qualquer um dos parágrafos 6 a 8, em que R⁸ é H.

10. Um composto de qualquer um dos parágrafos 6 a 8, em que R⁸ é



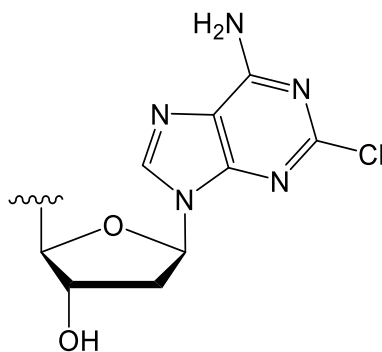
11. Um composto do parágrafo 1 ou parágrafo 2, em que

R⁶ é



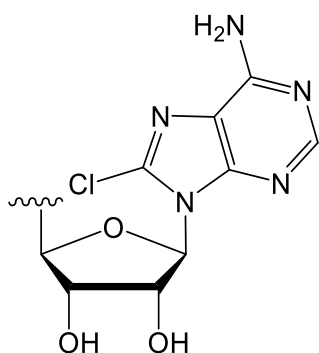
12. Um composto do parágrafo 1 ou parágrafo 2, em que

R⁶ é



13. Um composto do parágrafo 1 ou parágrafo 2, em que

R⁶ é



14. Um composto de qualquer um dos parágrafos 1 a 13, em que R¹ é selecionado a partir de cicloalquil-C₅-C₇, alquil-

C₁-C₈ e benzil.

15. Um composto do parágrafo 14, em que R¹ é um grupo benzil.

16. Um composto do parágrafo 14, em que R¹ é alquil-C₁-C₈, por exemplo, etil.

17. Um composto de qualquer um dos parágrafos 1 a 16, em que R³ é H.

18. Um composto de qualquer um dos parágrafos 1 a 17, em que R² é alquil-C₁-C₄.

19. Um composto de qualquer um dos parágrafos 1 a 17, em que R² é H.

20. Um composto de qualquer um dos parágrafos 1 a 19, em que R⁵ é fenil.

21. Um composto de qualquer um dos parágrafos 1 a 19, em que R⁵ é naftil.

22. Um composto de qualquer um dos parágrafos 1 a 21, em que X⁺ é um cátion metálico ou um cátion amônio.

23. Um composto de qualquer um dos parágrafos 1 a 22 para uso médico.

24. Um composto de qualquer um dos parágrafos de 1 a 23 para uso no tratamento de câncer.

25. Um composto para uso de acordo com o parágrafo 24, em que o câncer é leucemia ou linfoma.

26. Um composto para uso de acordo com o parágrafo 25,

em que o câncer é uma leucemia selecionada do grupo que consiste em leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, síndromes mielodisplásicas, leucemia promielocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfocítica crônica, leucemia monoblástica e leucemia de células ciliadas.

27. Uma composição farmacêutica que compreende compostos de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 22 e pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0072] As modalidades da presente invenção são adicionalmente descritas a seguir com referência aos desenhos anexos, nos quais:

- a Figura 1 exhibe curvas sigmoidais de dose-resposta para (A) clofarabina, (B) Exemplo 1 e (C) Exemplo 2. Clofarabina e Exemplo 1 mostraram a maior potência. Todos os ensaios foram realizados utilizando células KG1a e os dados são apresentados como média (\pm DP) de três experimentos independentes.

- a Figura 2 exhibe uma análise da capacidade de direcionamento às LSC da clofarabina, do Exemplo 1 e do Exemplo 2. Sob condições normóxicas, todos os compostos mostraram direcionamento às células-tronco em concentrações acima de 1×10^{-7} M. Todos os dados são a média (\pm DP) de três

experimentos independentes.

- a Figura 3 exibe a comparação da fração de células KG1a que expressam um fenótipo de LSC em condições normóxicas e hipóxicas. (A) as células KG1a mostram um aumento dependente do tempo nas células que expressam um fenótipo de LSC sob condições hipóxicas, que foi (B) revertido quando as células foram transferidas para condições de cultura normóxicas. Todos os dados são as médias (\pm DP) de quatro experimentos independentes.

- a Figura 4 exibe a comparação dos valores de DL₅₀ médios para (A) clofarabina, (B) Exemplo 1 e (C) Exemplo 2 sob condições normóxicas e hipóxicas. A clofarabina mostrou uma perda significativa de potência em condições hipóxicas. Em contraste, os compostos da presente invenção mantiveram sua potência sob condições hipóxicas. Todos os dados são as médias (\pm DP) de três experimentos independentes.

- a Figura 5 exibe a comparação do dano ao DNA, conforme medido pelo ensaio de fosforilação de γ H2A.X, induzido em LSCs purificadas e células de massa tumoral após exposição de 2 horas à: (A) clofarabina, (B) Exemplo 1 e (C) Exemplo 2 em condições de hipoxia (5% de O₂). Todos os dados são as médias (\pm DP) de três experimentos independentes.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0073] O termo 'solução salina' pretende se referir a

uma solução aquosa de cloreto de sódio. As soluções salinas da presente invenção serão tipicamente estéreis e estarão tipicamente em uma concentração adequada para uso na administração parenteral. As concentrações adequadas são de até 2% p/v ou até 1% p/v. Para otimizar a osmolaridade, diferentes formulações de solução salina podem ser usadas nas formulações da presente invenção, por exemplo, 0,9% p/v ou 0,45% p/v.

[0074] As formulações da presente invenção podem ser utilizadas no tratamento do corpo humano. Elas podem ser utilizadas no tratamento do corpo de um animal.

[0075] Os compostos nas formulações da presente invenção podem ser obtidos, armazenados e/ou administrados na forma de um sal farmacologicamente aceitável. Os sais farmacologicamente aceitáveis adequados incluem, mas não estão limitados a, sais de ácidos inorgânicos farmacologicamente aceitáveis, tais como ácidos clorídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbônico, bórico, sulfâmico e bromídrico, ou sais de ácidos orgânicos farmacologicamente aceitáveis, tais como ácido acético, propiônico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, málico, cítrico, láctico, mícico, glucônico, benzóico, succínico, oxálico, fenilacético, metanossulfônico, toluenossulfônico, benzenossulfônico, salicílico, sulfanílico, aspártico,

glutâmico, edético, esteárico, palmítico, oleico , láurico, pantotênico, tânico, ascórbico e valérico. Os sais de base adequados são formados a partir de bases que formam sais não tóxicos. Exemplos incluem os sais de alumínio, arginina, benzatina, cálcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnésio, meglumina, olamina, potássio, sódio, trometamina e zinco. Hemisais de ácidos e bases também podem ser formados, por exemplo, sais de hemissulfato, hemioxalato e hemicálcio.

[0076] Para as formulações da presente invenção acima mencionadas, a dosagem administrada variará de acordo com o composto empregado, o modo preciso de administração, o tratamento desejado e o distúrbio indicado. Espera-se que os níveis de dosagem, a frequência da dose e as durações dos tratamentos dos compostos da presente invenção sejam diferentes, dependendo da formulação e indicação clínica, idade e condições médicas de comorbidade do paciente. O tamanho da dose para fins terapêuticos dos compostos da presente invenção variará naturalmente de acordo com a natureza e gravidade das condições, a idade e sexo do animal ou paciente e a via de administração, de acordo com princípios bem conhecidos da medicina.

[0077] Uma formulação farmacêutica tipicamente assume a forma de uma composição na qual os compostos ativos, ou

sais farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos, estão em associação com um adjuvante, diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável. Um desses adjuvantes, diluentes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis nas formulações da invenção é o solvente polar aprótico. Os procedimentos convencionais para a seleção e preparação de formulações farmacêuticas adequadas são descritos, por exemplo, em "*Pharmaceuticals - The Science of Dosage Form Designs*", M. E. Aulton, Churchill Livingstone, **1988**.

[0078] As formulações podem ser adequadas para aplicação tópica (por exemplo, na pele ou na bexiga), para administração oral ou administração parenteral (por exemplo, administração intravenosa).

[0079] Quaisquer solventes utilizados nas formulações farmacêuticas da presente invenção devem ser de qualidade farmacêutica, pelo qual se entenderá que eles tenham um perfil de impurezas que os tornam adequados para a administração (por exemplo, administração intravenosa) em seres humanos.

[0080] Para administração oral, as formulações da presente invenção podem compreender o composto ativo misturado com um adjuvante ou um veículo, por exemplo, lactose, sacarose, sorbitol, manitol; um amido, por exemplo, amido de batata, amido de milho ou amilopectina; um derivado

de celulose; um aglutinante, por exemplo, gelatina ou polivinilpirrolidona; e/ou um lubrificante, por exemplo, estearato de magnésio, estearato de cálcio, polietilenoglicol, uma cera, parafina e similares, e em seguida comprimido em comprimidos. Se forem necessários comprimidos revestidos, os núcleos preparados como descrito acima podem ser revestidos com uma solução concentrada de açúcar que pode conter, por exemplo, goma arábica, gelatina, talco e dióxido de titânio. Alternativamente, o comprimido pode ser revestido com um polímero adequado dissolvido em um solvente orgânico facilmente volátil.

[0081] Para a preparação de cápsulas gelatinosas moles, os compostos ativos podem ser misturados com, por exemplo, um óleo vegetal ou polietilenoglicol. Cápsulas gelatinosas duras podem conter grânulos do composto usando os excipientes acima mencionados para comprimidos. Formulações líquidas ou semissólidas dos compostos ativos também podem ser colocadas em cápsulas gelatinosas duras.

[0082] As preparações líquidas para aplicação oral podem estar na forma de xaropes ou suspensões, por exemplo, soluções contendo o composto da presente invenção, sendo o restante açúcar e uma mistura de etanol, água, glicerol e propilenoglicol. Opcionalmente, tais preparações líquidas podem conter agentes corantes, aromatizantes, adoçantes (tal

como sacarina), conservantes e/ou carboximetilcelulose como agente espessante ou outros excipientes conhecidos pelos versados na técnica.

[0083] As formulações podem ser para administração parenteral (por exemplo, intravenosa). No que tange a administração parenteral (por exemplo, intravenosa), os compostos ativos podem ser administrados como uma solução aquosa ou oleosa estéril. Preferivelmente, os compostos ativos são administrados como uma solução aquosa estéril. A solução aquosa pode, ainda, compreender pelo menos um surfactante e/ou solvente orgânico. Solventes orgânicos ilustrativos incluem dimetilacetamida, etanol, etilenoglicol, N-metil-pirrolidinona, dimetilsulfóxido, dimetilformamida e isopropanol. Os surfactantes ilustrativos incluem ácidos graxos polietoxilados e ésteres de ácidos graxos e misturas dos mesmos. Os surfactantes adequados incluem óleo de rícino polietoxilado (por exemplo, aquele vendido sob o nome comercial Kolliphor® ELP); ou ácido esteárico polietoxilado (por exemplo, aquele vendido sob os nomes comerciais Solutol® ou Kolliphor® HS15); ou monooleato de sorbitano polietoxilado (por exemplo, polioxietileno (20)) (por exemplo, aqueles que são vendidos sob os nomes comerciais de Polissorbato 80 ou Tween® 80).

[0084] A composição farmacêutica da presente invenção

compreenderá, preferivelmente, 0,05% a 99% em peso (por cento em peso) do composto da presente invenção, mais preferivelmente 0,05% a 80% em peso do composto da presente invenção, ainda mais preferivelmente 0,10% a 70% em peso do composto da presente invenção, e, ainda mais preferivelmente, 0,10% a 50% em peso do composto da presente invenção, sendo todas as porcentagens em peso baseadas na composição total.

[0085] As ciclodextrinas têm mostrado vasta aplicação na distribuição de fármacos (Rasheed *et al.*, *Sci. Pharm.*, 2008, 76, 567-598). As ciclodextrinas são uma família de oligossacarídeos cíclicos. Elas agem como uma 'gaiola molecular' que encapsula as moléculas dos fármacos e altera as propriedades dessas moléculas, tal como a solubilidade. As ciclodextrinas compreendem unidades de α -D-glicopirranose ligadas a (α -1,4). As ciclodextrinas podem conter 6, 7 ou 8 unidades de glicopirranose (designadas α -, β - e γ -ciclodextrinas, respectivamente). As ciclodextrinas utilizadas em formulações farmacêuticas são frequentemente β -ciclodextrinas. Os grupos hidroxil pendentes podem ser alquilados com um grupo alquil C₁-C₆ substituído ou não substituído. Exemplos de ciclodextrinas são α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), sal sódico de sulfobutiléter- β -

ciclodextrina, β -ciclodextrina parcialmente metilada. As formulações da presente invenção também podem compreender pelo menos uma ciclodextrina.

[0086] O termo C_m-C_n refere-se a um grupo contendo de 'm' a 'n' átomos de carbono.

[0087] O termo "alquil" refere-se a um grupo hidrocarboneto linear ou ramificado. Um grupo alquil é monovalente. Por exemplo, alquil- C_1-C_6 pode referir-se a metil, etil, n-propil, iso-propil, n-butil, sec-butil, terc-butil, n-pentil e n-hexil. Os grupos alquil são preferivelmente não substituídos.

[0088] O termo "alquilenos" refere-se a uma cadeia linear de hidrocarbonetos. Um grupo alquilenos é divalente. Por exemplo, alquilenos- C_1 pode referir-se a um grupo CH_2 . Alquilenos- C_2 pode referir-se ao grupo CH_2CH_2 . Os grupos alquilenos são preferivelmente não substituídos.

[0089] O termo "haloalquil" refere-se a uma cadeia de hidrocarbonetos substituída por pelo menos um átomo de halogênio escolhido independentemente em cada ocorrência a partir de: flúor, cloro, bromo e iodo. O átomo de halogênio pode estar presente em qualquer posição na cadeia de hidrocarbonetos. Por exemplo, haloalquil- C_1-C_4 pode referir-se a clorometil, fluorometil, trifluorometil, cloroetil, por exemplo, 1-clorometil e 2-cloroetil, tricloroetil, por

exemplo 1,2,2-tricloroetil, 2,2,2-tricloroetil, fluoroetil, por exemplo 1-fluorometil e 2-fluoroetil, trifluoroetil, por exemplo 1,2,2-trifluoroetil e 2,2,2-trifluoroetil, cloropropil, tricloropropil, fluoropropil, trifluoropropil. Um grupo haloalquil pode ser um grupo fluoroalquil, isto é, uma cadeia de hidrocarbonetos substituída por pelo menos um átomo de flúor.

[0090] O termo "alquenil" refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto linear ou ramificada que contém pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono. As ligações duplas podem estar presentes como isômeros 'E' ou 'Z'. A ligação dupla pode estar em qualquer posição possível da cadeia de hidrocarbonetos. Por exemplo, alquenil-C₂-C₄ pode referir-se a etenil, alil e butenil. Os grupos alquenil são preferivelmente não substituídos.

[0091] O termo "alquinil" refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto linear ou ramificada que contém pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono. A ligação tripla pode estar em qualquer posição possível da cadeia de hidrocarbonetos. Por exemplo, alquinil-C₂-C₆ pode referir-se a etinil, propinil, butinil. Os grupos alquinil são preferivelmente não substituídos.

[0092] O termo "cicloalquil" refere-se a um sistema de anel de hidrocarboneto saturado contendo 3, 4, 5 ou 6 átomos

de carbono. Por exemplo, "cicloalquil de 3 a 6 membros" pode se referir a ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, ciclohexil. Os grupos cicloalquil são preferivelmente não substituídos.

[0093] O termo "heterocicloalquil" pode se referir a um grupo monocíclico saturado ou parcialmente saturado compreendendo 1 ou 2 heteroátomos selecionados independentemente a partir de O, S e N no sistema em anel (em outras palavras, 1 ou 2 dos átomos que formam o sistema em anel são selecionado dentre O, S e N). Exemplos de grupos heterocicloalquil incluem piperidina, piperazina, morfolina, tiomorfolina, pirrolidina, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, tetrahidropirano, dihidropirano, dioxano, azepina. Os grupos heterocicloalquil são preferivelmente não substituídos ou substituídos.

[0094] A presente invenção também inclui formulações de todas as formas de composto isotopicamente marcados e aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico, em que um ou mais átomos são substituídos por átomos com o mesmo número atômico, mas uma massa atômica ou número de massa diferente em relação à massa atômica ou número de massa do isótopo predominante geralmente encontrado na natureza.

[0095] Exemplos de isótopos adequados para inclusão nos compostos da presente invenção incluem isótopos de

hidrogênio, tal como ^2H e ^3H , carbono, tal como ^{11}C , ^{13}C e ^{14}C , cloro, tal como ^{36}Cl , flúor, tal como ^{18}F , iodo, tal como ^{123}I e ^{125}I , nitrogênio, tal como ^{13}N e ^{15}N , oxigênio, tal como ^{15}O , ^{17}O e ^{18}O , fósforo, tal como ^{32}P e enxofre, tal como ^{35}S .

[0096] Certos compostos isotopicamente marcados, por exemplo, aqueles que incorporam um isótopo radioativo, são úteis em estudos de distribuição de fármacos e/ou substratos nos tecidos. Os isótopos radioativos trítio (isto é, ^3H), carbono-14 (isto é, ^{14}C) e ^{18}F são particularmente úteis para esse fim, em vista de sua facilidade de incorporação e meios prontos de detecção.

[0097] A substituição com isótopos mais pesados, tais como deutério, isto é, ^2H , pode proporcionar certas vantagens terapêuticas resultantes de maior estabilidade metabólica, por exemplo, aumento de meia-vida *in vivo*, ou requisitos de dosagem reduzidos e, portanto, podem ser preferenciais em algumas circunstâncias.

[0098] Os compostos marcados isotopicamente podem, geralmente, ser preparados por técnicas convencionais conhecidas pelos versados no assunto ou através de processos análogos aos descritos usando um reagente isotopicamente marcado apropriado no lugar do reagente não marcado anteriormente empregado.

[0099] O método de tratamento ou a formulação para uso

no tratamento de câncer, incluindo linfoma ou leucemia, pode envolver, além das formulações da presente invenção, cirurgia convencional, radioterapia ou quimioterapia. A quimioterapia pode incluir a administração de um ou mais outros agentes ativos.

[00100] Quando um agente ativo adicional é administrado como parte de um método de tratamento da presente invenção, esse tratamento combinado pode ser alcançado por meio de dosagem simultânea, sequencial ou separada dos componentes individuais do tratamento. Tais produtos de combinação empregam os compostos da presente invenção dentro de uma faixa de dosagem terapeuticamente eficaz descrita anteriormente e um ou mais outros agentes farmacologicamente ativos dentro de sua faixa de dosagem aprovada.

[00101] Assim, as formulações farmacêuticas da presente invenção podem compreender outro agente ativo.

[00102] Um ou mais dos outros agentes ativos podem ser uma ou mais das seguintes categorias de agentes antitumorais:

(i) fármacos antiproliferativos / antineoplásicos e combinações dos mesmos, tais como agentes alquilantes (por exemplo, ciclofosfamida, mostarda nitrogenada, bendamustina, melfalano, clorambucil, bussulfano, temozolamida e nitrosoureas); antimetabólitos (por exemplo, gemcitabina e antifolatos, tais como fluoropirimidinas como 5-fluorouracil

e tegafur, raltitrexede, metotrexato, pemetrexede, citosina-arabinosídeo e hidroxiureia); antibióticos (por exemplo, antraciclinas, tais como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina-C, dactinomicina e mitramicina); agentes antimitóticos (por exemplo, alcalóides da vinca como vincristina, vinblastina, vindesina e vinorelbina e taxóides como taxol e inibidores de taxotere e poloquinase); inibidores de proteassoma (por exemplo, carfilzomibe e bortezomibe); terapia com interferon; e inibidores de topoisomerase (por exemplo, epipodofilotoxinas como etoposido e teniposido, amsacrina, topotecano, mitoxantrona e camptotecina);

(ii) agentes citostáticos, tais como antiestrogênicos (por exemplo, tamoxifeno, fulvestrant, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno e iodoxifeno), antiandrogênicos (por exemplo, bicalutamida, flutamida, nilutamida e acetato de ciproterona), antagonistas de LHRH ou agonistas de LHRH (por exemplo, goserelina, leuprorelina e buserelina), progestógenos (por exemplo, acetato de megestrol), inibidores de aromatase (por exemplo, anastrozol, letrozol, vorazol e exemestano) e inibidores de 5 α -redutase, tais como finasterida;

(iii) agentes anti-invasão, por exemplo, dasatinibe e

bosutinibe (SKI-606), e inibidores de metaloproteinase, inibidores da função do receptor ativador de plasminogênio da uroquinase ou anticorpos para a heparanase;

(iv) inibidores da função do fator de crescimento: por exemplo, esses inibidores incluem anticorpos para fator de crescimento e anticorpos para receptores de fator de crescimento, por exemplo, o anticorpo anti-erbB2 trastuzumab [Herceptin™], o anticorpo anti-EGFR panitumumab, o anticorpo anti-erbB1 cetuximabe, inibidores de tirosina quinase, por exemplo, inibidores da família de fatores de crescimento epidérmico (por exemplo, família EGFR de inibidores de tirosina quinase, tais como gefitinibe, erlotinibe e 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolino propoxi)-quinazolin-4-amina (CI 1033), inibidores de tirosina-quinase erbB2, tais como lapatinibe; inibidores da família de fatores de crescimento de hepatócitos; inibidores da família de fatores de crescimento de insulina; moduladores de reguladores de proteínas da apoptose celular (por exemplo inibidores de Bcl-2); inibidores da família de fatores de crescimento derivados de plaquetas, tais como imatinibe e/ou nilotinibe (AMN107); inibidores de serina / treonina quinases (por exemplo, inibidores de sinalização Ras/Raf, tais como inibidores de farnesil transferase, por exemplo sorafenibe, tipifarnibe e lonafarnibe), inibidores de

sinalização celular através de MEK e/ou AKT quinases, inibidores c-kit, inibidores de abl quinase, inibidores de PI3 quinase, inibidores de PI3 quinase, inibidores de CSF-1R quinase, receptor de IGF, inibidores de quinase; inibidores de aurora quinase e inibidores de quinase dependentes de ciclina, tais como inibidores de CDK2 e/ou CDK4;

(v) agentes antiangiogênicos, tais como aqueles que inibem os efeitos do fator de crescimento endotelial vascular, por exemplo, o anticorpo do fator de crescimento celular endotelial antivascolar bevacizumab (Avastin™); talidomida; lenalidomida; e, por exemplo, um inibidor da tirosina quinase do receptor VEGF, tal como vandetanibe, vatalanibe, sunitinibe, axitinibe e pazopanibe;

(vi) abordagens de terapia gênica, incluindo, por exemplo, abordagens para substituir genes aberrantes, tais como p53 aberrante ou BRCA1 ou BRCA2 aberrante;

(vii) abordagens de imunoterapia, incluindo, por exemplo, transferência celular adotiva, tal como terapia CAR com células T; terapia de anticorpos, tal como alemtuzumabe, rituximabe, ibritumomab tiuxetan (Zevalin®) e ofatumumabe; interferons, tal como interferon α ; interleucinas, tal como IL-2 (aldesleucina); inibidores de interleucina, por exemplo, inibidores de IRAK4; vacinas contra o câncer,

incluindo vacinas profiláticas e de tratamento, tais como vacinas contra o HPV, por exemplo, Gardasil, Cervarix, Oncophage e Sipuleucel-T (Provenge); e moduladores de receptores do tipo *toll*, por exemplo, agonistas de TLR-7 ou TLR-9;

(viii) agentes citotóxicos, por exemplo, fludarabina (fludara), cladribina, pentostatina (NipentTM);

(ix) esteróides como corticosteróides, incluindo glicocorticóides e mineralocorticóides, por exemplo, aclometasona, dipropionato de aclometasona, aldosterona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, dipropionato de betametasona, fosfato de betametasona sódica, valerato de betametasona, budesonida, clobetasona, butirato de clobetasona, propionato de clobetasol, cloprednol, cortisona, acetato de cortisona, cortivazol, desoxicortona, desonida, desoximetasona, dexametasona, fosfato de dexametasona sódica, isonicotinato de dexametasona, difluorocortolona, fluclorolona, flumetasona, flunisolida, fluocinolona, acetato de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina butil, fluorocortisona, fluorocortolona, caproato de fluocortolona, pivalato de fluocortolona, fluorometolona, fluprednido, acetato de fluprednido, flurandrenolona, fluticasona, propionato de fluticasona, halcinonida, hidrocortisona,

acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, valerato de hidrocortisona, icomethasona, enbutato de icomethasona, meprednisona, metilprednisolona, mometasona parametasona, furoato de mometasona monohidratado, prednicarbato, prednisolona, prednisona, tixocortol, pivalato de tixocortol, triamcinolona, acetonido de triamcinolona, álcool triamcinolona e seus respectivos derivados farmacêuticamente aceitáveis. Uma combinação de esteróides pode ser usada, por exemplo, uma combinação de dois ou mais esteróides mencionados neste parágrafo;

(x) terapias direcionadas, por exemplo, inibidores de PI3Kd, por exemplo idelalisibe e perifosina; ou compostos inibidores de ponto de verificação, incluindo moléculas anti-PD-1, anti-PD-L1 e anti-CTLA4, tais como nivolumabe, pembrolizumabe, pidilizumabe, atezolizumabe, durvalumabe e avelumabe.

