

MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 94.178

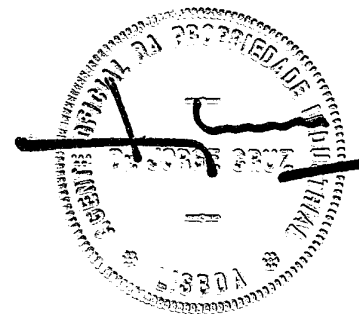
NOME: BEECHAM GROUP p.l.c., inglesa, industrial, com sede em SB House, Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9BD, Inglaterra

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE PURINA CONTENDO FOSFORO"

INVENTORES: MICHAEL RAYMOND HARNDEN e DAVID MALCOLM DUCKWORTH

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883.
30 de Maio de 1989 sob o No.8912348.3, no Reino Unido

94.178



BEECHAM GROUP p.l.c.

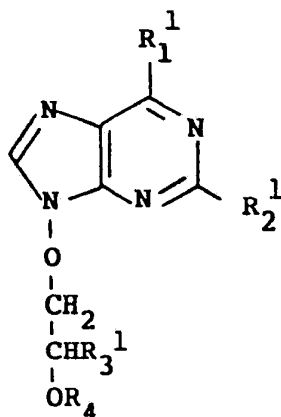
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE PURINA CONTENDO FÓSFORO"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

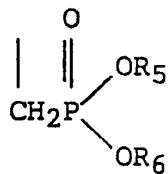
Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de isômero (R) ou do isômero (S) de um composto com a fórmula (IA), facultativamente em mistura com até 45% da mistura, em peso, do correspondente isômero (S) ou isômero (R), respectivamente:



(IA)

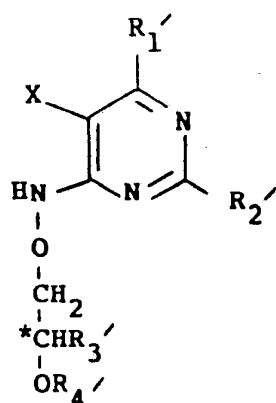
em que R_1^1 é hidroxí ou amino; R_2^1 é amino ou hidrogénio; R_3^1 é, por exemplo, hidroximetilo ou aciloximetilo; e R_4 é, por exemplo, um grupo com a fórmula:



em que R_5 e R_6 são independentemente seleccionados de entre hidrogénio, C_1-C_6 alquilo e fenilo substituído facultativamente.

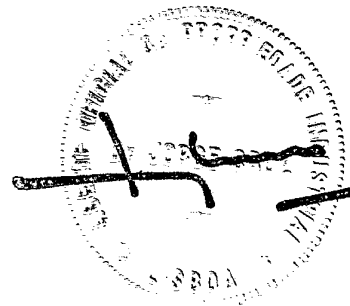
Estes compostos são úteis no tratamento de infecções a vírus ou de doenças neoplásticas.

O processo de preparação consiste, por exemplo, no fecho do anel imidazole de um composto com a fórmula (II):



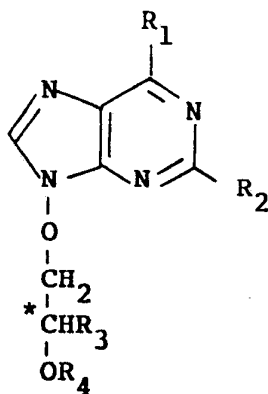
(II)

em que X é um grupo capaz de ciclização a fim de formar um anel imidazole, tal como amino ou um derivado de amino, por exemplo, formilamino.



O presente invento relaciona-se com uma forma isomérica de compostos químicos apresentando actividade antiviral, com processos para a preparação de tais isómeros e com a sua utilização como agentes farmacêuticos.

A EP-A-319 228 (Beecham Group p.l.c.), cuja matéria objecto do mesmo é incorporada nesta Memória Descritiva como referência, revela compostos antivirais de fórmula (I) e seus sais farmacêuticamente aceitáveis:



(I)

em que

R_1 é hidroxil, amino, cloro ou OR_7 ;

em que

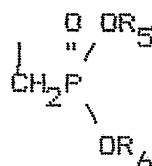
R_7 é C_{1-6} alquilo, fenilo ou fenil- C_{1-6} alquilo, em que qualquer das porções fenilo pode ser substituída por um ou dois substituintes seleccionados a partir de halo, C_{1-4} alquilo ou C_{1-4} alcoxi;



R_2 é amino ou, quando R_1 é hidroxil ou amino, R_2 pode também ser hidrogénio;

R_3 é hidrogénio, hidroximetil ou aciloximetil; e

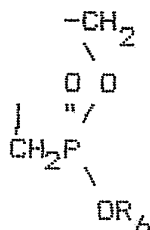
R_4 é um grupo com a fórmula:



em que

R_5 e R_6 são independentemente seleccionados de entre hidrogénio, C_1-C_6 alquilo e fenilo substituído facultativamente; ou

R_3 e R_4 em conjunto são:



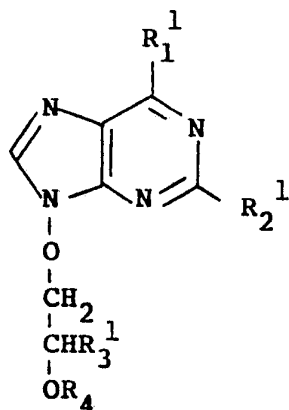
em que

R_6 é tal como foi definido anteriormente.

Os Exemplos 6-10, 15 e 16 descrevem a mistura racémica (R,S) dos compostos em que R_3 é diferente de hidrogénio (átomo de carbono assimétrico assinalado por "*" na fórmula (I)). Os isómeros (R) e (S) puros foram agora preparados e mostraram possuir acitividade antiviral.



De acordo com o anteriormente exposto, o presente invento fornece o isômero (R) ou o isômero (S) de um composto com a fórmula (IA), facultativamente em mistura com até 45% da mistura, em peso, do correspondente isômero (S) ou isômero (R), respectivamente:



(IA)

em que

R_1^1 é hidroxí ou amino;

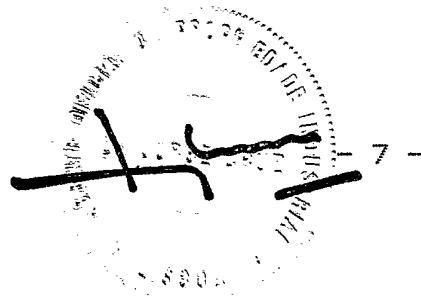
R_2^1 é amino ou hidrogénio;

R_3^1 é hidroximetilo ou aciloximetilo; e

R_4 é como definido relativamente à fórmula (I).

Quando R_1^1 é hidroxí e R_2^1 é amino, o composto com a fórmula (IA) é um derivado da guanina;

Quando R_1^1 é amino e R_2^1 é hidrogénio, o composto com a fórmula (IA) é um derivado da adenina;



Quando R_1^1 é hidroxí e R_2^1 é hidrogénio, o composto com a fórmula (IA) é um derivado da hipoxantina; e

Quando R_1^1 e R_2^1 são ambos grupos amino, o composto com a fórmula (IA) é um derivado da 2,6-diaminopurina.

Frequentemente, o composto com a fórmula (I) é uma guanina ou um derivado da adenina.

Exemplos apropriados do grupo acilo em R_3^1 quando aciloximetilo, incluem acilo carboxílico, tal como C_{1-7} alcanoilo e benzoilo substituído facultativamente no anel fenilo tal como é definido a seguir para R_5/R_6 . Grupos acilo preferidos incluem acetilo, propionilo, butirilo, heptanoilo e hexanoilo.

Exemplos apropriados de R_5 e R_6 incluem hidrogénio, metilo, etilo, n- e iso-propilo, n-, sec-, iso- e terc-butilo, e fenilo substituído facultativamente por um, dois ou três grupos ou átomos seleccionados de entre halogénio, tal como fluoro, cloro, bromo, e C_{1-4} alquilo ou C_{1-4} alcoxi em que a porção alquilo é seleccionada de entre as indicadas anteriormente para R_5/R_6 .

Exemplos de sais farmacêuticamente aceitáveis do composto de fórmula (I) são os sais de adição de ácidos formados com um ácido farmacêuticamente aceitável, tal como ácido clorídrico, ácido ortofosfórico e ácido sulfúrico. Os sais farmacêuticamente aceitáveis incluem também os que são formados com bases orgânicas, de preferência com aminas, tais como etanolaminas ou diaminas; e com metais alcalinos, tais como sódio e potássio.

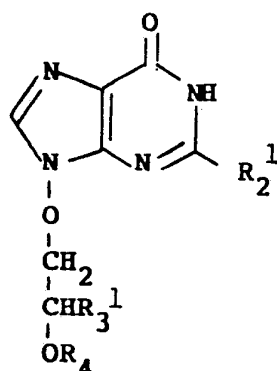
Quando o composto de fórmula (IA) contém um grupo fosfonato, os sais adequados incluem sais de metal, tais como



sais de metal alcalino, por exemplo sódio ou potássio, sais de metal alcalino-terroso, tal como cálcio ou magnésio, e sais de amônio ou amônio substituído, por exemplo aqueles com alquil inferior-aminas, tais como trietilamina, hidroxi-alquil inferior-aminas tais como 2-hidroxi-etilamina, bis-(2-hidroxi-etil)-amina ou tris-(2-hidroxi-etil)-amina.

Os compostos com a fórmula (IA) incluindo os seus sais de metal alcalino podem formar solvatos tais como hidratos e estes são incluídos sempre que é aqui referido um composto com a fórmula (IA) ou um seu sal.

Será tomado em consideração que, quando R_1^1 é hidroxi na fórmula (IA) o composto existe na forma tautomérica predominante com a estrutura (IB):



(IB)

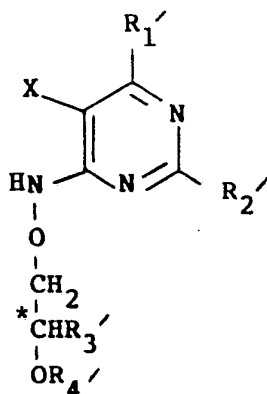
De preferência, o isómero (R) ou o isómero (S) de um composto de fórmula (IA) ou um seu derivado, como definido, está numa forma contendo desde 0 até 40%, 0 até 30%, 0 até 20% ou 0 até 10% do correspondente isómero (S) ou isómero (R), respectivamente. Com maior preferência, o isómero (R) ou o isómero (S) está



numa forma contendo de 0 até 5% do correspondente isómero (S) ou isómero (R), respectivamente. Com ainda maior preferência, o isómero (R) ou o isómero (S) está numa forma contendo 0% ou uma quantidade não detectável do correspondente isómero (S) ou isómero (R), respectivamente. Todas as percentagens aqui anteriormente referidas são percentagem da mistura em peso. A presença do isómero indesejado pode, por exemplo, ser rotineiramente detectada pela comparação da rotação óptica de uma amostra da mistura isomérica desejada com a de uma amostra pura do isómero desejado, ou pelo espectro de ^1H RMN de uma amostra da mistura isomérica na presença de um reagente de deslocamento quiral ou agente de solvatação quiral.

O invento também proporciona um processo para a preparação de um composto com a fórmula (I), ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, processo esse que compreende ou

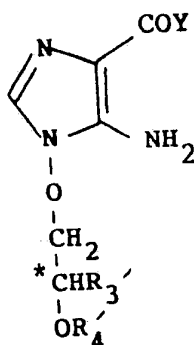
- i) o fecho do anel imidazole de um composto com a fórmula (II):



(II)

em que X é um grupo capaz de ciclização a fim de formar um anel imidazole, tal como amino ou um derivado de amino, por exemplo, formilamino; ou

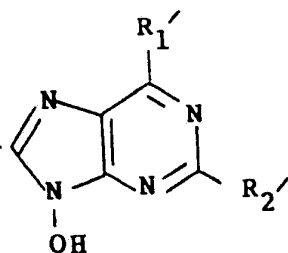
ii) o fecho do anel pirimidina de um composto com a fórmula (III):



(III)

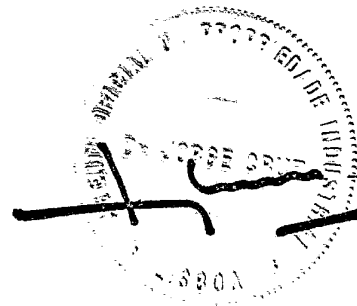
em que Y é amino ou C₁₋₆ alcoxi, com um agente de condensação capaz de ciclização a fim de formar um anel pirimidina tendo um substituinte 2-R₂', para dar origem a um composto com a fórmula (I) em que R₁ é hidroxil e R₂ é amino; ou

iii) a condensação de um composto com a fórmula (IV):



(IV)

com uma intermediário de cadeia lateral com a fórmula (V):



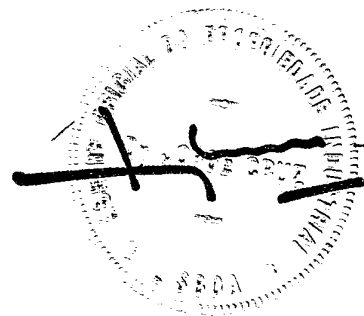
em que Z é um grupo separável e o átomo de carbono marcado com "*" nas fórmulas (II), (III) e (V) está 55% ou mais na configuração que resulta no isômero (R) ou no isômero (S) de um composto de fórmula (IA);

e em que nas fórmulas (II) a (V), R_1' , R_2' , R_3' e R_4' são R_1^1 , R_2^1 , R_3^1 e R_4 respectivamente, ou grupos ou átomos neles convertíveis; e em seguida, quando desejado ou necessário, a conversão de R_1' , R_2' , R_3' e/ou R_4' , quando diferentes de R_1^1 , R_2^1 , R_3^1 e/ou R_4 em R_1^1 , R_2^1 , R_3^1 e/ou R_4 respectivamente, e/ou a conversão de R_1' , R_2' , R_3' e/ou R_4' quando R_1^1 , R_2^1 , R_3^1 e/ou R_4 , em outros R_1^1 , R_2^1 , R_3^1 e/ou R_4 .

O processo i) pode ser realizado, de preferência quando X é formilo, usando um agente de condensação de ciclização, tal como acetato de dietoximetilo ou ortoformato de trietilo, ou por fusão.

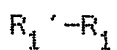
O processo ii) é de preferência realizado de acordo com os métodos descritos em EP-A-242 482, cuja matéria objecto do mesmo é aqui incorporado como referência.

O processo iii) pode ser realizado com valores apropriados para Z incluindo halo, tal como cloro, bromo e iodo, de preferência iodo; ou outros grupos facilmente deslocáveis por nucleófilos, tais como mesiloxi ou tosiloxi. A reacção tem lugar de preferência num solvente inerte, tal como dimetilformamida a 0-50°C, de preferência à temperatura ambiente. Quando Z é hidroxil, a reacção tem lugar na presença de um catalisador de desidratação, tal como azodicarboxilato de dietilo na presença de



trifenilfosfina. Quando Z é halo, a reação tem lugar de preferência na presença de uma base tal como carbonato de potássio.

Exemplos de conversões de grupos variáveis são como se segue:

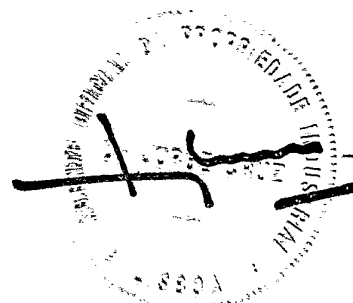


a) Um grupo hidroxil R_1^1 pode ser convertido em R_1' que seja cloro, por cloração utilizando um reagente tal como oxidocloreto de fósforo, de preferência na presença de cloreto de tetraetilamônio e dimetilalanilina (como aceitador de ácido) em CH_3CN a temperaturas de refluxo, de acordo com o método descrito por M.J. Robins e B. Ozanski Can. J. Chem, 57, 2601 (1981).

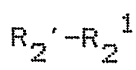
b) Um grupo cloro R_1' pode ser convertido em R_1 que seja hidroxil por hidrólise utilizando ácido mineral aquoso, tal como ácido clorídrico, ou com maior preferência, utilizando um ácido orgânico, tal como ácido fórmico a uma temperatura elevada, apropriadamente 70-150°C, de preferência à volta de 100°C.

c) Um grupo cloro R_1' pode ser convertido em R_1 que seja amino por tratamento com amoníaco num alanol inferior, tal como etanol ou metanol num autoclave a 100°C, durante um período de cerca de 7 horas, ou alternativamente, por tratamento com azeto de sódio em dimetilformamida (formando um intermediário em que R_1^1 seja N_3), seguido por redução com formato de amónio/paládio sobre carvão vegetal, em metanol.

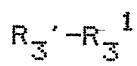
d) Um grupo alcoxi R_1' , tal como metoxi, pode ser convertido em hidroxil R_1^1 pelos métodos de D.R. Haines, J. Med. Chem. 1987, 30, 943 e K. K. Ogivie e H. R. Hanna, Can. J. Chem. 1984, 62, 2702.



e) Um grupo amino protegido R_1' , tal como tritilamino, pode ser convertido em amino, por tratamento com ácido acético aquoso, de preferência ácido acético a 80% a uma temperatura elevada, à volta de 80°C. R_1' pode também ser ftalimido, o qual pode ser convertido em amino por tratamento com metil-hidrazina ou hidrazina num solvente inerte, tal como diclorometano, à temperatura ambiente.



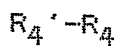
a) R_2' pode ser amino protegido, tal como formilamino, o qual pode ser convertido em R_2^1 que seja amino por hidrólise.



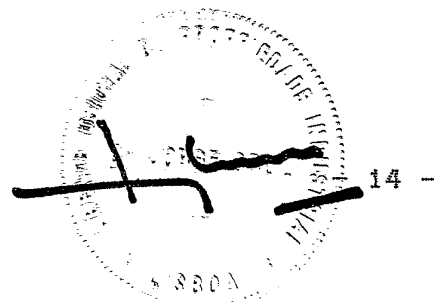
a) Hidroximetilo R_3^1 pode ser convertido em aciloximetilo por processos de acilação convencionais.

b) R_3' pode ser hidroximetilo protegido, o qual pode ser convertido em hidroximetilo R_3^1 por métodos de desprotecção convencionais.

Exemplos apropriados de grupos protectores e sua remoção, são tal como foram descritos em EP-A-242 482 e 319 228. Um grupo protector particularmente apropriado inclui também o grupo t-butildifenilsililo, removível por tratamento com ácido aquoso, tal como ácido trifluoroacético, à temperatura ambiente.



a) Quando R_5 e R_6 em R_4 são diferentes de hidrogénio, eles podem ser convertidos em R_5 e R_6 que sejam hidrogénio, utilizando um reagente de desesterificação, tal como brometo de



trimetilsililo num solvente aprótico tal como diclorometano ou dimetilformamida à temperatura ambiente, tal como é descrito por C.E. McKenna et. al. J.C.S. Chem. Comm., 1979, 739.

A conversão selectiva de um de entre R_5 e R_6 em hidrogénio, pode ser realizada por tratamento com ião hidróxido, tal como é descrito por Rabinowitz JACS 1960, 82, 4564.

b) R_4' pode ser hidrogénio, o qual pode ser convertido em R_4 , por meio de tratamento com QR_4 em que Q é um grupo separável e R_4 é como definido. Q é de preferência um grupo tosiloxi. As condições para esta reacção são i) formação preliminar de um alcóxido utilizando uma base, tal como hidreto de sódio, num solvente aprótico, por exemplo dimetilformamida ii) reacção com QR_4 aproximadamente à temperatura ambiente. A reacção é como descrito em A. Holy et al., Collect. Czech. Chem. Comm., 1982, 47, 3447.

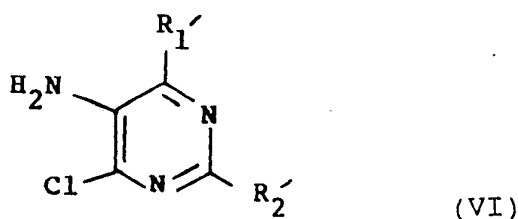
Neste caso, R_5 e R_6 são, de preferência, diferentes de hidrogénio.

c) R_4' pode ser hidrogénio, o qual pode ser convertido, quando R_3 for hidroximetilo, em R_4 que seja $CH_2PO(OH)(OR_5)$, por meio de tratamento com $ClCH_2PCl_2$ seguido por tratamento com uma base, seguida por OR_5^- , de acordo com o método descrito por A. Holly et al., Czech. Chem. Comm., 1985, 50, 1507; ibid 1987, 52, 2775.

d) Quando R_5 é hidrogénio, e R_3^1 é hidroximetilo, eles podem ser convertidos num composto em que R_3^1 e R_4 formam, em conjunto, um fosfonato cíclico, por reacção com N,N-diciclo-hexil-4-morfolinocarboxamidina na presença de um catalisador de desidratação, tal como N,N-diciclo-hexilcarbodi-imida.

Será tomado em consideração que as conversões atrás referidas podem ter lugar em qualquer ordem desejada ou necessária, tendo como objectivo o desejado composto final com a fórmula (I).

Os intermediários com a fórmula (II) podem ser preparados a partir do correspondente composto com a fórmula (VI):



e por meio de intermediários com a fórmula (V) em que Z é OH, tal como foi aqui anteriormente definido, de acordo com os métodos descritos em EP-A-242 482, isto é, por conversão do composto com a fórmula (V) em que Z é OH no derivado ftalimidooxi seguindo-se reacção com metil-hidrazina.

O composto com a fórmula (VI) em que R_1' é cloro e R_2' é amino, é um composto conhecido tal como foi descrito por Temple *et al.* J. Org. Chem., 40 (21), 3141, 1975.

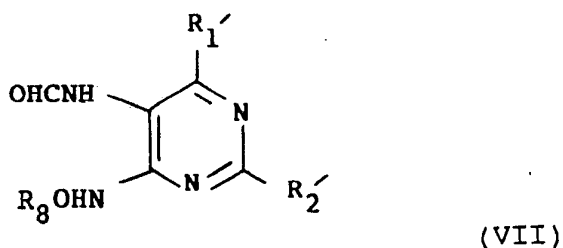
O composto com a fórmula (VI) em que R_1' é cloro e R_2' é hidrogénio é um composto comercialmente disponível.

Intermediários com a fórmula (III) podem ser preparados de acordo com os métodos geralmente descritos em EP-A-242 482.

Compostos com a fórmula (IV) são preparados a partir de compostos com a fórmula (VI) em que o grupo 5-amino é formilado,



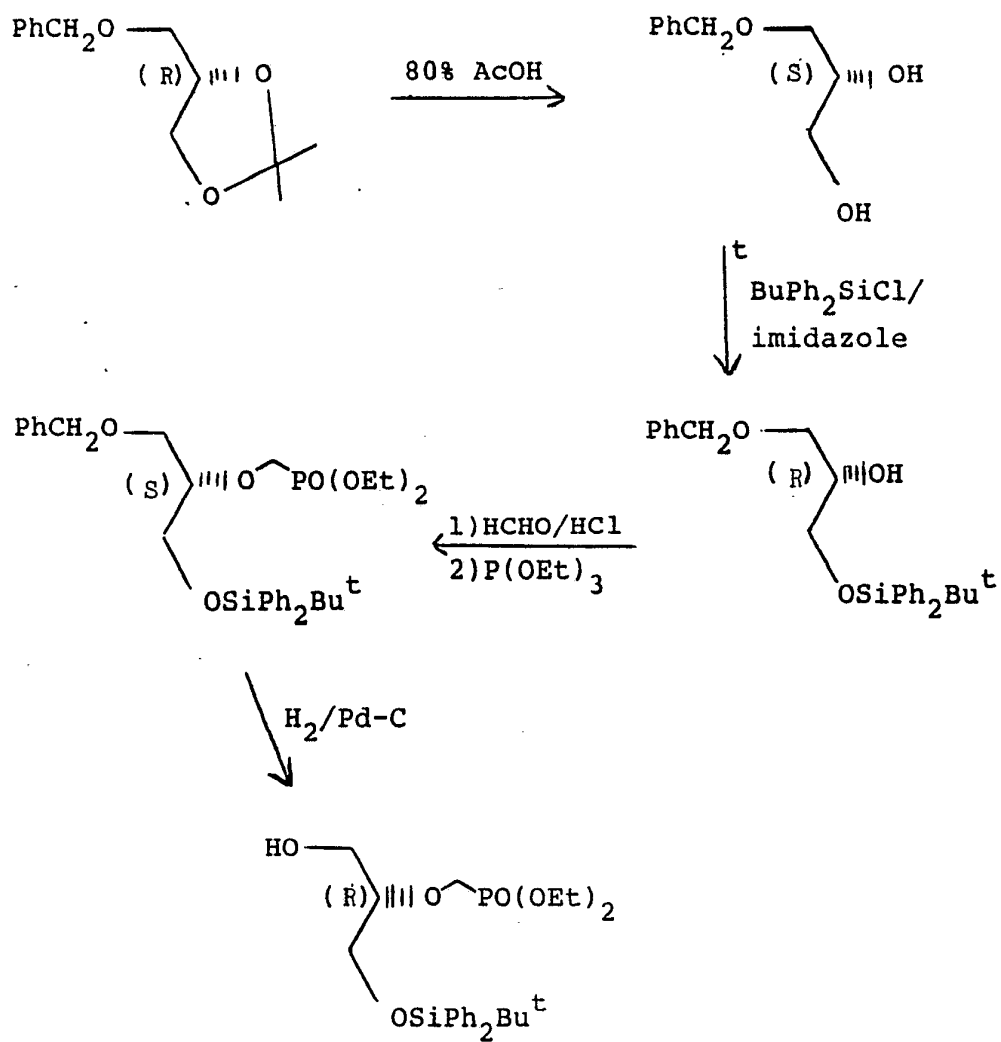
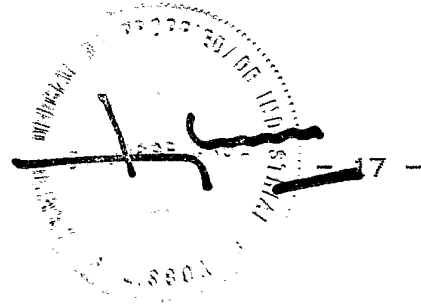
por reacção com R_8ONH_2 em que R_8 é um grupo protector, para dar origem a um composto com a fórmula (VII):



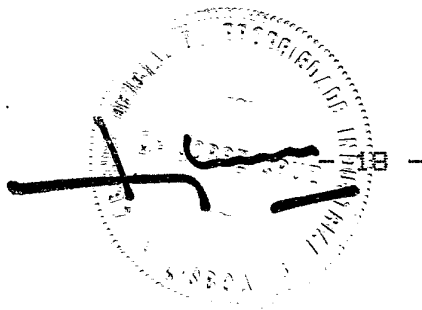
que pode ser ciclizado com acetato de dietoximetilo, para dar origem a um composto com a fórmula (IV) em que o grupo OH está protegido. Valores apropriados para R_8 incluem benzilo, removível por hidrogenação, e o grupo tetra-hidropiran-2-ilo removível por tratamento com ácido acético a 80%, à temperatura ambiente.