[00103] Um ou mais dos outros agentes ativos também podem ser antibióticos.

[00104] Ao longo da descrição e reivindicações desta especificação, as palavras "compreendem" e "contêm" e variações delas significam "incluindo, mas não se limitando a", e não se destinam a excluir (e não excluem) outras porções, aditivos, componentes, números inteiros ou etapas.

Em toda a descrição e reivindicações desta especificação, o item singular abrange o plural, a menos que o contexto exija de outra forma. Em particular, quando o artigo indefinido é usado, a especificação deve ser entendida como contemplando a pluralidade e a singularidade, a menos que o contexto exija de outra forma.

[00105] Recursos, números inteiros, características, compostos, porções ou grupos químicos descritos em conjunto com um aspecto particular, modalidade ou exemplo da presente invenção devem ser entendidos como aplicáveis a qualquer outro aspecto, modalidade ou exemplo aqui descrito, a menos que seja incompatível com os mesmos. Todas os recursos divulgados neste relatório descritivo (incluindo quaisquer reivindicações, resumo e figuras), e/ou todas as etapas de qualquer método ou processo divulgado, podem ser combinadas em qualquer combinação, exceto combinações em que pelo menos alguns desses recursos e/ou etapas são mutuamente exclusivas. A presente invenção não está restrita aos detalhes de quaisquer modalidades anteriores. A invenção se estende a qualquer novo recurso, ou qualquer nova combinação dos recursos divulgados neste relatório específico (incluindo quaisquer reivindicações, resumo e desenhos anexos), ou a qualquer nova etapa, ou qualquer nova combinação de etapas de qualquer método ou processo assim

divulgado.

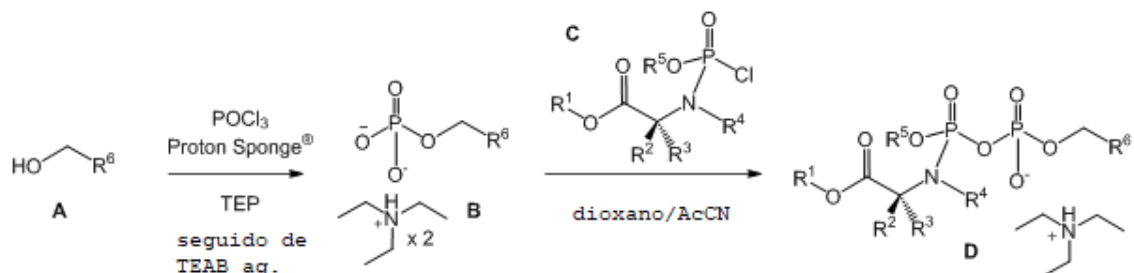
[00106] A atenção do leitor é direcionada a todos os artigos e documentos depositados simultaneamente com, ou antes de, este relatório descritivo em conexão com este pedido e que estão abertos à inspeção pública com esta especificação, e o conteúdo de todos esses artigos e documentos é incorporado aqui por referência.

EXEMPLOS

[00107] Em todo o relatório descritivo, essas abreviações têm os seguintes significados:

AcCN	acetonitrila	MS	espectrometria de massa
aq	aquoso	RMN	ressonância magnética nuclear
DCM	diclorometano	Np	1-naftil
DMSO	dimetilsulfóxido	rt	temperatura ambiente
EC ₅₀	meia concentração eficaz máxima	TEA	Trietilamina
eq.	Equivalentes	TEAB	tampão de hidrogenocarbonato de trietilamônio
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão	TEP	trietilfosfato
h	Horas	t _R	tempo de retenção
IC ₅₀	meia concentração inibitória máxima		

Procedimento geral para a síntese de difosfato

fosforamidatos

[00108] O nucleosídeo seco **A** (~1,0 mmol, 1,0 eq.) foi dissolvido em 5 mL de trietilfosfato (TEP) e agitado durante 5 minutos à temperatura ambiente. A mistura reacional foi arrefecida para 4°C e 1,8-bis(dimetilamino)naftaleno seco (Proton Sponge®, 1,5 eq.) foi adicionado, seguido por adição gota a gota de POCl₃ (1,3 eq.). A suspensão resultante foi agitada a 4°C durante 2 a 3 horas. Após este período, tampão aquoso frio de hidrogenocarbonato de trietilamônio (TEAB) 0,5 M (pH 7,5) foi adicionado à mistura reacional e a mistura resultante foi agitada durante 30 minutos; deixada aquecer até a temperatura ambiente e agitada por mais 1 hora. O TEP foi extraído com éter *terc*-butilmetílico (4 x 50 mL), e a solução aquosa foi evaporada e seca sob alto vácuo durante a noite para produzir o correspondente sal de nucleosídeo 5'-monofosfato de trietilamônio **B** como óleo incolor vítreo ou pó branco, o qual foi usado na próxima etapa sem purificação adicional. A formação do nucleosídeo 5'-monofosfato foi confirmada por espectrometria de massa de

ions negativos.

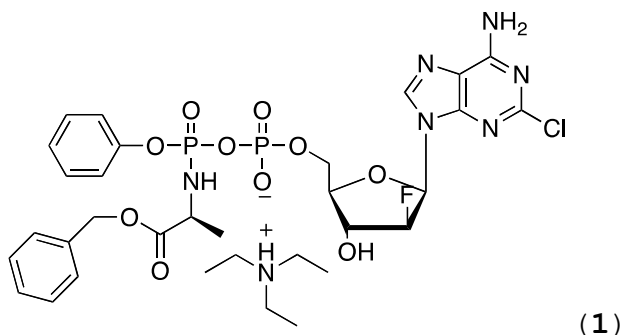
[00109] Uma solução de TEAB 0,5 M foi preparada por meio de borbulhamento de CO₂ através de uma solução de trietilamina (TEA) 0,5 M em água (0°C a 4°C) durante 30 a 45 minutos (pH de aproximadamente 7,4 a 7,6, a menos que indicado de outra forma).

[00110] Uma síntese do sal de nucleosídeo 5'-monofosfato de trietilamônio na primeira etapa foi realizada seguindo a referência modificada: El-Tayeb A. *et al. J. Med. Chem.* 2006, 49 (24), 7076-7087.

[00111] Uma mistura do sal de nucleosídeo 5'-monofosfato de trietilamônio **B** (1 mmol) em uma mistura 1:1 de 1,4-dioxano / acetonitrila (20 mL) foi agitada à temperatura ambiente (rt) sob uma atmosfera de argônio, e um fosforocloridrato **C** (1,0 eq.) apropriado, dissolvido em acetonitrila anidra, foi adicionado gota a gota. A mistura reacional resultante foi agitada por 18 horas à temperatura ambiente. A mistura bruta foi evaporada sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em DCM, e adsorvido em sílica gel desativada com TEA (3%) em uma mistura de DCM/MeOH (92%/5%). A purificação de materiais brutos (preparados para carga seca) por *Biotage Isolera One* automática em cartucho SNAP Ultra 50 g pré-preparado com 3CV de TEA (3%) em uma mistura de DCM/MeOH (92%/5%) com um gradiente de MeOH em DCM (2% a

20%, fluxo de 50 mL/min) proporcionou os compostos desejados, os quais foram novamente purificados em *Biotage Isolera One* (cartucho C18 SNAP Ultra 30 g com gradiente de TEAB 0,1 M em AcCN (acetonitrila) de 100% a 0% como eluente em 60 min., fluxo de 15 mL/min) ou por HPLC em coluna semi-preparativa (Varian Pursuit XRs 5C18, 150 x 21,22 mm) usando gradiente de TEAB 0,1 M em AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 minutos.

Exemplo 1: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-alaninil)] difosfato trietilamônio.



[00112] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,58 g, 0,98 mmol), fenil(benzoxi-L-alaninil) fosforocloridrato (0,35 g, 0,98 mmol) como uma espuma branca (0,04 g, 6%).

- **RMN de ³¹P** (202 MHz, MeOD): δ_P -7,73 (d, J = 21,0 Hz), -7,93 (d, J = 21,2 Hz), -11,96 (d, J = 18,4 Hz), -12,06 (d, J = 20,8 Hz);

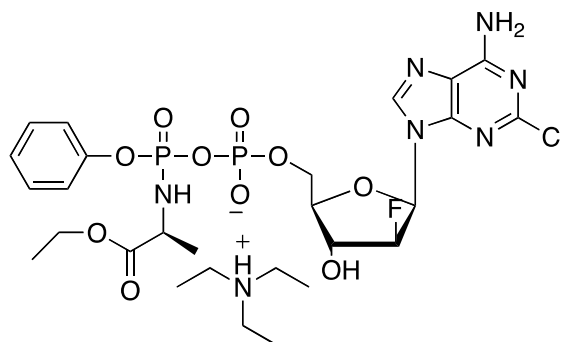
- **RMN de ¹H** (500 MHz, MeOD): δ_H 8,29, 8,28 (2 x 0,5 H,

H-8), 7,33 - 7,24 (9H, m, H-Ar), 7,18 - 7,14 (1H, m, H-Ar), 6,44, 6,41 (2 x 0,5H, 2 x d, $J = 3,5$ Hz, H-1'), 5,20 - 5,19 (0,5H, m, H-2'), 5,11 (2H, s aparente, OCH₂Ph), 5,10 - 5,08 (0,5H, m, H-2'), 4,58 - 4,54 (1H, m, H-3'), 4,26 - 4,24 (2H, m, 2 x H-5'), 4,16 - 4,13 (2H, m, H-4', NHCHCH₃), 3,08 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, 3 x CH₂CH₃), 1,39, 1,35 (3H, 2 x d, $J = 7,0$ Hz, NHCHCH₃), 1,26 (9H, t, $J = 7,0$ Hz, 3 x CH₂CH₃);

- **MS** (ES) em modo negativo m/z: 699 ([M-H]⁻). Massa exata: C₂₅H₂₈ClFN₆O₁₀P₂ requerida 700,93, encontrada 699,20 ([M-H]⁻);

- **HPLC de fase reversa**, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min., F = 1 mL/min, $\lambda = 254$ nm, t_R = 14,05 min.

Exemplo 2: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[fenil(etoxi-L-alaninil)] difosfato trietilamônio.



[00113] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabino

furanosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,58 g, 0,98 mmol),
fenil(etoxi-L-alaninil)fosforocloridrato (0,28 g, 0,98 mmol)
como um sólido branco (0,07 g, 10%).

- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, MeOD): δ_{P} -7,72 (d, $J = 20,2$ Hz),
-7,89 (d, $J = 20,2$ Hz), -11,94 (d, $J = 18,2$ Hz), -12,10 (d,
 $J = 18,2$ Hz);

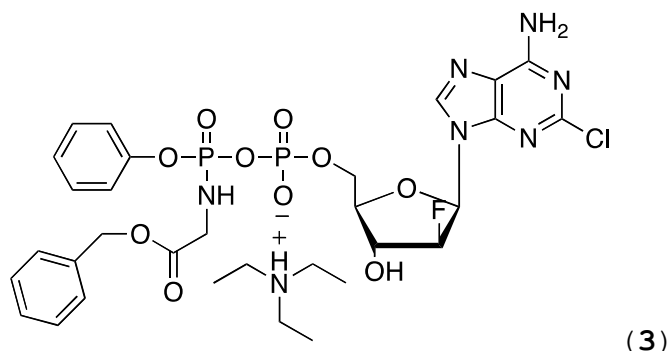
- **RMN de ^1H** (500 MHz, MeOD): δ_{H} 8,29 (1H, s, H-8), 7,34
- 7,27 (4H, m, H-Ar), 7,17 - 7,15 (1H, m, H-Ar), 6,45, 6,42
(2 x 0,5H, 2 x t aparente, $J = 1,5$ Hz, H-1'), 5,24, 5,10 (2
x 0,5H, 2 x t aparente, $J = 1,5$ Hz, H-2'), 4,59, 4,55 (2 x
0,5H, 2 x t aparente, $J = 2,0$ Hz, H-3'), 4,26 - 4,24 (2H, m,
OCH₂CH₃), 4,17 - 4,07 (4H, m, H-5', NHCHCH₃, H-4'), 3,05 (6H,
q, $J = 7,0$ Hz, 3 x CH₂CH₃), 1,39, 1,34 (2 x 1,5 H, 2 x d, J
= 7,0, NHCHCH₃), 1,26 - 1,20 (12H, m, OCH₂CH₃, 3 x CH₂CH₃);

- **MS** (ES) em modo negativo m/z: 637 ([M-H]⁻). Massa
exata: C₂₁H₂₆ClFN₆O₁₀P₂ requerida 638,86, encontrada 637,12
([M-H]⁻);

- **HPLC de fase reversa**, eluindo com H₂O/AcCN de 90/10 a
0/100 em 30 min., F = 1 mL/min, $\lambda = 254$ nm, dois picos de
dois diastereoisômeros com $t_{\text{R}} = 14,20$ min.

Exemplo 3: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-
arabinofuranosil)adenina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-glicinil)]

difosfato trietilamônio.



[00114] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabino furanosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,58 g, 0,98 mmol), fenil(benzoxi-L-glicinil) fosforocloridrato (0,335 g, 0,98 mmol) como um sólido branco (0,10 g, 13%).

- **RMN de ³¹P** (202 MHz, MeOD): δ_P -6,70 (d, J = 20,2 Hz), -11,86 (d, J = 22,2 Hz);

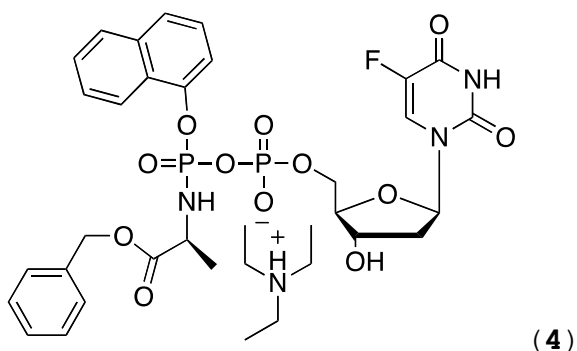
- **RMN de ¹H** (500 MHz, MeOD): δ_H 8,30, 8,29 (2 x 0,5H, 2 x d, J = 2,0 Hz, H-8), 7,36 - 7,28 (9H, m, H-Ar), 7,18 - 7,14 (1H, m, H-Ar), 6,44, 6,41 (2 x 0,5H, 2 x d, J = 4,5 Hz, H-1'), 5,20 - 5,18 (0,5H, m, H-2'), 5,16 (2H, s aparente, OCH₂Ph), 5,09 - 5,07 (0,5H, m, H-2'), 4,61 - 4,55 (1H, m, H-3'), 4,29 - 4,25 (2H, m, 2 x H-5'), 4,17 - 4,13 (1H, m, H-4'), 3,96 - 3,84 (2H, m, NHCH₂), 2,89 (6H, q, J = 7,0 Hz, 3 x CH₂CH₃), 1,19 (9H, t, J = 7,0 Hz, 3 x CH₂CH₃);

- **MS** (ES) em modo negativo m/z: 685 ([M-H]⁻). Massa exata: C₂₅H₂₆ClFN₆O₁₀P₂ requerida 686, encontrada 685,119 ([M-

H]⁻);

- **HPLC de fase reversa**, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min., F = 1 mL/min, λ = 254 nm, T_R = 13,6 min.

Exemplo 4: Sal de 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil-(benzoxi-L-alaninil)]difosfato trietilamônio.



[00115] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato TEA (1,07 g, 2,03 mmol), 1-naftil(benzoxi-L-alaninil) fosforocloridrato (0,82 g, 2,03 mmol) como um sólido branco (0,16 g, 10%).

- **RMN de ³¹P** (202 MHz, MeOD): δ_P -7,43 (d, J = 22,2 Hz), -7,79 (d, J = 22,2 Hz), -11,89 (d, J = 20,2 Hz), -12,02 (d, J = 20,2 Hz);

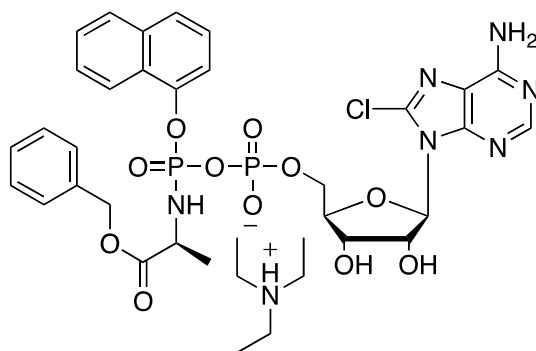
- **RMN de ¹H** (MeOD, 500 MHz) δ_H 8,39 - 8,35 (1H, m, H-Ar), 7,99 (1H, t aparente, J = 6,0 Hz, H-Ar), 7,87 - 7,86 (1H, m, H-Ar), 7,69 (1H, t, J = 7,0 Hz, H-Ar), 7,58 (1H, d aparente, J = 7,0 Hz, H-Ar), 7,53 - 7,51 (2H, m, H-Ar, H-6),

7,43 - 7,36 (1H, m, H-Ar), 7,29 - 7,26 (5H, m, H-Ar), 6,26 (1H, q aparente, $J = 6,5$ Hz, H-1'), 5,02 - 4,94 (2H, 2 x d aparente, $J = 13,5$, $J = 12,5$ Hz, OCH₂Ph), 4,46 - 4,43 (1H, m, H-3'), 4,24 - 4,16 (3H, m, 3H, 2 x H-5', NHCHCH₃), 4,03 (1H, s aparente, H-4'), 3,09 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, 3 x CH₂CH₃), 2,22 - 2,19 (1H, m, H-2'), 2,16 - 2,4 (1H, m, H-2'), 1,37 (1,5H, d, $J = 7,0$ Hz, NHCHCH₃), 1,29 (1,5H, d, $J = 7,0$ Hz, NHCHCH₃), 1,26 (9H, t, $J = 7,0$ Hz, 3 x CH₂CH₃);

- **MS** (ES) em modo negativo m/z: 692 ([M-H]⁻). Massa exata: C₂₉H₃₀FN₃O₁₂P₂ requerida 693, encontrada 692,128 ([M-H]⁻);

- **HPLC de fase reversa**, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min., F = 1 mL/min, $\lambda = 254$ nm, $t_R = 14,24$ min., 14,34 min.

Exemplo 5: Sal de 8-cloroadenosina-5'-O-[1-naftil-(benzoxi-L-alaninil)]difosfato de trietilamônio.



(5)

[00116] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 8-cloroadenosina-5'-monofosfato TEA (0,46

g, 0,795 mmol), 1-naftil(benzoxi-L-alaninil) fosforocloridrato (0,32 g, 0,795 mmol) após duas re-purificações em *Biotage Isolera One* (cartucho C18 30 g) e HPLC (coluna C18 semi-preparativa) como um sólido branco (0,02 g, 4%).

- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, MeOD): δ_{P} -7,58 (d, $J = 22,2$ Hz), -8,0 (d, $J = 20,2$ Hz), -11,85 (d, $J = 22,2$ Hz), -12,05 (d, $J = 20,2$ Hz);

- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,36 - 8,33 (1H, m, H-Ar), 8,14, 8,10 (2 x 0,5H, 2 x s, H-2), 7,86 - 7,84 (1H, m, H-Ar), 7,66 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-Ar), 7,56 - 7,45 (3H, m, H-Ar), 7,38 - 7,33 (1H, m, H-Ar), 7,29 - 7,24 (5H, m, H-Ar), 6,02 (1H, t, $J = 6,0$ Hz, H-1'), 5,35 - 5,32 (1H, m, H-2'), 5,00, 4,98, 4,97, 4,94 (2H, AB, $J_{\text{AB}} = 12,3$ Hz, OCH_2Ph), 4,54 - 4,50 (1H, m, H-3'), 4,40 - 4,33 (1H, m, H-5'), 4,26 - 4,13 (3H, m, H-5', H-4', NHCHCH_3), 3,06 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, 3 x CH_2CH_3), 1,36 (1,5H, d, $J = 7,0$ Hz, NHCHCH_3), 1,26 (1,5H, d, $J = 7,0$ Hz, NHCHCH_3), 1,25 (9H, t, $J = 7,0$ Hz, 3 x CH_2CH_3);

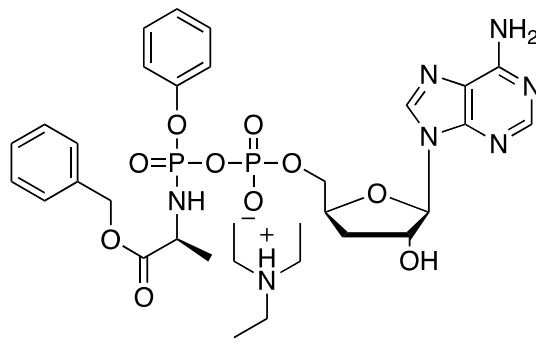
- **MS** (ES) em modo negativo m/z: 747 ($[\text{M}-\text{H}]^-$). Massa exata: $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{ClN}_6\text{O}_{11}\text{P}_2$ requerida 749, encontrada 747,1102 ($[\text{M}-\text{H}]^-$);

- **HPLC de fase reversa**, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, $F = 1$ mL/min, $\lambda = 254$ nm, $T_{\text{R}} =$

14,32, 14,48 min.

Exemplos 6 e 7: sal de 3'-desoxiadenosina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-alaninil)]difosfato trietilamônio (6) e sal de 3'-desoxiadenosina-5',2'-bis-O-[fenil(benzoxi-L-alaninil)]difosfato trietilamônio (7).

[00117] Preparados de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 3'-desoxiadenosina-5'-monofosfato TEA (0,63 g, 1,186 mmol), fenil(benzoxi-L-alaninil) fosforocloridrato (0,42 g, 1,186 mmol). Dois produtos foram isolados: sal de 3'-desoxiadenosina-5',2'-O-[fenil(benzoxi-L-alaninil)]difosfato trietilamônio (0,05 g, 5%) e 3'-desoxiadenosina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-alaninil)]difosfato como um filme incolor (0,01 g, 1,3%).



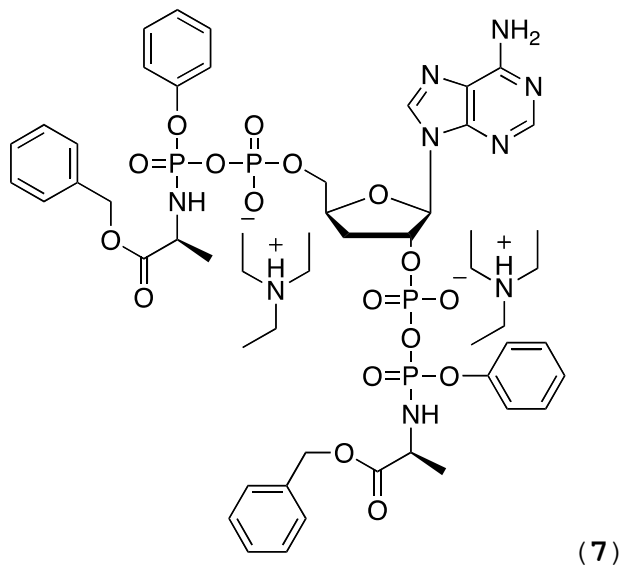
- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, MeOD): δ_{P} -7,76 (d, $J = 21,0$ Hz), -8,03 (d, $J = 21,8$ Hz), -11,70 (d, $J = 20,4$ Hz), -11,81 (d, $J = 16,76$ Hz);

- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,45 (1H, s, H-8), 8,21 (1H, s, H-2), 7,34-7,23 (9H, m, H-Ar), 7,14 - 7,11 (1H, m,

H-Ar), 6,02 (1H, s aparente, H-1'), 5,10 (2H, sistema AB, t aparente, $J_{AB} = 16,5$ Hz, OCH₂Ph), 4,66 - 4,60 (2H, m, H-2', H-4'), 4,29 - 4,27 (1H, m, H-5'), 4,19 - 4,13 (2H, m, H-5', NHCHCH₃), 3,06 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, 3 x CH₂CH₃), 2,42 - 2,33 (1H, m, H-3'), 2,11 - 2,06 (1H, m, H-3'), 1,40 (1,5H, d, $J = 7,0$ Hz, NHCHCH₃), 1,35 (1,5H, d, $J = 7,0$ Hz, NHCHCH₃), 1,25 (9H, t, $J = 7,0$ Hz, 3 x CH₂CH₃);

- **MS** (ES) em modo negativo m/z: 647 ([M-H]⁻). Massa exata: C₂₆H₃₀N₆O₁₀P₂ requerida 648, encontrada 647,154 ([M-H]⁻);

- **HPLC de fase reversa**, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 20 min, F = 1 mL/min, $\lambda = 254$ nm, $t_R = 8,20$ min.



- **RMN de ³¹P** (202 MHz, MeOD): δ_P -7,78 (d, $J = 20,4$ Hz), -7,84 (d, $J = 22,08$ Hz), -8,01 (d, $J = 21,0$ Hz), -12,08 (d,

$J = 21,6$ Hz), $-12,18$ (d, $J = 22,0$ Hz), $-13,50$ (d, $J = 20,6$ Hz), $-13,56$ (d, $J = 20,2$ Hz);

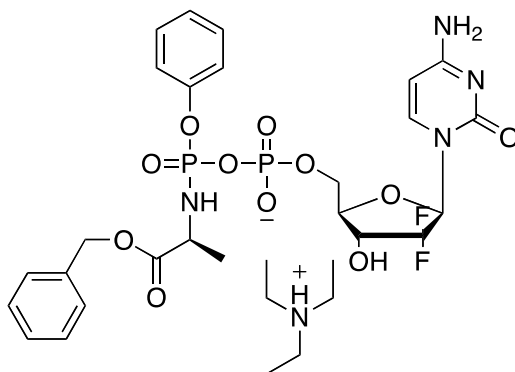
- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} $8,20$ (0,5H, s, H-8), $8,19$ (0,5H, s, H-8), $8,04$ (1H, s, H-2), $7,21 - 7,19$ (12H, m, H-Ar), $7,14 - 6,97$ (8H, m, H-Ar), $6,16$ (0,5H, s, H-1'), $6,15$ (0,5H, s, H-1'), $5,27$ (0,5H, t aparente, $J = 7,0$ Hz, H-2'), $5,15$ (0,5H, t aparente, $J = 5,0$ Hz, H-2'), $5,0 - 4,94$ (4H, m, 2 x OCH_2Ph), $4,48 - 4,60$ (1H, m, H-4'), $4,13 - 4,08$ (1H, m, H-5'), $4,05 - 3,95$ (3H, m, H-5', 2 x NHCHCH_3), $3,06$ (12H, q, $J = 7,0$ Hz, 3 x CH_2CH_3), $2,50 - 2,42$ (1H, m, H-3'), $2,27 - 2,20$ (1H, m, H-3'), $1,26 - 1,17$ (6H, m, 2 x NHCHCH_3), $1,25$ (18H, t, $J = 7,0$ Hz, 3 x CH_2CH_3);

- **MS** (ES) em modo negativo m/z : 1044 ($[\text{M}-\text{H}]^-$). Massa exata: $\text{C}_{42}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_4$ requerida 1045, encontrada 1044,232 ($[\text{M}-\text{H}]^-$);

- **HPLC de fase reversa**, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, $F = 1$ mL/min, $\lambda = 254$ nm, $t_{\text{R}} = 9,75$ min, 10,37 min.

Exemplo 8: sal de 2'-desoxi-2',2'-difluoro-D-citidina-

5'-O-[fenil(benzoxi-L-alaninil)]difosfato trietilamônio.



(8)

[00118] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2'-desoxi-2',2'-difluoro-D-citidina-5'-monofosfato TEA (0,62 g, 1,13 mmol), fenil(benzoxi-L-alaninil)fosforocloridrato (0,40 g, 1,13 mmol) como um sólido branco (0,05 g, 6%).

- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, MeOD): δ_{P} -7,65 (d, $J = 21,0$ Hz), -7,87 (d, $J = 21,0$ Hz), -12,12 (d, $J = 16,9$ Hz), -12,21 (d, $J = 21,4$ Hz);

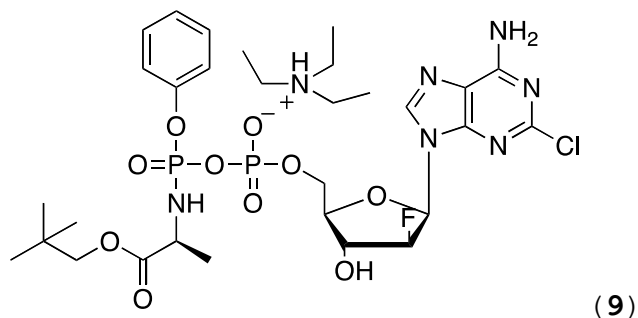
- **RMN de ^1H** (500 MHz, MeOD): δ_{H} 7,83 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-6), 7,35-7,25 (9H, m, H-Ar), 7,16 (1H, t aparente, $J = 7,0$ Hz, H-Ar), 6,27 - 6,24 (1H, m, H-1'), 5,96, 5,95 (1H, 2 x d, $J = 5,0$ Hz, H-5), 5,13 (2H, sistema AB, s aparente, OCH_2Ph), 4,37 - 4,25 (3H, m, 2 x H-5', H-3'), 4,18 - 4,12 (1H, m, H-4'), 4,00 - 3,97 (1H, m, NHCHCH_3), 3,20 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, 3 x CH_2CH_3), 1,40, 1,35 (3H, 2 x d, $J = 7,5$ Hz, NHCHCH_3), 1,31 (9H, t, $J = 7,5$ Hz, 3 x CH_2CH_3);

- **MS** (ES) em modo negativo m/z: 659 ($[\text{M}-\text{H}]^-$). Massa

exata: $C_{25}H_{28}F_2N_4O_{11}P_4$ requerida 660, encontrada 659 ($[M-H]^-$);

- **HPLC de fase reversa**, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, $F = 1$ mL/min, $\lambda = 254$ nm, $T_R = 12,55$ min, 12,85 min.

Exemplo 9: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[fenil(neopentoxi-L-alaninil)]difosfato trietilamônio.



[00119] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,77 g, 1,32 mmol), fenil(neopentoxi-L-alaninil)fosforocloridrato (0,43 g, 1,32 mmol) e TEA (0,53 mL, 3,81 mmol) como um sólido branco (0,065 g, 6%).

- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, CD_3OD): δ_P -7,67 (d, $J = 21,0$ Hz), -7,93 (d, $J = 21,0$ Hz), -11,93 (d, $J = 21,21$ Hz), -12,04 (d, $J = 21,21$ Hz);

- **RMN de 1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_H 8,18 (0,5H, s, H-8), 8,17 (0,5H, s, H-8), 7,22 - 7,15 (4H, m, H-Ar), 7,12 - 7,09 (1H, m, H-Ar), 6,33 (0,5H, t, $J = 1,5$ Hz, H-1'), 6,30 (0,5H,

t, $J = 1,5$ Hz, H-1'), 5,08 (0,5H, t aparente, $J = 1,5$ Hz, H-2'), 4,96 (0,5H, t aparente, $J = 1,5$ Hz, H-2'), 4,46 (0,5H, t aparente, $J = 2,0$ Hz, H-3'), 4,43 (0,5H, t aparente, $J = 2,0$ Hz, H-3'), 4,15 - 4,11 (2H, m, H-5'), 4,05 - 3,99 (2H, m, NHCHCH₃, H-4'), 3,72, 3,69, 3,63, 3,61 (2H, sistema AB, $J = 10,50$ Hz, OCH₂C(CH₃)₃), 3,05 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, N(CH₂CH₃)₃), 1,31, 1,25 (2 x 1,5 H, 2 x d, $J = 7,0$ NHCHCH₃), 1,31 (9H, t, $J = 7,5$ Hz, N(CH₂CH₃)₃), 0,80 (9H, s, OCH₂C(CH₃)₃);

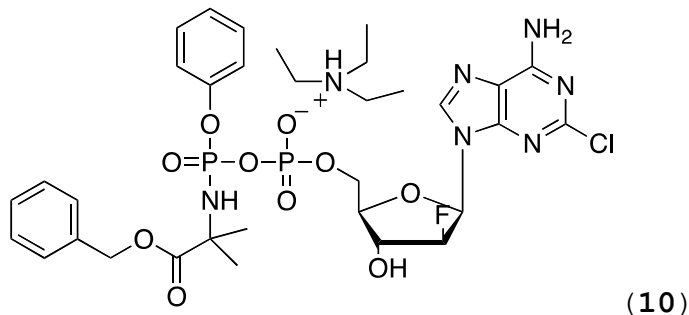
- **RMN de ¹³C** (125 MHz, CD₃OD): δ_c 175,10 (d, $^3J_{C-P} = 6,4$ Hz, C=O, éster), 173,56 (d, $^3J_{C-P} = 6,4$ Hz, C=O, éster), 156,72 (C-6), 154,16 (C-2), 153,42 (d, $^2J_{C-P} = 3,8$ Hz, C-Ar), 150,90 (d, $^2J_{C-P} = 5,8$ Hz, C-Ar), 150,26 (C-4), 142,68 (C-8), 129,26, 128,73, 124,65, 124,60, 122,40 (CH-Ar), 120,38, 120,15 (2 x d, $^3J_{C-P} = 4,6$ Hz, CH-Ar), 117,15 (C-5), 94,99 (d, $^1J_{C-F} = 191,4$ Hz, C-2'), 82,92 (d, $^3J_{C-F} = 8,25$ Hz, C-4'), 82,78 (d, $^2J_{C-F} = 8,5$ Hz, C-1'), 73,96, 73,66 (OCH₂C(CH₃)₃), 73,61 (d, $^2J_{C-F} = 24,5$ Hz, C-3'), 65,05 (C-5'), 50,59, 50,29 (NHCHCH₃), 46,26 (N(CH₂CH₃)₃), 30,91 (OCH₂C(CH₃)₃), 25,36 (OCH₂C(CH₃)₃), 19,75, 19,63 (2 x d, $^3J_{C-P} = 5,4$ Hz, NHCHCH₃), 7,84 (N(CH₂CH₃)₃);

- C₂₄H₃₂ClFN₆O₁₀P₂ massa requerida m/z 680,94; encontrada MS (ES⁻) m/z: 679,19 ([M-H]⁻);

- **HPLC de fase reversa**, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, $\lambda = 254$ nm, um pico

de dois diastereoisômeros com $t_R = 15,83$ min.

Exemplo 10: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[fenil(benzoxi-dimetilglicinil)]difosfato trietilamônio.



[00120] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,96 g, 1,64 mmol), fenil(benzoxi-dimetilglicinil)fosforocloridrato (0,60 g, 1,64 mmol) e TEA (0,66 mL, 4,75 mmol) como um sólido branco (0,085 g, 6%).

- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, CD_3OD): δ_{P} -9,79 (d, $J = 22,6$ Hz), -9,82 (d, $J = 22,6$ Hz), -12,17 (d, $J = 21,20$ Hz), -12,20 (d, $J = 21,0$ Hz);

- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,29 (0,5H, s, H-8), 8,27 (0,5H, s, H-8), 7,36 - 7,26 (9H, m, H-Ar), 7,16 - 7,13 (1H, m, H-Ar), 6,43 (0,5H, d, $J = 1,5$ Hz, H-1'), 6,39 (0,5H, d, $J = 1,5$ Hz, H-1'), 5,20 - 5,17 (0,5H, m, H-2'), 5,15 - 5,13 (2H, m, OCH_2Ph), 5,11 - 5,07 (0,5H, m, H-2'), 4,60 - 4,52 (1H, m, H-3'), 4,26 - 4,23 (2H, m, H-5'), 4,15 - 4,11

(1H, m, H-4'), 3,05 (6H, q, J = 7,0 Hz, N(CH₂CH₃)₃), 1,54 (6H, s, NHC(CH₃)₂), 1,31 (9H, t, J = 7,5 Hz, N(CH₂CH₃)₃);

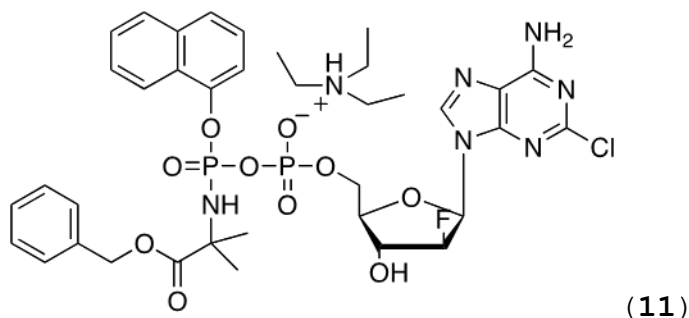
- **RMN de ¹³C** (125 MHz, CD₃OD): δ_c 174,96 (d, ³J_{C-P} = 6,6 Hz, C=O, éster), 156,69 (C-6), 154,13 (C-2), 151,06 (d, ²J_{C-P} = 7,3 Hz, C-Ar), 150,22 (C-4), 140,21 (C-8), 136,04 (C-Ar), 129,15, 128,12, 127,76, 127,68, 124,48, 120,47, 120,43 (CH-Ar), 117,12 (C-5), 95,49 (d, ¹J_{C-F} = 192,5 Hz, C-2'), 82,84 (d, ³J_{C-F} = 3,6 Hz, C-4'), 82,68 (d, ²J_{C-F} = 11,5 Hz, C-1'), 73,59 (d, ²J_{C-F} = 11,5 Hz, C-3'), 73,41 (d, ²J_{C-F} = 10,5 Hz, C-3'), 66,74 (OCH₂Ph), 64,90 (C-5'), 48,47 (NHC(CH₃)₂), 46,35 (N(CH₂CH₃)₃), 26,14, 26,12 (NHC(CH₃)₂), 9,85 (N(CH₂CH₃)₃);

- C₂₇H₃₀ClFN₆O₁₀P₂ massa requerida m/z 714,96; encontrada MS (ES⁻) m/z: 713,13 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, λ = 254 nm, um pico de dois diastereoisômeros com t_R = 14,51 min.

Exemplo 11: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-naftil(benzoxi-dimetil

glicinil)]difosfato trietilamônio.



[00121] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabino furanosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,96 g, 1,64 mmol), 1-naftil(benzoxi-dimetilglicinil)fosforocloridrato (0,68 g, 1,64 mmol) e TEA (0,66 mL, 4,75 mmol) como um sólido branco, o qual foi ainda repurificado por HPLC preparativa (0,14 g, 10%).

- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, CD_3OD): δ_{P} -9,79 (d, $J = 22,6$ Hz), -9,82 (d, $J = 22,6$ Hz), -12,17 (d, $J = 21,20$ Hz), -12,20 (d, $J = 21,0$ Hz);

- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,38 - 8,34 (2H, m, H-Ar), 8,24 (0,5H, d, $^5J_{\text{H-F}} = 2,0$ Hz, H-8), 8,22 (0,5H, d, $^5J_{\text{H-F}} = 2,0$ Hz, H-8), 7,85 - 7,83 (2H, m, H-Ar), 7,65 - 7,60 (3H, m, H-Ar), 7,48 - 7,44 (3H, m, H-Ar), 7,38 - 7,29 (2H, m, H-Ar), 6,39 (0,5H, t, $J = 1,5$ Hz, H-1'), 6,36 (0,5H, t, $J = 1,5$ Hz, H-1'), 5,17 - 5,15 (0,5H, m, H-2'), 5,14 - 5,07 (2H, m, OCH_2Ph), 5,05 - 5,02 (0,5H, m, H-2'), 4,57 - 4,50 (1H, m, H-3'), 4,27 - 4,24 (2H, m, H-5'), 4,15 - 4,10 (1H, m, H-4'),

3,05 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, $N(CH_2CH_3)_3$), 1,90 (6H, s, $NHC(CH_3)_2$), 1,31 (9H, t, $J = 7,5$ Hz, $N(CH_2CH_3)_3$);

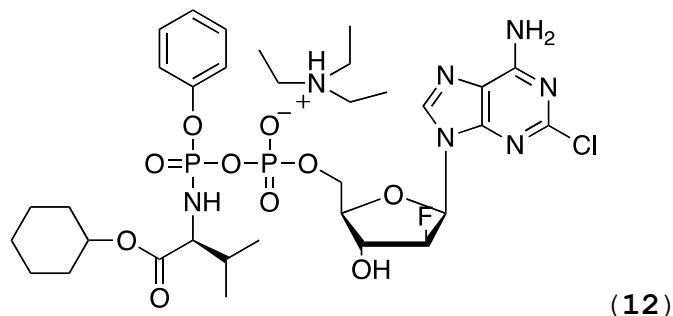
- **RMN de ^{13}C** (125 MHz, CD_3OD): δ_c 176,53, 174,95 (2 x d, $^3J_{C-P} = 6,7$ Hz, C=O, éster), 156,64 (C-6), 154,08 (C-2), 150,16, 149,36 (2 x d, $^3J_{C-P} = 7,0$ Hz, C-Ar), 146,91, 146,85 (C-4), 142,89 (C-8), 136,23, 135,99, 134,79 (C-Ar), 128,07, 127,70, 127,65, 127,61, 127,16, 126,99, 126,18, 125,83, 125,59, 125,43, 125,06, 124,76, 124,20, 122,57, 122,25, 122,20, 121,44 (CH-Ar), 117,07 (C-5), 115,9 (d, $^4J_{C-P} = 3,2$ Hz, CH-Ar), 113,15 (d, $^4J_{C-P} = 3,2$ Hz, CH-Ar), 94,98, 94,95 (2 x d, $^1J_{C-F} = 191,5$ Hz, C-2'), 82,80 (d, $^3J_{C-F} = 3,8$ Hz C-4'), 82,68 (d, $^2J_{C-F} = 24,5$ Hz, C-1'), 73,57, 73,45 (2 x d, $^2J_{C-F} = 24,5$ Hz, C-3'), 66,69, 66,37 (OCH_2Ph), 64,94 (C-5'), 56,95, 55,87 ($NHC(CH_3)_2$), 46,28 ($N(CH_2CH_3)_3$), 26,10 (d, $^3J_{C-P} = 4,1$ Hz, $NHC(CH_3)_2$), 7,86 ($N(CH_2CH_3)_3$);

- $C_{31}H_{32}ClFN_6O_{10}P_2$ massa requerida m/z 764,13; encontrada MS (ES^-) m/z: 763,15 ($[M-H]^-$);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, $F = 1$ mL/min, $\lambda = 254$ nm, um pico de dois diastereoisômeros com $t_R = 14,85$ min.