Intermediários com a fórmula (V) em que Z é hidroxí são compostos conhecidos ou são preparados por métodos análogos aos usados para compostos conhecidos estruturalmente semelhantes.

Será tomado em consideração que a síntese do intermediário de fórmula (V) em que Z é hidróxi, envolverá a desprotecção selectiva de um intermediário em que Z é hidróxi protegido e R_3 é hidroximetilo protegido, por exemplo como mostrado no esquema que se segue, quando é desejado o isómero (R).



N.B. Todas as configurações representadas são invertidas quando é desejado o isômero (S).



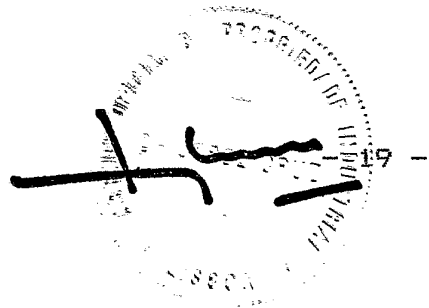
Os intermediários de fórmulas (II), (III) e (V) mas em que Z está substituído por um grupo aminoxi, e em que R_4' é R_4 como definido para a fórmula (I), pensa-se serem novos e constituem um aspecto do invento.

Podem ser preparados sais farmacologicamente aceitáveis de um modo convencional, por exemplo, no caso de sais de adição de ácidos, por reacção com o ácido orgânico ou inorgânico apropriado.

Será tomado em consideração que o invento proporciona um processo para a preparação de um composto com a fórmula (IA) em que R_3^1 é hidroximetilo processo esse que compreende desprotecção de um composto com a fórmula (IA) em que R_3^1 está na forma protegida. Métodos preferidos para desprotecção são tal como foi aqui anteriormente descrito.

O invento proporciona também um processo para a preparação de um composto com a fórmula (IA) em que R_5 e R_6 são ambos hidrogénio, processo esse que compreende a desesterificação de um composto correspondente com a fórmula (IA) em que R_5 e R_6 são o mesmo grupo alquilo ou fenilo substituído facultativamente.

O presente invento fornece também um processo para a preparação do isómero (R) ou do isómero (S) de um composto de fórmula (IA), ou de um seu sal farmacologicamente aceitável, facultativamente em mistura com até 45% da mistura, em peso, do correspondente isómero (S) ou isómero (R), respectivamente, cujo processo compreende a resolução de uma mistura de isómeros (R) e (S) de um composto de fórmula (IA), até ao ponto em que a fracção de resolução que contém, predominantemente, o isómero (R) ou o isómero (S), contenha facultativamente até 45% da fracção de resolução, em peso, do correspondente isómero (S) ou isómero (R),



respectivamente; e, facultativamente, a formação de um seu sal farmacêuticamente aceitável

O termo "resolução" é aqui utilizado no sentido da prática convencional utilizada nesta técnica de modo a incluir a resolução parcial, isto é, a separação de uma mistura de enantiómeros de um composto (em qualquer proporção) em duas fracções, uma das quais está enriquecida num enantiómero relativamente à mistura inicial.

A resolução das misturas de isómeros (R) e (S) de um composto de fórmula (IA) pode ser efectuada de modo conveniente por derivação da mistura com um agente de derivação quiral, de modo a formar uma mistura de diastereómeros de um derivado do composto de fórmula (IA). Os componentes da mistura podem em seguida ser convencionalmente separados, por exemplo por cristalização fraccionada. A separação pode ser completa, ou parcial, de modo que uma determinada fracção separada até 45% da fracção total em peso do derivado diastereomérico do isómero (S) ou do isómero (R). Subsequentemente, o derivado diastereomérico do desejado isómero (R) ou isómero (S), respectivamente, facultativamente em mistura com o derivado diastereomérico do isómero (S) ou isómero (R), respectivamente, é convertido no desejado isómero do composto de fórmula (IA), facultativamente em mistura com até 45% do outro isómero.

A derivação relativamente ao processo do presente invento é de preferência levada a cabo sobre uma mistura de isómeros (R) e (S) de um composto de fórmula (IA) por meio de reacção desta mistura de isómeros com um reagente opticamente activo adequado para a resolução de álcoois. Tais reagentes incluem ácidos opticamente activos, tais como derivados de



ácidos, tais como cloretos de ácidos, anidridos de ácidos ou isocianatos.

Os sais e derivados podem ser preparados como aqui anteriormente descrito.

Pode ser preparada uma mistura racémica de isómeros de acordo com o método descrito no EP-A-319 228.

O processo preferido para a preparação de um isómero puro da fórmula (IA) é, contudo, por meio de intermediários quirais de fórmula (V).

Os compostos do invento são potencialmente utilizáveis no tratamento de infecções causadas por vírus, em especial vírus herpes tais como os tipos 1 e 2 do herpes simplex, vírus varicela-zoster, vírus Epstein-Barr e vírus de inclusão citomegálica; e retrovírus, incluindo lentivírus tais como vírus visna e o vírus da imunodeficiência humana (estirpes 1 e 2).

Os compostos podem também ser inibidores dos vírus tumorigênicos e/ou ser potencialmente utilizados no tratamento de doenças neoplásicas, isto é, do cancro.

Os compostos do invento podem ser formulados para utilização numa composição farmacêutica. Consequentemente, num outro aspecto do invento, proporciona-se uma composição farmacêutica que compreende um composto com a fórmula (I) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável juntamente com um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

Uma composição que pode ser administrada pela via oral a seres humanos pode ser composta sob a forma de um xarope,

comprimido ou cápsula. Quando a composição se apresenta sob a forma de comprimido, pode ser usado qualquer veículo farmacêutico apropriado para a formulação dessas composições sólidas, por exemplo estearato de magnésio, amido, lactose, glucose, arroz, farinha e giz. A composição pode também apresentar-se sob a forma de uma cápsula ingerível, por exemplo de gelatina, para conter o composto, ou sob a forma de um xarope, uma solução ou uma suspensão. Veículos farmacêuticos líquidos apropriados incluem álcool etílico, glicerina, solução salina e água aos quais se pode adicionar agentes aromatizantes ou corantes a fim de formar xaropes. Os compostos podem também ser apresentados com um veículo líquido estéril para injeção.

A composição pode também ser formulada para aplicação tópica à pele ou aos olhos.

Para aplicação tópica à pele, a composição pode apresentar-se sob a forma de um creme, loção ou unguento. Estas formulações podem ser formulações convencionais bem conhecidas nesta técnica, por exemplo, como é descrito em livros padrão sobre indústria farmacêutica e cosmética, tal como Harry's Cosmectology publicado por Leonard Hill Books e a British Pharmacopaeia.

A composição para aplicação aos olhos pode ser uma composição convencional de gotas para os olhos bem conhecida nesta técnica, ou uma composição sob a forma de unguento.

De preferência, a composição deste invento apresenta-se sob a forma de unidade de dosagem ou sob qualquer outra forma que possa ser administrada numa dose única. Uma unidade de dosagem apropriada pode conter de 50 mg a 1 g de ingrediente activo, por exemplo 100 a 500 mg.



Essas doses podem ser administradas 1 a 4 vezes por dia ou mais usualmente 2 ou 3 vezes por dia. A dose eficaz do composto variará em geral entre 1,0 e 20 mg/kg do peso corporal por dia ou mais usualmente entre 2,0 e 10 mg/kg por dia.

Não se verificaram quaisquer efeitos tóxicos não aceitáveis com os níveis de dosagem descritos anteriormente.

O invento também proporciona um método para o tratamento de infecções a vírus no animal humano ou não humano, o qual compreende a administração ao animal de uma quantidade não tóxica, eficaz de um composto com a fórmula (I) ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável.

O invento também proporciona um composto com a fórmula (I) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável para utilização como uma substância terapêutica activa, em particular para o tratamento de infecções a vírus.

Pensa-se também que os compostos do invento apresentam um efeito anti-viral sinérgico em conjunto com interferências; e produtos de combinação compreendendo estes dois componentes para administração sequencial ou concomitante, pelas mesmas ou diferentes vias, apresentam-se assim no âmbito do presente invento.

Os exemplos que se seguem ilustram o invento; as descrições que se seguem ilustram a preparação dos produtos intermediários. Os Exemplos 1 a 3 são exemplos de isómeros (R) e os Exemplos 4 e 6 são exemplos de Isómeros (S).

Será tomado em consideração que, quando R_3 e R_4 estão ligados na fórmula (I), tal como nos Exemplos 2 e 5, a designação



da estereoquímica absoluta é invertida, de acordo com as regras de prioridade da estereoquímica.



Descrição 1

a) (S)-1-Benziloxi-3-(t-butildifenilsiloxi)-propan-2-ol

A uma solução de (R)-3-benziloxipropano-1,2-diol (preparada a partir de (S)-4-benzilmetil-2,2-dimetil-1,3-dioxolano (comercialmente disponível a partir de FLUKA) por hidrólise ácida utilizando ácido acético aquoso a 80%), (8,3 g, 47,2 mmol) em THF seco (70 ml) foi adicionado imidazole (6,42 g, 94,4 mmol). Depois de 2 minutos, foi adicionado cloreto de t-butildifenilsililo (12,8 ml, 47,2 mmol). Depois de 2 minutos, a mistura reacional foi filtrada e o filtrado evaporado. O resíduo foi partilhado entre acetato de etilo e água, a camada orgânica foi separada, lavada com salmoura saturada, seca (MgSO_4), filtrada e evaporada até se obter um óleo incolor. A cromatografia do óleo sobre gel de sílica (diclorometano como eluente) produziu o composto em epígrafe sob a forma de um óleo incolor (17,72 g, 90%).

IV: ν_{max} (filme) 3580, 3070, 2940, 2860, 1595, 1475, 1455, 1430, 1395, 1365, 1345, 1310, 1270, 1265, 1240, 1110, 1030, 1010, 1000, 960, 940, 828, 810, 745, 710 cm^{-1} .

^1H RMN : δ_{H} [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] 0,97 (9H, s, t-Bu), 3,4-3,85 (5H, m, CH_2CHCH_2), 4,50 (2H, s, OCH_2Ph), 4,84 (1H, d, $J = 5,3\text{Hz}$, D_2O permutável OH), 7,25-7,70 (15H, m, H aromático).

Encontrado: C, 74,27; H, 7,71%.

$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{Si}$ requer: C, 74,24; H, 7,67%.

m/z : (NH_3 C.I.) 438 (MNH_4^+ , 8%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (CHCl_3) $-1,7^\circ$ (C = 0,94).

b) (S)-[2-benziloxi-1-(t-butildifenilsililoximetil)etoxilmetil-
fosfonato de dietilo]

Fez-se borbulhar HCl seco através de uma solução de (S)-1-benziloxi-3-(t-butildifenilsililoxi)propan-2-ol (4,206 g, 0,01 mmol) e paraformaldeído (0,3 g, 0,01 mmol) em diclorometano seco (20 ml) contendo cloreto de cálcio anidro (7,5 g), durante 1 hora. Quaisquer vestígios remanescentes de água foram removidos por secagem sobre sulfato de magnésio. A solução foi filtrada e evaporada até à secura de modo a obter-se um óleo incolor. Foi adicionado fosfito de trietilo (1,71 ml, 0,01 mmol) e a solução foi aquecida a 140°C durante 5 horas, em seguida foi deixada arrefecer até à temperatura ambiente. O produto de reacção foi cromatografado sobre gel de sílica (diclorometano:metanol, 99:1 como eluente) de modo a obter-se o composto do título sob a forma de um óleo incolor (2,25 g, 40%).

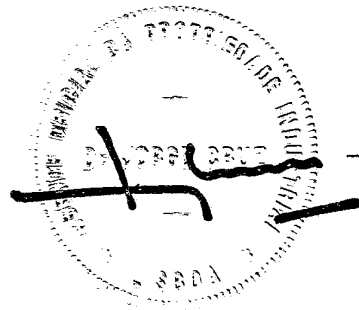
IV: $\nu_{\max}$ (filme) 3060, 2960, 2930, 2900, 2850, 1475, 1455, 1430, 1390, 1365, 1260, 1115, 1055, 1030, 960, 820, 805, 740, 710 cm^{-1} .

$^1\text{H RMN}$: δ_{H} (CDCl_3) 1,03 (9H, s, t-Bu), 1,28 (2x3H, 2xt, J = 7Hz, $(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 3,5-3,85 (5H, m, CH_2CHCH_2), 3,96 (2H, d, J = 8,9Hz, OCH_2P), 4,05-4,25 (4H, m, $(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 4,52 (2H, s, OCH_2Ph), 7,25-7,75 (15H, m, H aromático).

Encontrado: C, 65,43; H, 7,70%.

$\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{O}_6\text{PSi}$ requer: C, 65,24; H, 7,59%.

m/z: (NH_3 C.I.) 588 (MNH_4^+ , 35%), 571 (MH^+ , 100%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (CHCl_3) -6,9° (C = 1,06).



Descrição 2 [isômeros (R)]

(S)-[1-(t-butildifenilsililoximetil)-2-hidroxi-etoxilmetilfosfonato de dietilo]

A uma solução de (S)-[2-benziloxi-1-(t-butildifenilsililoximetil)etoxilmetilfosfonato de dietilo (1,90 g, 3,3 mmol) em etanol (20 ml) contendo um vestígio de metanol/HCl (10 gotas), foi adicionado Pd a 10%-C. A mistura foi chocalhada sob uma atmosfera de hidrogénio à temperatura ambiente e à pressão atmosférica até que a absorção do hidrogénio ficasse completa e a t.l.c. (SiO₂, CH₂Cl₂-MeOH, 95:5) indicasse que não restava material de partida. A mistura reaccional foi filtrada, o filtrado evaporado e o resíduo obtido cromatografado sobre gel de sílica (diclorometano-metanol, 95:5 como eluente) de modo a obter-se o composto do título sob a forma de um óleo incolor (1,35 g, 84%).

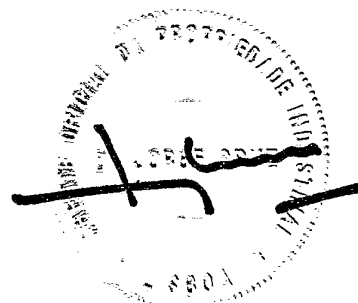
IV: $\nu_{\max}$ (filme) 3420, 3080, 3060, 2945, 2870, 1595, 1475, 1430, 1395, 1365, 1245, 1115, 1060, 1030, 975, 825, 745, 715 cm⁻¹.

¹H RMN : δ_H [(CD₃)₂SO] 1,0 (9H, s, t-Bu), 1,20 (2x3H, 2xt, J = 7,1Hz, (OCH₂CH₃)₂), 3,45-3,60 (3H, m, CH₂CH), 3,65-3,80 (2H, m, CH₂), 3,90-4,15 (6H, m, OCH₂P, (OCH₂CH₃)₂), 4,65 (1H, t, J = 5,2Hz, D₂O permutável OH), 7,30-7,75 (10H, m, H aromático).

Encontrado: C, 60,11; H, 7,87%.

C₂₄H₃₇O₆PSi requer: C, 59,97; H, 7,76%.

m/z: (NH₃ C.I.) 498 (MNH₄⁺, 15%), 481 (MH⁺, 100%). $[\alpha]_D^{25}$ (CHCl₃) -19,0° (C = 0,4).



Descrição 3 [isômeros (S)]

(R)-[2-benziloxi-1-(hidroximetil)etoxilmetilfosfanato de dietilo

Uma suspensão de (S)-[2-benziloxi-1-(t-butildifenilsililoximetil)etoxilmetilfosfonato (3,09 g, 5,4 mmol) em ácido trifluoroacético/água 2:1 (12 ml) foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora. A solução obtida foi extraída com hexano (2 x 10 ml) e a fase contendo água foi evaporada até à secura. O resíduo obtido foi tratado com amoníaco etanólico (5 ml) durante 5 minutos à temperatura ambiente, o solvente foi evaporado e o resíduo cromatografado sobre gel de sílica utilizando diclorometano/metanol 95:5 como eluente. O composto do título foi obtido sob a forma de um óleo incolor (1,35 g, 75%).

IV: $\nu_{\max}$ (filme) 3380, 3060, 3030, 2980, 2910, 2860, 1495, 1480, 1450, 1390, 1370, 1250, 1160, 1100, 1075, 975, 910, 890, 820, 780, 740, 700 cm^{-1} .

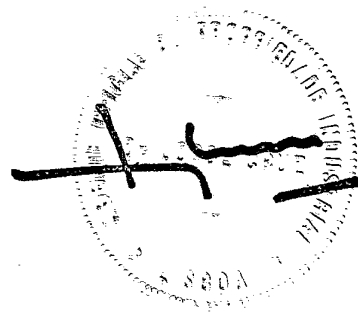
^1H RMN : δ_{H} [(CD_3)₂SO] 1,21, 1,22 (2x3H, 2xt, $J = 7\text{Hz}$, (OCH_2CH_3)₂), 3,4-3,65 (5H, m, CH_2 , CH, CH_2), 3,94 (2H, d, $J = 8,5\text{Hz}$, OCH_2P), 3,97-4,1 (4H, m, (OCH_2CH_3)₂), 4,5 (2H, s, CH_2Ph), 4,67 (1H, t, $J = 5,5\text{Hz}$, D_2O permutável OH), 7,20-7,40 (5H, m, Ph).

Encontrados: C, 53,20; H, 7,72%.

$\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{P}$ 0,33 H_2O requer: C, 53,25; H, 7,64%.

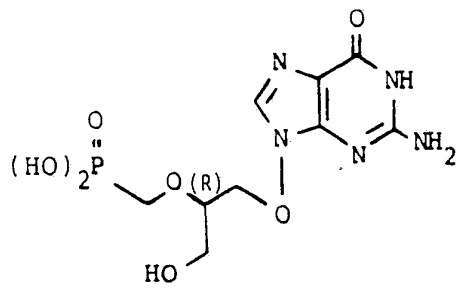
m/z: observado 332,1383.

$\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{P}$ requer 332,1387. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (CHCl_3) +16,7° (C = 1,06).



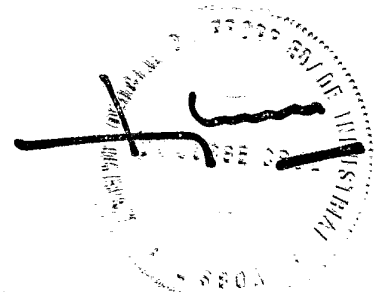
Exemplo 1

(R)-9-[3-Hidroxi-2-(fosfonometoxi)propoxil]guanina



a) A uma mistura agitada de (S)-[1-(t-butildifenilsililoxime-
til)2-hidroxi-etoxilmetilfosfonato de dietilo (540 mg, 1,12 mmol),
trifenilfosfina (440 mg, 1,68 mmol) e 2-[bis-(t-butoxicarbonil)-
amino]-9-hidroxi-6-metoxipurina (preparada como descrito no
EP-A-319 228 (428 mg, 1,12 mmol) em THF seco (20 ml), arrefecida
em gelo e sob uma atmosfera de azoto, foi adicionado gota a gota
azodicarboxilato de dietilo (0,27 ml, 1,68 mmol). Dentro de cinco
minutos tinha ocorrido a dissolução completa e o banho de gelo
foi removido. Depois de 1 hora, a solução foi evaporada até à
secura e o resíduo obtido foi cromatografado sobre gel de sílica
(eluente inicial hexano:acetato de etilo 2:1, seguido de hexa-
no:acetato de etilo em proporções 1:1, 1:2, 1:3) de modo a
obter-se (S)-2-[bis-(t-butoxicarbonil)amino]-9-[3-(t-butildife-
nilsililoxi)-2-(dietoxifosforilmetoxi)-propoxil]-6-metoxipurina,
sob a forma de um vidro incolor (310 mg, 32%).

^1H RMN : δ_{H} [(CD₃)₂SO] 0,96 (9H, s, t-Bu), 1,18, 1,19
(2x3H, 2xt, J = 7Hz, (OCH₂CH₃)₂), 1,37 (18H, sl, 2xt-Bu),



3,7-4,15 (12H, m, CHCH_2 , $(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, OCH_2P , OCH_3), 4,45-4,70 (2H, m, NOCH_2), 7,25-7,75 (10H, m, 2xPh), 8,75 (1H, s, H-8).

m/z: (BAR +ve ião, tioglicerol/HCl) 844 (MH^+ , 4%), 644 (100%).

b) Uma solução de (S)-2-[bis-(t-butiloxycarbonil)amino]-9-[3-(t-butildifenilsililo)-2-(dietoxifosforilmetoxi)propoxil]-6-metoxipurina (300 mg, 0,36 mmol) em ácido trifluoroacético aquoso a 67% (3 ml) foi mantida à temperatura ambiente durante 3 horas. A solução foi lavada com hexano (3 x 10 ml) e a fase aquosa foi evaporada até à secura. O resíduo obtido foi cromatografado sobre gel de sílica (diclorometano:metanol 95:5 como eluente, em seguida 90:10) de modo a obter-se a (R)-2-amino-9-[2-(dietoxifosforilmetoxi)-3-hidroxipropoxil]-6-metoxipurina sob a forma de um vidro amarelo pálido (101 mg, 70%).

^1H RMN : δ_{H} [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] 1,23 (6H, t, $J = 7,1\text{Hz}$, $(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 3,5-3,65 (2H, m, CH_2), 3,70-3,80 (1H, m, CH), 3,96 (3H, s, OCH_3), 3,98-4,10 (6H, m, $(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, OCH_2P), 4,31 (1H, dd, $J = 11,27\text{Hz}$, $J = 6,87\text{Hz}$, NOCH_B), 4,45 (1H, dd, $J = 11,27\text{Hz}$, $J = 3,02\text{Hz}$, NOCH_A), 4,85 (1H, t, $J = 5,50\text{Hz}$, D_2O permutável OH), 6,60 (2H, s, D_2O permutável NH_2), 8,14 (1H, s, H-8).

m/z: (BAR +ve ião, tioglicerol) 406 (MH^+ , 100%).

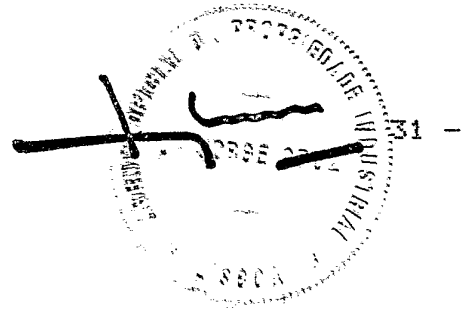
c) A uma solução de (R)-2-amino-9-[2-(dietoxifosforilmetoxi)-3-hidroxipropoxi]-6-metoxipurina (100 mg, 0,25 mmol) em dimetilformamida seca (1 ml) foi adicionado brometo de trimetilsililo (0,5 ml, 3,8 mmol) e a solução foi agitada à temperatura ambiente durante duas horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo co-evaporado coacetona-água, 1:1 (x 2). O sólido obtido foi cristalizado a partir de água quente de modo a



obter-se o composto do título sob a forma de um sólido creme (16 mg, 20%).

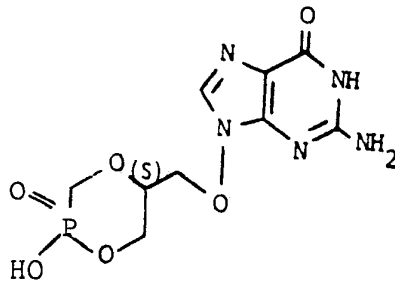
^1H RMN : δ_{H} [(CD_3)₂SO] 3,52 (2H, m, CH_2OH), 3,60-3,80 (3H, m, OCH_2P , CH), 4,25 (1H, dd, $J = 11,9\text{Hz}$, $J = 7,1\text{Hz}$, NOCH_B), 4,40 (1H, dd, $J = 11,9\text{Hz}$, $J = 3,3\text{Hz}$, NOCH_A), 6,60 (2H, sl, D_2O permutável NH_2), 8,00 (1H, s, H-8), 10,65 (1H, sl, D_2O permutável NH), 2,6-4,1 (3H, largo, D_2O permutável OH, $\text{PO}(\text{OH})_2$).

m/z: (BAR +ve ião, tioglicerol) 336 (MH^+ , 28%).

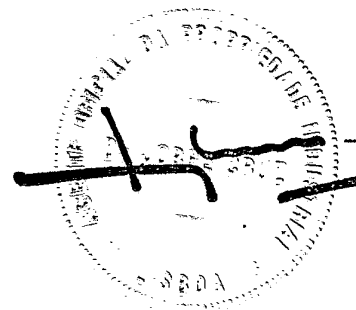


Exemplo 2

(S)-9-[2-Hidroxi-2-oxo-1,4,2-dioxafosforinan-5-il]metoxilguanina



Uma solução de diciclo-hexilcarbodi-imida (0,615 g, 3,0 mmol) em butanol (15 ml) foi adicionada, gota a gota, durante 30 minutos a uma solução de (R)-9-[3-hidroxi-2-(fosfomometoxi)-propoxilguanina (0,20 g, 0,6 mmol) e N,N-diciclo-hexil-4-morfolinocarboxiamidina (0,175 g, 0,6 mmol) em t-butanol aquoso a 50% (30 ml). A mistura reaccional foi aquecida sob refluxo durante 5 horas, deixada arrefecer até à temperatura ambiente e evaporada até à secura. Foi adicionada água ao resíduo e a mistura resultante foi filtrada através de um papael de filtro de fibra de vidro. O filtrado foi evaporado até à secura e o sólido obtido foi purificado sobre DEAE-Sephadex (forma HCO_3^-) eluindo com um gradiente linear de bicarbonato de trietilamónio aquoso (pH 7,5) desde 0,001 M até 0,25 M. As fracções relevantes foram combinadas e evaporadas até à secura co-evaporando com etanol/água 3:1 (x 3) de modo a remover todos os vestígios de trietilamina. O produto foi convertido no sal de sódio utilizando DOEX 50W-X8 (forma Na^+). O composto do título foi obtido sob a forma de um pó branco (0,16 g, 79%) depois de liofilização.

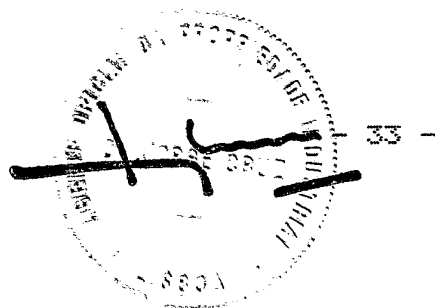


UV: $\lambda_{\max}$ (H_2O) 253 (ϵ 11,180)nm.