Exemplo 12: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[fenil(ciclohexoxi-L-

valinil)]difosfato trietilamônio.



[00122] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabino furanosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,96 g, 1,64 mmol), fenil(ciclo-hexoxi-L-valinil)fosforocloridrato (0,61 g, 1,64 mmol) e TEA (0,66 mL, 4,75 mmol) como um sólido branco (0,19 g, 14%).

- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, CD_3OD): δ_{P} -6,74 (d, $J = 21,2$ Hz), -6,78 (d, $J = 21,0$ Hz), -12,0 (d, $J = 21,4$ Hz);

- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,18 (0,5H, d, $^5J_{\text{H-F}} = 1,0$ Hz, H-8), 8,17 (0,5H, d, $^5J_{\text{H-F}} = 1,0$ Hz, H-8), 7,22 - 7,15 (4H, m, H-Ar), 7,01 - 6,98 (1H, m, H-Ar), 6,34 (0,5H, t, $J = 1,5$ Hz, H-1'), 6,30 (0,5H, t, $J = 1,5$ Hz, H-1'), 5,08 - 5,06 (0,5H, m, H-2'), 4,97 - 4,96 (0,5H, m, H-2'), 4,62 - 4,54 (1H, m, OCH), 4,46 (0,5H, t aparente, $J = 2,0$ Hz, H-3'), 4,43 (0,5H, t aparente, $J = 2,0$ Hz, H-3'), 4,15 - 4,12 (2H, m, H-5'), 4,06 - 4,02 (1H, m, H-4'), 3,68 (0,5H, dd aparente, $J = 10,0$ Hz, $J = 5,5$ Hz, $\text{NHCHCH}(\text{CH}_3)_2$), 3,64 (0,5H, dd aparente, $J = 10,0$ Hz, $J = 5,5$ Hz, $\text{NHCHCH}(\text{CH}_3)_2$), 3,05

(6H, q, $J = 7,0$ Hz, $N(CH_2CH_3)_3$), 1,91-1,80 (1H, m, $NHCHCH(CH_3)_2$), 1,67 - 1,58 (5H, m, CH_2), 1,39 - 1,37 (1H, m, CH_2), 1,36 - 1,31 (3H, m, CH_2), 1,31 (9H, t, $J = 7,5$ Hz, $N(CH_2CH_3)_3$), 0,86 - 0,78 (6H, m, $NHCHCH(CH_3)_2$);

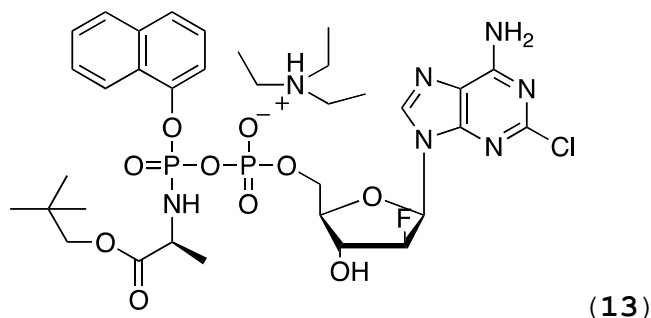
- **RMN de ^{13}C** (125 MHz, CD_3OD): δ_c 171,98, 171,95 (2 x d, $^3J_{C-P} = 4,5$ Hz, C=O, éster), 156,69 (C-6), 154,14 (C-2), 151,02 (d, $^2J_{C-P} = 3,8$ Hz, C-Ar), 150,23 (C-4), 142,25 (C-8), 129,16, 128,60, 124,56, 124,47, 120,44 (CH-Ar), 117,13 (C-5), 94,96 (d, $^1J_{C-F} = 191,4$ Hz, C-2'), 82,90 (d, $^3J_{C-F} = 3,8$ Hz, C-4'), 82,81 (d, $^2J_{C-F} = 32,5$ Hz, C-1'), 73,59, (d, $^2J_{C-F} = 24,5$ Hz, C-3'), 73,42 (d, $^2J_{C-F} = 16,8$ Hz, C-3'), 62,88 (d, $^2J_{C-P} = 7,5$ Hz, C-C-5'), 60,45, 60,20 ($NHCHCH(CH_3)_2$), 46,42 ($N(CH_2CH_3)_3$), 32,56, 32,09 ($NHCHCH(CH_3)_2$), 31,14 (CH_2), 25,00 (CH_2), 23,25 (CH_2), 17,79, 16,76 ($NHCHCHCH_3$), 7,82 ($N(CH_2CH_3)_3$);

- $C_{27}H_{36}ClFN_6O_{10}P_2$ massa requerida m/z 720,16; encontrada MS (ES⁻) m/z: 719,17 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, $\lambda = 254$ nm, um pico de dois diastereoisômeros com $t_R = 15,73$ min.

Exemplo 13: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-naftil(neopentoxi-L-

alaninil)]difosfato trietilamônio.



[00123] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabino furanosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,57 g, 0,97 mmol), 1-naftil(neopentoxi-L-alaninil) fosforocloridrato (0,37 g, 0,97 mmol) e TEA (0,39 mL, 2,86 mmol) como um sólido branco (0,13 g, 16%).

- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, CD_3OD): δ_{P} -7,41 (d, $J = 23,5$ Hz), -7,82 (d, $J = 22,5$ Hz), -11,82 (d, $J = 22,69$ Hz), -11,95 (d, $J = 21,80$ Hz);

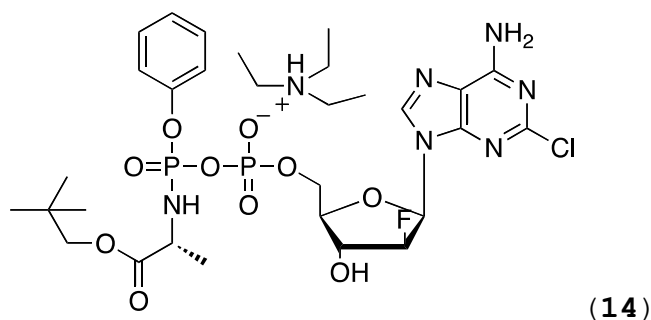
- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,36 - 8,25 (2H, m, H-Ar), 7,85 - 7,79 (2H, m, H-Ar), 7,68 - 7,65 (2H, m, H-8), 7,58 - 7,36 (2H, m, H-Ar), (6H, m, H-Ar), 6,4 (1H, dd $J = 16,68$ Hz, 4,1 Hz, H-1'), 5,19 - 5,05 (1H, m, H-2'), 4,58 - 4,53 (1H m, H-3'), 4,29 - 4,25 (2H, m, H-5'), 4,17 - 4,14 (1,5H, m, H-4' e NHCHCH_3), 4,06 - 4,01 (0,5H, m, NHHCH_3), 3,75 - 3,66 (2H, m, $\text{OCHH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3,14 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1,31 - 1,26 (12H, m, NHCHCH_3 , $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$);

- $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{ClFN}_6\text{O}_{10}\text{P}_2$ massa requerida m/z 730,15; encontrada

MS (ES⁻) m/z: 729,09 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB (pH 7,2)/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, λ = 254 nm, um pico para dois diastereoisômeros com t_R = 14,63 min.

Exemplo 14: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[fenil(neopentoxi-D-alaninil)]difosfato trietilamônio.



[00124] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48 mmol), fenil(neopentoxi-D-alaninil) fosforocloridrato (0,49 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido branco (0,16 g, 14%).

- **RMN de ³¹P** (202 MHz, CD₃OD): δ_P -7,68 (d, J = 21,0 Hz), -7,91 (d, J = 21,0 Hz), -12,04 (d, J = 20,08 Hz), -12,14 (d, J = 20,08 Hz);

- **RMN de ¹H** (500 MHz, CD₃OD): δ_H 8,30 (0,5H, d, J_{H-F} = 2,0 Hz, H-8), 8,29 (0,5H, d, J_{H-F} = 2,0 Hz, H-8), 7,35 - 7,27 (4H, m, H-Ar), 7,18 - 7,14 (1H, m, H-Ar), 6,45 (0,5H, t, J

= 3,5 Hz, H-1'), 6,42 (0,5H, t, J = 3,5 Hz, H-1'), 5,20 (0,5H, t aparente, J = 3,5 Hz, H-2'), 5,09 (0,5H, t aparente, J = 3,5 Hz, H-2'), 4,61 - 4,54 (1H, m, H-3'), 4,27 - 4,23 (2H, m, H-5'), 4,17 - 4,10 (2H, m, NHCHCH₃, H-4'), 3,80 - 3,72 (2H, m, OCHH₂C(CH₃)₃), 3,33 (6H, q, J = 7,0 Hz, N(CH₂CH₃)₃), 1,42 (1,5H, dd, J = 7,0 Hz, J = 0,5 Hz, NHCHCH₃), 1,36 (1,5H, dd, J = 7,0 Hz, J = 0,5 Hz, NHCHCH₃), 1,31 (9H, t, J = 7,5 Hz, N(CH₂CH₃)₃), 0,80 (9H, s, OCH₂C(CH₃)₃);

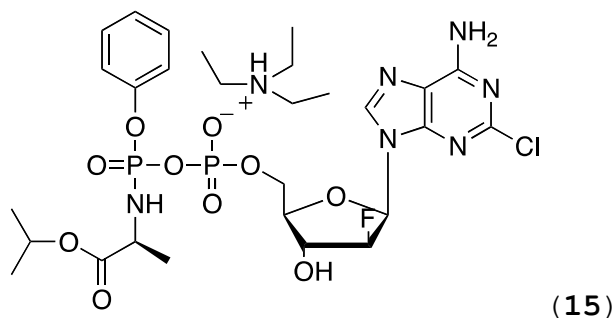
- **RMN de ¹³C** (125 MHz, CD₃OD): δ_c 173,56, 173,48 (t aparente, ³J_{C-P} = 7,6 Hz, C=O, éster), 156,70 (C-6), 154,13 (C-2), 150,89 (t aparente, ²J_{C-P} = 6,6 Hz, C-Ar), 150,24 (C-4), 142,68 (C-8), 129,22, 128,67, 124,65, 124,60, 122,34 (CH-Ar), 120,38, 120,36 (2 x d, ³J_{C-P} = 4,6 Hz, CH-Ar), 117,14 (C-5), 95,0, 94,99 (2 x d, ¹J_{C-F} = 191,6 Hz, C-2'), 82,76 (d, ³J_{C-F} = 8,25 Hz, C-4'), 82,68 (d, ²J_{C-F} = 8,5 Hz, C-1'), 73,95, 73,92 (OCCH₂C(CH₃)₃), 73,58, 73,50 (2 x d, ²J_{C-F} = 24,5 Hz, C-3'), 64,98, 64,86 (2 x d, ²J_{C-P} = 4,6 Hz, C-5'), 50,36, 50,27 (2 x d, ³J_{C-P} = 2,4 Hz, NHCHCH₃), 46,36 (N(CH₂CH₃)₃), 30,92, 30,89 (OCH₂C(CH₃)₃), 25,35, 25,33 (OCH₂C(CH₃)₃), 19,75, 19,61 (2 x d, ³J_{C-P} = 5,6 Hz, NHCHCH₃), 7,82 (N(CH₂CH₃)₃);

- C₂₄H₃₂ClFN₆O₁₀P₂ massa requerida m/z 680,94; encontrada MS (ES⁻) m/z: 679,19 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, λ = 254 nm, um pico

de dois diastereoisômeros com $t_R = 14,23$ min.

Exemplo 15: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-fenil(isopropoxi-L-alaninil)]difosfato trietilamônio.



[00125] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabino furanosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48 mmol), fenil(isopropoxi-L-alaninil)fosforocloridrato (0,45 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido branco (0,126 g, 11%).

- **RMN ³¹P** (202 MHz, CD₃OD): δ_P -7,62 (d, J = 21,0 Hz), -7,85 (d, J = 21,0 Hz), -12,14 (t aparente, J = 20,2 Hz);

- **RMN de ¹H** (500 MHz, CD₃OD): δ_H 8,30 (1H, d, $^5J_{H-F} = 2,0$ Hz, H-8), 7,35 - 7,27 (4H, m, H-Ar), 7,18 - 7,14 (1H, m, H-Ar), 6,45 (0,5H, t, J = 3,5 Hz, H-1'), 6,42 (0,5H, t, J = 3,5 Hz, H-1'), 5,22 (0,5H, q, J = 3,5 Hz, H-2'), 5,13 (0,5H, q, J = 3,5 Hz, H-2'), 4,96 - 4,94 (1H, m, OCHH(CH₃)₂), 4,61 - 4,58 (0,5H, m, H-3'), 4,57 - 4,55 (0,5H, m, H-3'), 4,29 - 4,25 (2H, m, H-5'), 4,19 - 4,15 (1H, m, NHCHCH₃), 4,07 - 4,00

(1H, m, H-4'), 3,33 (6H, q, J = 7,0 Hz, N(CH₂CH₃)₃), 1,38 (1H, d, J = 7,5 Hz, NHCHCH₃), 1,33 (2H, dd, J = 7,5 Hz, NHCHCH₃), 1,31 (9H, t, J = 7,5 Hz, N(CH₂CH₃)₃), 1,20 (6H, t aparente, J = 6,0 Hz, OCH(CH₃)₂);

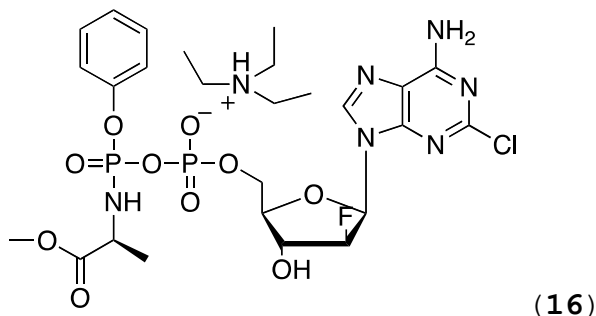
- **RMN de ¹³C** (125 MHz, CD₃OD): δ_C 173,10 (d, ³J_{C-P} = 7,1 Hz, C=O, éster), 173,02 (C=O, éster), 156,73 (C-6), 154,16 (C-2), 150,92, 150,86 (2 x d, ²J_{C-P} = 5,2 Hz, C-Ar), 150,24 (C-4), 142,55 (C-8), 129,26, 124,64, 124,62 (CH-Ar), 120,34 (d, ³J_{C-P} = 4,5 Hz, CH-Ar), 117,16 (C-5), 95,00 (d, ¹J_{C-F} = 191,5 Hz, C-2'), 82,90 (d, ³J_{C-F} = 6,5 Hz, C-4'), 82,80, 82,76 (2 x d, ²J_{C-F} = 10,5 Hz, C-1'), 73,60, 73,59 (2 x d, ²J_{C-F} = 24,5 Hz, C-3'), 68,71 (OCH(CH₃)₂), 65,08 (d, ²J_{C-P} = 4,2 Hz, C-5'), 50,39, 50,34 (2 x d, ²J_{C-P} = 1,8 Hz, NHCHCH₃), 46,23 (N(CH₂CH₃)₃), 20,61, 20,54 (OCH(CH₃)₂), 19,60, 19,47 (2 x d, ³J_{C-P} = 6,0 Hz, NHCHCH₃), 7,86 (N(CH₂CH₃)₃);

- C₂₂H₂₈ClFN₆O₁₀P₂ massa requerida m/z 652,10; encontrada MS (ES⁻) m/z: 651,13 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, λ = 254 nm, um pico de dois diastereoisômeros com t_R = 12,32 min.

Exemplo 16: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-fenil(metoxi-L-alaninil)]

difosfato trietilamônio.



[00126] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48 mmol), fenil(metoxi-L-alaninil)fosforocloridrato (0,41 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido branco (0,182 g, 17%).

- **RMN de ³¹P** (202 MHz, CD₃OD): δ_P -7,73 (d, J = 20,7 Hz), -7,84 (d, J = 20,8 Hz), -12,04 (d, J = 21,0 Hz), -12,11 (d, J = 20,8 Hz);

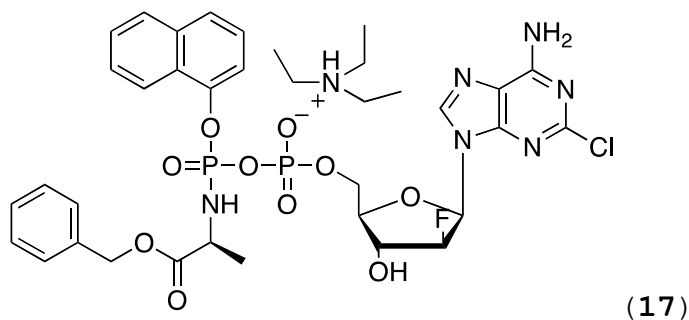
- **RMN de ¹H** (500 MHz, CD₃OD): δ_H 8,31 (0,5H, d, J_{H-F} = 2,5 Hz, H-8), 8,30 (0,5H, d, J_{H-F} = 2,0 Hz, H-8), 7,35 - 7,27 (4H, m, H-Ar), 7,18 - 7,14 (1H, m, H-Ar), 6,44 (0,5H, dd, J_{H-F} = 16,4 Hz, J = 3,9 Hz, H-1'), 6,42 (0,5H, dd, J_{H-F} = 16,4 Hz, J = 3,7 Hz, H-1'), 5,20 - 5,09 (1H, m, H-2'), 4,68 - 4,52 (1H, m, H-3'), 4,28 - 4,24 (2H, m, H-5'), 4,18 - 4,15 (1H, m, H-4'), 4,12 - 4,07 (1H, m, NHCHCH₃), 3,66 (1,5H, s, OCH₃), 3,65 (1,5H, s, OCH₃), 3,78 (6H, q, J = 7,0 Hz, N(CH₂CH₃)₃), 1,37 (1,5H, dd, J = 7,0 Hz, J = 0,5 Hz, NHCHCH₃),

1,32 (1,5H, dd, $J = 7,0$ Hz, $J = 0,5$ Hz, NHCHCH₃), 1,14 (9H, t, $J = 7,5$ Hz, N(CH₂CH₃)₃);

- C₂₀H₂₄ClFN₆O₁₀P₂ massa requerida m/z 724,07; encontrada MS (ES⁻) m/z: 723,01 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, $\lambda = 254$ nm, um pico de dois diastereoisômeros com $t_R = 12,24$ min.

Exemplo 17: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-1-naftil(benzoxi-L-alaninil)]difosfato trietilamônio.



[00127] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48 mmol), 1-naftil(benzoxi-L-alaninil) fosforocloridrato (0,59 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido branco (0,226 g, 18%).

- **RMN de ³¹P** (202 MHz, CD₃OD): δ_P -7,26 (d, $J = 20,2$ Hz), -7,61 (d, $J = 20,2$ Hz), -12,07 (d, $J = 20,40$ Hz), -12,27 (d,

$J = 20,40 \text{ Hz}$);

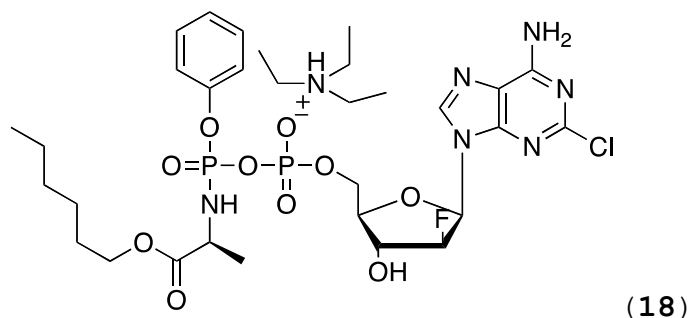
- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,19 - 8,17 (2H, m, H-Ar), 8,13 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,0 \text{ Hz}$, H-8), 8,12 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,0 \text{ Hz}$, H-8), 7,72 - 7,68 (2H, m, H-Ar), 7,54 - 7,52 (1H, d aparente, $J = 9,5 \text{ Hz}$, H-Ar), 7,44 - 7,40 (4H, m, H-Ar), 7,37 - 7,35 (1H, m, H-Ar), 6,28 (0,5H, t, $J = 4,0 \text{ Hz}$, H-1'), 6,25 (0,5H, t, $J = 4,0 \text{ Hz}$, H-1'), 5,06 - 5,02 (0,5H, m, H-2'), 4,95 - 4,93 (0,5H, m, H-2'), 4,89 - 4,80 (2H, OCH_2Ph), 4,43 - 4,43 (0,5H, m, H-3'), 4,41 - 4,40 (0,5H, m, H-3'), 4,15 - 4,12 (2H, m, H-5'), 4,09 - 4,06 (1H, m, NHCHCH_3), 4,03-4,01 (1H, m, H-4'), 3,33 (6H, q, $J = 7,0 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1,23 (1,5H, dd, $J = 7,0 \text{ Hz}$, $J = 0,5 \text{ Hz}$, NHCHCH_3), 1,20 (1,5H, dd, $J = 7,0 \text{ Hz}$, $J = 0,5 \text{ Hz}$, NHCHCH_3), 1,31 (9H, t, $J = 7,5 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$);

- $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{ClFN}_6\text{O}_{10}\text{P}_2$ massa requerida m/z 750,99; encontrada MS (ES^-) m/z : 749,19 ($[\text{M-H}]^-$);

HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, $F = 1 \text{ mL/min}$, $\lambda = 254 \text{ nm}$, $t_{\text{R}} = 14,69, 14,81 \text{ min}$.

Exemplo 18: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-fenil(hexoxi-L-alaninil)]

difosfato trietilamônio.



[00128] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48 mmol), 1-fenil(hexoxi-L-alaninil)fosforocloridrato (0,51 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido branco (0,235 g, 20%).

- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, CD_3OD): δ_{P} -7,55 (d, $J = 23,00$ Hz), -7,77 (d, $J = 19,40$ Hz), -12,09 (d, $J = 19,40$ Hz), -12,19 (d, $J = 20,10$ Hz);

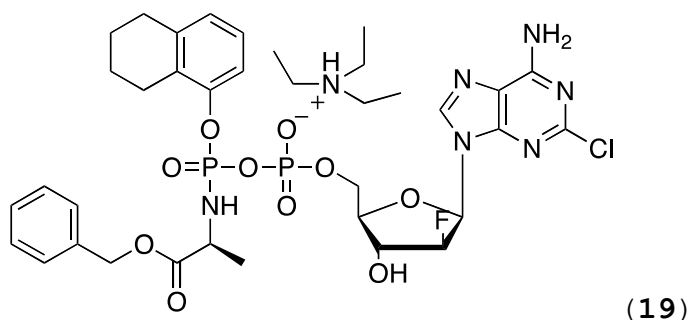
- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,18 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,0$ Hz, H-8), 8,17 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,0$ Hz, H-8), 7,23 - 7,11 (4H, m, H-Ar), 7,08 - 7,03 (1H, m, H-Ar), 6,33 (0,5H, dd, $J = 4,0, 1,5$ Hz, H-1'), 6,29 (0,5H, dd, $J = 4,0$ Hz, $J = 1,5$ Hz, H-1'), 5,08 - 5,06 (0,5H, m, H-2'), 4,98 - 4,96 (0,5H, m, H-2'), 4,47 - 4,45 (0,5H, m, H-3'), 4,44 - 4,42 (0,5H, m, H-3'), 4,15 - 4,11 (2H, m, H-5'), 4,06 - 4,03 (1H, m, NHCHCH₃), 3,97-3,90 (5H, m, H-4', 2 x CH₂, OCH₂(CH₂)₄CH₃), 3,84 - 3,78 (1H, m, OCH₂(CH₂)₄CH₃), 3,33 (6H, q, $J = 7,0$ Hz,

$N(CH_2CH_3)_3$, 1,50 - 1,43 (4H, m, 2 x CH_2 , $OCH_2(CH_2)_4CH_3$), 1,31 - 1,22 (6H, m, CH_2 , $OCH_2(CH_2)_4CH_3$, $NHCHCH_3$), 1,31 (9H, t, $J = 7,5$ Hz, $N(CH_2CH_3)_3$), 0,81 - 0,76 (3H, m, $OCH_2(CH_2)_4CH_3$);

- $C_{25}H_{34}ClFN_6O_{10}P_2$ massa requerida m/z 694,97; encontrada MS (ES⁻) m/z: 693,14 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, $\lambda = 254$ nm, $t_R = 15,13$ e 15,21 min.

Exemplo 19: Sal de 2-cloro-9-(2'-Desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-5,6,7,8-tetrahidro-1-naftil(benzoxi-L-alaninil)]difosfato trietilamônio.



[00129] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48 mmol), 5,6,7,8-tetrahidro-1-naftil(benzoxi-L-alaninil) fosforocloridrato (0,603 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido branco (0,19 g, 15%).

- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, CD_3OD): δ_P -7,06 (d, $J = 24,0$ Hz), -7,55 (d, $J = 21,2$ Hz), -11,24 (d, $J = 21,2$ Hz), -11,38 (d,

$J = 24,0 \text{ Hz}$);

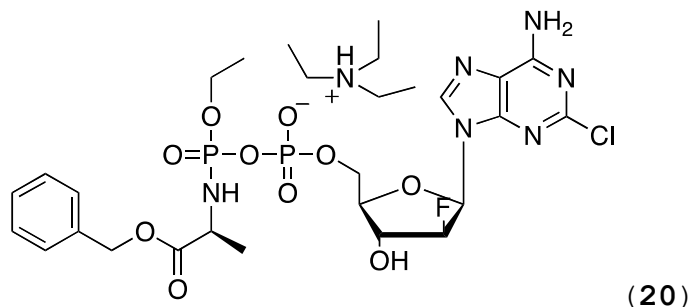
- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,27 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,0 \text{ Hz}$, H-8), 8,25 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,0 \text{ Hz}$, H-8), 7,33 - 7,30 (3H, m, H-Ar), 7,22 - 7,18 (2H, m, H-Ar), 7,00 - 6,93 (2H, m, H-Ar), 6,84 (1H, t aparente, $J = 6,5 \text{ Hz}$, H-Ar), 6,72 (1H, d aparente, $J = 7,5 \text{ Hz}$, H-Ar), 6,43 (0,5H, dd, $J = 4,0 \text{ Hz}$, $J = 2,0 \text{ Hz}$, H-1'), 6,39 (0,5H, dd, $J = 4,0 \text{ Hz}$, $J = 2,0 \text{ Hz}$, H-1'), 5,19 - 5,16 (0,5H, m, H-2'), 5,09 - 5,06 (0,5H, m, H-2'), 5,06 - 5,03 (2H, m, OCH_2Ph), 4,56 - 4,49 (1H, m, H-3'), 4,27 - 4,10 (3H, m, H-5', H-4'), 4,02 - 3,97 (1H, m, NHCHCH_3), 3,33 (6H, q, $J = 7,0 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 2,73 (4H, bt, $2 \times \text{CH}_2$), 1,75 - 1,72 (4, m, $2 \times \text{CH}_2$), 1,42 (1,5H, d, $J = 7,5 \text{ Hz}$, NHCHCH_3), 1,38 (1,5H, dd, $J = 7,0 \text{ Hz}$, NHCHCH_3), 1,31 (9H, t, $J = 7,5 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$);

- $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{ClFN}_6\text{O}_{10}\text{P}_2$ massa requerida m/z 754,15; encontrada MS (ES^-) m/z : 753,23 ($[\text{M-H}]^-$);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, $F = 1 \text{ mL/min}$, $\lambda = 254 \text{ nm}$, $t_{\text{R}} = 15,32$ e 15,44 min.

Exemplo 20: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-etil(benzoxi-L-alaninil)]

difosfato trietilamônio.



[00130] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48 mmol), etil(benzoxi-L-alaninil)fosforocloridrato (0,45 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido branco (0,218 g, 20%).

- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, CD_3OD): δ_{P} -2,73 (d, $J = 20,2$ Hz), -3,04 (d, $J = 20,4$ Hz), -11,96 (d, $J = 20,2$ Hz), -12,07 (d, $J = 20,04$ Hz);

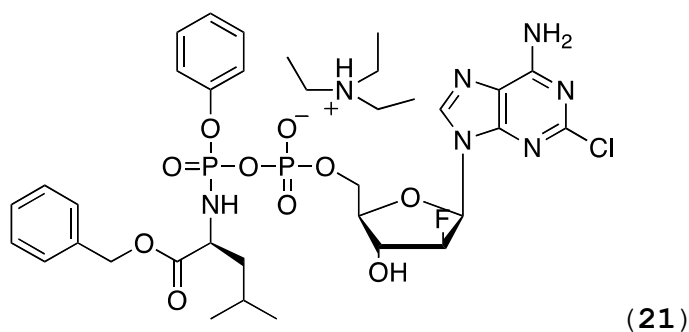
- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,32 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,0$ Hz, H-8), 8,31 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,0$ Hz, H-8), 7,37 - 7,27 (5H, m, H-Ar), 6,46 (0,5H, dd, $J = 4,0$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H-1'), 6,43 (0,5H, dd, $J = 4,0$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H-1'), 5,24 - 5,22 (0,5H, m, H-2'), 5,20 - 5,14 (2H, m, OCH_2Ph), 5,13 - 5,11 (0,5H, m, H-2'), 4,62 - 4,60 (0,5H, m, H-3'), 4,59 - 4,57 (0,5H, m, H-3'), 4,29 - 4,26 (2H, m, H-5'), 4,19 - 4,17 (2H, m, NHCH_2CH_3), 4,12 - 4,04 (3H, m, H-4', OCH_2CH_3), 2,86 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1,43 (1,5H, dd, $J = 7,0$ Hz, $J = 0,5$

Hz, NHCHCH₃), 1,42 (1,5H, dd, J = 7,0 Hz, J = 0,5 Hz, NHCHCH₃), 1,27-1,23 (3H, m, OCH₂CH₃), 1,19 (9H, t, J = 7,5 Hz, N(CH₂CH₃)₃);

- C₂₂H₂₈ClFN₆O₁₀P₂ massa requerida m/z 652,89; encontrada MS (ES⁻) m/z: 651,15 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, λ = 254 nm, um pico de dois diastereoisômeros com t_R = 14,12 min.

Exemplo 21: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-fenil(benzoxi-L-leucinil)] difosfato trietilamônio.



[00131] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48 mmol), fenil(benzoxi-L-leucinil)fosforocloridato (0,58 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido branco (0,30 g, 24%).

- **RMN ³¹P** (202 MHz, CD₃OD): δ_P -7,28 (d, J = 21,4 Hz), -

7,57 (d, $J = 21,6$ Hz), -12,18 (d, $J = 21,6$ Hz);

- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,18 (1H, s, H-8), 7,19 - 7,10 (8H, m, H-Ar), 7,06 - 6,99 (2H, m, H-Ar), 6,32 (0,5H, t, $J = 3,5$ Hz, H-1'), 6,29 (0,5H, t, $J = 3,5$ Hz, H-1'), 5,10 - 5,08 (0,5H, m, H-2'), 4,97 - 4,88 (2,5H, m, H-2', OCH_2Ph), 4,46 (0,5H, t aparente, $J = 3,5$ Hz, H-3'), 4,43 (0,5H, t aparente, $J = 3,5$ Hz, H-3'), 4,17 - 4,13 (2H, m, H-5'), 4,06 - 4,04 (1H, m, H-4'), 3,94 - 3,88 (1H, m, $\text{NHCHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,33 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1,13 (9H, t, $J = 7,5$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1,43 - 1,37 (3H, m, $\text{NHCHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0,75 - 0,72 (3H, m, $\text{NHCHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0,65 - 0,64 (3H, dd aparente, $J = 14,0$ Hz, $J = 6,0$ Hz, $\text{NHCHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$);

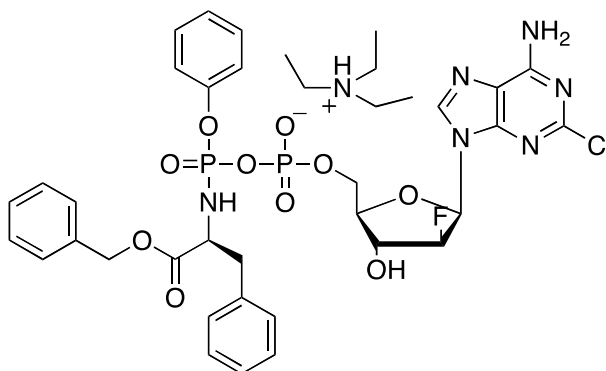
- **RMN de ^{13}C** (125 MHz, CD_3OD): δ_{C} 173,43, 173,22 (2 x d, $^3\text{J}_{\text{C-P}} = 3,5$ Hz, C=O, éster), 156,78, 156,72 (C-6), 154,16 (C-2), 150,92 (d, $^2\text{J}_{\text{C-P}} = 7,0$ Hz, C-Ar), 150,24 (C-4), 135,84, 135,81 (C-8), 129,26, 128,74, 128,26, 128,13, 127,95, 127,90, 127,88, 127,83, 124,68, 124,57, 122,30 (CH-Ar), 120,44 (d, $^3\text{J}_{\text{C-P}} = 4,6$ Hz, CH-Ar), 120,27 (d, $^3\text{J}_{\text{C-P}} = 5,2$ Hz, CH-Ar), 119,98, 119,94 (CH-Ar), 117,17 (C-5), 95,00 (d, $^1\text{J}_{\text{C-F}} = 191,6$ Hz, C-2'), 82,90 (d, $^3\text{J}_{\text{C-F}} = 4,1$ Hz C-4'), 82,74 (d, $^2\text{J}_{\text{C-F}} = 11,0$ Hz, C-1'), 73,63, 73,58 (2 x d, $^2\text{J}_{\text{C-F}} = 24,5$ Hz, C-3'), 66,43, 66,05 (OCH_2Ph), 65,10 (d, $^2\text{J}_{\text{C-P}} = 5,5$ Hz, C-5'), 53,70 (NHCH), 53,31 (d, $^2\text{J}_{\text{C-P}} = 5,5$ Hz, NHCH), 46,21 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 43,20, 43,00 (2 x d, $^3\text{J}_{\text{C-P}} = 7,0$ Hz, NHCHCH_2),

24,13, 24,08 (NHCHCH₂CH(CH₃)₂), 21,66, 21,45, 21,07, 20,99
(NHCHCH₂CH(CH₃)₂), 7,83 (N(CH₂CH₃)₃);

- C₂₉H₃₄ClFN₆O₁₀P₂ massa requerida m/z 742,15; encontrada
MS (ES⁻) m/z: 741,18 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de
90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, λ = 254 nm, um pico
de dois diastereoisômeros com t_R = 14,91 min.

Exemplo 22: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-
arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-fenil(benzoxi-L-
fenilalaninil)]difosfato trietilamônio.



(22)

[00132] Preparado de acordo com o procedimento geral a
partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-
arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48
mmol), fenil(benzoxi-L-fenilalaninil) fosforocloridrato
(0,63 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido
branco (0,185 g, 14%).

- **RMN de ³¹P** (202 MHz, CD₃OD): δ_P -7,88 (d, J = 20,6 Hz),

-7,98 (d, $J = 20,0$ Hz), -12,00 (d, $J = 21,21$ Hz);

- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,17 (0,5H, d, $^5J_{\text{H-F}} = 2,5$ Hz, H-8), 8,14 (0,5H, d, $^5J_{\text{H-F}} = 2,5$ Hz, H-8), 7,18 - 7,08 (10, m, H-Ar), 6,97 - 6,87 (5H, m, H-Ar), 6,30 (0,5H, dd, $J = 4,0$ Hz, $J = 1,5$ Hz, H-1'), 6,27 (0,5H, dd, $J = 4,0$ Hz, $J = 1,5$ Hz, H-1'), 5,08 - 5,05 (0,5H, m, H-2'), 4,97 - 4,95 (0,5H, m, H-2'), 4,86 - 4,77 (4H, m, OCH_2Ph , NHCHCH_2Ph), 4,46 - 4,44 (0,5H, m, H-3'), 4,43 - 4,41 (0,5H, m, H-3'), 4,25 - 4,17 (1H, m, NHCHCH_2Ph), 4,16 - 4,12 (2H, m, H-5'), 4,10 - 4,05 (1H, m, H-4'), 3,33 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1,31 (9H, t, $J = 7,5$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$);

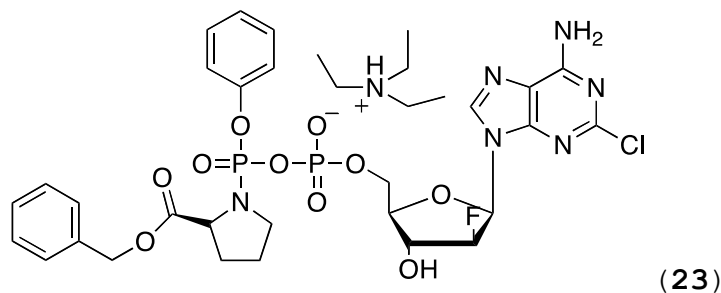
- **RMN de ^{13}C** (125 MHz, CD_3OD): δ_{C} 173,46 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4,6$ Hz, C=O, éster), 172,05 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4,5$ Hz, C=O, éster), 156,68 (C-6), 154,13 (C-2), 153,36 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7,1$ Hz, C-Ar), 150,85, 150,83 (C-4), 150,23 (C-Ar), 136,73, 136,11 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4,7$ Hz, C-Ar), 135,69 (C-8), 135,52, 135,50 (C-Ar), 129,20 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 3,1$ Hz, CH-Ar), 128,74, 128,09, 128,05 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 2,8$ Hz, CH-Ar), 127,90, 127,84, 127,78, 126,44, 126,25, 124,59, 122,40, 120,38, 120,34, 120,30, 120,26, 120,15, 120,11 (CH-Ar), 117,15 (C-5), 95,01 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 191,0$ Hz, C-2'), 95,00 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 191,0$ Hz, C-2'), 82,84 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-4'), 82,68 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 32,5$ Hz, C-1'), 73,58 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 24,5$ Hz, C-3'), 66,45, 66,44 (OCH_2Ph), 66,11 (OCH_2Ph), 65,04 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4,8$ Hz, C-5'), 56,44 (NHCHCH_2Ph), 56,19

(NHCHCH₂Ph), 46,21 (N(CH₂CH₃)₃), 40,79, 40,74 (CH₂Ph), 9,85 (N(CH₂CH₃)₃).

- C₃₂H₃₂ClFN₆O₁₀P₂ massa requerida m/z 776,13; encontrada MS (ES⁻) m/z: 775,17 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, λ = 254 nm, um pico de dois diastereoisômeros com t_R = 24,28 min.

Exemplo 23: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-fenil(benzoxi-L-prolinil)] difosfato trietilamônio.



[00133] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48 mmol), fenil(benzoxi-L-prolinil)fosforocloridrato (0,55 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido branco (0,17 g, 14%).

- RMN de ³¹P (202 MHz, CD₃OD): δ_P -9,05 (d, J = 17,6 Hz), -9,72 (d, J = 21,6 Hz), -11,75 (d, J = 17,6 Hz), -12,12 (d,

$J = 21,6 \text{ Hz}$);

- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,17 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,5 \text{ Hz}$, H-8), 8,16 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,5 \text{ Hz}$, H-8), 7,21 - 7,15 (8H, m, H-Ar), 7,11 - 7,09 (1H, m, H-Ar), 7,04 - 7,00 (1H, m, H-Ar), 6,32 (0,5H, d, $J = 4,0 \text{ Hz}$, H-1'), 6,31 (0,5H, d, $J = 4,0 \text{ Hz}$, H-1'), 5,08 - 5,06 (0,5H, m, H-2'), 5,01 - 4,99 (0,5H, m, H-2'), 4,98 - 4,91 (2H, m, OCH_2Ph), 4,48 - 4,45 (1H, m, NCH), 4,43 - 4,41 (0,5H, m, H-3'), 4,34 - 4,30 (0,5H, m, H-3'), 4,16 - 4,09 (2H, m, H-5'), 4,05 - 4,00 (1H, m, H-4'), 3,46 - 3,38 (2H, m, NCH_2), 2,21 - 2,05 (1H, m, um H de NCH_2CH_2), 1,85 - 1,76 (3H, m, 1 x H, NCH_2CH_2 , 2 x H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3,33 (6H, q, $J = 7,0 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1,31 (9H, t, $J = 7,5 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$);

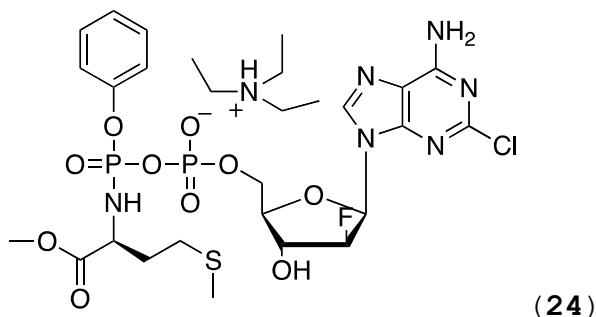
- **RMN de ^{13}C** (125 MHz, CD_3OD): δ_{C} 173,60, 173,31 (C=O, éster), 156,69 (C-6), 154,14 (C-2), 150,78 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 3,8 \text{ Hz}$, C-Ar), 150,22 (C-4), 136,37 (C-8), 136,03, 135,96 (C-Ar), 129,29, 129,23, 128,13, 127,80, 127,76, 127,67, 124,57 (CH-Ar), 120,15 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5,2 \text{ Hz}$, CH-Ar), 119,96 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5,2 \text{ Hz}$, CH-Ar), 117,14 (C-5), 95,02 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 191,7 \text{ Hz}$, C-2'), 94,99 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 191,7 \text{ Hz}$, C-2'), 82,85 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 5,6 \text{ Hz}$, C-4'), 82,71 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 32,5 \text{ Hz}$, C-1'), 73,59 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 24,5 \text{ Hz}$, C-3'), 73,55 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 24,5 \text{ Hz}$, C-3'), 66,32, 66,25 (OCH_2Ph), 65,02 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4,0 \text{ Hz}$, C-5'), 64,90 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4,0 \text{ Hz}$, C-5), 60,72 ($^2J_{\text{C-P}} = 7,75 \text{ Hz}$, NCH), 60,35 ($^2J_{\text{C-P}} = 7,75$

Hz, NCH), 46,31 (N(CH₂CH₃)₃), 30,99 (²J_{C-P} = 11,0 Hz, NCH₂), 30,89 (²J_{C-P} = 11,0 Hz, NCH₂), 24,84 (³J_{C-P} = 9,0 Hz, NCH₂CH₂), 24,40 (³J_{C-P} = 9,0 Hz, NCHCH₂), 7,85 (N(CH₂CH₃)₃);

- C₂₈H₃₀ClFN₆O₁₀P₂ massa requerida m/z 726,97; encontrada MS (ES⁻) m/z: 725,67 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, λ = 254 nm, um pico de dois diastereoisômeros com t_R = 15,39 min.

Exemplo 24: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-fenil(metoxi-L-metioninil)]difosfato trietilamônio.



[00134] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48 mmol), fenil(metoxi-L-metioninil) fosforocloridrato (0,49 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido branco (0,25 g, 22%).

- RMN de ³¹P (202 MHz, CD₃OD): δ_P -7,41 (d, J = 21,33

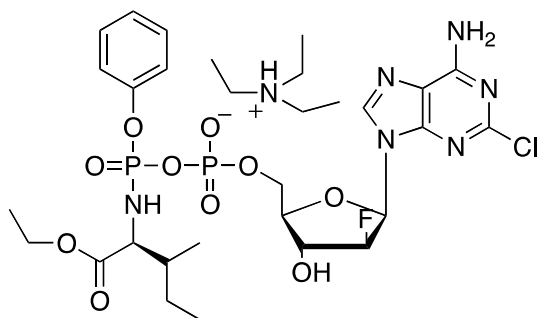
Hz), -7,69 (d, $J = 21,6$ Hz), -12,29 (d, $J = 20,6$ Hz);

- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,19 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,1$ Hz, H-8), 8,18 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,0$ Hz, H-8), 7,21 - 7,16 (4H, m, H-Ar), 7,09 - 7,02 (1H, m, H-Ar), 6,32 (0,5H, dd, $J_{\text{H-F}} = 16,6$ Hz, $J = 4,3$ Hz, H-1'), 6,31 (0,5H, dd, $J_{\text{H-F}} = 16,6$ Hz, $J = 4,2$ Hz, H-1'), 5,02 (0,5H, dd, $J_{\text{H-F}} = 51,9$ Hz, $J_{\text{H-F}} = 2,2$ Hz, H-2') 5,00 (0,5H, dd, $J_{\text{H-F}} = 51,9$ Hz, $J_{\text{H-H}} = 2,2$ Hz, H-2'), 4,48 - 4,43 (1H, m, H-3'), 4,17 - 4,13 (2H, m, H-5'), 4,08 - 4,00 (m, 2H, NHCHCH_3 , H-4'), 3,56, 3,43 (3H, 2s, OCH_3), 2,80 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$, 2,42 - 2,39 (1H, m, $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_{2\text{a}}$), 2,28 - 2,24 (1H, m, $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_{2\text{b}}$), 1,90, 1,86 (3H, 2 x s, SCH_3), 1,90 - 1,71 (2H, m, $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_{2\text{a}}$). $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{ClFN}_6\text{O}_{10}\text{P}_2\text{S}$ massa requerida 684,96; encontrada MS (ES^-) m/z: 683 ($[\text{M-H}]^-$);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, $F = 1$ mL/min, $\lambda = 254$ nm, um pico de dois diastereoisômeros com $t_{\text{R}} = 12,28$ min.