IV: $\nu_{\max}$ (KBr) 3411, 3400, 3144, 2759, 1696, 1617, 1591, 1476, 1380, 1330, 1239, 1209, 1174, 1081, 1045, 1010, 960, 815, 796 cm^{-1} .

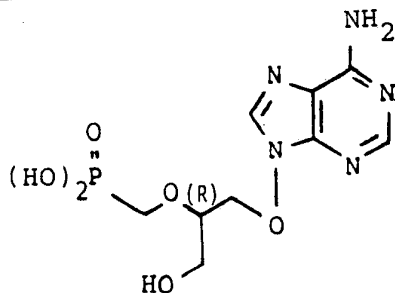
1H RMN : δ_H [$(CD_3)_2SO$] 3,40 (1H, dd, $J = 12,9Hz$, $J = 3,3Hz$, OCH_BP), 3,50 (1H, dd, $J = 12,9Hz$, $J = 8Hz$, OCH_AP), 3,74 (1H, m, CH), 3,90 (1H, m, CH_BOP), 4,0-4,3 (3H, m, CH_AOP , $NOCH_2$), 6,75 (2H, sl, D_2O permutável NH_2), 7,90 (1H, s, H-B), 10,81 (1H, sl, D_2O permutável NH).

m/z: (BAR matriz tioglicerol) 340 (MH^+). $[\alpha]_D^{25}$ (H_2O) $-38,7^\circ$ (C = 0,93).



Exemplo 3

(R)-9-[3-Hidroxi-2-(fosfometoxi)propoxil]adenina



a) A uma mistura agitada de (S)-[1-(t-butildifenilsililoximetil)-2-hidroxietoxil]metilfosfonato de dietilo (1,07 g, 2,2 mmol), trifenilfosfina (0,7 g, 2,7 mmol) e 9-hidroxi-6-ftalimidopurina (preparada como descrito no EP-A-319 228 (0,63 g, 2,2 mmol) em THF seco (20 ml), arrefecida em gelo e sob uma atmosfera de azoto, foi adicionado gota a gota azodicarboxilato de dietilo (0,42 ml, 2,7 mmol). A solução resultante foi agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente, foi evaporada até à secura e o resíduo obtido foi cromatografado sobre gel de sílica utilizando hexano:acetato de etilo 3:1 como eluente. O eluente foi mudado com se segue: hexano/acetato de etilo 1:1, hexano/acetato de etilo 1:2, e finalmente até acetato de etilo de modo a obter-se (S)-9-[3-(t-butildifenilsililoxi)-2-(dietoxifosforilmetoxi)-propoxil]-6-N-ftalimidopurina, sob a forma de uma espuma creme (1,1 g, 66%).

IV: $\nu_{\max}$ (filme) 3070, 2930, 2860, 1795, 1603, 1580, 1470, 1450, 1430, 1405, 1365, 1330, 1250, 1175, 1160, 1105, 1020, 970, 885, 835, 795, 780 cm^{-1} .



^1H RMN : δ_{H} [(CD₃)₂SO] 0,97 (9H, s, t-Bu), 1,19, 1,20 (2x3H, 2xt, J = 7Hz, (OCH₂CH₃)₂), 3,8-4,15 (9H, m, OCH₂CH₃)₂, OCH₂P, CHCH₂), 4,65 (1H, dd, J = 11,5Hz, J = 6,6Hz, NOCH_B), 4,78 (1H, dd, J = 11,5Hz, J = 3,0Hz, NOCH_A), 7,3-7,7 (10H, m, 2xPh), 8,0-8,15 (4H, m, H aromático), 9,04 (1H, s, H-2 ou H-8), 9,08 (1H, s, H-2 ou H-8).

Encontrado: C, 59,51; H, 5,76; N, 9,42%.
C₃₇H₄₂N₅O₅PSi requer: C, 59,74; H, 5,69; N, 9,41%.

m/z: (BAR, matriz tioglicerol) 744 (MH⁺).

b) Uma solução de (S)-9-[3-(t-butildifenilsililoxi)-2-(dietoxifosforilmetoxi)propoxil-6-N-ftalimidopurina (0,98 g, 1,6mmol) em diclorometano seco (10 ml) foi tratada com N-metil-hidrazina (0,093 ml, 1,75 mmol) à temperatura ambiente durante 1 hora. A mistura reaccional foi filtrada, concentrada in vacuo e o resíduo foi cromatografado sobre gel de sílica utilizando diclorometano como eluente inicial. O eluente foi mudado para diclorometano/metanol 96:4 de modo a obter-se (S)-9-[3-(t-butildifenilsililoxi)-2-(dietoxifosforilmetoxi)propoxiladenina sob a forma de um óleo incolor (0,61 g, 75%).

UV: λ_{max} (EtOH) 260 (13,690)nm.

IV: ν_{max} (filme) 3322, 3176, 2930, 2902, 2857, 1643, 1594, 1471, 1427, 1405, 1398, 1325, 1292, 1251, 1112, 1051, 1026, 971, 823, 795, 741 cm⁻¹.

^1H RMN : δ_{H} [(CD₃)₂SO] 0,94 (9H, s, t-Bu), 1,19 (2x3H, 2xt, J = 7Hz, (OCH₂CH₃)₂), 3,7-4,15 (9H, m, CHCH₂, OCH₂P, (OCH₂CH₃)₂), 4,48 (1H, dd, J = 11,27Hz, J = 6Hz, NOCH_B), 4,65 (1H, dd, J =



11,27Hz, $J = 2,75\text{Hz}$, NOCH_A), 7,3-7,7 (12H, m, $2 \times \text{Ph} + \text{D}_2\text{O}$ permutável NH_2), 8,14 (1H, s, H-2 ou H-8), 8,41 (1H, s, H-2 ou H-8).

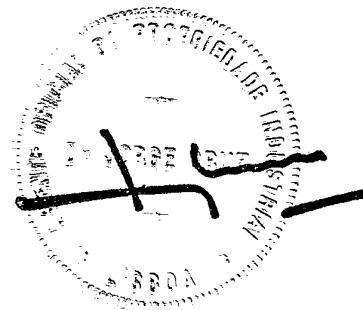
Encontrado: C, 55,65; H, 6,52; N, 11,24%.
 $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5\text{PSi}$ 0,75 H_2O requer: C, 55,53; H, 6,67; N, 11,16%.

m/z : (BAR, matriz tioglicerol) 614 (MH^+).

c) A (S)-9-[3-(*t*-butildifenilsililoxi)-2-(dietoxifosforilmetoxi)propoxiladenina (0,61 g, 1 mmol) foi dissolvida em ácido trifluoroacético/água, 2:1 (6 ml) e a solução foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas. Foi adicionado hexano (10 ml) e a mistura foi chocalhada. A fase aquosa foi separada, lavada uma vez mais com hexano (10 ml) e evaporada até à secura. O resíduo foi tratado com solução etanólica de amoníaco (5 ml), à temperatura ambiente, durante 5 minutos após o que a solução foi evaporada até à secura. O resíduo foi cromatografado sobre gel de sílica utilizando diclorometano/metanol 90:10 como eluente de modo a obter-se (R)-9-[2-(dietoxifosforilmetoxi)-3-hidroxipropoxiladenina sob a forma de um óleo incolor (0,3 g, 80%) o qual, após repouso prolongado, cristalizou sob a forma de agulhas brancas p.f. 98-102°C.

IV: ν_{max} (filme) 3340, 3210, 2995, 2930, 2910, 1660, 1645, 1600, 1470, 1445, 1415, 1395; 1370, 1330, 1300, 1240, 1210, 1165, 1125, 1045, 1020, 980, 825, 795, 735 cm^{-1} .

^1H RMN : δ_{H} [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] 1,23 (6H, t, $J = 7\text{Hz}$, $(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 3,5-3,7 (2H, m, CH_2OH), 3,75-3,85 (1H, m, CH), 3,95-4,15 (6H, m, $(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, OCH_2P), 4,38 (1H, dd, $J = 11,3\text{Hz}$, $J = 6,6\text{Hz}$, NOCH_B), 4,55 (1H, dd, $J = 11,3\text{Hz}$, $J = 3,0\text{Hz}$, NOCH_A), 4,88 (1H, t, $J = 5,5\text{Hz}$, D_2O permutável OH), 7,38 (2H, s, D_2O permutável NH_2), 8,15 (1H, s, H-2 ou H-8), 8,43 (1H, s, H-2 ou H-8).



- 36 -

Encontrado: C, 39,26; H, 6,05; N, 17,33%.
 $C_{13}H_{22}N_5O_6P$ 1,25 H_2O requer: C, 39,25; H, 6,20; N, 17,61%.

m/z: (BAR, matriz tioglicerol) 376 (MH^+).

d) A uma solução de (R)-9-[2-(dietoxifosforilmetoxi)-3-hidroxi-propoxiladenina (0,16 g, 0,43 mmol) em DMF seco (3 ml) foi adicionado brometo de trimetilsililo (0,56 ml, 4,3 mmol) e a solução foi agitada à temperatura ambiente durante 4 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo co-evaporado com acetona/água 1:1 (x 3). O resíduo sólido foi cristalizado a partir de acetona/água (0,1 g, 77%), p.f. 200-205°C.

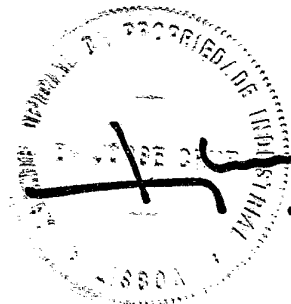
UV: λ_{max} (EtOH) 260 (11,800)nm.

IV: ν_{max} (KBr) 3449, 3400, 3199, 3105, 2951, 2897, 1711, 1680, 1612, 1569, 1467, 1420, 1355, 1330, 1305, 1244, 1216, 1128, 1080, 924, 866 cm^{-1} .

1H RMN : δ_H [(CD_3)₂SO] 3,54 (2H, m, CH_2OH), 3,70-3,85 (3H, m, OCH_2P , CH), 4,36 (1H, dd, J = 11Hz, J = 7Hz, $NOCH_B$), 4,55 (1H, dd, J = 11Hz, J = 3Hz, $NOCH_A$), 7,51 (2H, s, D_2O permutável NH_2), 8,17 (1H, s, H-2 ou H-8), 8,50 (1H, s, H-2 ou H-8), 3,5-7,0 (3H, largo, $PO(OH)_2$, OH).

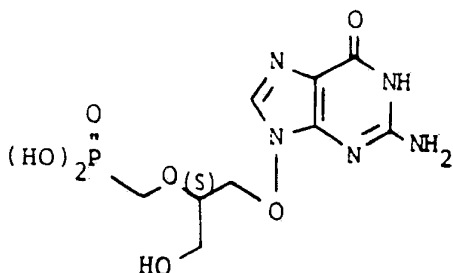
Encontrado: C, 32,07; H, 4,73; N, 20,46%.
 $C_9H_{14}N_5O_5P$ 1 H_2O requer: C, 32,05; H, 4,78; N, 20,76%.

m/z: (BAR, matriz tioglicerol) 320 (MH^+). $[\alpha]_D^{25}$ (0,1M NaOH) -11,5° (C = 0,2).



Exemplo 4

(S)-9-[3-Hidroxi-2-(fosfonometoxi)propoxil]guanina



a) A uma mistura agitada de (R)-[2-benziloxi-1-(hidroximetil)-etoxilmetilfosfonato de dietilo (1,0 g, 3 mmol), trifenilfosfina (1,18 g, 4,5 mmol) e 2-[bis-(t-butoxicarbonil)amino]-9-hidroxi-6-metoxipurina (preparada como descrito no EP-A-319 228) (1,15 g, 3 mmol) em THF seco (20 ml), arrefecida em gelo e sob uma atmosfera de azoto, foi adicionado gota a gota azodicarboxilato de dietilo (0,71 ml, 4,5 mmol). A solução resultante foi deixada a aquecer à temperatura ambiente, e deixada em agitação durante 1 horas. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi cromatografado sobre gel de sílica utilizando hexano:acetato de etilo 2:1 como eluente. O eluente foi mudado com se segue: hexano/acetato de etilo 1:1, hexano/acetato de etilo 1:2, e finalmente até acetato de etilo de modo a obter-se (S)-2-[bis-(t-butoxicarbonil)amino]-9-[3-(benziloxi-2-(dietoxifosforilmetoxi)-propoxil]-6-metoxipurina, sob a forma de um óleo incolor (1,85 g, 88%).



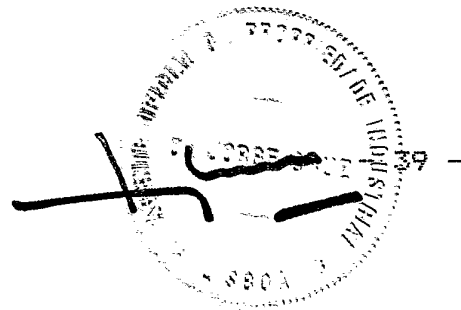
IV: $\nu_{\max}$ (filme) 3070, 2990, 2940, 2910, 1795, 1755, 1740, 1595, 1480, 1455, 1425, 1395, 1370, 1325, 1255, 1160, 1120, 1100, 1050, 1025, 975, 855, 795, 740, 705 cm^{-1} .

^1H RMN : δ_{H} [(CD_3)₂SO] 1,20 (6H, t, $J = 7\text{Hz}$, (OCH_2CH_3)₂), 1,38 (18H, s, 2xt-Bu), 3,5-3,75 (2H, m, CH_2), 3,95-4,1 (7H, m, OCH_2P , CH, (OCH_2CH_3)₂), 4,08 (3H, s, OCH_3), 4,45-4,65 (2H, m, NOCH_2), 4,51 (2H, s, OCH_2Ph), 7,25-7,40 (5H, m, Ph), 8,75 (1H, s, H-8).

Encontrado: C, 52,27; H, 6,77; N, 9,65%.
 $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P} \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ requer: C, 52,17; H, 6,77; N, 9,81%.

m/z : (BAR, TDE/matriz Na) 718 (32%, $\text{M}+\text{Na}^+$) 696 (13%, MH^+).

b) Foi adicionado ácido trifluoroacético a uma solução arrefecida com gelo de (S)-2-[bis-(t-butoxicarbonil)amino]-9-[3-(benziloxi-2-(dietoxifosforilmetoxi)-propoxil-6-metoxipurina (1,65 g, 2,3 mmol) em diclorometano seco (30 ml) e a solução resultante foi deixada durante 2 horas. Após aquecimento até à temperatura ambiente, foi adicionado Pd a 10%-C (800 mg) e a mistura foi hidrogenada à temperatura e pressão ambientes durante 2 horas. A mistura reaccional foi filtrada, o catalisador foi lavado com diclorometano (20 ml), o filtrado foi lavado com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, salmoura, seco (MgSO_4) e evaporado de modo a deixar um óleo viscoso incolor. A cromatografia do óleo sobre gel de sílica utilizando diclorometano/metanol 95:5 como eluente inicial, em seguida mudando o eluente para diclorometano/metanol 90:10, deu origem à (S)-2-amino-9-[3-(benziloxi-2-(dietoxifosforilmetoxi)-3-hidroxipropoxil-6-metoxipurina sob a forma de óleo incolor (0,65 g, 67%).



IV: $\nu_{\max}$ (filme) 3360, 3230, 2990, 2940, 2910, 1620, 1585, 1500, 1485, 1455, 1390, 1335, 1265, 1240, 1165, 1120, 1060, 1025, 975, 825, 785 cm^{-1} .

^1H RMN : δ_{H} [(CD_3)₂SO] 1,23 (6H, t, $J = 7\text{Hz}$, (OCH_2CH_3)₂), 3,45-3,60 (2H, m, decai para d na permuta D_2O , CH_2OH), 3,70-3,85 (1H, m, CH), 3,96 (3H, s, OCH_3), 3,9-4,15 (6H, m, (OCH_2CH_3 , OCH_2P), 4,31 (1H, dd, $J = 11,3\text{Hz}$, $J = 6,9\text{Hz}$, NOCH_B), 4,45 (1H, dd, $J = 11,3\text{Hz}$, $J = 3\text{Hz}$, NOCH_A), 4,84 (1H, t, $J = 5,5\text{Hz}$, D_2O permutável OH), 6,59 (2H, sl, D_2O permutável NH_2), 8,14 (3H, s, H-8).

m/z: (BAR, matriz tioglicerol) 406 (MH^+).

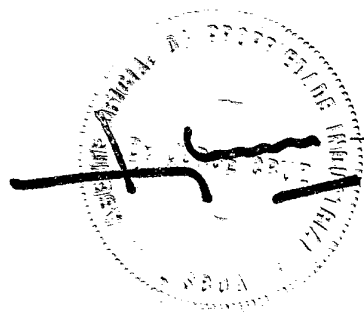
c) A uma solução de (S)-2-amino-9-[3-(benziloxy-2-(diethoxyfosforilmetoxy)-3-hidroxi propoxil-6-metoxipurina (0,56 g, 1,38 mmol), em dimetilformamida seca (5 ml) foi adicionado brometo de trimetilsililo (1,82 ml, 13,8 mmol) e a solução foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo co-evaporado com acetona/água 1:1 (x 2). O sólido branco obtido foi cristalizado a partir de água quente de modo a obter-se o composto do título sob a forma de um sólido branco (0,305 g, 66%).

IV: $\nu_{\max}$ (KBr) 3380, 3320, 3160, 1715, 1645, 1600, 1385, 1185, 1160, 1100, 1060, 1045, 925, 770 cm^{-1} .

^1H RMN : δ_{H} ($\text{D}_2\text{O} + \text{NH}_3$) 3,61 (1H, dd, $J = 12,1\text{Hz}$, $J = 9,9\text{Hz}$, $\text{CH}_\text{B}\text{P}$), 3,65-3,75 (2H, m, $\text{CH}_\text{A}\text{P}$, $\text{CH}_\text{B}\text{OH}$), 3,82-3,89 (1H, m, CH), 3,93 (1H, dd, $J = 12,3\text{Hz}$, $J = 3,6\text{Hz}$, $\text{CH}_\text{A}\text{OH}$), 4,46-4,53 (2H, m, NOCH_2), 8,03 (1H, s, H-8).

Encontrado:

C, 32,24; H, 4,16; N, 20,59%.

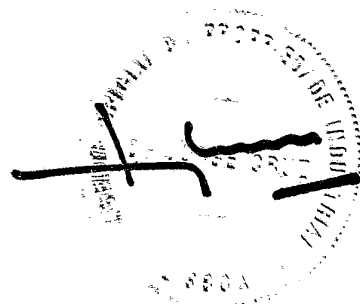
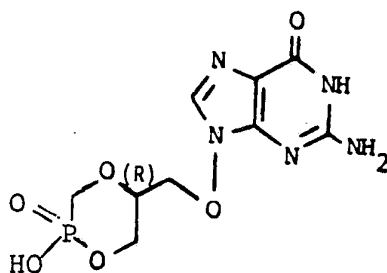


40 -

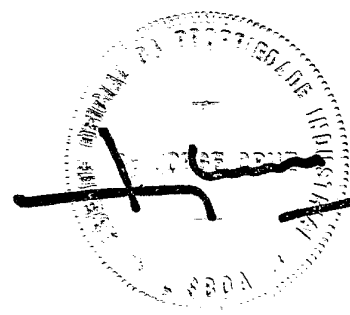
$C_7H_{14}N_5O_7P$ requer:

C, 32,24; H, 4,21; N, 20,89%.

m/z: (BAR, matriz tioglicerol) 336 (MH^+). $[\alpha]_D^{25}$ (0,1M NaOH)
+12,8° (C = 0,43).

Exemplo 5(R)-9-[2-Hidroxi-2-oxo-1,4,2-dioxafosforinan-5-il]metoxilguanina

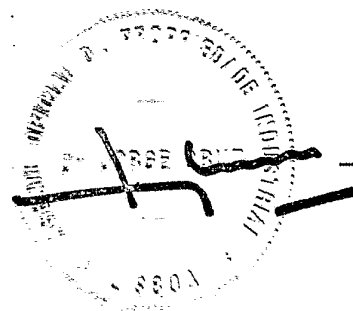
Uma solução de diciclo-hexilcarbodi-imida (0,615 g, 3,0 mmol) em t-butanol (10 ml) foi adicionada, gota a gota, durante 10 minutos a uma solução de (S)-9-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propoxilguanina (0,20 g, 0,6 mmol) e N,N-diciclo-hexil-4-morfolinocarboxamidina (0,175 g, 0,6 mmol) em t-butanol aquoso a 50% (30 ml). A mistura reaccional foi aquecida sob refluxo durante 4 horas, deixada a arrefece até à temperatura ambiente e evaporada até à secura. Foi adicionada água ao residuo e a mistura foi filtrada através de um papel de filtro de fibra de vidro. O filtrado foi evaporado até à secura e o sólido obtido foi purificado sobre DEAE-Sephadex (forma HCO_3^-) eluindo com um gradiente linear de bicarbonato de trietilamónio aquoso (pH 7,5) desde 0,001 M até 0,25 M. As fracções relevantes foram combinadas e evaporadas até à secura co-evaporando com etanol/água 3:1 (x 2) de modo a remover todos os vestígios de trietilamina. O produto foi convertido no sal de sódio utilizando DOEX 50W-XB (forma Na^+). O composto do título foi obtido sob a forma de um sólido branco (0,12 g, 59%) depois de liofilização.



IV: $\nu_{\max}$ (KBr) 3400, 3140, 1690, 1610, 1475, 1380, 1240, 1208, 1079, 1040, 1010, 960, 790 cm^{-1} .

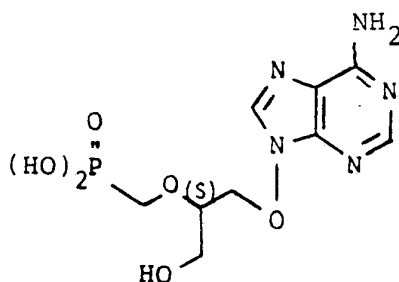
^1H RMN : δ_{H} [(CD_3)₂SO] 3,42 (1H, dd, $J = 13,2\text{Hz}$, $J = 3,3\text{Hz}$, $\text{OCH}_\text{B}\text{P}$), 3,55 (1H, dd, $J = 13,2\text{Hz}$, $J = 8\text{Hz}$, $\text{OCH}_\text{A}\text{P}$), 3,79 (1H, m, CH), 3,92 (1H, m, $\text{CH}_\text{B}\text{OP}$), 4,07-4,32 (3H, m, $\text{CH}_\text{A}\text{OP}$, NOCH_2), 6,86 (2H, s1, D_2O permutável NH_2), 7,90 (1H, s, H-8), 10,97 (1H, s1, D_2O permutável NH).

m/z : (BAR, tioglicerol) 318 ($\text{M}-\text{Na}+2\text{H}^+$), 340 (MH^+).



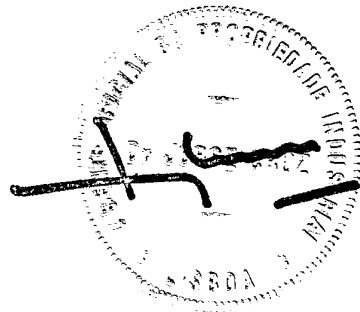
Exemplo 6

(S)-9-[3-Hidroxi-2-(fosfonometoxi)propoxil]adenina



a) A uma mistura agitada de (R)-[2-benziloxi-1-(hidroximetil)-etoxilmetilfosfonato de dietilo (0,9 g, 2,7 mmol), trifenilfosfina (1,06 g, 4 mmol) e 9-hidroxi-6-N-ftalimidopurina (0,76 g, 2,7 mmol) (preparada como descrito no EP-A-319 228) em THF seco (15 ml), arrefecida em gelo e sob uma atmosfera de azoto, foi adicionado gota a gota azodicarboxilato de dietilo (0,6 ml, 4 mmol). A solução resultante foi deixada a aquecer até a temperatura ambiente e agitada durante 4 horas. O solvente foi evaporada sob pressão reduzida e o residuo obtido foi cromatografado sobre gel de sílica utilizando hexano:acetato de etilo 1:1 como eluente. O eluente foi mudado até acetato de etilo de modo a obter-se (S)-9-[3-benziloxi-2-(dietoxifosforilmetoxi)-propoxil]-6-N-ftalimidopurina, sob a forma de um óleo amarelo pálido (1,16 g, 72%), o qual foi utilizado directamente na etapa seguinte.

b) Uma solução de (S)-9-[3-benziloxi-2-(dietoxifosforilmetoxi)-propoxil]-6-N-ftalimidopurina (0,83 g, 1,39mmol) em diclorometano seco (10 ml) foi tratada com N-metil-hidrazina (0,08 ml, 1,53 mmol) à temperatura ambiente durante 3 horas. A mistura foi

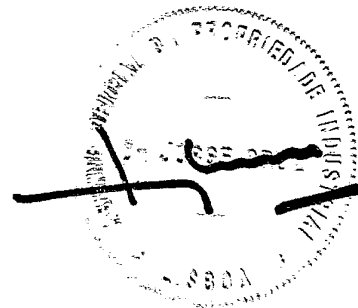


filtrada, o filtrado foi concentrado in vacuo e o resíduo foi cromatografado sobre gel de sílica utilizando diclorometano como eluente inicial. O eluente foi mudado para diclorometano/metanol 98:2 de modo a obter-se (S)-9-[3-benziloxi-2-(dietoxifosforilmetoxi)propoxiladenina sob a forma de uma goma incolor (0,27 g, 41%).

IV: $\nu_{\max}$ (filme) 3320, 3180, 2990, 2905, 1650, 1595, 1470, 1455, 1410, 1390, 1370, 1295, 1245, 1160, 1095, 1050, 1025, 970, 820, 790, 730, 700 cm^{-1} .

^1H RMN : δ_{H} [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] 1,21 (2x3H, 2xt, $J = 7\text{Hz}$, $(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 3,61-3,72 (2H, m, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Ph}$), 3,96-4,12 (7H, m, CH, OCH_2P , $(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 4,40-4,58 (2H, m, NOCH_2), 4,52 (2H, s, OCH_2Ph), 7,25-7,50 (7H, m, Ph + D_2O permutável NH_2), 8,15 (1H, s, H-2 ou H-8), 8,41 (1H, s, H-2 ou H-8).

c) Foi adicionado Pd a 10%-C (50 mg) a uma solução de (S)-9-[3-benziloxi-2-(dietoxifosforilmetoxi)propoxiladenina (0,21 g, 0,45 mmol) em diclorometano (5 ml) e ácido trifluoroacético (1 ml) e a mistura foi hidrogenada à pressão atmosférica e à temperatura ambiente durante 5 horas. A mistura foi filtrada, o filtrado evaporado e o resíduo obtido foi dissolvido em solução de amoníaco etanólica (5 ml). Depois de 15 minutos o solvente foi evaporado e o resíduo cromatografado sobre gel de sílica utilizando diclorometano/metanol 90:10 como eluente. O exame por t.l.c. do produto indicou vestígios de uma impureza que não absorvia UV, a qual foi removida por t.l.c. preparativa, utilizando diclorometano/metanol 88:12 como eluente. A (S)-9-[2-(dietoxifosforilmetoxi)-3-hidroxipropoxiladenina foi obtida sob a forma de uma goma incolor (0,11 g, 65%).