Exemplo 25: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-fenil(etoxi-L-

isoleucinil)]difosfato trietilamônio.



(25)

[00135] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48 mmol), fenil(etoxi-L-isoleucinil)fosforocloridrato (0,49 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido branco (0,26 g, 23%).

- **RMN de ^{31}P** (202 MHz, CD_3OD): δ_{P} -6,84 (d, $J = 21,5$ Hz), -6,99 (d, $J = 22,3$ Hz), -12,00 (d, $J = 21,6$ Hz);

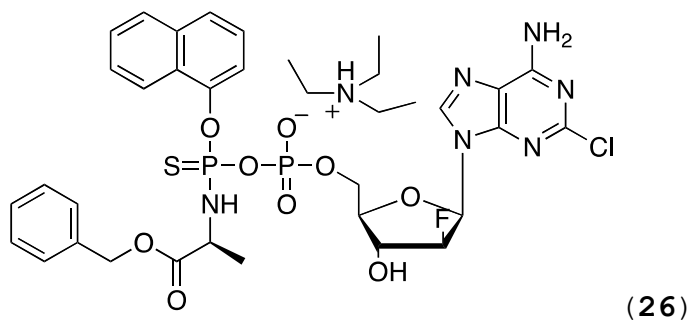
- **RMN de ^1H** (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8,30 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,4$ Hz, H-8), 8,29 (0,5H, d, $J_{\text{H-F}} = 2,3$ Hz, H-8), 7,35 - 7,23 (4H, m, H-Ar), 7,19 - 7,13 (1H, m, H-Ar), 6,44 (0,5H, dd, $J_{\text{H-F}} = 16,7$ Hz, $J = 3,9$ Hz, H-1'), 6,43 (0,5H, dd, $J_{\text{H-F}} = 16,7$ Hz, $J_{\text{H-H}} = 4,2$ Hz, H-1'), 5,21 - 5,08 (1H, m, H-2'), 4,59 - 4,54 (1H, m, H-3'), 4,28 - 4,25 (2H, m, OCH_2CH_3), 4,18 - 4,07 (3H, m, H-5'_a, H-4', NHCHCH_3), 3,83 (0,5H, dd, $J = 9,8$ Hz, $J = 5,7$ Hz, H-5'_b), 3,82 (0,5H, dd, $J = 9,8$ Hz, $J = 5,7$ Hz, H_b-5'), 3,33 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$, 1,77 - 1,68 (1H, m, CHCH_3), 1,55 - 1,42 (1H, m, CHCH_2a), 1,15-1,09 (1H, m,

CHCH_{2b}), 1,27 - 1,20 (12H, m, N(CH₂CH₃)₃, OCH₂CH₃), 0,91 - 0,82 (6H, CHCH₃, CH₂CH₃);

- C₂₄H₃₂ClFN₆O₁₀P₂ massa requerida 680,14; encontrada MS (ES⁻) m/z: 680,18 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, λ = 254 nm, um pico de dois diastereoisômeros com t_R = 13,57 min.

Exemplo 26: Sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-O-[1-naftil(benzoxi-L-alaninil)]fosforotiol-fosfato trietilamônio.



[00136] Preparado de acordo com o procedimento geral a partir de sal de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)adenina-5'-monofosfato TEA (0,86 g, 1,48 mmol), 1-naftil(benzoxi-L-alaninil)fosforotiolcloridrato (0,62 g, 1,48 mmol) e TEA (0,59 mL, 4,25 mmol) como um sólido branco (0,054 g, 4%).

- **RMN de ³¹P** (202 MHz, CD₃OD): δ_P 55,05 (d, J = 28,5 Hz), 53,71 (d, J = 28,5 Hz), -12,24 (d largo, J = 28,7 Hz);

- **RMN de ¹H** (500 MHz, CD₃OD): δ_H 8,37 - 8,34 (1H, m, H-

Ar), 8,28 (0,5H, d, $J_{H-F} = 2,0$ Hz, H-8), 8,26 (0,5 H, d, $J_{H-F} = 2,0$ Hz, H-8), 7,85 - 7,82 (1H, m, H-Ar), 7,66 - 7,64 (2H, m, H-Ar), 7,50 - 7,43 (2H, m, H-Ar), 7,38 - 7,19 (5H, m, H-Ar), 6,42 (0,5H, t, $J = 4,0$ Hz, H-1'), 6,39 (0,5H, t, $J = 4,0$ Hz, H-1'), 5,19 - 5,16 (1H, m, H-2'), 5,11 - 5,02 (2H, m, OCH₂Ph), 4,60 - 4,57 (0,5H, m, H-3'), 4,56 - 4,54 (0,5H, m, H-3'), 4,44 - 4,28 (3H, m, H-5', NHCHCH₃), 4,20 - 4,17 (1H, m, H-4'), 3,33 (6H, q, $J = 7,0$ Hz, N(CH₂CH₃)₃), 1,47 - 1,41 (3H, m, NHCHCH₃), 1,31 (9H, t, $J = 7,5$ Hz, N(CH₂CH₃)₃);

- C₃₀H₃₀ClFN₆O₉P₂S massa requerida m/z 767,06; encontrada MS (ES⁻) m/z 766,12 ([M-H]⁻);

- HPLC de fase reversa, eluindo com 0,1 M TEAB/AcCN de 90/10 a 0/100 em 30 min, F = 1 mL/min, $\lambda = 254$ nm, um pico de dois diastereoisômeros com $t_R = 16,39$ min.

Exemplo 27 - Análises de citotoxicidade *in vitro*

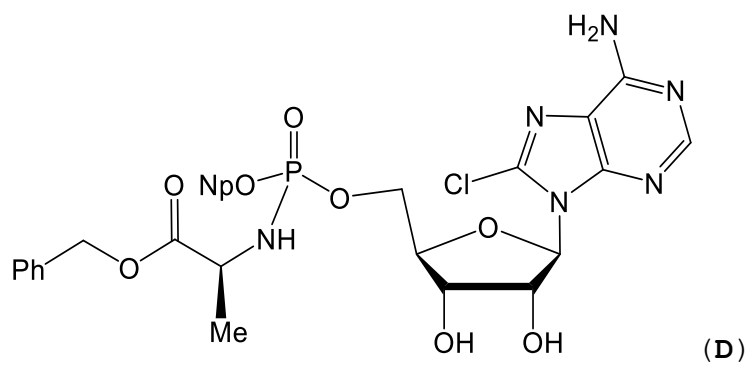
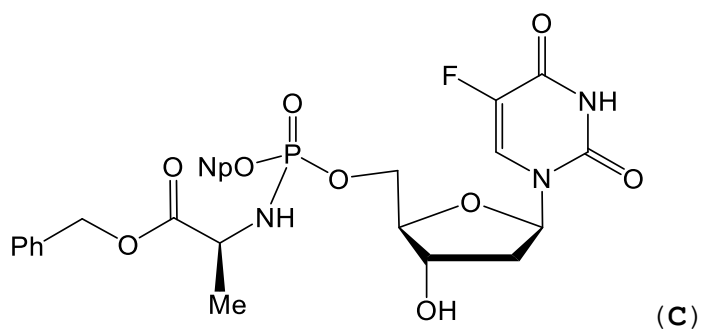
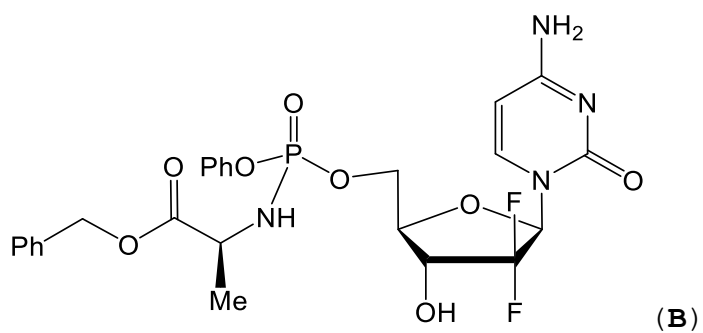
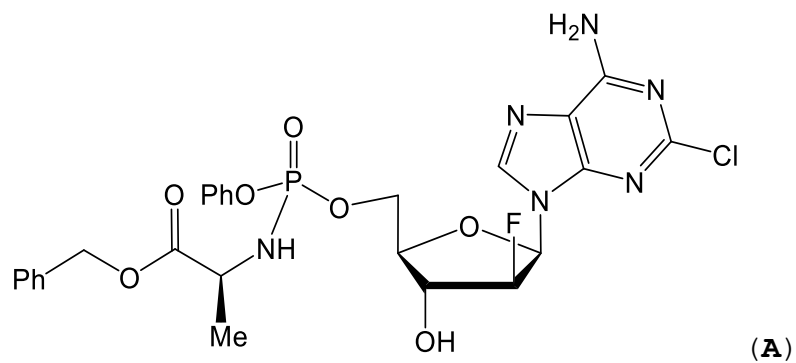
[00137] Um subconjunto de compostos da presente invenção foi testado quanto à sua atividade citotóxica em uma variedade de diferentes tumores sólidos e malignidades hematológicas usando o seguinte ensaio.

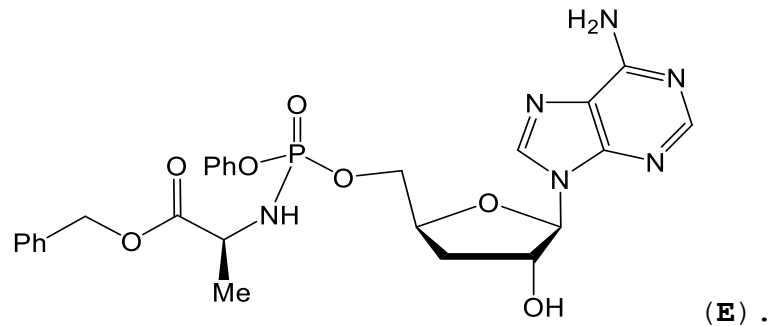
[00138] Tumor sólido e ensaio de malignidade hematológica.

[00139] O ensaio de viabilidade *in vitro* foi realizado para avaliar os efeitos dos compostos no que tange a viabilidade celular em linhagens celulares selecionadas ao

longo de 72 horas utilizando o ensaio CellTiterGlo (CTG, Promega-G7573). Os testes foram realizados em duplicata, com tratamento de compostos em 9 pontos, titulação de 3,16 vezes em placas de 96 poços durante ~72 h. As concentrações iniciais do composto foram de 198 μM . Foi realizado o ensaio de viabilidade celular utilizando CellTiterGlo em placas de 96 poços. Tratamento de composto em 72 horas, condições padrão de crescimento, e em duplicatas. Os compostos foram dissolvidos a 40 mM com descongelado 100%. Os compostos foram diluídos em série em 3,16 vezes em DMSO descongelado, e aquecidos a 37°C antes de serem dissolvidos no meio (2 μL + 200 μL). Após os compostos serem dissolvidos, os meios contendo os compostos foram aquecidos a 37°C em uma incubadora e, em seguida, os compostos nos meios foram adicionados às placas de células (50 μL + 50 μL) em duplicata. As concentrações finais dos compostos foram de 198 μM a 19,8 nM. Todas as solubilidades dos compostos foram verificadas e registradas novamente, depois as placas foram transferidas para a incubadora de cultura de tecidos de CO₂ imediatamente e incubadas por 3 dias. A concentração final de DMSO é de 0,5%. O nucleosídeo parental em cada caso foi testado como um comparador, assim como foi um ProTide exemplificativo. Os fármacos da classe ProTide testados

foram os seguintes:





[00140] As seguintes linhagens celulares foram testadas e são referidas na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1

Linhagem celular	Malignidade	Linhagem celular	Malignidade
MOLT-4	Leucemia linfoblástica aguda tipo T	MCF-7	Adenocarcinoma de mama
CCRF-CEM	Leucemia linfoblástica aguda	HL-60	Leucemia promielocítica
RL	Linfoma não Hodgkin	MV4-11	Leucemia mielomonocítica bifenotípica tipo B
RPMI-8226	Mieloma múltiplo humano	HepG2	Carcinoma hepatocelular
K562	Leucemia mieloide crônica	HT29	Adenocarcinoma do cólon
OVCAR-3	Adenocarcinoma de ovário	Mia-Pa-Ca-2	Carcinoma pancreático
KG-1	Leucemia mieloide aguda		

[00141] Os resultados destes rastreamentos são apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4.

[00142] Na Tabela 3, 'A' representa uma EC₅₀ de não mais

do que 0,2 μM ; 'B' representa uma EC_{50} superior a 0,2 μM , mas não superior a 2 μM ; 'C' representa uma EC_{50} superior a 2 μM , mas não superior a 5 μM ; 'D' representa uma EC_{50} superior a 5 μM , mas não superior a 10 μM ; e 'E' representa uma EC_{50} superior a 10 μM . Nenhum valor significa que não foi realizado um rastreamento do composto indicado contra a linhagem celular indicada.

[00143] Na Tabela 4, 'A' representa uma EC_{50} de não mais que 0,2 μM ; 'B' representa uma EC_{50} superior a 0,2 μM , mas não superior a 1 μM ; 'C' representa uma EC_{50} superior a 1 μM , mas não superior a 5 μM ; 'D' representa uma EC_{50} superior a 5 μM , mas não superior a 10 μM ; e 'E' representa uma EC_{50} superior a 10 μM . Letras em negrito representam uma EC_{50} menor do que a do ProTide A exemplificativo.

[00144] Nas Tabelas 2, 3 e 4, 'Ab EC_{50} ' refere-se à EC_{50} absoluta e 'inibição máxima' refere-se à porcentagem de inibição alcançada na concentração mais alta testada.

Tabela 2

	Mia-Pa-Ca-2		HT29		HepG2		OVCAR 3		MCF-7	
Composto	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)
Gemcitabina	0,03	79	0,22	65	28,0	54	>198	44	0,011	53
8	0,07	79	0,48	62	83,13	52	>198	48,5	0,07	52
B	0,53	82	8,55	62	21,33	57	>198	33,5	2,71	54
FUDR	0,35	90	0,22	82	84,02	61	2,32	66	7,23	73
4	0,11	67	0,25	77	>198	48	2,81	67,5	15,80	66
C	1,01	89	1,91	81	70,60	65	-	-	27,25	89
8-CI- Adenosina	0,42	85	1,96	73	-	-	-	-	1,83	85,7
5	0,43	87,6	1,41	76,5	-	-	-	-	1,69	88
D	1,97	99,7	3,82	94	-	-	-	-	4,30	99,6
Cordicepina	84,73	88	32,74	87	-	-	-	-	-	-
7	3,32	98,90	7,79	79	-	-	-	-	-	-
6	40,89	95,7	24,34	82	-	-	-	-	-	-
E	7,92	98	10,75	97	-	-	-	-	-	-

Tabela 2 (continuação)

	CCRF-CEM		MOLT-4		K562		HL-60		RL		RPMI-8226	
Composto	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)
Gemcitabina	0,02	101	0,004	88	-	-	-	-	-	-	-	-
8	0,04	99,9	0,009	84	>198	29	0,08	98	0,20	66,5	-	-
B	-	-	0,24	76,4	-	-	-	-	-	-	-	-
FUDR	0,04	91,9	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11	99
4	0,03	97,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	95
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-CI-Adenosina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cordicepina	-	-	100,65	76,5	117,51	94	117,58	56	> 198	16,6	> 198	17
7	-	-	25,30	90	9,16	94	6,97	100	11,10	93	1,60	98
6	-	-	14,19	95	52,28	81	62,50	80	88,81	72	-	-
E	-	-	5,23	96	10,95	87	31,13	97	18,29	90,5	19,89	97,8

Tabela 3

	HT29		HepG2		OVCAR 3		MCF-7	
Composto	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)
Clofarabina	B	64	C	64	E	48	B	55
1	B	66	-	-	E	-	B	59
2	B	62	-	-	E	48	B	54
3	B	61	C	53	E	49	C	59
A	C	94	-	-	-	-	D	99,6

Tabela 3 (continuação)

	CCRF-CEM		MOLT-4		K562		HL-60		RL		RPMI-8226	
Composto	Ab	Inibição	Ab	Inibição	Ab	Inibição	Ab	Inibição	Ab	Inibição	Ab	Inibição
	EC ₅₀	máxima	EC ₅₀	máxima	EC ₅₀	máxima	EC ₅₀	máxima	EC ₅₀	máxima	EC ₅₀	máxima
	(μ M)	(%)	(μ M)	(%)	(μ M)	(%)	(μ M)	(%)	(μ M)	(%)	(μ M)	(%)
Clofarabina	A	98,7	A	84,1	E	23	A	97	B	77	D	89
1	A	98,7	A	82,7	E	24	A	97	B	70	D	91
2	A	98,7	A	98	E	29	A	98	B	65	D	92
3	A	99,6	A	96	E	24	A	97	B	63	D	91,6
A	A	99,4	B	93	E	32	B	97	C	99,8	C	97

Tabela 4

Composto	HT29		HepG2		MCF-7		MOLT-4	
	Ab	Inibição	Ab	Inibição	Ab	Inibição	Ab	Inibição
	EC ₅₀ (μ M)	máxima (%)	EC ₅₀ (μ M)	máxima (%)	EC ₅₀ (μ M)	máxima (%)	EC ₅₀ (μ M)	máxima (%)
Clofarabina	B	68	C	57	B	54	A	94
A	C	86	D	99	D	99	B	100
9	B	70	B	53	-	45	A	92
10	B	70	C	55	E	51	A	93
11	B	69	C	58	E	57	A	91
12	0,37	71	0,29	54	-	44	0,04	91
13	B	68	-	49	-	49	A	89
14	B	71	B	52	-	48	A	95
15	0,33	69	0,37	51	-	47	0,03	90
16	B	71	B	53	-	47	A	97
17	B	69	B	52	-	46	A	88
18	B	66	B	53	-	44	A	88
19	B	68	B	51	-	47	A	90
20	B	69	B	54	-	48	A	89
21	B	69	B	53	-	49	A	90
22	B	69	-	47	-	50	A	89
23	B	68	C	51	-	48	A	89
24	B	70	C	54	-	49	A	88
25	B	67	-	49	-	43	A	86
26	B	64	-	49	-	44	A	84

Tabela 4 (continuação)

Composto	OVCAR 3		CCRF-CEM		K 562		HL-60	
	Ab	Inibição	Ab	Inibição	Ab	Inibição	Ab	Inibição
	EC ₅₀ (μ M)	máxima (%)	EC ₅₀ (μ M)	máxima (%)	EC ₅₀ (μ M)	máxima (%)	EC ₅₀ (μ M)	máxima (%)
Clofarabina	E	42	A	99	E	32	A	97
A	E	94	A	99	E	85	B	97
9	E	43	A	99	E	40	A	96
10	E	42	A	99	E	37	A	96
11	E	70	A	99	E	50	A	96
12	>198	41	<0,02	99	>198	40	0,07	96
13	E	80	A	99	E	44	A	96
14	E	43	A	99	E	36	A	96
15	>198	41	<0,02	99	>198	36	0,06	96
16	E	44	A	99	E	33	A	96
17	E	47	A	99	E	37	A	96
18	E	47	A	99	E	40	A	96
19	E	51	A	99	E	37	A	95
20	E	49	A	99	E	35	A	96
21	E	47	A	99	E	32	A	96
22	E	73	A	99	E	62	A	95
23	E	63	A	99	E	35	A	96
24	E	67	A	99	E	49	A	95
25	E	24	A	99	E	33	A	95
26	E	62	A	99	E	69	A	95

Tabela 4 (continuação)

Composto	KG-1		RL		RPMI-8226	
	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)	Ab EC ₅₀ (μ M)	Inibição máxima (%)
Clofarabina	A	93	B	61	E	80
A	B	93	C	90	C	94
9	A	92	B	53	E	81
10	A	92	-	48	E	80
11	A	92	-	47	E	81
12	0,14	91	-	47	39,55	79
13	A	93	-	48	E	88
14	A	93	-	49	E	78
15	0,09	92	-	49	30,28	80
16	A	93	-	49	E	84
17	A	92	-	48	E	82
18	A	91	-	48	E	84
19	A	92	B	57	E	79
20	A	92	B	69	E	80
21	A	92	C	70	E	81
22	A	92	-	42	C	86
23	A	93	-	39	E	85
24	A	91	-	39	E	86
25	A	91	-	44	C	83
26	A	91	E	56	C	93

[00145] Como pode ser visto a partir das Tabelas 3 e 4, certos compostos da presente invenção foram mais ativos do que o ProTide A contra uma gama de diferentes linhagens

celulares de câncer.

Exemplo 28 - Estabilidade Metabólica

[00146] O ensaio foi realizado de acordo com o procedimento publicado (Kuhnz, W.; Gieschen, H. *Drug Metab. Dispos.* **1998**, *26*, 1120-1127).

[00147] Os hepatócitos criopreservados reunidos foram descongelados, lavados e ressuspensos em tampão Krebs-Henseleit (pH 7,3). A reação foi iniciada pela adição do composto de teste (concentração final de 1 µM) na suspensão celular, seguido de incubação em um volume final de 100 µL em uma placa de 96 poços de fundo plano por 0 min e 120 min, respectivamente, a 37°C / 5% CO₂. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de acetonitrila à mistura de incubação. As amostras foram, então, misturadas suavemente e brevemente em um agitador de placas, transferidas completamente para uma placa de 96 poços com fundo em V de 0,8 mL e centrifugadas a 2500 x g por 15 min à temperatura ambiente. Cada sobrenadante (150 µL) foi transferido para um tubo de cluster limpo, seguido por análise de HPLC-MS/MS em um sistema triplo quadrupolo da Thermo Electron.

[00148] Para comparação, o nucleosídeo parental e um

ProTide correspondente foram testados no mesmo ensaio.

[00149] Os resultados são mostrados nas Tabelas 5 e 6:

Tabela 5

Composto	Meia-vida média (min.) de hepatócitos humanos
D	53
5	18
8-Cl-Adenosina	> 120
B	139
8	27
Gemcitabina	-
C	24
4	15
FUDR	69
E	90
7	27
Cordicepina	48

Tabela 6

Composto	Meia-vida média (min.) de hepatócitos humanos
A	24
1	Na faixa de 20 a 100
2	Na faixa de 20 a 100
3	Na faixa de 20 a 100
Clofarabina	> 120

Exemplo 29 - Avaliação de clofarabina e difosfato fosforamidatos de clofarabina selecionados em um modelo de linhagem celular KG1a de leucemia mieloide aguda (LMA).

[00150] A clofarabina e os Exemplos 1 e 2 foram selecionados para análise para determinar se: (1) os compostos da presente invenção possuíam potência aumentada quando comparados ao composto parental e (2) os compostos da presente invenção preferivelmente alvejavam células-tronco leucêmicas (LSCs). Para estabelecer isso, a linhagem celular de leucemia mieloide aguda, KG1a, foi empregada, uma vez que manifesta uma divisão semelhante à célula-tronco menor com um imunofenótipo distinto (Lin⁻/CD34⁺/CD38⁻/CD123⁺). Os compostos foram avaliados ao longo de uma faixa de dose estendida. Além disso, os efeitos dos compostos na divisão de célula-tronco foram avaliados ao longo de toda a faixa de

dose. A DL₅₀ média (a concentração de droga necessária para matar 50% das células) da clofarabina foi de $1,69 \times 10^{-8}$ M. O Exemplo 1 mostrou um valor de DL₅₀ médio semelhante ($1,37 \times 10^{-8}$ M), enquanto o Exemplo 2 mostrou um aumento significativo dos valores médios de DL₅₀ ($4,38 \times 10^{-8}$ M e $7,10 \times 10^{-8}$ M, respectivamente).

[00151] Sob condições normóxicas, a divisão de LSC (Lin⁻/CD34⁺/CD38⁻/CD123⁺) constituía ~3,5% da linhagem celular total. No entanto, em condições hipóxicas (1% e 5% de oxigênio), a proporção de LSCs apresentou um aumento dependente do tempo (até 23,7%). Além disso, isso foi revertido quando a linhagem celular foi transferida de volta para condições normóxicas. Não houve diferença significativa na fração de LSCs nas culturas entre 1% e 5% de oxigênio. Ao considerar a potência relativa dos compostos em condições normóxicas e hipóxicas (5% de oxigênio), a clofarabina mostrou um aumento significativo na DL₅₀ média em condições hipóxicas (de $1,69 \times 10^{-8}$ M a $5,31 \times 10^{-8}$ M; $P = 0,01$). Em contraste, o Exemplo 1 não mostrou qualquer diferença significativa nos valores médios de DL₅₀.

Objetivos

1. Gerar uma curva de dose-resposta completa de citotoxicidade para uma série de compostos selecionados e

seus respectivos nucleosídeos parentais em células KG1a;

2. Estabelecer os efeitos dos compostos testados na divisão de LSC em toda a faixa de concentrações utilizadas;

3. Comparar os efeitos dos compostos testados em condições hipóxicas (1% e 5% de oxigênio);

4. Investigar a persistência de focos de γ H2A.X em LSCs e células de massa tumoral após tratamento com clofarabina e os compostos testados em condições hipóxicas.

Materiais e métodos

Condições de cultura de células KG1a

[00152] A linhagem celular KG1a da leucemia mieloide aguda (LMA) foi mantida em meio RPMI (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) suplementado com 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e soro fetal de bezerro a 20%. As células foram subsequentemente aliqüotadas (10^5 células/100 μ L) em placas de 96 poços e incubadas a 37°C em uma atmosfera normóxica (20% de oxigênio) ou hipóxica (1% ou 5% de oxigênio) umidificadas por 48 horas na presença de clofarabina, ou difosfato fosforamidatos de clofarabina da presente invenção (1×10^{-10} M - 1×10^{-6} M). Além disso, foram realizadas culturas de controle às quais nenhum fármaco foi adicionado. As células foram subsequentemente colhidas por centrifugação e analisadas por citometria de fluxo usando o

ensaio *Annexin V*.

Medição da apoptose *in vitro*

[00153] As células cultivadas foram colhidas por centrifugação e depois ressuspensas em 195 µL de tampão rico em cálcio. Subsequentemente, 5 µL de *Annexin V* (Caltag Medsystems, Botolph Claydon, Reino Unido) foram adicionados à suspensão celular, e as células foram incubadas no escuro por 10 minutos antes da lavagem. Finalmente, as células foram ressuspensas em 190 µL de tampão rico em cálcio, juntamente com 10 µL de iodeto de propídio. A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo imunofluorescente de duas cores, tal como descrito anteriormente. Subsequentemente os valores de DL₅₀ (dose necessária para matar 50% das células em cultura) foram calculados para cada análogo de nucleosídeo e difosfato fosforamidato.

Identificação imunofenotípica da divisão de células-tronco leucêmicas

[00154] As células KG1a foram cultivadas por 48 horas na presença de uma ampla faixa de concentrações de cada análogo de nucleosídeo e seu respectivo difosfato fosfiramato. As células foram, então, colhidas e marcadas com um coquetel de anticorpos anti-linhagem (PE-cy7), anti-CD34 (FITC), anti-CD38 (PE) e anti-CD123 (PERCP cy5). A subpopulação que expressa um fenótipo de células-tronco

leucêmicas (LSC) foi subsequentemente identificada e expressa como uma porcentagem de todas as células viáveis restantes na cultura. As porcentagens de células-tronco remanescentes foram, então, plotadas em um gráfico de dose-resposta e os efeitos do difosfato fosforamidato foram comparados com os nucleosídeos parentais.

Classificação celular

[00155] As células KG1a foram cultivadas em condições hipóxicas por 7 dias com o intuito de gerar 10^7 células e aumentar a porcentagem de células que expressam um fenótipo de LSC. Subsequentemente, LSCs $\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD38}^-/\text{CD123}^+$ e células de massa tumoral $\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD38}^+/\text{CD123}^+$ foram purificadas por classificação celular de alta velocidade usando um classificador celular FACS *Melody* (Becton Dickenson), e foram colocadas de novo em condições hipóxicas de cultura celular antes da adição de clofarabina ou difosfato fosforamidatos de clofarabina.

Ensaio de fosforilação de $\gamma\text{H2A.X}$

[00156] A fosforilação da variante de histona $\gamma\text{H2A.X}$ ocorre como uma resposta rápida a quebras de DNA de fita dupla. O *Phosphorylation Assay Kit* de $\gamma\text{H2A.X}$ (citometria de fluxo) é um ensaio à base de células formatado para detecção de citometria de fluxo de níveis de Histona $\gamma\text{H2A.X}$

fosforilada (Merck, Reino Unido). As células LSC e de massa tumoral foram cultivadas em placas de 96 poços na presença de clofarabina ou difosfato fosforamidatos de clofarabina. Após 2 horas de exposição ao fármaco, as células foram colhidas por centrifugação, depois fixadas e permeabilizadas em preparação para coloração e detecção. Histona γ H2A.X fosforilada na serina 139 é detectada pela adição do anti-fosfo-Histona γ H2A.X conjugado com APC. Em seguida, as células foram analisadas em um citômetro de fluxo para quantificar o número de células com coloração positiva para Histona γ H2A.X fosforilada.

Análise estatística

[00157] Os dados obtidos nesses experimentos foram avaliados usando *one-way* ANOVA. Todos os dados foram confirmados como gaussianos ou com aproximação gaussiana usando o teste *omnibus* K2. Os valores de DL₅₀ foram calculados a partir de regressão não linear e da linhagem de análise de melhor ajuste das curvas sigmoidais de dose-resposta. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Graphpad Prism 6.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA).

Resultados

Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

[00158] A sensibilidade *in vitro* do fármaco de células

KG1a foi avaliada utilizando o ensaio *Annexin V*/iodeto de propídio. As curvas sigmoidais de dose-resposta para cada composto testado são mostradas nas Figuras de 1A a 1C. Os resultados estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7

Composto	DL₅₀ média (nM)
Clofarabina	16,9
Exemplo 1	13,7
Exemplo 2	71,0

[00159] A clofarabina e os compostos da presente invenção mostraram potência na faixa nanomolar; clofarabina e Exemplo 1 tinham valores de DL₅₀ semelhantes, com o Exemplo 1 sendo ligeiramente mais potente.

Fração de células KG1a que expressa um fenótipo de LSC é modulada por hipóxia

[00160] As células KG1a foram cultivadas em condições normóxicas e hipóxicas e o fenótipo de LSC foi monitorado ao longo do tempo. Sob condições normóxicas, o fenótipo de LSC foi mantido de forma estável em aproximadamente 3,5% das células em cultura. Por outro lado, em condições hipóxicas, a fração das células em cultura que expressam o fenótipo de LSC aumentou de maneira dependente do tempo (Figura 3A). Quando as células foram, então, transferidas de volta para

condições de cultura normóxicas, a fração de células que expressa o fenótipo de LSC retornou a ~3,5%, novamente de maneira dependente do tempo (Figura 3B).

Comparação entre clofarabina e compostos da presente invenção em condições normóxicas e hipóxicas

[00161] Dado o aumento observado em um fenótipo de LSC sob condições hipóxicas, a potência relativa de clofarabina e dos compostos da presente invenção foi avaliada em células KG1a cultivadas sob condições normóxicas e hipóxicas (5% de O₂). A Figura 4 mostra as curvas sigmoidais de dose-resposta sobrepostas para a clofarabina e os compostos da presente invenção. Os resultados estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8

Composto	DL₅₀ média de Normoxia (nM)	DL₅₀ média de Hipóxia (nM)	Razão Normoxia / Hipóxia
Clofarabina	16,9	53,1	31,8
Exemplo 1	13,7	16,3	84,0
Exemplo 2	71,0	95,0	74,7

[00162] Como pode ser observado, a clofarabina mostrou uma redução significativa na potência quando usada em células cultivadas sob condições hipóxicas. Esta redução na potência não foi observada quando os Exemplos 1 e 2 foram utilizados

nas mesmas condições hipóxicas.

Clofarabina induz significativamente menos danos ao DNA nas LSCs do que nas células de massa tumoral em condições hipóxicas

[00163] Numa tentativa de entender por que as células tratadas com clofarabina eram menos sensíveis aos efeitos do fármaco em condições hipóxicas, as células foram cultivadas em condições hipóxicas e, em seguida, as LSC e frações de massa tumoral foram purificadas usando classificação celular de alta velocidade. As células purificadas foram, então, expostas ao fármaco por 2 horas e a quantidade de dano ao DNA foi quantificada usando um ensaio de fosforilação de γ H2A.X. A Figura 5 exibe que o nível de dano ao DNA nas LSCs foi significativamente menor do que nas células de massa tumoral após o tratamento com clofarabina. Em contraste, os Exemplos 1 e 2 induziram níveis semelhantes de dano ao DNA tanto nas LSCs quanto nas células de massa tumoral.

1. Em termos de alvejamento às células-tronco, todos os compostos testados mostraram evidências de alvejamento às células-tronco em concentrações acima de 10^{-8} M. O Exemplo 1 mostrou uma tendência em direção ao aumento da seletividade contra LSCs Lin⁻/CD34⁺/CD38⁻/CD123⁺.

2. O fenótipo de LSC mostrou-se induzível sob condições hipóxicas e isso foi revertido quando as células foram

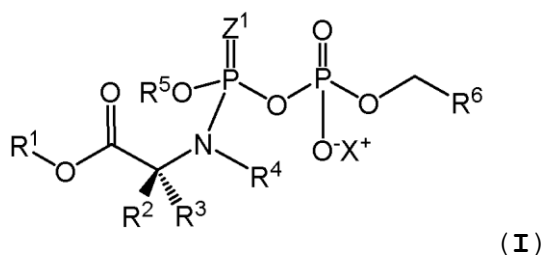
reintroduzidas em condições de cultura normóxicas. A dinâmica das mudanças na fração de LSC sugere uma plasticidade no fenótipo, em vez de uma expansão / contração seletiva em uma subpopulação fixa de LSC.

3. A clofarabina mostrou uma redução significativa na potência quando usada em células cultivadas sob condições hipóxicas. Esta redução na potência não foi observada quando os Exemplos 1 e 2 foram utilizados nas mesmas condições hipóxicas. Muitos cânceres existem em um estado hipóxico no corpo humano.

4. Uma explicação para a potência reduzida de clofarabina em condições hipóxicas é que há uma expansão significativa da fração de LSC nessas condições e as LSCs apresentaram danos no DNA significativamente menores, medidos pela fosforilação de γ H2A.X, após exposição em curto prazo à clofarabina. Em contraste, os Exemplos 1 e 2 induziram níveis semelhantes de dano ao DNA nas células de massa tumoral e nas LSCs com as mesmas condições.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula (I), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, **caracterizado por** ter a fórmula (I):



em que:

- R¹ é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de alquil-C₁-C₂₄, alquenil-C₃-C₂₄, alquinil-C₃-C₂₄, alquilenos-C₀-C₄-cicloalquil-C₃-C₈ e aril-alquilenos-C₀-C₄;

- R² e R³ são cada um, independentemente em cada ocorrência, selecionados a partir de H, alquil-C₁-C₆ e alquilenos-C₁-C₃-R⁷; ou R² e R³ em conjunto com o átomo ao qual eles estão ligados formam um grupo cicloalquil ou heterocicloalquil com 3 a 6 membros;

- R⁴ é, independentemente em cada ocorrência, H ou alquil-C₁-C₄; ou

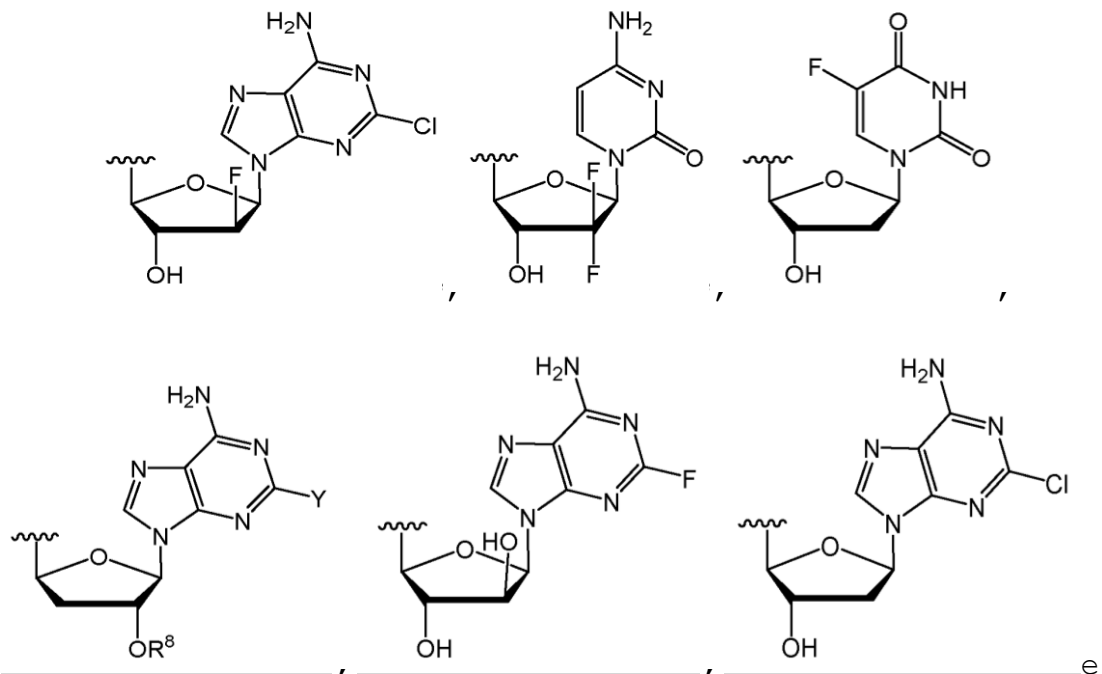
- R⁴, um grupo selecionado a partir de R² e R³ e os átomos aos quais eles estão ligados podem formar um grupo heterocicloalquil com 3 a 6 membros;

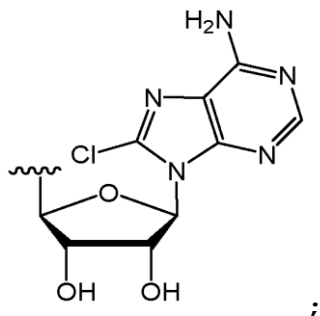
- R⁵ é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de aril, heteroaril com 5, 6, 9 ou 10

membros, cicloalquil-C₃-C₈, heterocicloalquil com 3 a 7 membros, alquilenos-C₁-C₃-R^{5a} e alquil-C₁-C₈, estando o referido aril opcionalmente fundido ao cicloalquil-C₆-C₈;

-R^{5a} é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de aril, heteroaril com 5, 6, 9 ou 10 membros, cicloalquil-C₃-C₈, heterocicloalquil com 3 a 7 membros, estando o referido aril opcionalmente fundido ao cicloalquil-C₆-C₈;

- R⁶ é independentemente selecionado a partir de:

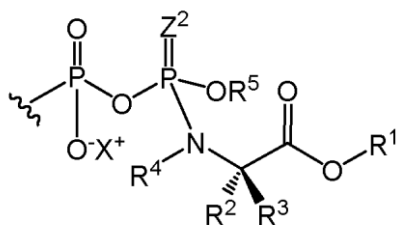




;

- R^7 é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de aril, imidazol, indol, SR^a , OR^a , CO_2R^a , $CO_2NR^aR^a$, NR^aR^b e $NH(=NH)NH_2$;

- R^8 é independentemente selecionado a partir de H e



;

- Z^1 e Z^2 são, cada um, independentemente selecionados a partir de O e S;

- Y é independentemente selecionado a partir de H, F, Cl e OMe;

- X é, independentemente em cada ocorrência, um cátion farmacologicamente aceitável;

em que qualquer grupo aril é tanto fenil ou naftil;

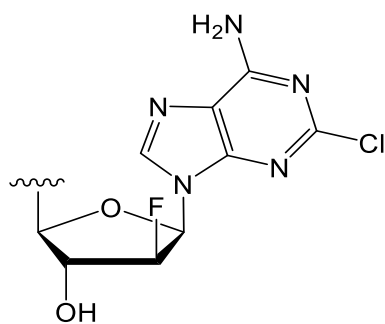
em que quando qualquer um dentre R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 ou R^7 é um alquil, cicloalquil, heterocicloalquil, aril ou heteroaril; o grupo alquil, cicloalquil, heterocicloalquil,

aril ou heteroaril é opcionalmente substituído com 1 a 4 substituintes selecionados a partir de: halo, nitro, ciano, NR^aR^a , $\text{NR}^a\text{S}(\text{O})_2\text{R}^a$, $\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{R}^a$, $\text{NR}^a\text{CONR}^a\text{R}^a$, $\text{NR}^a\text{CO}_2\text{R}^a$, OR^a , SR^a , SOR^a , SO_3R^a , SO_2R^a , $\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^a$, CO_2R^a , $\text{C}(\text{O})\text{R}^a$, CONR^aR^a , $\text{CR}^a\text{R}^a\text{NR}^a\text{R}^a$, alquil- $\text{C}_1\text{-C}_4$, alquenil- $\text{C}_2\text{-C}_4$, alquinil- $\text{C}_2\text{-C}_4$ e haloalquil- $\text{C}_1\text{-C}_4$;

em que R^a é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de: H e alquil- $\text{C}_1\text{-C}_4$; e R^b é, independentemente em cada ocorrência, selecionado a partir de: H, alquil- $\text{C}_1\text{-C}_4$ e $\text{C}(\text{O})\text{-alquil-}\text{C}_1\text{-C}_4$.

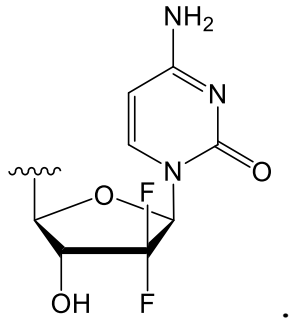
2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** R^4 ser H.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **caracterizado por** R^6 ser

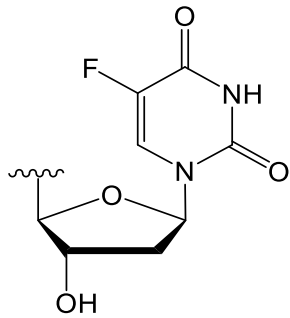


4. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou

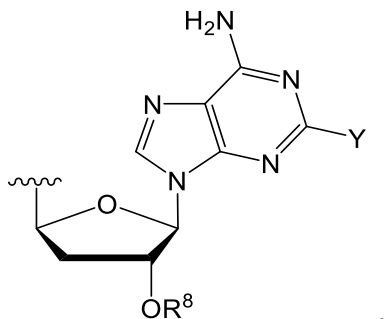
reivindicação 2, **caracterizado por** R⁶ ser



5. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **caracterizado por** R⁶ ser



6. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **caracterizado por** R⁶ ser



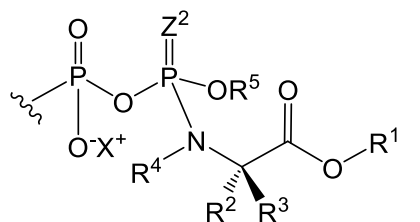
7. Composto, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por** Y ser H.

8. Composto, de acordo com a reivindicação 6,

caracterizado por Y ser F.

9. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, **caracterizado por** R⁸ ser H.

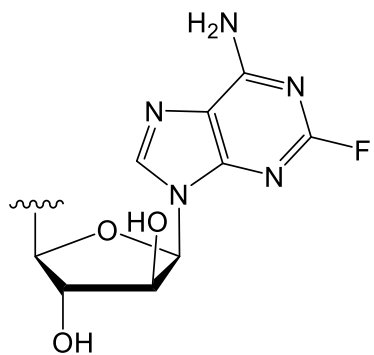
10. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, **caracterizado por** R⁸ ser



11. Composto, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** Z² ser O.

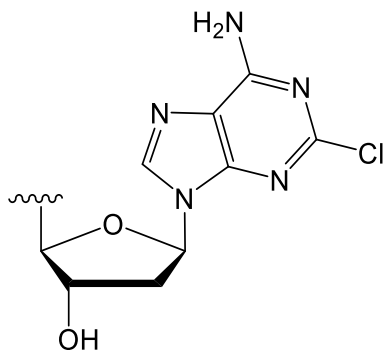
12. Composto, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** Z² ser S.

13. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **caracterizado por** R⁶ ser

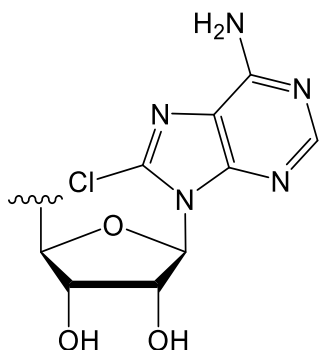


14. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou

reivindicação 2, **caracterizado por** R⁶ ser



15. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **caracterizado por** R⁶ ser



16. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizado por** R¹ ser selecionado a partir de cicloalquil-C₅-C₇, alquil-C₁-C₈ e benzil.

17. Composto, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado por** R¹ ser benzil.

18. Composto, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado por** R¹ ser alquil-C₁-C₈, por exemplo, etil.

19. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, **caracterizado por** R³ ser H.

20. Composto, de acordo com qualquer uma das

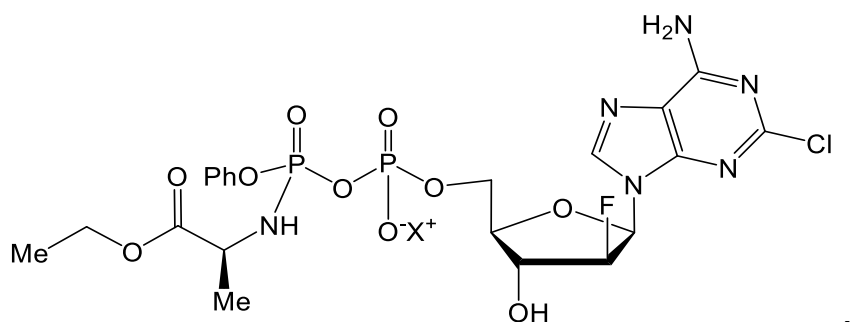
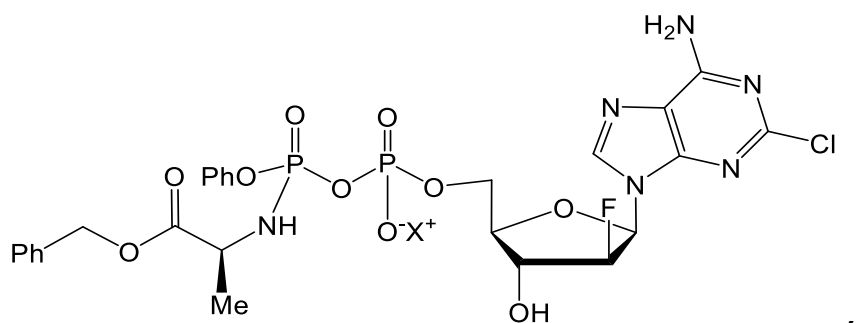
reivindicações 1 a 19, **caracterizado por** R² ser alquil-C₁-C₄.

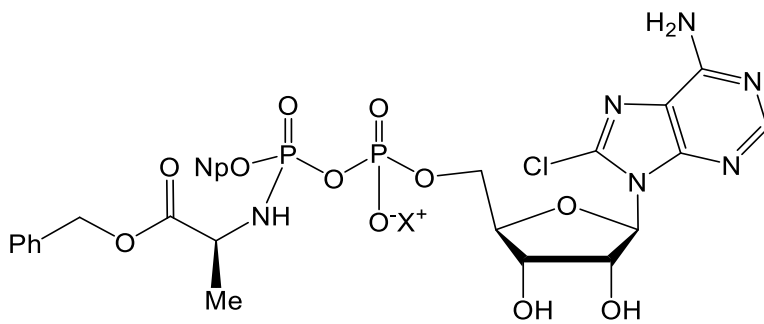
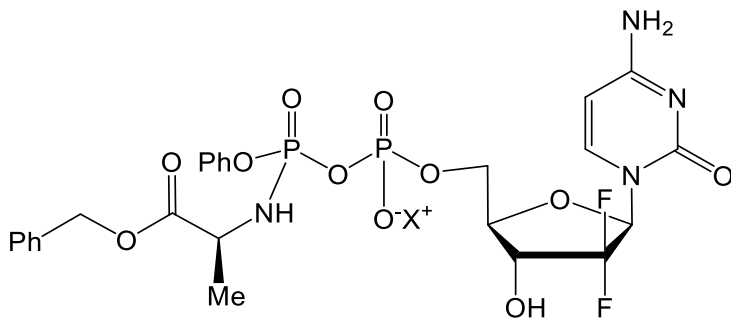
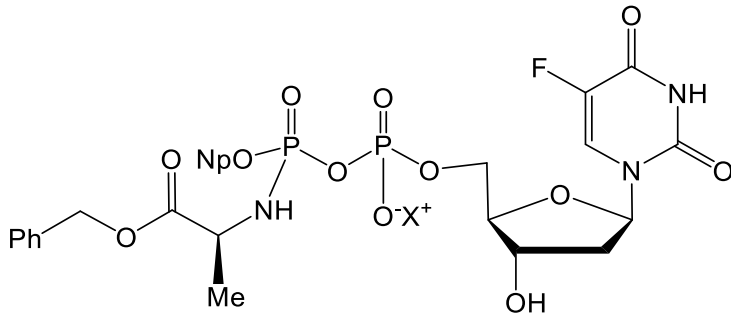
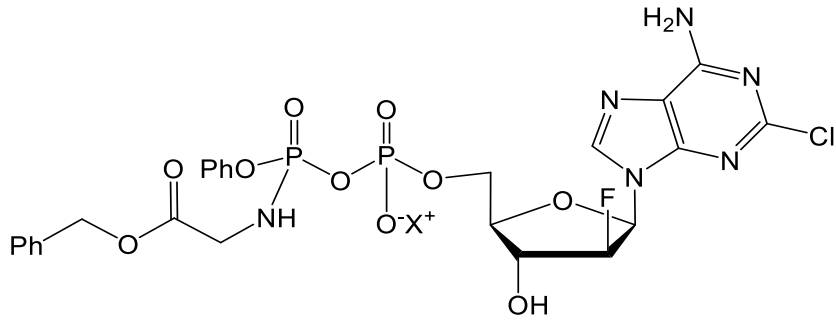
21. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, **caracterizado por** R² ser H.

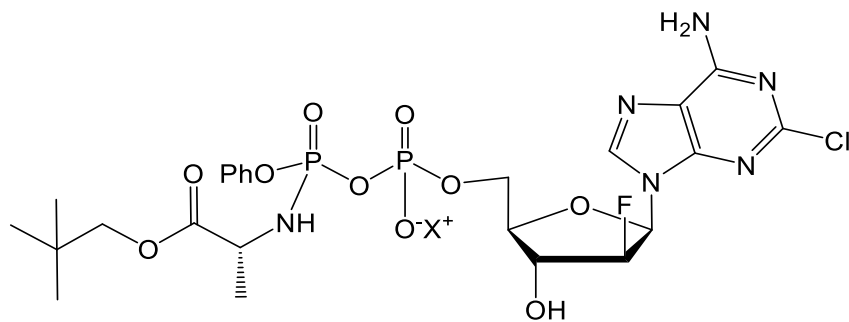
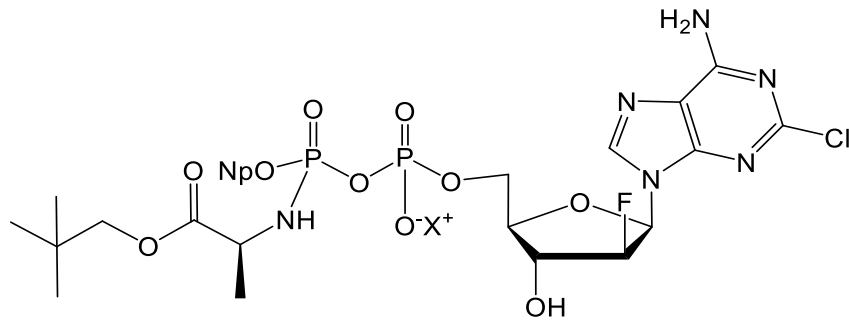
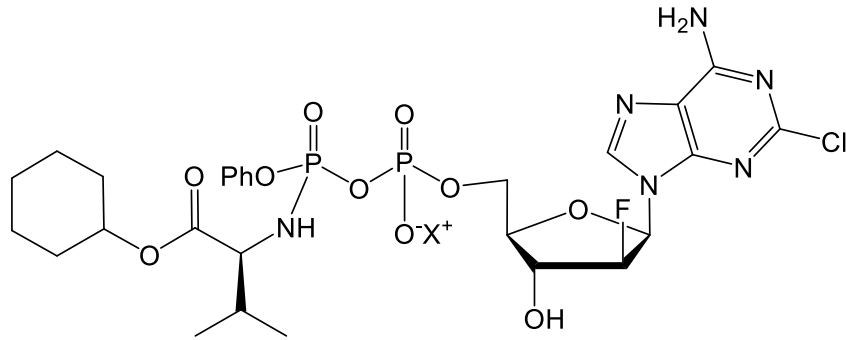
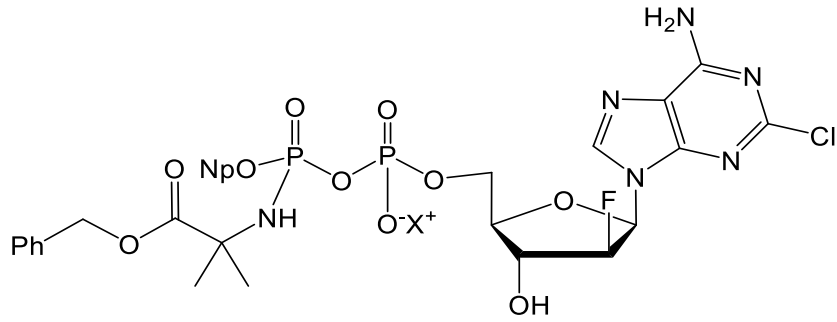
22. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, **caracterizado por** R⁵ ser fenil.

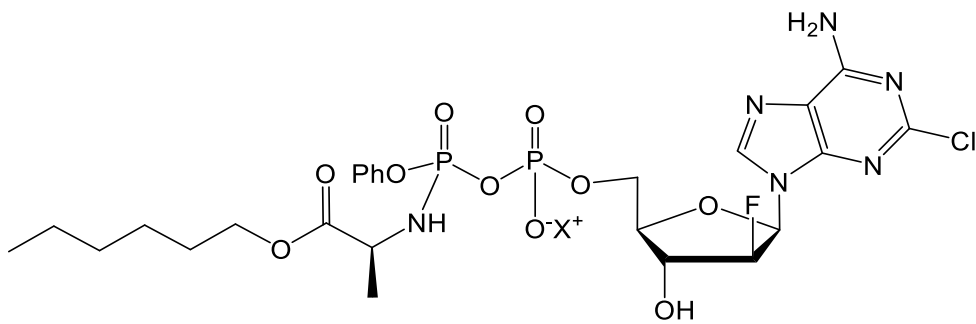
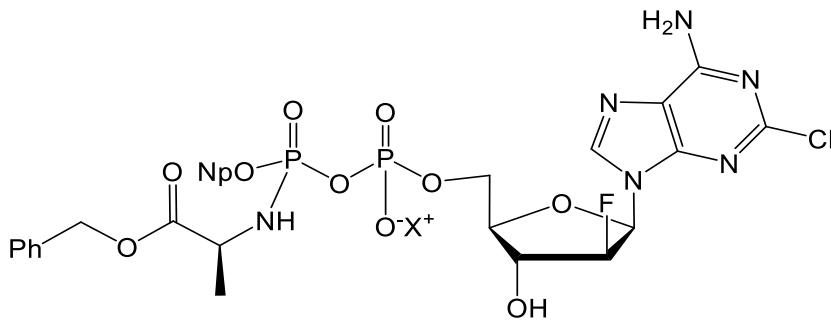
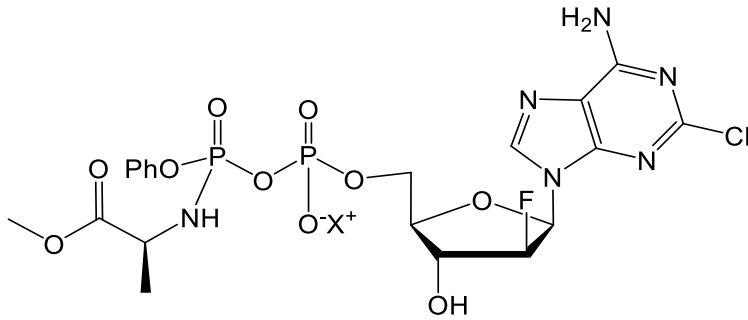
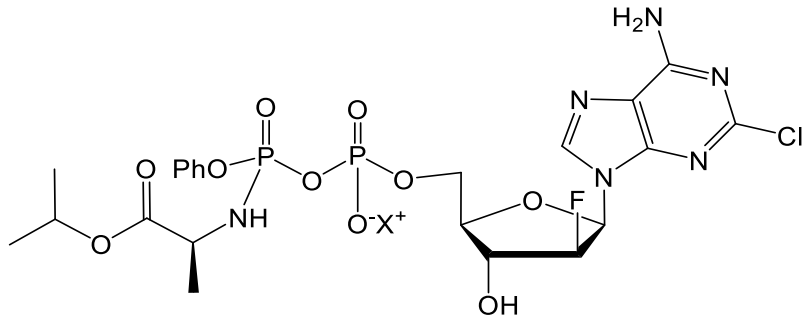
23. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, **caracterizado por** R⁵ ser naftil.

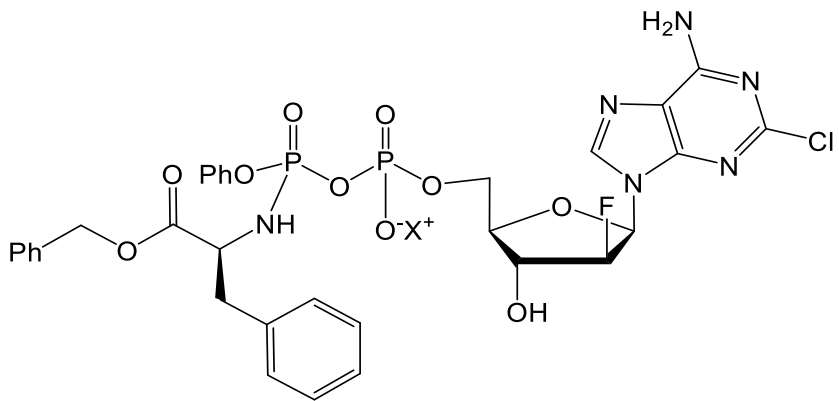
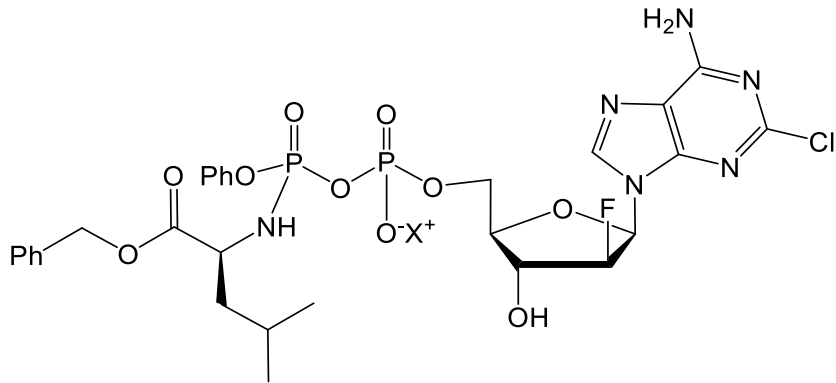
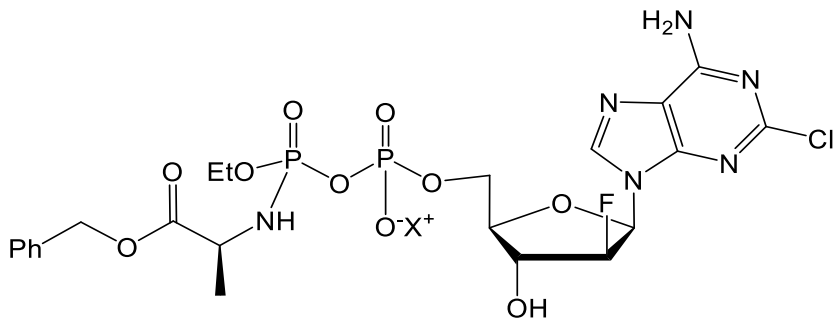
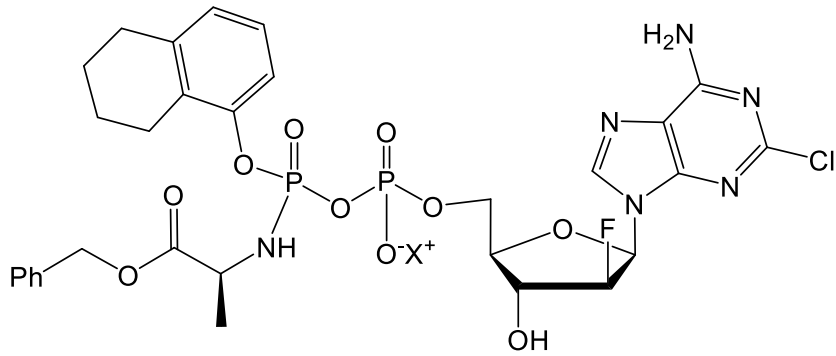
24. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o composto de fórmula (I) ser selecionado a partir de:

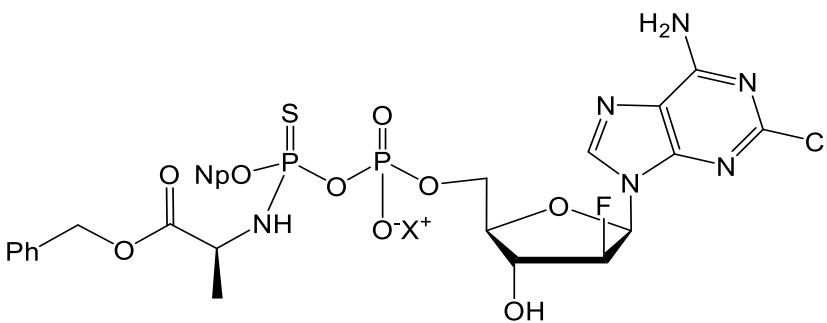
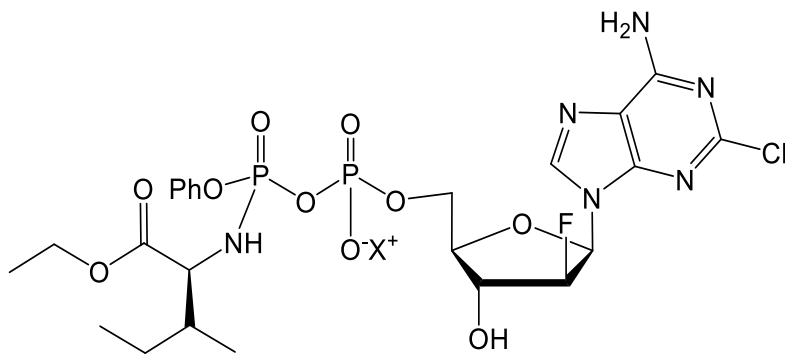
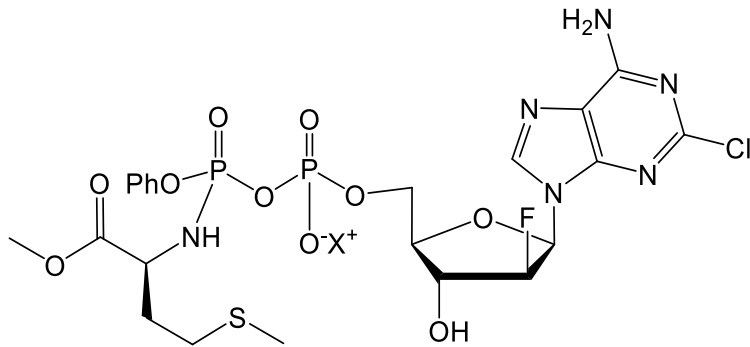
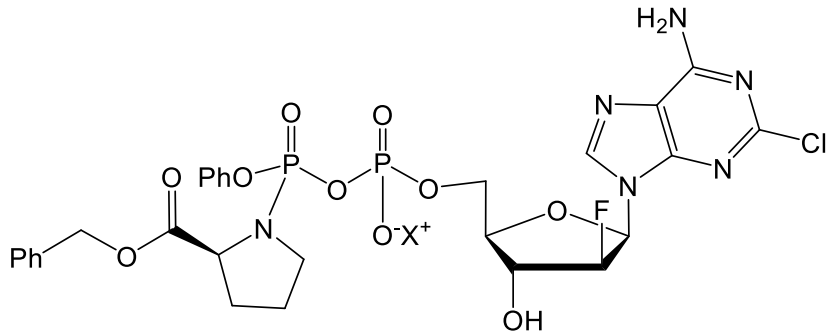












25. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, **caracterizado por** X⁺ ser um cátion

metálico ou um cátion amônio.

26. Uso de um composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 **caracterizado por** ser para a fabricação de um medicamento para tratamento de câncer.

27. Uso, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado por** o câncer ser leucemia ou linfoma.

28. Uso, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado por** o câncer ser uma leucemia selecionada a partir do grupo que consiste em leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoide aguda (LLA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfoide crônica (LLC) e leucemia bifenotípica aguda (LBA).

29. Uso, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado por** o câncer ser um linfoma selecionado a partir do grupo que consiste em linfoma de Hodgkin e linfoma não Hodgkin.

30. Composição farmacêutica **caracterizada por** compreender compostos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 e pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

RESUMO

"COMPOSTOS DE DIFOSFATO FOSFORAMIDATO DE NUCLEOSÍDEOS, SEU USO NO TRATAMENTO DE CÂNCER E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO OS MESMOS".

A presente invenção se refere a compostos compreendendo um sal de um difosfato fosforamidato de um fármaco nucleosídeo, por exemplo, clofarabina. Os compostos são úteis no tratamento de câncer, por exemplo, leucemia.