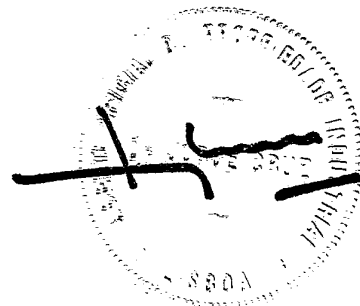


^1H RMN : δ_{H} [(CD₃)₂SO] 1,23 (6H, t, J = 7Hz, (OCH₂CH₃)₂), 3,5-3,65 (2H, m, CH₂OH), 3,75-3,85 (1H, m, CH), 3,98-4,15 (6H, m, OCH₂P, (OCH₂CH₃)₂), 4,38 (1H, dd, J = 6,6Hz, J = 11,3Hz, NOCH_B), 4,54 (1H, dd, J = 3Hz, J = 11,3Hz, NOCH_A), 4,88 (1H, t, J = 5,5Hz, D₂O permutável OH), 7,38 (2H, sl, D₂O permutável NH₂), 8,15 (1H, s, H-2 ou H-8), 8,43 (1H, s, H-2 ou H-8).

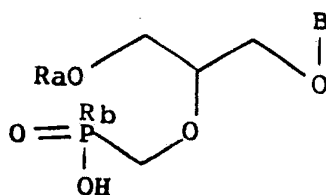
m/z: (BAR⁺, matriz tioglicerol) 376 (MH⁺).

d) A uma solução de (S)-9-[2-(dietoxifosforilmetoxi)-3-hidroxipropoxiladenina (0,09 g, 0,24 mmol) em diclorometano seco (3 ml) foi adicionado brometo de trimetilsililo (0,31 ml, 2,4 mmol) e a solução foi agitada à temperatura ambiente durante 4 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo co-evaporado com acetona/água 1:1 (x 3). A cristalização do resíduo a partir de água/acetona deu origem ao composto do título sob a forma de um sólido branco (0,06 g, 78%), p.f. 193-198%.

^1H RMN : δ_{H} [(CD₃)₂SO] 3,55 (2H, m, CH₂OH), 3,65-3,85 (3H, m, OCH₂P, CH), 4,36 (1H, dd, J = 7Hz, J = 11Hz, NOCH_B), 4,55 (1H, dd, J = 3Hz, J = 11Hz, NOCH_A), 7,61 (2H, sl, D₂O permutável NH₂), 8,19 (1H, s, H-2 ou H-8), 8,52 (1H, s, H-2 ou H-8), 2,7-5,5 (3H, largo, D₂O permutável PO(OH)₂, OH).



Os isômeros (R) e (S) que se seguem dos compostos de fórmula (IA) são preparados analogamente de acordo com métodos anteriormente aqui descritos.



R

R_a

R_b

2,4-diaminopurina

H

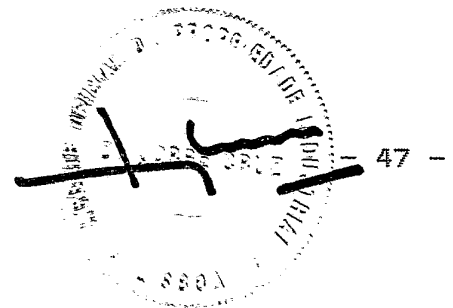
OH

adenina

uma ligação

2,4-diamino purina

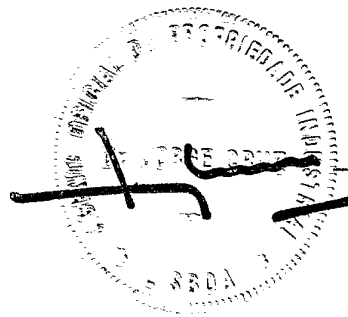
uma ligação



Actividade Antiviral

1. Teste da Redução da Placa para o Virus 1 e 2 do Herpes Simplex

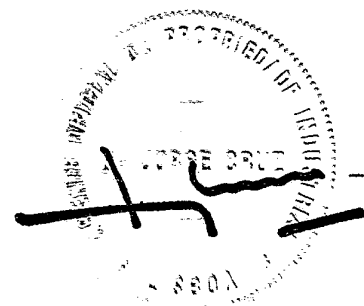
Células Vero ou MRC-5 foram feitas crescer até à confluência em multi-placas com 24 cavidades (diâmetro de cavidade = 1,5 cm). As monocamadas de células drenadas foram, cada uma delas, infectadas com aproximadamente 50 partículas infecciosas de vírus 1 do herpes simplex (HSV-2; estirpe HFEM) ou vírus 2 do herpes simplex (HSV-2; estirpe MS) em 100µl de solução salina tamponada com fosfato. O vírus foi adsorvido durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a adsorção, o inóculo residual foi removido de cada recipiente e substituído com 0,5 ml de MEM de Eagle contendo 5% de soro de vitelo recém-nascido e 0,9% de agarose (A37). Uma vez introduzida a agarose, diluições do composto do teste, que tinham sido preparadas em MEM de Eagle (contendo 5% de soro de vitelo recém-nascido) foram adicionadas, recebendo cada recipiente 0,5 ml da camada superior líquida. O composto do teste foi diluído para dar origem à seguinte série de concentrações: 200, 60, 20, 6....0,6µg/ml; as concentrações finais no ensaio variaram, assim, entre 100µg/ml e 0,03µg/ml. As culturas infectadas foram incubadas a 37°C numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂ até as placas serem claramente visíveis (2 ou 3 dias para células Vero, usualmente 1 dia para células MRC-5).



2. Teste da Redução da Placa para o Vírus Zoster da Varicela

Células MRC-5 foram feitas crescer até à confluência em multi-placas com 24 cavidades (diâmetro de cavidade = 1,5 cm). As monocamadas de células drenadas foram, cada uma delas, infectada com aproximadamente 50 partículas infecciosas de vírus zoster da varicela (VZV); estirpe Ellen) em 100µl de solução salina tamponada com fosfato. O vírus foi adsorvido durante 1 hora à temperatura ambiente. Após adsorção, o inóculo residual foi removido de cada recipiente e substituído por 0,5 ml de MEM de Eagle contendo 5% de soro de vitelo fetal inativado pelo calor e 0,9% de agarose (A37). Uma vez introduzida a agarose, diluições do composto do teste, que tinham sido preparadas em MEM de Eagle (contendo 5% de soro de vitelo fetal inativado pelo calor), foram adicionadas, recebendo cada recipiente 0,5 ml da camada superior líquida. O composto do teste foi diluído para dar origem à seguinte série de concentrações : 200, 60, 20, 6....0,06µg/ml; as concentrações finais no ensaio variaram assim, entre 100µg/ml e 0,03µg/ml. As culturas infectadas foram incubadas a 37°C numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂ até as placas serem claramente visíveis (5 ou 6 dias).

As culturas dos testes 1 e 2 foram fixadas em formal solução salina, sendo as camadas de agarose cuidadosamente eliminadas por lavagem, e sendo então as monocamadas de células coradas com carbol fucsina. Foi utilizado um microscópio estéreo para a contagem das placas. A CI₅₀ (concentração da droga que inibe o número de placas formadas em 50% em relação ao número de placas observadas para o controlo do vírus nas monocamadas) do composto do teste foi calculada. Além disso, as monocamadas foram examinadas quanto à evidência de citotoxicidade induzida pela



droga; foi registrada a concentração mínima com a qual se registou citotoxicidade.

3. Teste de Redução da Placa em relação ao Virus de Inclusão Citomegálica

Células MRC-5 foram feitas crescer até à confluência em multi-placas com 24 cavidades (diâmetro de cavidade = 1,5 cm). As monocamadas de células drenadas foram, cada uma delas, infectadas com aproximadamente 50 partículas infecciosas de virus de inclusão citomegálica (CMV; estirpe AD-169) em 100 µl de solução salina tamponada com fosfato. O virus foi adsorvido durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a adsorção, o inóculo residual foi removido de cada recipiente e substituído por 1 ml de MEM de Eagle contendo 10% de soro de vitelo fetal inativado pelo calor e 0,9% de agarose (A37). Uma vez introduzida a agarose, diluições do composto do teste, que tinham sido preparadas em MEM de Eagle (contendo 10% de soro de vitelo inativado pelo calor), foram adicionadas, recebendo cada recipiente 1 ml da camada superior líquida. O composto do teste foi diluído para dar origem à seguinte série de concentrações: 200, 60, 20, 6....0,06µg/ml; as concentrações finais no ensaio variam, assim, entre 100µg/ml e 0,03µg/ml. As culturas infectadas foram incubadas a 37°C numa atmosfera húmida contendo 5% de CO₂ até as placas serem claramente visíveis (cerca de 12 dias). As culturas são fixadas em formol solução salina, sendo as camadas de agarose eliminadas cuidadosamente por lavagem, e sendo então as monocamadas de células coradas com carbol fucsina. Foi usado um microscópio estereo para a contagem das placas. A CI₅₀ (concentração da droga que inibe o número de placas formadas em 50% em relação ao número de placas observadas nas monocamadas de controlo do virus) do composto do



teste foi calculada. Além disso, as monocamadas foram examinadas quanto a evidência de citotoxicidade induzida pela droga; foi registrada a concentração mínima com a qual ocorreu citotoxicidade.

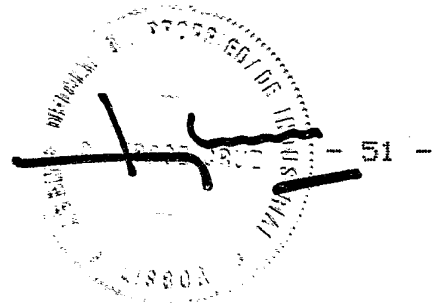
4. Teste para o Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV)

a) Teste da Citotoxicidade Celular

Linfócitos humanos periféricos foram isolados por centrifugação de gradiente de densidade a partir de colheitas feitas em doadores de sangue voluntários normais. As frações "camada cor de camurça" destes doativos foram proporcionadas pelos centros de doadores de sangue.

A camada cor de camurça foi diluída 1:1 com solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS; fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, cloreto de sódio 0,9%) e subsequentemente colocada em camada sobre Ficoll. A seguir à centrifugação (30 minutos a 400 x g) o produto sobrenadante foi eliminado e a interfase contendo os linfócitos foi recuperada. Os linfócitos foram lavados duas vezes em PBS e foram suspensos de novo finalmente no meio de cultura celular.

Foi realizada uma coloração de viabilidade por meio do método de exclusão de corante azul tripano. A concentração das células em suspensão e a percentagem de células viáveis foram calculadas. Subsequentemente, a suspensão celular foi ajustada para uma concentração de 1×10^7 células/ml. Esta suspensão celular foi transferida para frascos de cultura de tecidos: Dois terços da suspensão celular foram ativados policlonalmente pela adição



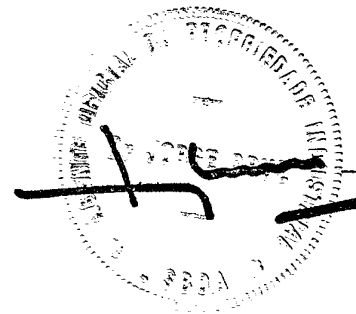
de fitohemaglutinina (concentração final 5 $\mu\text{g}.\text{ml}$) Um terço da suspensão permaneceu não estimulada.

Os linfócitos foram cultivados num incubador com uma atmosfera humidificada e 5% de CO_2 durante 48 a 64 horas a 37°C . A seguir a este período de incubação, as células foram colhidas por centrifugação, suspensas de novo em meio de cultura celular e contadas. As células estimuladas e não estimuladas foram combinadas numa relação de 2:1 e ajustadas para uma concentração de 2×10^6 células/ml com meio de cultura celular que continha, adicionalmente, 10 unidades/ml de interleuquina-2 recombinante humana.

Apenas aquelas preparações de linfócitos foram utilizadas para o teste de controlo em que mais de 70% dos linfócitos estimulados expressavam o antígeno CD 25 e mais de 45% dos linfócitos expressavam do antígeno CD 4.

Adicionaram-se 100 μg desta suspensão de linfócitos a cada cavidade das placas de microtitulação contendo os compostos do teste diluídos seriadamente entre 100 μM e 0,1 μM . Subsequentemente, as placas de microtitulação foram cultivadas durante 4 dias a 37°C .

A sobrevivência e a proliferação dos linfócitos que cresceram na presença do composto foram medidas por meio de um ensaio colorimétrico quantitativo. As células viáveis cultivadas na presença do corante MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difeniltetrazólio) reduzem este substrato amarelo claro pela actividade das suas desidrogenases mitocondriais até um formazano de cor púrpura. A quantidade de produto que é uma função do número celular e da actividade celular metabólica foi quantificada fotométricamente. Por meio deste ensaio, os efeitos potenciais



citotóxico e citostático dos compostos em relação aos linfócitos foram detectados com precisão.

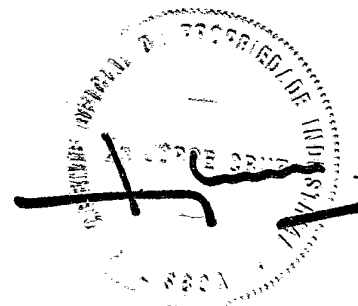
As placas de microtitulação foram centrifugadas durante 5 minutos a 900 x g. O produto sobrenadante foi eliminado e as células de cada cavidade foram suspensas de novo em 50 µl de meio de cultura celular contendo 2 mg/ml de MTT. Após quatro horas de incubação a 37°C adicionaram-se 100 µl de solvente (isopropanol com HCl 0,04 N e 10% (v/v) de Triton 100) a cada recipiente. Por agitação das placas de microtitulação o formazano foi solubilizado. Subsequentemente, as placas foram avaliadas em fotômetro ELISA no modo de comprimento de onda duplo (comprimento de onda medido: 550 nm; comprimento de onda de referência: 690 nm).

Para cada recipiente foi calculada a diferença na absorção (abs. 550 nm - abs. 690 nm). Estes dados proporcionaram a base para posterior avaliação do teste citotóxico. Foi calculada a DC_{50} aproximada (dose citotóxica semi-máxima) de cada composto.

b) Teste de Supressão do HIV

Foram preparados, cultivados, linfócitos humanos periféricos, e foram colhidos como anteriormente. Seguindo a determinação dos marcadores da superfície dos linfócitos, células não estimuladas e estimuladas por mitogénio foram combinadas numa relação de 1:2.

Em condições de segurança estas células são infectadas com uma preparação padrão de HIV. As células são sedimentadas por



centrifugação. O produto sobrenadante foi eliminado e as células foram suspensas de novo no inóculo de HIV.

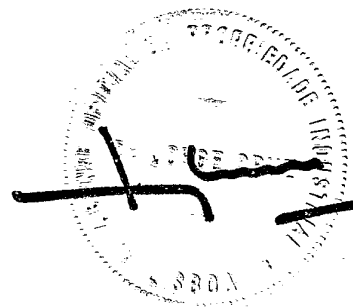
Este inóculo é uma suspensão líquida da estirpe HIV-1 do vírus, pré-testada e ajustada até um título que resulte numa síntese de proteína do núcleo viral p24 de >100 ng/ml no dia quatro a seguir à infecção dos linfócitos humanos de acordo com o protocolo.

3×10^8 linfócitos foram suspensos de novo em 1 ml de inóculo de HIV e incubados a 37°C durante 60 minutos. Subsequentemente, as células foram lavadas duas vezes com 50 ml de meio de cultura e suspensas de novo em meio de cultura contendo 10 unidades/ml de interleuquina-2 recombinante humana para proporcionar uma concentração celular de 2×10^6 células/ml. Adicionaram-se 100 μl desta suspensão celular a cada recipiente das placas de microtitulação contendo as soluções diluídas dos compostos. As placas de microtitulação foram cultivadas num incubador com uma atmosfera humidificada e 5% de CO_2 a 37°C .

Consequentemente, uma fracção de linfócitos foi infectada simuladamente com a mesma preparação de vírus que foi inactivada pelo calor (30 minutos a 56°C) antes da infecção.

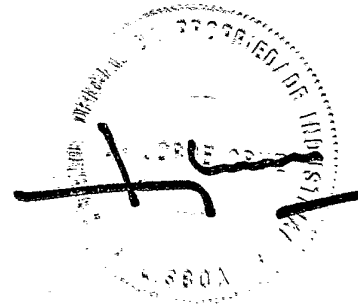
Em cada um dos dias 2, 3 e 4 após a infecção uma das placas de microtitulação que tinha sido estabelecida em triplicado foi preparada para determinação da replicação viral. O RNA viral é determinado no interior das células enquanto que a proteína p24 do núcleo viral foi detectada no produto sobrenadante da cultura de linfócitos.

Consequentemente, foram removidos 150 μl de produto sobrenadante de cada cavidade e transferidos para a cavidade de



uma placa de microtitulação contendo 50µl/recipiente de SDS (dodecilsulfato de sódio, 0,08%), Estas placas foram armazenadas congeladas. Adicionou-se às células que permaneceram em cada recipiente 50 µl de solução de paragem (1% SDS, acetato de sódio 20mM, pH 5,0, e 200 µg/ml de heparina). As placas foram armazenadas congeladas.

A concentração de p24 sintetizado pelas células infectadas com HIV foi determinada por meio de um ELISA sanduiche, enquanto que a concentração de RNA viral foi avaliado quantitativamente por hibridação de ácido nucleico, usando uma sonda de DNA marcado com ³²P em relação à região gag/pol do genoma viral. Os níveis absolutos do antígeno viral e do RNA nas amostras tratadas com droga foram comparados com controles não tratados, infectados com vírus e foi calculada a percentagem de inibição.



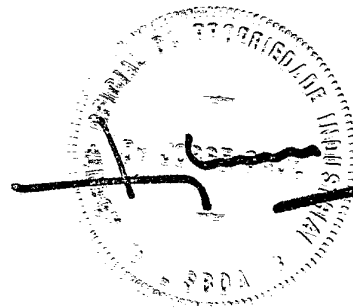
Resultados

Os compostos dos Exemplos 1, 2, 4, e 5 foram activos contra o virur HSV-1 com valores de CI_{50} de 7, 21, 25 e 73 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Os mesmos compostos testatdos contra HSV-2 deram valores de CI_{50} de 10, 15, 23 e 36 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, e contra VZV deram 17, 13, 52 e 24 mg/ml , respectivamente, e contra CMV deram 3, 3, 29 e 17 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Contra o vírus HIV, foram obtidos os rsultados que se seguem.

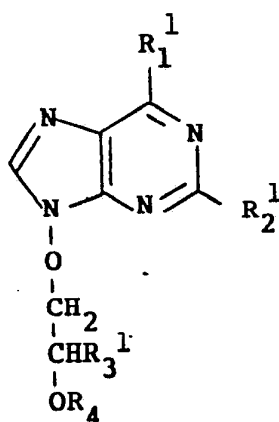
% de Inibição aos Dias 3 e 4 depois da infeccção

<u>Ex. No.</u>	<u>Concn. (μM)</u>	<u>Antigénio Viral</u>		<u>RNA Viral</u>	
		<u>Dia 3</u>	<u>Dia 4</u>	<u>Dia 3</u>	<u>Dia 4</u>
1	1	100	35	73	54
2	10	100	33	92	32
3	10	80	91	83	90
4	1	54	15	10	14
5	10	50	7	64	0



Reivindicações

1a. - Processo para a preparação do isômero (R) ou do isômero (S) de um composto com a fórmula (IA), facultativamente em mistura com até 45% da mistura, em peso, do correspondente isômero (S) ou isômero (R), respectivamente:



(IA)

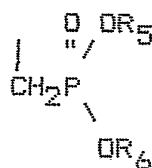
em que

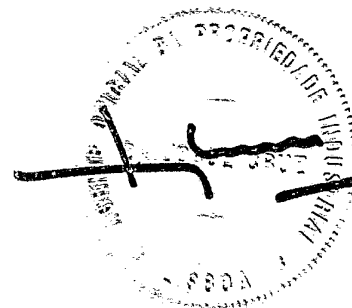
R_1 é hidroxí ou amino;

R_2 é amino ou hidrogénio;

R_3 é hidroximetilo ou aciloximetilo; e

R_4 é um grupo com a fórmula:

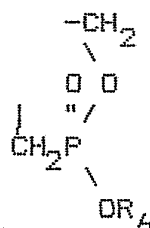




em que

R_5 e R_6 são independentemente seleccionados de entre hidrogénio, C_1-C_6 alquilo e fenilo substituído facultativamente; ou

R_3 e R_4 em conjunto são:

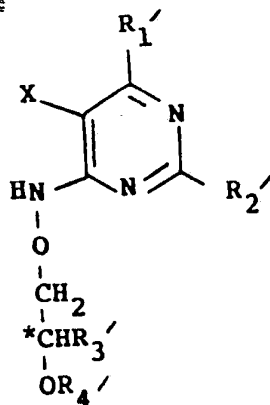


em que

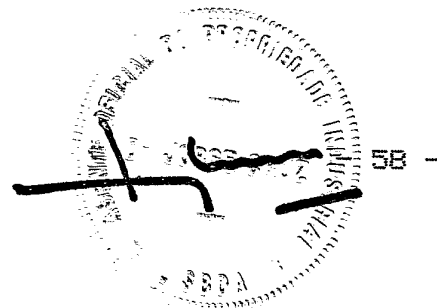
R_6 é tal como foi definido anteriormente;

caracterizado por compreender:

- i) o fecho do anel imidazole de um composto com a fórmula (II):

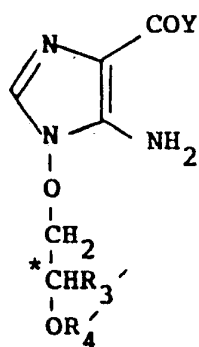


(II)



em que X é um grupo capaz de ciclização a fim de formar um anel imidazole, tal como amino ou um derivado de amino, por exemplo, formilamino; ou

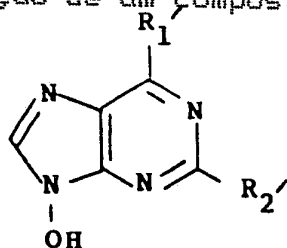
ii) o fecho do anel pirimidina de um composto com a fórmula (III):



(III)

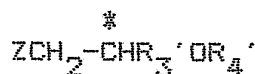
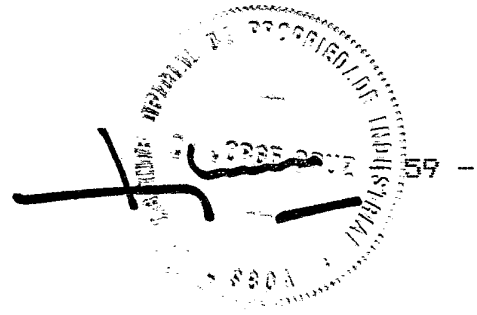
em que Y é amino ou C₁₋₆ alcoxi, com um agente de condensação capaz de ciclização a fim de formar um anel pirimidina tendo um substituinte 2-R₂', para dar origem a um composto com a fórmula (I) em que R₁ é hidroxil e R₂ é amino; ou

iii) a condensação de um composto com a fórmula (IV):



(IV)

com uma intermediário de cadeia lateral com a fórmula (V):



(V)

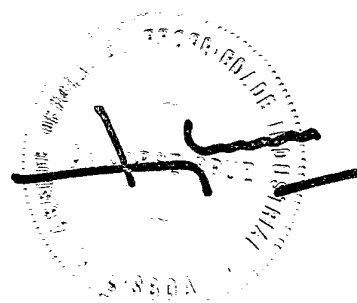
em que Z é um grupo separável e o átomo de carbono marcado com "*" nas fórmulas (II), (III) e (V) está 55% ou mais na configuração que resulta no isómero (R) ou no isómero (S) de um composto de fórmula (IA);

e em que nas fórmulas (II) a (V), R_1' , R_2' , R_3' e R_4' são R_1^1 , R_2^1 , R_3^1 e R_4 respectivamente, ou grupos ou átomos neles convertíveis; e em seguida, quando desejado ou necessário, a conversão de R_1' , R_2' , R_3' e/ou R_4' , quando diferentes de R_1^1 , R_2^1 , R_3^1 e/ou R_4 em R_1^1 , R_2^1 , R_3^1 e/ou R_4 respectivamente, e/ou a conversão de R_1' , R_2' , R_3' e/ou R_4' quando R_1^1 , R_2^1 , R_3^1 e/ou R_4 , em outros R_1^1 , R_2^1 , R_3^1 e/ou R_4 .

2a. - Processo para a preparação do isómero (R) ou do isómero (S) de um composto de fórmula (IA), como definido na reivindicação 1, ou de um seu sal farmacologicamente aceitável, facultativamente em mistura com até 45% da mistura, em peso, do correspondente isómero (S) ou isómero (R), respectivamente, caracterizado por compreender a resolução de uma mistura de isómeros (R) e (S) de um composto de fórmula (IA), até ao ponto em que a fracção de resolução que contém, predominantemente, o isómero (R) ou o isómero (S), contenha facultativamente até 45% da fracção de resolução, em peso, do correspondente isómero (S) ou isómero (R), respectivamente; e, facultativamente, a formação de um seu sal farmacologicamente aceitável

3a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por R_1^1 ser hidroxil e R_2^1 ser amino.

4a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por R_1^1 ser amino e R_2^1 ser hidrogénio.



5a. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por R_3^1 ser hidroximetilo.

6a. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por R_5 e R_6 serem ambos hidrogénio.

7a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por se preparar um isómero como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, o qual é o isómero (R) quando R_3 e R_4 não forem tomados em conjunto, e é o isómero (S) quando R_3 e R_4 forem tomados em conjunto.

8a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por se preparar um isómero (R) ou um isómero (S) como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, numa forma que contem desde 0 até 5% do correspondente isómero (S) ou isómero (R), respectivamente.

9a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por se preparar um isómero como definido na reivindicação 1 ou 7, o qual é:

(S)-9-[(2-hidroxi-2-oxo-1,4,2-dioxafosforinan-5-il)metoxilguanina,

(R)-9-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propoxiladenina,

(S)-9-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propoxilguanina,

(R)-9-[(2-hidroxi-2-oxo-1,4,2-dioxafosforinan-5-il)metoxilguanina, ou

(S)-9-[3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propoxiladenina,



10a. - Processo para a preparação de um medicamento para utilização no tratamento de infecções a vírus ou de doenças neoplásticas, caracterizado por se incluir no referido medicamento um isómero tal como foi definido na reivindicação 1, juntamente com um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

Lisboa, 28 de Maio de 1990

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA