



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

(21) BR 10 2012 020638-2 A2

(22) Data de Depósito: 17/08/2012
(43) Data da Publicação: 01/07/2014
(RPI 2269)



(51) Int.Cl.:

C07K 14/18
C07K 14/81
A61K 38/00
A61K 38/16
A61K 38/57
A61P 31/00
A61P 31/12

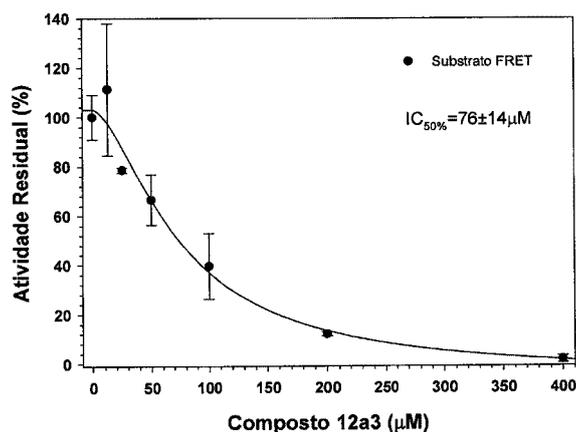
(54) **Título:** COMPOSTOS PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DERIVADOS DO ÁCIDO TARTÁRICO POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA VÍRUS DA HEPATITE C E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO TAIS COMPOSTOS

(73) **Titular(es):** Universidade Federal Fluminense, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro

(72) **Inventor(es):** Aline Cordeiro Portela, Amilcar Tanuri, Anne Miranda Capaccia, Bárbara de Azevedo Abraham Vieira, Emmerson Corrêa Brasil da Costa, Estela Maris Freitas Muri, Gustavo Tavares Ventura, Pedro Henrique Rodrigues de Alencar Azevedo, Ronaldo da Silva Mohana Borges, Sergio Pinheiro

(57) **Resumo:** COMPOSTOS PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DERIVADOS DO ÁCIDO TARTÁRICO POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA VÍRUS DA HEPATITE C E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO TAIS COMPOSTOS A presente invenção se refere a compostos peptídeo mimético derivados do ácido tartárico potencialmente ativos contra vírus da hepatite C e composição farmacêutica contendo tais compostos, desenhados como inibidores de polimerases e serina protease do vírus da Hepatite C (HCV), sintéticos, caracterizados por possui, uma estrutura do tipo 1,4:3,6-dianidromanitol e um carne tipo ácido tartárico. As porções laterais são caracterizadas por possui ligações peptídeos miméticas provenientes do acoplamento com diversos aminoésteres.

Figura 1



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSTOS PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DERIVADOS DO ÁCIDO TARTÁRICO
POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA VÍRUS DA HEPATITE C E COMPOSIÇÃO
5 FARMACÊUTICA CONTENDO TAIS COMPOSTOS

Campo da Invenção

A presente invenção se refere a COMPOSTOS PEPTÍDEO MIMÉTICOS
DERIVADOS DO ÁCIDO TARTÁRICO POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA
10 VÍRUS DA HEPATITE C E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO
TAIS COMPOSTOS, desenhados como inibidores de polimerases e serina
protease do vírus da Hepatite C (HCV), sintéticos, caracterizados por possuir,
na porção central, uma estrutura derivada do ácido tartárico. As porções
laterais são caracterizadas por possuir uma estrutura do tipo 1,4:3,6-
15 dianidromanitol e ligações peptídeo miméticas provenientes do acoplamento
com diversos aminoésteres. Esses novos compostos, se ativos contra o vírus
da hepatite C, poderão ser a base para a preparação de formulações antivirais
capazes de cessar a proliferação do HCV responsável pela flavivirose, a
Hepatite C.

20

Antecedentes da Invenção

Flaviviridae é uma grande família de patógenos virais causadores de
diversas doenças e alta taxa de óbitos entre animais, especialmente o homem.
Esta família consiste em três gêneros: Flavivirus, Pestivirus e Hepacivirus. Na
25 família *Flaviviridae*, estão incluídos os vírus da hepatite C (gênero Hepacivirus),
febre amarela, oeste do Nilo e dengue, que pertencem ao gênero Flavivirus
(Linderbach B.D.; Thiel H.J.; Rice C.M. *Flaviviridae: The viruses and their
replication in Fields Virology*. 2007, 33, 1101-1133).

A hepatite é uma doença inflamatória que compromete os hepatócitos e
30 pode ser classificada como viral, tóxica (causada pela reação ao álcool, drogas
ou medicamentos), ou auto-imune, condição na qual ocorre a ação de células
citotóxicas sobre o tecido hepático (Manual de aconselhamento em hepatites

virais / Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, DF, 2005).

No caso das hepatites virais, sete tipos já foram caracterizados: A, B, C, D, E, G e TT, que têm em comum o hepatotropismo e podem levar a inflamação e necrose hepática. As hepatites virais, particularmente, são causadas por diferentes agentes etiológicos de distribuição global, dentre eles o HCV (Craxi, A.; Laffi, G.; Zignego, A.L., Hepatitis C virus (HCV) infection: a systemic disease, *Mol. Aspects Med.* **2008**, 29, 85-95; Manns, M.P.; Foster, G.R.; Rockstroh, J.K.; Zeuzem, S.; Zoulim, F.; Houghton, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 991-1000).

O HCV causa infecções hepáticas persistentes, isto é, infecções leves, não progressivas do fígado, portanto, sem sintomas. Porém, na grande maioria dos pacientes que desenvolvem a forma severa da hepatite C a infecção se torna crônica, podendo resultar em cirrose, falência ou carcinoma do fígado causando milhares de mortes anualmente (Chevaliez S. & Pawlotsky J. M. *HCV Genome and life Cycle in Hepatitis C virus genomes and molecular biology* **2006**, 1, 5-47).

Em termos estruturais, o HCV é um vírus envelopado e possui um genoma RNA, com aproximadamente 9.4Kb. O genoma possui uma única janela aberta de leitura que codifica quatro proteínas estruturais (C, E1, E2 e p7) e seis proteínas não estruturais (NS2 a NS5B). Duas regiões não traduzidas (UTR) presentes em cada extremidade do genoma são importantes para as etapas de tradução e transcrição do genoma RNA. Baseando-se em sua história evolutiva, inferida a partir de análise filogenética, o HCV é classificado em 6 genótipos (de 1 a 6), cujos RNAs diferem em mais de 30% na sequência dos nucleotídeos. Porém, todos eles compartilham um complemento idêntico de genes co-lineares de mesmo tamanho na janela aberta de leitura, sendo as principais diferenças encontradas ao longo do genoma, principalmente em regiões que codificam a proteína de envelope E2, provavelmente originadas por mutações selecionadas imunologicamente (Simmonds P.; Bukh J.; Combet C.; Deléage G.; Enomoto N.; Feinstone S.; Halfon P.; Inchauspé G.; Kuiken C.; Maertens G.; Mizokami M.; Murphy D. G.; Okamoto H.; Pawlotsky J. M.; Penin F.; Sablon E.; Shin-I T.; Stuyver L. J.; Thiel H. J.; Viazov S.; Weiner A. J.; Widell A., Consensus proposals for a unified

system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes,. *Hepatology* **2005**, 42(4), 962-973). Há uma distribuição geográfica diferenciada em relação aos diferentes genótipos. No Brasil, os mais freqüentes são os genótipos 1, 2 e 3 com incidência de 70; 2,5 e 28%, respectivamente.

5 O genoma viral codifica uma única poliproteína longa de aproximadamente 3000 aminoácidos. Esta poliproteína é posteriormente clivada em quatro proteínas estruturais (C, E1, E2 e p7) e em seis não-estruturais (NS) designadas NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. Enquanto as proteínas estruturais são processadas por proteases da célula hospedeira
10 no retículo endoplasmático (RE), as não-estruturais são clivadas pelas proteínas NS2 e pelo complexo NS3/NS4A, que tem em sua porção N-terminal um domínio proteásico (Grakoui A.; McCourt D. W.; Wychowski C.; Feinstone S. M.; Rice, C.M., Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of the proteinase-dependent polyprotein cleavage sites, *J. Virol.* **1993**, 67, 2832-2843; Failla C.; Tomei L.; De Francesco R. J., Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins, *Virol.* **1994**, 68, 3753-3760).

A terapia mais utilizada para indivíduos com hepatite C crônica é a combinação de injeções de interferon alfa (IFN- α) e doses orais de ribavirina.
20 Estudos com pacientes submetidos a tratamento apenas com o IFN- α mostraram que somente 10-19% deles apresentaram resposta sustentada, definida como sendo a ausência de RNA do HCV detectável 24 semanas após a terapia. Quando usada a ribavirina em combinação com IFN- α , 38-43% dos pacientes tratados (infectados com os genótipos 2 a 6) apresentaram resposta
25 virológica sustentada, que veio acompanhada de melhores resultados na análise histológica (biópsia). A Ribavirina é um análogo sintético da guanósina que tem ação direta contra vírus de RNA e DNA, por provável mecanismo de inibição da RNA polimerase vírus-dependente. Ela sozinha, no entanto, não tem qualquer efeito sobre a hepatite C.

30 Associando-se o polietilenoglicol (PEG) ao IFN- α conseguiu-se uma forma do IFN- α (PEG-IFN) de absorção e eliminação mais lentas. O PEG-IFN passou a ser administrado por via subcutânea apenas uma vez por semana e neste período o nível do medicamento no sangue permanece constante. Outra

vantagem da monoterapia com o PEG-IFN é que a resposta sustentada, que era de 10-19% com IFN- α passou a ser de 39% para pacientes infectados com os genótipos 2 a 6. Este percentual, porém, aumenta com o uso da associação PEG-IFN + ribavirina, sendo então considerado o tratamento mais eficaz contra

5 hepatite C atualmente (Fried M. W.; Shiffman M. L.; Reddy K. R.; Smith C.; Marinos G.; Gonçales F. L. Jr.; Häussinger D.; Diago M.; Carosi G.; Dhumeaux D.; Craxi A.; Lin A.; Hoffman J.; Yu J., Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection, *N. Engl. J. Med.* **2002**, 347, 975-982).

Mesmo com este arsenal terapêutico, a infecção pelo HCV é

10 responsável por mais de 80% dos transplantes de fígado no mundo, e no Brasil (Consenso da Sociedade Paulista de Infectologia (SPI) para Manuseio e Terapia da Hepatite C, São Paulo, SP.). Além disso, este tratamento acarreta muitos efeitos colaterais aos pacientes, já que tanto o interferon quanto a

15 ribavirina induzem uma resposta antiviral sistêmica. O interferon causa febre, calafrios e sintomas semelhantes aos de gripe, enquanto a ribavirina pode causar anemia hemolítica, depressão severa levando a tendências suicidas e até mesmo defeitos de nascimento aos descendentes. Como consequência

destes efeitos, um estudo com portadores de HCV submetidos ao tratamento com PEG-IFN mostrou que aproximadamente 35% dos pacientes

20 abandonaram a terapia (Belon, C. A. & Frick, D. N., Helicase inhibitors as specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C, *Future Virol.* **2009** 4(3), 277-293).

Sendo assim, se torna cada vez mais evidente a necessidade de se

25 identificar drogas que tenham como alvos específicos proteínas ou o RNA do HCV, de forma a otimizar o tratamento padrão, permitindo que este apresente melhor eficácia e acarrete menos efeitos colaterais aos pacientes.

O HCV possui dois alvos potenciais para desenvolvimento de novas drogas antivirais. Um deles é a proteína NS5B RNA polimerase RNA dependente (RdRp) que consegue replicar uma molécula de RNA em outra.

30 Esta é uma atividade única dos vírus de RNA, não se encontrando essa atividade nas células hospedeiras. Dessa forma a NS5B RdRp é um alvo muito específico para o HCV. Além da replicase viral ainda temos a NS3-4A (serino-protease) que é responsável pelo processamento da poliproteína viral. Apesar

de ser uma serino-protease, a NS3 tem uma estrutura molecular muito diferente das serinas proteases das células humanas, o que

A estrutura tridimensional elucidada por cristalografia e difração de raios-X mostrou que ela possui dois subdomínios em folhas- β formando barril típico de uma quimotripsina serino-protease. Ela apresenta uma fenda de interação com o substrato localizada entre os subdomínios, importante para atividade proteolítica (Kim J. L.; Morgenstern K. A.; Lin C.; Fox T.; Dwyer M. D.; Landro J. A.; Chambers S. P.; Markland W.; Lepre C. A.; O'Malley E. T.; Harbeson S. L.; Rice C. M.; Murcko M. A.; Caron P. R.; Thomson J. A., Crystal Structure of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Domain Complexed with a Synthetic NS4A Cofactor Peptide, *Cell*, **1996**, 87, 343-355). O domínio protease da NS3 é responsável primeiramente pela auto clivagem do sítio NS3/4A da poliproteína do HCV, enquanto que as clivagens subsequentes nos outros sítios ocorrem preferencialmente na ordem NS5A/5B, NS4A/4B, NS4B/5A (Steinkuhler C.; Urbani A.; Tomei L.; Biasiol G.; Sardana M.; Bianchi E.; Pessi A.; De Francesco R., Activity of Purified Hepatitis C Virus Protease NS3 on Peptide Substrates, *J. virol.* **1996**, 70(10), 6694-6700; Steinkuhler C. *Hepacivirin in Handbook of proteolytic enzymes.* **2004**, 1773-1779).

Comparando a sequência da NS3 de outros flavivírus podemos identificar três resíduos conservados (His-57, Asp-81, and Ser-139) que compõem o centro catalítico desta protease. O centro ativo da protease NS3 contém um sítio estabilizador de um oxianion tetraédrico, intermediário da reação, "oxyanion/stabilization loop", e uma fita E2 e precedida por uma fita E1.

A NS3 assume uma estrutura de dois conjuntos de fitas beta pregueadas. O primeiro localizado na porção N-terminal contém as fitas A1, B1, C1, D1, E1, e F1. O segundo barril beta é composto pelas fitas A2, B2, C2, D2, E2, e F2.

Vários trabalhos têm sido relatados sobre inibidores de serino-protease. Recentemente, derivados hexapeptídicos contendo uma função eletrofílica α -ceto-amida têm sido descritos como potentes inibidores da serina protease de HCV (Arasappan, A.; Njoroge, F.G.; Chan, T.-Y.; Bennett, F.; Bogen, S.L.; Chen, K.; Gu, H.; Hong, L.; Jao, E.; Liu, Y.-T.; Lovey, R.G.; Parekh, T.; Pike, R.E.; Pinto, P.; Santhanam, B.; Venkatraman, S.; Vaccaro, H.; Wang, H.; Yang, X.; Zhu, Z.; Mckittrick, B.; Saksena, A.K.; Girijavallabhan, V.; Pichardo, J.;

Butkiewicz, N.; Ingram, N.; Malcolm, B.; Prongay, A.; Yao, N.; Marten, B.; Madison, V.; Kemp, S.; Levy, O.; Lim-Wilby, M.; Tamura, S.; Ganguly, A.K., Hepatitis C virus NS3-4A serine protease inhibitors: SAR of P'2 moiety with improved potency, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4180-4184). Ainda dentro da classe das α -ceto-amidas, encontram-se em desenvolvimento clínico o telaprevir e o boceprevir. (Chen, K.X.; Vibulbhan, B.; Yang, W.; Cheng, K-C.; Liu, R.; Pichardo, J.; Butkiewicz, N.; Njoroge, F.G., Potent and selective small molecule NS3 serine protease inhibitors of Hepatitis C virus with dichlorocyclopropylproline as P2 residue, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, doi:10.1016/j.bmc.2007.11.002. Perni, R.B.; Almquist, S.J.; Byrn, R.A.; Chandorkar, G.; Chaturvedi, P.R.; Courtney, L.F.; Decker, C.J.; Dinehart, K.; Gates, C.A.; Harbeson, S.L.; Heiser, A.; Kalkeri, G.; Kolaczowski, E.; Lin, K.; Luong, Y-P.; Rao, B.G.; Taylor, W.P.; Thomson, J.A.; Tung, R.D.; Wei, Y.; Kwong, A.D.; Lin, C., Preclinical profile of VX-950, a potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of hepatitis C virus NS3-4A serine protease, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 899-909).

De acordo com este panorama, os principais inibidores que têm se mostrado promissores em estudos clínicos envolvendo seres humanos até o momento se concentram na inibição do processamento proteolítico (inibidores da NS3-4A protease viral) e da replicação do genoma RNA (inibidores da NS5B RNA polimerase RNA dependente viral), conforme é possível observar na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 – Inibidores da protease e polimerase viral em desenvolvimento para o tratamento da hepatite C (Asselah, T. & Marcellin, P., New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C, *Liver International* **2011**, *31(1)*, 68-77).

Nome da droga	Fabricante	Fase do estudo	Alvo molecular
Telaprevir	Vertex - Tibotec	Fase 3	NS3-4A protease
Boceprevir	Schering-Plough/Merck	Fase 3	NS3-4A protease
TMC 435350	Tibotec/Medavir	Fase 2	NS3-4A protease
BI 201335	Boehringer Ingelheim	Fase 2	NS3-4A protease
R 7227/ITMN 191	InterMune/Roche	Fase 2	NS3-4A protease
MK 7009	Merck	Fase 2	NS3-4A protease

BMS 650032	Bristol-Myers Squibb	Fase 1	NS3-4A protease
PHX 1766	Phenomix	Fase 1	NS3-4A protease
R 7128	Roche/Pharmasset	Fase 2	NS5B RdRp
PS -7851	Pharmasset	Fase 1	NS5B RdRp
IDX 184	Idenix	Fase 1	NS5B RdRp
BI 207127	Boehringer Ingelheim	Fase 2	NS5B RdRp
Filibuvir	Pfizer	Fase 2	NS5B RdRp
GS 9190	Gilead	Fase 1	NS5B RdRp
MK 3281	Merck	Fase 1	NS5B RdRp
VCH 759	ViroChem Pharma	Fase 1	NS5B RdRp
VCH 916	ViroChem Pharma	Fase 1	NS5B RdRp
VCH 222	ViroChem Pharma	Fase 1	NS5B RdRp
ANA 598	Anadys	Fase 1	NS5B RdRp
ABT 333	Abbott	Fase 1	NS5B RdRp

Os alvos da terapia anti-HCV estão concentrados nas diferentes etapas de replicação do RNA viral, e além desses as novas terapias estão direcionadas nas etapas de tradução (ribozimas, oligos anti-senso, RNAi), processamento proteolítico (inibidores da protease viral) e de replicação do genoma RNA (inibidores da RNA polimerase viral).

Em estudos recentes, o inibidor da protease viral telaprevir foi empregado como um terceiro medicamento no tratamento de pacientes com hepatite C crônica (infectados com o genótipo 1), junto com o PEG interferon e a Ribavirina, visando a obtenção de maior resposta terapêutica. Estes estudos demonstraram que o tratamento com a adição do telaprevir aumentou a resposta virológica rápida de 11% para 79% e a resposta virológica sustentada de 35% para 61% quando comparadas às dos pacientes tratados com o tratamento padrão (McHutchison J. G.; Everson G. T.; Gordon S. C.; Jacobson I. M.; Sulkowski M.; Kauffman R.; McNair L.; Alam J.; Muir A. J., Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection, *N Engl J Med.* **2009**, *360*, 1827-1838; Hézode C.; Forestier N.; Dusheiko G.; Ferenci P.; Pol S.; Goeser T.; Bronowicki J. P.; Bourlière M.; Gharakhanian S.; Bengtsson L.; McNair L.; George S.; Kieffer T.; Kwong A.; Kauffman R. S.; Alam J.; Pawlotsky J. M.; Zeuzem S., Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection, *N Engl J Med.* **2009**, *360*, 1839-1850).

Outro inibidor da protease que também vem sendo testado é o boceprevir, que quando combinado com o tratamento padrão apresentou cerca

de 70% de aumento na resposta virológica sustentada dos pacientes com hepatite C crônica (infectados com o genótipo 1) (Kwo P. Y.; Lawitz E. J.; McCone J.; Schiff E. R.; Vierling J. M.; Pound D.; Davis M. N.; Galati J. S.; Gordon S. C.; Ravendhran N.; Rossaro L.; Anderson F. H.; Jacobson I. M.; Rubin R.; Koury K.; Pedicone L. D.; Brass C. A.; Chaudhri E.; Albrecht J. K., Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naive patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial, *Lancet*, **2010**, 376, 705-716).

Ambos os inibidores encontram-se em fase 3 de testes clínicos em humanos, ressaltando a importância da NS3-4A protease com um dos principais alvos para o tratamento de pacientes com hepatite C crônica. Entretanto, apesar do aumento na eficácia do tratamento, tanto o telaprevir quanto o boceprevir acarretam efeitos colaterais aos pacientes, como anemia, náuseas, dores de cabeça e insônia, indicando, portanto, a necessidade de testes mais aprofundados e com maior número de pacientes até que estas drogas sejam adicionadas efetivamente ao tratamento padrão do HCV (Asselah, T. & Marcellin, P., New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C, *Liver International* **2011**, 31(1), 68-77).

Na literatura patentária foram encontrados documentos relacionados à presente invenção, porém sem infringir o escopo da mesma, sendo as mais relevantes descritas a seguir:

O documento WO2008137126 descreve um método de tratamento de infecção por HCV utilizando uma combinação terapêutica compreendendo um inibidor de serina protease e um de polimerase. Não sendo um composto único como inibidor de ambas serina protease e polimerase do HCV, e tais compostos descritos fazem parte do estado da técnica.

O documento WO2007092616 descreve medicamentos, composições ou kits farmacêuticos e métodos, baseados em combinações de pelo menos um inibidor de protease de HCV, e um inibidor de polimerase de HCV, para serem administrados no tratamento de sintomas causados por HCV. Os compostos que atuam como inibidores de protease e polimerase também estão descritos.

O documento US7105499 descreve compostos que atuam como inibidores de polimerase do HCV.

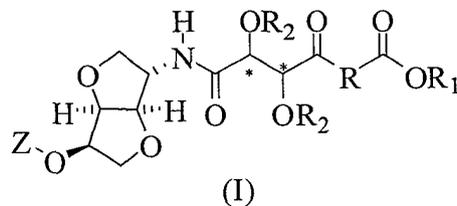
O documento US2007027071 descreve compostos macrocíclicos que atuam como inibidores de protease do HCV.

O documento PI0401908-3, de titularidade da UFRJ, descreve compostos inibidores de serina protease sintéticos, com um eixo de simetria C₂, utilizados como base para a preparação de formulações antivirais capazes de cessar a proliferação dos vírus responsáveis pela maioria das flaviroses, como por exemplo, hepatite C, Dengue e febre do oeste do Nilo.

Como pode ser observado existem diversos documentos que descrevem ou inibidores de protease ou inibidores de polimerase, ou ainda uma combinação de ambos, porém nenhum consegue descrever um composto capaz de atuar como inibidor de protease e polimerase, mais especificamente relacionado ao HCV.

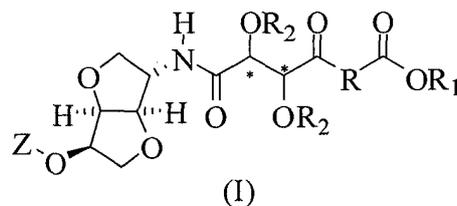
15 Sumário da Invenção

O primeiro objeto da presente invenção refere-se a compostos inibidores da serina protease e potencialmente inibidores de RNA e DNA polimerases de fórmula geral (I):



20

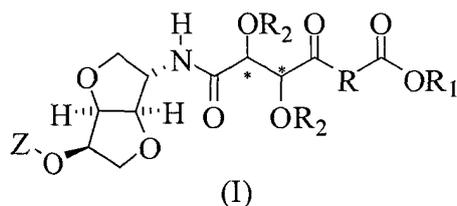
O segundo objeto dessa invenção refere-se a uma composição farmacêutica contendo o dito composto de fórmula molecular (I),



25

assim como seus derivados e/ou seus sais farmacologicamente aceitáveis, para a produção de um medicamento usados como inibidores de DNA e RNA polimerases e/ou serina proteases.

- 5 O terceiro objeto dessa invenção trata-se de uma composição farmacêutica contendo o composto de fórmula molecular (I),



- 10 assim como seus derivados e/ou seus sais farmacologicamente aceitáveis, voltados para a produção de um medicamento usado no tratamento de doenças causadas pelos vírus da família Flaviviridae em mamíferos humanos e não humanos.

Descrição das Figuras

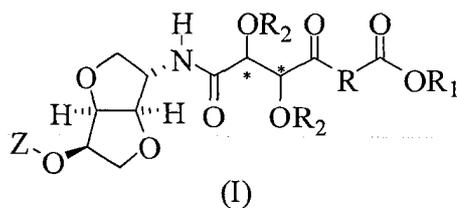
- 15 A **Figura 1**: Dose-resposta do composto **12a3** frente à atividade proteolítica da NS3/4A protease do HCV-1b. Os pontos representam as médias das atividades relativas para cada concentração do composto (0, 12.5, 25, 50, 100, 200 e 400µM) à partir de dois experimentos independentes.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção refere-se aos compostos de fórmula geral (I), desenhados como inibidores de polimerases e serina proteases.

- 25 Estes compostos são potencialmente ativos em vírus da família flaviviridae, preferencialmente; tais compostos são ativos na inibição da serina protease do HCV e vírus da dengue.

Para os compostos inibidores de polimerases e serina proteases da presente invenção de fórmula geral (I),



R é definido como aminoésteres derivados dos aminoácidos L-fenilalanina (L-Phe), L-valina (L-Val), L-glicina (L-Gly), L-prolina (L-Pro), L-arginina (L-Arg) e L-lisina (L-Lys) que serão utilizados na síntese dos pseudo-peptídeos. Sendo Z igual à benzila (-Bn), carboxibenzila (-Cbz) ou carboxi-*t*-butila (-Boc); capazes de conferir rigidez ao inibidor, e que por sua natureza também podem atuar em polimerases, como DNA ou RNA polimerases, inibindo-as.

Os ditos compostos de fórmula molecular (I), assim como seus derivados e/ou sais farmacêuticamente aceitáveis são usados em uma composição farmacêutica como inibidores de DNA e RNA polimerases e serina proteases.

Tal composição farmacêutica apresenta uma concentração que varia na faixa de 10µM a 400µM do dito composto de fórmula molecular I, assim como seus derivados e/ou sais farmacêuticamente aceitáveis.

Para fins dessa invenção os excipientes são todos aqueles compostos químicos que tem como objetivo dar forma, volume, estabilidade a composição farmacêutica. Todos os excipientes que aqui serão usados são aqueles das indústrias farmacêuticas tais como: adjuvantes, edulcorantes, solventes, estabilizantes, antioxidantes, conservantes, tampões, flavorizantes, tensoativos, umectantes, lubrificantes, dispersantes e todos aqueles conhecidos por um técnico na área.

Os tais excipientes podem ser empregados em diferentes formas farmacêuticas, tais como pós, comprimidos, cápsulas, nanocápsulas, nanoesferas, processos de hot-melt extrusion, co-cristais, ampolas, soluções orais, adesivos transdérmicos, soluções injetáveis musculares ou parenterais, pomadas, cremes, géis, suspensões, emulsões, aerosóis, tinturas, elexires, pastas, pastilhas, supositórios, ugüentos, óvulos, e todas aquelas conhecidas por um técnico da arte.

Tal composição farmacêutica que contém os compostos (I), assim como seus derivados e sais farmaceuticamente aceitáveis, é empregada para a produção de um medicamento no tratamento de doenças causadas pelos vírus da família Flaviviridae, compreendendo os vírus dessa família os vírus da hepatite C, da dengue, da febre amarela, da febre do oeste ou febre do Nilo, sendo preferencialmente empregado no tratamento de doenças provocadas pelo vírus da dengue e da hepatite C. No caso da hepatite C estão compreendidos os seguintes vírus A, B, C, D, E, G e TT.

Compostos de fórmula geral (I) foram produzidos a partir do isomanídeo como análogos dos previamente publicados pelo grupo, com a analogia adicional a pró-nucleosídios, isto é, compostos capazes de inibir polimerases. Sua analogia estrutural com dipeptídeos rígidos cíclicos o faz um excelente chassi, cerne rígido, "scaffold". Além disto, pelo fato de apresentar um eixo C2 de simetria, pode ser homologado, em duas ou em uma posição, mantendo ou não o eixo de simetria, via reação com diferentes aminoácidos e diidroaminoácidos, por exemplo, via acoplamento direto catalisado por EDC, HOBt, e aminoácidos.

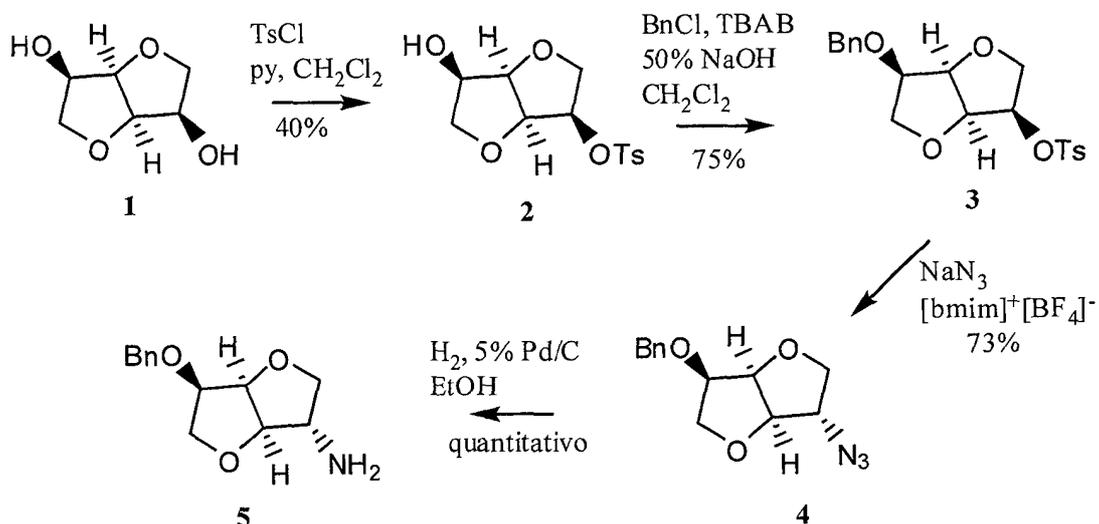
A partir dos dados obtidos anteriormente passou-se, então, a etapa de síntese dos inibidores da serina protease previstos.

A primeira etapa na obtenção dos derivados de fórmula geral (I) consistiu na conversão do isomanídeo (**1**) no derivado mono-tosilado **2** por reação com cloreto de *p*-toluenosulfonila em piridina por 12h a temperatura ambiente. O tratamento do mono-tosilado **2** com cloreto de benzila em meio básico usando TBAB como catalisador de transferência de fases forneceu o derivado benzilado **3**. Este reagiu com azida de sódio em [bmim]BF₄ a 120°C por 12h e forneceu a azida **4**, com inversão de configuração. Redução da azida **4** com paládio sobre carbono em etanol por 12h utilizando uma pressão de 40psi resultou na amina **5** (Esquema 1) (Barros, T. G.; Pinheiro, S.; Williamson, J. S.; Tanuri, A.; Pereira, H. S.; Brindeiro, R. M.; Alonso Neto, J. B.; Antunes, O. A. C.; Muri, E. M. F.; *Synthesis*. **2009**, 620. Barros, T. G.; Pinheiro, S.; Williamson, J. S.; Tanuri, A.; Pereira, H. S.; Brindeiro, R. M.; Alonso Neto, J. B.; Antunes, O. A. C.; Muri, E. M. F.; *Amino acids*. **2010**, *3*, 701).

Diferentes solventes podem ser usados na etapa de substituição nucleofílica, tais como, DMF e DMSO. Porém, o [bmim]BF₄, líquido iônico,

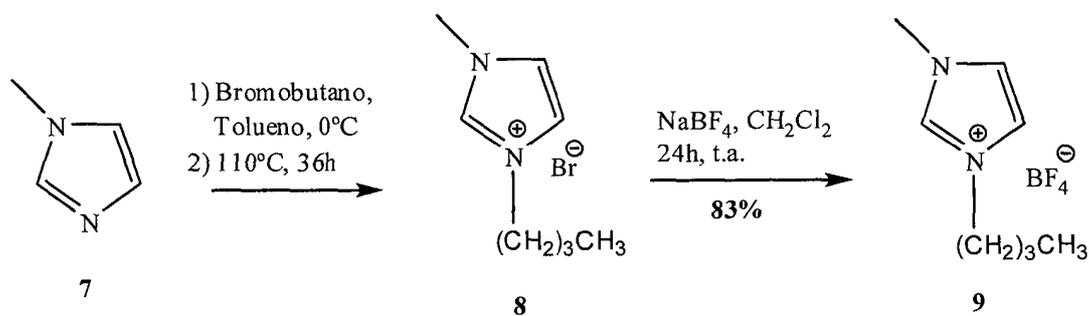
apresenta muitas vantagens em relação aos solventes orgânicos convencionais, além de ter apresentado um melhor rendimento reacional. Os líquidos iônicos não possuem pressão de vapor mensurável à temperatura ambiente, e mesmo a temperaturas bastante elevadas degradam apenas
 5 acima de 400°C, podendo ser usados em vácuo sem que haja perda de solvente.

O líquido iônico, [bmim]BF₄ **9** foi sintetizado a partir do N-metilimidazol (**7**). Este reagiu com o 1-bromobutano formando o derivado **8** que, por troca iônica com NaBF₄, originou **7**. O líquido iônico foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel tendo como eluente o diclorometano, sendo obtido
 10 em 83% de rendimento como mostrado no esquema 2.



Esquema 1. Síntese dos compostos intermediários para a obtenção da amina **5**.

15



Esquema 2. Síntese do líquido iônico [Bmim]⁺[BF₄]⁻.

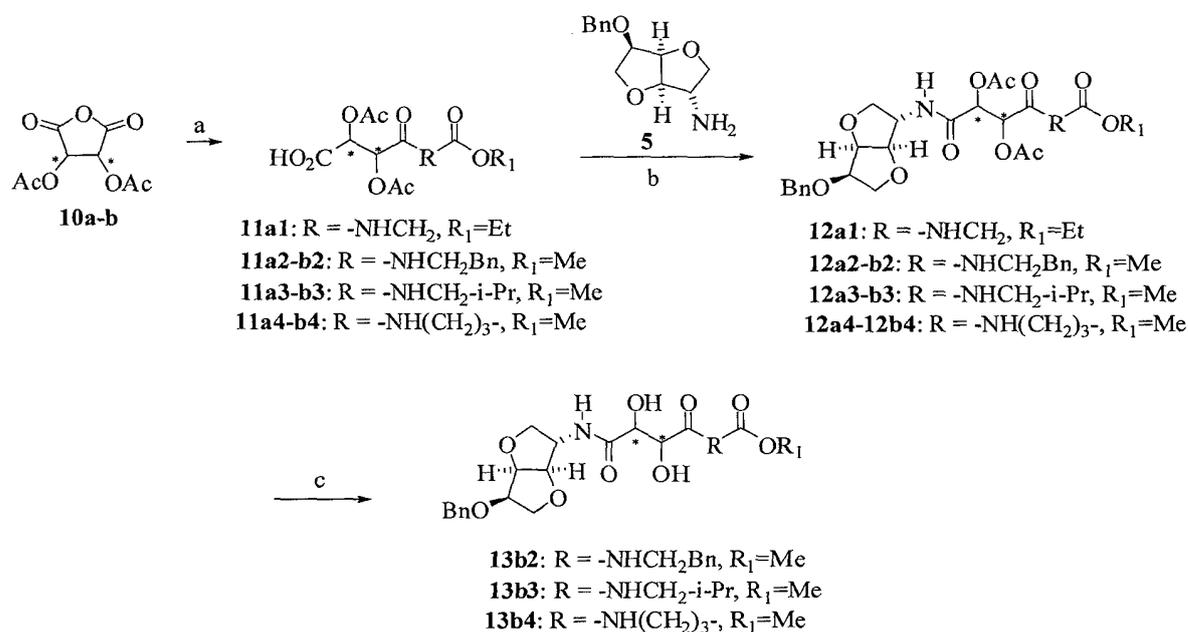
Compostos contendo o cerne ácido tartárico não hidrolisável tem sido descritos como inibidores de HIV-1 protease (Peçanha, E. P.; Figueiredo, L. J. O.; Brindeiro, R. M.; Tanuri, A.; Calazans, A. R.; Antunes, O. A. C.; *// Farmaco*. **2003**, *58*, 149. Barros, J. C.; da Silva, J. F. M.; Calazans, A.; Tanuri, A.;
5 Brindeiro, R. M.; Williamson, J. S.; Antunes, O. A. C.; *Lett. Org. Chem.* **2006**, *3*, 882. Resende, G. O.; Aguiar, L. C. S.; Cotrim, B. A.; daSilva, J. F. C.; Antunes, O. A. C.; *Lett. Org. Chem.* **2007**, *4*, 168). Peptideo miméticos derivados do ácido L-tartárico já foram sintetizados pelo protocolo clássico, EDC/HOBt a partir do ácido livre, ou usando o cloreto do ácido correspondente, formando
10 pseudo-peptideos com um eixo C2 de simetria (Peçanha, E. P.; Figueiredo, L. J. O.; Brindeiro, R. M.; Tanuri, A.; Calazans, A. R.; Antunes, O. A. C.; *// Farmaco*. **2003**, *58*, 149. Barros, J. C.; da Silva, J. F. M.; Calazans, A.; Tanuri, A.; Brindeiro, R. M.; Williamson, J. S.; Antunes, O. A. C.; *Lett. Org. Chem.* **2006**, *3*, 882).

15 Uma rota sintética eficiente para obtenção de peptideo miméticos contendo o cerne ácido tartárico, mas sem um eixo C2 de simetria é mostrada no esquema 3, partindo do O,O-anidrido tartárico de diacetila (**10a-b**), o qual é diretamente preparado respectivamente a partir dos ácidos D- e L-tartárico em bons rendimentos (Shriner, R. L.; Furow, C.L. *Org. Synth. Coll.* *4*: 242, 1963.
20 Resende, G. O.; Aguiar, L. C. S.; Cotrim, B. A.; daSilva, J. F. C.; Antunes, O. A. C.; *Lett. Org. Chem.* **2007**, *4*, 168). O O,O-anidrido D-tartárico de diacetila (**10a**) reagiu com os cloridratos do éster etílico da L-glicina, ésteres metílicos da L-fenilalanina e L-valina na presença de N-metil morfolina (NMM) formando os correspondentes pseudo-peptideos **11a1-a3** em rendimentos moderados. A
25 reação com o cloridrato do éster metílico da L-prolina não logrou sucesso então o produto **11a4** foi obtido usando a amina livre, o éster metílico da L-prolina. Da mesma forma o O,O-anidrido L-tartárico de diacetila (**10b**) reagiu com os cloridratos dos ésteres metílicos da L-fenilalanina e L-valina fornecendo os ácidos **11b2-b3**. O composto **11b4** também foi obtido usando a amina livre do
30 éster metílico da L-prolina (Esquema 3) (Resende, G. O.; Aguiar, L. C. S.; Cotrim, B. A.; daSilva, J. F. C.; Antunes, O. A. C.; *Lett. Org. Chem.* **2007**, *4*, 168).

Assim, uma reação de acoplamento dos ácidos **11a-b** e a amina **5**, preparada de acordo com o esquema 1, empregando o protocolo clássico

EDC/HOBt/NMM, forneceu os correspondentes peptídeo miméticos **12a-b** em rendimentos moderados (Esquema 3).

Com o intuito de verificar a importância dos grupos acetila na atividade biológica dos compostos sintetizados, os compostos **12b2-b4** foram seletivamente desprotegidos em condições básicas. Metanólise seletiva dos grupos acetila foi obtida tratando os referidos compostos com K_2CO_3 em metanol obtendo os dióis **13b2-b4** em bons rendimentos. (Resende, G. O.; Aguiar, L. C. S.; Cotrim, B. A.; daSilva, J. F. C.; Antunes, O. A. C.; *Letf. Org. Chem.* **2007**, 4, 168).



10

Esquema 3. Síntese dos compostos **(11)**, **(12)** e **(13)**. **a** HCl.H₂NCH₂CO₂CH₂CH₃ ou HCl.H₂NCH(Bn)CO₂CH₃ ou HCl.H₂NCH(iPr)CO₂CH₃ ou HCl.HN(CH₂)₃CO₂CH₃, NMM, CH₂Cl₂, 0 °C, 30 min., 40% (**11a1**), 55% (**11a2**), 50% (**11a3**), 84% (**11a4**), 83% (**11b2**), 78% (**11b3**), 95% (**11b4**). **b** Composto **5**, EDC.HCl, HOBt, NMM, CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h, então t.a., 12h, 40% (**12a1**), 40% (**12a2**), 42% (**12a3**), 50% (**12a4**), 50% (**12b2**), 75% (**12b3**), 51% (**12b4**). **c.** MeOH, 0°C, K₂CO₃, t.a. 30 min., 92% (**13b2**), 74% (**13b3**), 90% (**13b4**).

20

Purificação e expressão da NS3/4A protease do HCV

O plasmídeo recombinante pET21d_6xHis-Tev-HCVNS3pro/4A (clonado no Laboratório de Genômica Estrutural do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho -IBCCF/UFRJ pelo Dr. Emmerison C. B. da Costa) foi inserido em *E. coli* da cepa BL21 [λDE3] (Novagen) e a expressão da proteína recombinante

25

6xHis-Tev-HCVNS3pro/4A foi induzida utilizando 0,5mM de isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). As células foram centrifugadas e o sedimento de bactérias foram lisados para a purificação da 6xHis-Tev-HCVNS3pro/4A utilizando coluna de afinidade HisTRAP (GE-Healthcare) (Gui-Xin Du, Li-Hua Hou, Rong-Bin Guan, Yi-Gang Tong, Hai-Tao Wang, Stablishment of a simple assay in vitro for hepatitis C virus NS3 serine protease based on recombinant substrate and single-chain protease, *World Journal of Gastroenterology*, **2002** 8(6):1088-93), seguido de excisão da cauda de 6xHis-tev da NS3pro/4A com a enzima TEV protease (Joseph J., Savithri H.S., Mutational analysis of the N1a protease from pepper vein banding potyvirus, *Archives Virology*, **2000**, 145, 2493-2002). O grau de pureza da NS3Pro/4A foi avaliado em gel de SDS-Page a 15%, e a quantificação da proteína foi realizada utilizando o kit *Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit* (Pierce) seguindo o protocolo do fabricante.

15 **Ensaio de atividade e inibição da protease recombinante NS3pro/4A do HCV:**

A avaliação da atividade proteolítica do HCV foi realizada com o kit *SensoLyte®520 HCV Protease Assay Kit *Fluorimetric** (AnaSpec,CA,USA). Este ensaio possibilita realizar a triagem de inibidores anti-HCV-NS3pro/4A com maior eficiência e sensibilidade, baseado no fenômeno de FRET (*fluorecence ressonance energy transfer*), no qual o peptídeo derivado do sítio de clivagem NS4A/NS4B encontra-se marcado com fluoróforo 5-FAM/QXL^{TM520}, sendo a fluorescência do 5-FAM suprimida pela QXL^{TM520}. A quantificação da atividade proteolítica ocorre quando o peptídeo FRET sofre a clivagem em dois fragmentos pela NS3pro/4A, com isso, a fluorescência do 5-FAM pode ser monitorada em excitação/emissão igual a 490nm/520nm. A grande vantagem na utilização do peptídeo marcado com 5-FAM, é que a emissão de fluorescência ocorre em longo comprimento de onda, sofrendo menos interferência da autofluorescência dos compostos testados.

30

Metodologia utilizada na dosagem da capacidade inibitória dos compostos descritos nesta patente.

Os compostos liofilizados foram resuspendidos em DMSO (100%) a uma concentração de 20mM. Posteriormente, 100 μ M dos compostos foram pré-

incubados a 25°C por 10 min com 56ng da enzima HCV-NS3pro/4A em volume final de 50µL do tampão de reação do kit SensoLyte®520 HCV Protease Assay Kit *Fluorimetric* (AnaSpec,CA,USA), seguindo o protocolo do fabricante. A reação foi iniciada com a adição do substrato Peptídeo 5-FAM/QXL™520 FRET, cuja clivagem do peptídeo foi monitorada no leitor de placas *SpectraMax M5* (Molecular Devices) em excitação/emissão igual a 490nm/520nm medindo a fluorescência gerada a cada 30 segundos por 60 min.

Os parâmetros cinéticos de velocidade inicial (V_i) das reações foram calculados por regressão linear ou polinomial de 3ª ordem utilizando-se o programa SigmaPlot versão 10.0 e Excel 2007, respectivamente, sendo os valores de V_i convertidos em atividade residual (%).

A triagem inicial dos 17 compostos contra a atividade proteolítica da NS3Pro/4A do HCV está demonstrada na Tabela 2. Podemos verificar que os compostos **12a3**, **13b3**, **11a1**, **12a4** tiveram melhor atividade inibitória para a protease NS3/4A do HCV, sendo que o composto **12a3** foi o mais ativo, com uma capacidade inibitória de $63\pm 13\%$. Posteriormente a dose-resposta do composto mais ativo (**12a3**) foi comparada com o inibidor padrão Ac-DE-Dif-E-Cha-C (AnaSpec, CA, USA), onde podemos observar um IC_{50} de $76\pm 14\mu M$ (Figura 1) e $0,8\pm 0,3\mu M$, respectivamente. Esses dados mostram a necessidade de mudanças estruturais na molécula objetivando uma otimização da atividade contra o sítio protease. Essas modificações na estrutura podem ser realizadas utilizando o *scaffold* da própria **12a3** como molécula protótipo.

Tabela 2 - Atividade inibitória dos 17 compostos frente à protease NS3Pro/4A do HCV numa reação *in vitro* com o kit SensoLyte® 520 HCV Protease Assay Kit (Anaspec, CA, USA). Compostos listados encontram-se em ordem decrescente de inibição

Composto	Percentual de inibição na concentração de 100µM (média%±DP)*
12a3	63±13
13b3[#]	54
11a1	49±17
12a4[#]	30

12b2[#]	26
13b2[#]	24
12a1	20±17
11b2[#]	11
12b3[#]	11
11a4[#]	10
11b4[#]	8
11b3[#]	7
12b4[#]	NI
13b4[#]	NI
12a2	NI
11a3	NI
11a2	NI

* desvio padrão obtido com os compostos testados em duplicata.

compostos testados uma única vez.

NI – não inibiu

5 A presente invenção será descrita detalhadamente através dos exemplos apresentados abaixo. É necessário frisar que a invenção não está limitada a esses exemplos e inclui variações e modificações dentro dos limites nos quais ela se aplica.

10 **Exemplo 1: Obtenção do 1,4:3,6-dianidro-mono(4-metilbenzenosulfonato)-D-manitol (2).**

A uma solução do isomanideo (1g, 6mmol) e piridina (1,10mL) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado cloreto de *p*-toluenosulfonila (1,49g, 7mmol) a 15 0°C. A reação foi agitada a temperatura ambiente por 12h e após foi diluída com CH₂Cl₂ (20mL). A solução foi lavada com água, HCl 1N e solução saturada de cloreto de sódio. Após evaporação do solvente, o sólido foi recristalizado com uma mistura de metanol/isopropanol fornecendo o produto como um sólido branco em 40% de rendimento. PF: 103-104°C.

20 RMN¹H δ ppm (CDCl₃, 300MHz): 7,84 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz); 7,34 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz); 4,91 (dd, 1H, *J* = 6,6/ 5,5 Hz); 4,42 (t, 1H, *J* = 5,1 Hz); 4,49 (t, 1H, *J* = 4,8 Hz); 4,29-4,25 (m, 1H); 4,04-3,95 (m, 2H); 3,79 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz); 3,55 (dd, 1H,

$J = 7,2/1,8$ Hz); 2,46 (s, 3H). IV ν cm^{-1} (KBr): 3526, 2933, 2866, 1596, 1359, 1189, 1173, 1050, 1019, 818, 663.

Exemplo 2: Obtenção do 1,4:3,6-dianidro-5-O-(benzil)-2-(4-metilbenzenosulfonato)-D-manitol (3).

A uma solução de **2** (10g, 33mmol), solução aquosa de KOH 50% e TBAB (0,322g, 1mmol) em CH_2Cl_2 (80mL), foi adicionado cloreto de benzila (6,54g, 38mmol). Após agitação por 12h, a mistura foi diluída com água (10mL) e a fase orgânica foi separada. A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 e seca com Na_2SO_4 . O produto foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel tendo como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila, fornecendo o produto como um óleo incolor em 75% de rendimento.

RMN¹H δ ppm (CDCl_3 , 300MHz): 7,81 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz); 7,35-7,32 (m, 7H); 4,91-4,89 (m, 1H); 4,69 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz); 4,50 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz); 4,47 (t, 2H, $J = 2,1$ Hz); 4,04-3,79 (m, 4H); 3,62 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz); 2,44 (s, 3H). IV ν cm^{-1} (filme): 3063, 2977, 2950, 2879, 1598, 1454, 1366, 1190, 1178, 1141, 1027, 853. $\alpha_D^{20} = +98$ (c, 0.1) DMSO.

Exemplo 3: Obtenção do 1,4:3,6-dianidro-2-azido-2-deoxi-5-O-(benzil)-D-Glucitol (4).

Uma mistura de **3** (1,86g, 4mmol), $[\text{bmim}]^+[\text{BF}_4]^-$ previamente seco sob vácuo a 90°C (4,8mL, 23mmol) e NaN_3 (0,93g, 14mmol) foi aquecida a 120°C por 12h. Adicionou-se água e a fase aquosa foi extraída com éter etílico. O produto foi purificado por coluna cromatográfica flash (hexano/acetato de etila), obtendo um óleo amarelo claro em 73% de rendimento.

RMN¹H δ ppm (CDCl_3 , 300MHz): 7,36-7,26 (m, 5H); 4,75 (d, 1H, $J = 11,7$ Hz); 4,66 (t, 1H, $J = 4,5$ Hz); 4,54 (d, 1H, $J = 11,7$ Hz); 4,48 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz); 4,15-4,00 (m, 4H); 3,86 (dd, 1H, $J = 6,3/2,7$ Hz); 3,66 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz). RMN ¹³C δ ppm (CDCl_3 , 75,4 MHz): 137,4 (-C), 128,3 (-CH), 127,8 (-CH), 127,7 (-CH), 86,4 (-CH), 80,5 (-CH), 78,8 (-CH), 72,6 (-CH₂), 72,4 (-CH₂), 70,7 (-CH₂), 66,2 (-CH). IV ν cm^{-1} (filme): 3063, 3031, 2946, 2878, 2102, 1455, 1320, 1256, 1135, 1100,

1083, 1021, 739. HRMS calculada para $C_{13}H_{15}N_3O_3Na$, 284,1011; encontrada, 284,1025. $\alpha_D^{20} = +92$ (c, 0.1) DMSO.

Exemplo 4: Obtenção do 1,4:3,6-dianidro-2-amino-2-deoxi-5-O-(benzil)-D-Glucitol (5)

A uma solução de **4** (0,870g, 3mmol) em etanol (25mL) foi adicionado Pd/C 5% (0,3mmol) e a mistura foi hidrogenada sob 40psi for 5h. Após esse tempo a suspensão foi filtrada em XAD-4 e lavada com etanol. Evaporado o

solvente obteve-se um óleo incolor em rendimento quantitativo.
 RMN¹H δ ppm (CDCl₃, 300MHz): 7,37-7,35 (m, 5H); 4,76 (d, 1H, $J = 11,4$ Hz); 4,68 (t, 1H, $J = 4,2$ Hz); 4,54 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz); 4,27 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz); 4,06-4,02 (m, 1H); 3,85 (dd, 1H, $J = 6,3/2,4$ Hz); 3,76 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz); 3,64 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz); 3,53 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz); 3,45 (s, 1H). RMN ¹³C δ ppm (CDCl₃, 75,4 MHz): 137,9 (-C), 128,6 (-CH), 128,0 (-CH), 127,8 (-CH), 90,0 (-CH), 80,1 (-CH), 79,4 (-CH), 76,3 (-CH₂), 72,6 (-CH₂), 70,5 (-CH₂), 58,8 (-CH). IV ν cm⁻¹(filme): 3360, 2876, 1605, 1455, 1369, 1209, 1065, 1017, 751, 700. HRMS calculada para $C_{13}H_{17}NO_3Na$, 236,1287; encontrada, 236,1284.

Exemplo 5: Obtenção do Líquido Iônico [Bmim]⁺BF₄⁻ (composto 9).

A uma solução de N-metilimidazol (200mmol, 16mL) em tolueno (25mL), a 0°C, foi adicionado 1-Bromobutano (230mmol, 25mL) lentamente e com agitação. A mistura foi deixada em refluxo (110°C) por 36 h. Foram formadas duas fases: a mais densa (viscosa) e a mais leve. Elas foram separadas. A fase viscosa foi lavada com éter etílico (3 x 50mL) e acetato de etila (3x50mL). Logo após, foi adicionado CH₂Cl₂ (150mL) e NaBF₄ (164mmol, 18g). A mistura ficou agitando por 24h à temperatura ambiente. Após este tempo, a mistura foi filtrada 2 vezes, adicionado o carvão ativo e deixada por mais 24h sob agitação. Ao final, a mistura foi filtrada, evaporada e por fim filtrada em alumina neutra lavando bem com CH₂Cl₂. O produto foi obtido como um óleo amarelo claro em 83% de rendimento.

RMN ^1H δ ppm (CDCl_3 , 300 MHz): 9,27 (s, 1H); 7,38 (s, 1H); 7,32 (s, 1H); 4,22 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz); 3,99 (s, 3H); 1,91-1,80 (m, 2H); 1,43-1,30 (m, 2H); 0,94 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz). IV ν cm^{-1} (KBr): 3606, 3418, 3161, 3119, 2964, 2939, 2877, 1634, 1574, 1467, 1385, 1338, 1286, 1170, 1062, 848, 754, 623.

5

Processo geral para obtenção dos ácidos 11a-b.

À uma solução do anidrido 10a-b (4,02mmol, 0,868g) em diclorometano anidro (5 mL) à 0°C foi adicionada gota-a-gota uma solução do apropriado cloridrato do amino éster (4,82 mmol) em diclorometano anidro (2,5mL) contendo N-metil morfolina (4,82mmol, 0,53mL). A mistura foi agitada por 12h sendo o solvente evaporado após esse tempo. O resíduo foi dissolvido em acetato de etila (ou diclorometano) e lavado sucessivamente com HCl 10% e solução saturada de NaCl. As fases orgânicas foram secas sob Na_2SO_4 e concentradas fornecendo os produtos **11a1-a3** e **11b2-b3** como óleos viscosos, os quais foram purificados por recristalização ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) obtendo um sólido higroscópico em 40% (**11a1**), 55% (**11a2**), 50% (**11a3**), 84% (**11b2**) e 78% (**11b3**) de rendimentos. A amina livre do éster metílico da L-prolina foi obtida dissolvendo o sal (7,87mmol, 1,3g) em um volume mínimo de K_2CO_3 20% e extraída oito vezes com éter etílico. Concentração das fases orgânicas forneceram a amina livre (4,02mmol, 0,519g) como um óleo a qual foi diretamente dissolvida em diclorometano (2,5mL) e adicionada à uma solução do anidrido **10** (4,02mmol, 0,868g) em diclorometano anidro (5mL). A mistura foi agitada por 12h e o solvente foi evaporado. O produto foi purificado por recristalização ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) obtendo um sólido higroscópico (**11a4**) em 84% e (**11b4**) em 95% de rendimentos.

25

Exemplo 6: Obtenção do ácido (2S,3S)-2,3-diacetoxi-4-(2-etoxi-2-oxoetilamino)-4-oxobutanóico (11a1). RMN ^1H δ (CDCl_3 , 300 MHz): 5.83 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 5.64 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 4.23 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 4.13 (1H, dd, $J = 18.3, 5.1$ Hz), 3.99 (dd, 1H, $J = 18.3, 5.1$ Hz), 2.22 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.30 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz). RMN ^{13}C δ (CDCl_3 , 75 MHz): 169.8, 169.6, 169.3, 169.1, 166.2, 71.7, 70.7, 61.8, 41.2, 20.4, 20.2, 14.0. IV (filme) ν cm^{-1} : 3851, 3626, 3369, 2926, 2853, 2479, 1746, 1731, 1694, 1681, 1652, 1634, 1538, 1532,

30

1463, 1455, 1377, 1271, 1212, 1116, 1073, 1032, 992, 896, 866, 799, 738, 702. $[\alpha]_D^{20} +20$ (c 0.10, CH₂Cl₂). HRMS (FAB): Calculada para C₁₂H₁₇NO₉ [M + 1]: 319.0903. Encontrada: 320.0611.

5 **Exemplo 7: Obtenção do ácido (2S,3S)-2,3-diacetoxi-4-((S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-ilamino)-4-oxobutanóico (11a2).** RMN ¹H δ ppm (CDCl₃, 300 MHz): 7.32-7.18 (m, 5H), 7.06 (d, 1H, J = 5.4 Hz), 5.74 (sl, 1H), 5.34 (sl, 1H), 4.79 (dd, 1H, J = 8.4, 3.9 Hz), 3.66 (s, 3H), 3.07 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H). RMN¹³C δ ppm (50 MHz, CDCl₃): 171.9, 171.2, 170.2, 169.4, 166.4, 135.2,
10 129.1, 128.6, 127.2, 72.3, 70.7, 52.6, 52.3, 37.3, 20.4, 20.3. IV (KBr) ν cm⁻¹: 3627, 3585, 3389, 2955, 1732, 1716, 1681, 1652, 1538, 1497, 1455, 1436, 1374, 1220, 1132, 1069, 946, 877, 738, 702. $[\alpha]_D^{20} +26.2$ (c 1.0, CH₂Cl₂). HRMS calculada para C₁₈H₂₁NO₉ [M + 1]: 395.1216. Encontrada: 396.6837.

15 **Exemplo 8: Obtenção do ácido (2S,3S)-2,3-diacetoxi-4-(S)-1-metoxi-3-metil-1-oxobutan-2-ilamino)-4-oxobutanóico (11a3).** RMN ¹H δ ppm (CDCl₃, 300 MHz): 6.68 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 5.76 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 5.64 (d, 1H, J = 2.7 Hz), 4.13 (dd, 1H, J = 14.4, 7.2 Hz), 3.76 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.28-1.24 (m, 1H), 0.91 (d, 3H, J = 6.9 Hz), 0.86 (d, 3H, J = 6.9 Hz). RMN¹³C δ
20 ppm (50 MHz, CDCl₃): 172.0, 169.8, 169.6, 169.2, 166.1, 72.1, 70.5, 56.9, 52.3, 31.0, 20.4, 20.1, 18.8, 17.4. IV ν (cm⁻¹) KBr: 3854, 3752, 3736, 3650, 3399, 2966, 2936, 2850, 2615, 1737, 1662, 1540, 1439, 1376, 1221, 1151, 1129, 1073, 1017, 945, 892, 823. $[\alpha]_D^{20} +12.6$ (c 1.0, CH₂Cl₂). HRMS calculada para C₁₄H₂₁NO₉ [M + 1]: 347.1216. Encontrada: 348.6792.

25

Exemplo 9: Obtenção do ácido (2S,3S)-2,3-diacetoxi-4-(2-(metoxicarbonil)pirrolidin-1-il)-4-oxobutanóico (11a4). RMN ¹H δ ppm (CDCl₃, 300 MHz): 5.74 (d, 1H, J = 4.5 Hz), 5.59 (d, 1H, J = 4.5 Hz), 4.43 (dd, 1H, J = 8.2, 3.0 Hz), 4.00-3.94 (m 1H), 3.69 (s, 3H), 3.60-3.51 (m, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.11-2.09 (m, 2H), 2.07-1.98 (m, 2H). RMN¹³C δ ppm (50 MHz, CDCl₃): 171.8, 169.9, 169.7, 169.1, 165.1, 70.9, 70.3, 59.7, 52.2, 46.9, 28.5, 24.7, 20.4, 20.3. IV ν (cm⁻¹) KBr: 3315, 2965, 2882, 1753, 1669, 1538,

1453, 1368, 1212, 1136, 1096, 1078, 961, 881, 740. $[\alpha]_D^{20}$ -47.0 (*c* 1.0, CH₂Cl₂).
HRMS calculada para C₁₄H₁₉NO₉ [M + 1]: 345.1060. Encontrada: 346.1280.

Exemplo 10: Obtenção do ácido (2*R*,3*R*)-2,3-diacetoxi-4-((*S*)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-ilamino)-4-oxobutanóico (11b2). RMN ¹H δ ppm (CDCl₃, 300 MHz): 7.32-7.22 (m, 5H), 6.60 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 5.73 (br s, 1H), 5.50 (br s, 1H), 4.88 (q, 1H, *J* = 5.7 Hz), 3.73 (s, 3H), 3.15-3.06 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H). RMN¹³C δ ppm (50 MHz, CDCl₃): 171.2, 171.1, 169.9, 169.1, 166.1, 135.2, 129.1, 128.6, 127.3, 72.3, 70.6, 52.6, 52.4, 37.4, 20.4, 20.3. IV v (cm⁻¹) KBr: 3500, 2957, 1750, 1677, 1534, 1455, 1374, 1214, 1115, 1063, 972, 703. $[\alpha]_D^{20}$ +32.5 (*c* 0.8, CH₂Cl₂). HRMS calculada para C₁₈H₂₁NO₉ [M + 1]: 395.1216. Encontrada: 396.1488.

Exemplo 11: Obtenção do ácido (2*R*,3*R*)-2,3-diacetoxi-4-((*S*)-1-metoxi-3-metil-1-oxobutan-2-ilamino)-4-oxobutanóico (11b3). RMN ¹H δ ppm (CDCl₃, 300 MHz): 6.77 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz), 6.76 (br s, 1H), 5.73 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 5.58 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 4.53 (dd, 1H, *J* = 8.8, 4.8 Hz), 3.74 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.15 (s, 1H), 2.14 (s, 1H), 0.90 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 0.86 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz). RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): 172.0, 170.2, 169.9, 169.4, 166.5, 72.4, 71.0, 56.9, 52.3, 31.1, 20.4, 20.1, 18.9, 17.5. IV v (cm⁻¹) filme: 3344, 2966, 1745, 1535, 1438, 1375, 1214, 1151, 1120, 1066, 973, 875, 736. $[\alpha]_D^{20}$ +26.7 (*c* 0.9, CH₂Cl₂). HRMS calculada para C₁₄H₂₁NO₉ [M + 1]: 347.1216. Encontrada: 348.1465.

Exemplo 12: Obtenção do ácido (2*R*,3*R*)-2,3-diacetoxi-4-((*S*)-(2-(metoxicarbonil)pirrolidin-1-il)-4-oxobutanóico (11b4). RMN ¹H δ ppm (CDCl₃, 300 MHz): 5.74 (d, 1H, *J* = 4.3 Hz), 5.63 (d, 1H, *J* = 4.3 Hz), 4.44 (dd, 1H, *J* = 8.4, 3.1 Hz), 4.00-3.95 (m 1H), 3.69 (s, 3H), 3.57-3.52 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.11-2.07 (m, 2H), 2.04-1.95 (m, 2H). RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): 171.8, 169.9, 169.7, 168.9, 70.7, 69.9, 59.7, 52.3, 47.0, 28.6, 24.7, 20.4, 20.3. IV v (cm⁻¹) filme: 3449, 2957, 1751, 1655, 1637, 1618, 1459, 1438, 1375, 1220, 1120, 1073, 874, 733. $[\alpha]_D^{20}$ -42.5 (*c* 0.8, CH₂Cl₂). HRMS calculada para C₁₄H₁₉NO₉ [M + 1]: 345.1060. Encontrada: 346.1271.

Processo geral para obtenção dos compostos 12a-b.

A uma solução do correspondente ácido **11a-b** (0,515mmol) e a amina **5** (0,618mmol, 0,145g) em diclorometano anidro (10mL) à 0°C sob atmosfera inerte, foram adicionados EDC.HCl (0,790mmol, 0,125g), HOBT (0,790mmol, 0,106g) e NMM (1,614mmol, 0,17mL). A mistura foi agitada a 0°C por 1h e a temperatura ambiente por 12h. O solvente foi evaporado e o resíduo dissolvido em acetato de etila e lavado sucessivamente com solução saturada de NaHCO₃, HCl 10% e solução saturada de NaCl. Após seco sob Na₂SO₄ e concentrado obteve-se o produto bruto **12a-b**.

Exemplo 13: Obtenção do (2S,3S)-1-((3S,6R)-6-(benziloxi)hexaidrofuro[3,2-b]furan-3-ilamino)-4-(2-etoxi-2-oxoetilamino)-1,4-dioxobutano-2,3-dil

diacetato (12a1). RMN ¹H δ ppm (CDCl₃, 300 MHz): 77.37-7.35 (m, 5H), 6.75 (t, 1H, *J* = 4.8 Hz); 6.42 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 5.65 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz), 5.53 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz), 4.76 (d, 1H, *J* = 11.7 Hz), 4.62 (t, 1H, *J* = 4.8 Hz), 4.55 (d, 1H, *J* = 11.7 Hz), 4.42 (d, 1H, *J* = 4.2 Hz), 4.39-4.34 (m, 1H), 4.22 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz), 4.10-4.05 (m, 4H), 4.00 (d, 1H, *J* = 5.1 Hz) 3.86 (dd, 1H, *J* = 9.0, 7.5 Hz), 3.67 (dd, 1H, *J* = 9.0, 7.5 Hz), 2.18 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.29 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz).
 RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): 169.3, 169.0, 168.9, 166.3, 165.7, 137.6, 128.4, 127.8, 127.7, 86.6, 80.3, 78.9, 72.9, 72.5, 71.2, 71.9, 70.8, 61.7, 57.0, 41.1, 20.5, 20.4, 14.0. IV ν (cm⁻¹) filme: 3311, 3066, 3032, 2959, 2929, 2875, 1746, 1669, 1602, 1546, 1496, 1455, 1374, 1344, 1274, 1225, 1134, 1094, 1085, 1070, 1017, 962, 912, 880, 845, 798, 780, 746, 698, 662, 638, 603. [α]_D²⁰ +28.0 (c 0.10, CH₂Cl₂). Aspecto: óleo amarelo. Rendimento: 40% após purificação por coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila). HRMS calculada para C₂₅H₃₂N₂O₁₁ [M + 1]: 536.5284; Encontrada, 537.73676.

Exemplo 14: Obtenção do (2S,3S)-1-((3S,6R)-6-(benziloxi)hexaidrofuro[3,2-b]furan-3-ilamino)-4-((S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-ilamino)-1,4-

dioxobutano-2,3-dil diacetato (12a2). RMN ¹H δ ppm (CDCl₃, 300 MHz): 7.35-7.26 (m, 8H), 7.05 (d, 2H, *J* = 4.2 Hz), 6.55 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz), 6.46 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz), 5.66 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 5.54 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 5.30 (s, 2H), 4.62 (dt, 1H, *J* = 11.4, 2.7 Hz), 4.55 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz), 4.41 (dd, 1H, *J* = 10.1, 2.4 Hz),

4.35-4.33 (m, 1H), 4.08-4.03 (m, 2H), 3.85-3.82 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.66 (t, 1H, $J = 5.0$ Hz), 3.13 (dd, 1H, $J = 11.6, 8.1$ Hz), 3.08 (dd, 1H, $J = 11.6, 8.1$ Hz), 2.13 (s, 3H), 2.06 (s, 3H). RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): 169.3, 169.2, 168.7, 165.8, 165.7, 137.6, 135.2, 129.2, 128.7, 128.5, 127.9, 127.8, 127.4, 86.8, 86.7, 80.3, 79.0, 73.0, 72.5, 72.3, 70.8, 57.1, 52.6, 52.4, 37.5, 20.5, 20.4. IV v (cm⁻¹) KBr: 3286, 3064, 3031, 2952, 2880, 2359, 1755, 1657, 1540, 1497, 1455, 1436, 1373, 1343, 1374, 1256, 1206, 1136, 1098, 1084, 1058, 1029, 963, 912, 879, 749, 700. $[\alpha]_D^{20} +50.0$ (c 0.10, CH₂Cl₂). Aspecto: sólido amarelo (Pf. 122-123°C). Rendimento: 40% após recristalização (diclorometano/éter etílico). HRMS calculada para C₃₁H₃₆N₂O₁₁ [M + 1]: 612.2319; Encontrada, 613.7522.

Exemplo 15: Obtenção do (2S,3S)-1-((3S,6R)-6-(benziloxi)hexaidrofuro[3,2-b]furan-3-ilamino)-4-((S)-1-metoxi-3-metil-1-oxobutan-2-ilamino)-1,4-dioxobutano-2,3-dil diacetato (12a3). RMN ¹H δ ppm (CDCl₃, 300 MHz): 7.35-7.33 (m, 5H), 6.68 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz), 6.58 (d, 1H $J = 4.5$ Hz), 5.66 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 5.56 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 5.51 (s, 2H), 4.74 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 4.64 (t, 1H, $J = 3.0$ Hz), 4.55 (t, 1H, $J = 3.0$ Hz), 4.35-4.33 (m, 1H), 4.06-4.03 (m, 2H), 3.87-3.80 (m, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.17-2.15 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 0.91 (d, 3H, $J = 3.9$ Hz), 0.87 (d, 3H, $J = 4.2$ Hz). RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): 169.3, 169.2, 168.9, 166.2, 166.0, 137.6, 128.3, 127.8, 127.7, 86.6, 86.5, 80.2, 78.9, 72.7, 72.4, 72.1, 70.8, 57.0, 56.9, 52.2, 30.9, 20.5, 20.4, 18.7. IV v (cm⁻¹) KBr: 3851, 3742, 3646, 3287, 3065, 2962, 2879, 1754, 1656, 1539, 1455, 1436, 1373, 1274, 1207, 1141, 1098, 1059, 1027, 964, 876, 845, 750, 699, 651. $[\alpha]_D^{20} +24.0$ (c 0.10, CH₂Cl₂). Aspecto: sólido amarelo (Pf. 112-113°C). Rendimento: 42% após recristalização (diclorometano/éter etílico). HRMS calculada para C₂₇H₃₆N₂O₁₁ [M + 1]: 564.5815; Encontrada, 565.76803.

Exemplo 16: Obtenção do (2S,3S)-1-((3S,6R)-6-(benziloxi)hexaidrofuro[3,2-b]furan-3-ilamino)-4-(R)-(2-(metoxicarbonil)pirrolidin-1-il)-1,4-dioxobutano-2,3-dil diacetato (12a4). RMN ¹H δ ppm (CDCl₃, 300 MHz): 7.36-7.28 (m, 5H), 6.48 (br s, 1H), 5.68 (d, 1H, $J = 4.9$ Hz), 5.55 (d, 1H, $J = 4.9$ Hz), 4.78 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz), 4.64-4.61 (m, 1H), 4.58 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz), 4.43-4.32 (m, 3H), 4.12-4.03 (m, 2H), 3.96-3.90 (m, 1H), 3.90-3.83 (m, 2H), 3.78 (s, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.21-2.18 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.08-2.00 (m, 2H). RMN¹³C

(50 MHz, CDCl₃): 171.7, 169.5, 169.1, 165.7, 164.7, 137.6, 128.4, 127.9, 127.8, 86.7, 80.3, 78.9, 72.8, 72.5, 71.2, 70.9, 70.3, 59.3, 57.0, 52.1, 46.8, 28.8, 24.6, 20.6, 20.3. IV ν (cm⁻¹) KBr: 3414, 2953, 2882, 1751, 1665, 1535, 1451, 1438, 1372, 1213, 1135, 1071, 960, 700. $[\alpha]_D^{20} +13.0$ (c 0.8, CH₂Cl₂). Aspecto: sólido
 5 branco higroscópico. Rendimento: 50% após purificação por coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila). HRMS calculada para C₂₇H₃₄N₂O₁₁ [M + 1]: 562.2163; Encontrada, 563.2430.

**Exemplo 17: Obtenção do (2R,3R)-1-((3S,6R)-6-(benziloxi)hexaidrofuro[3,2-
 10 b]furan-3-ilamino)-4-((S)-(1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-ilamino)-1,4-dioxobutano-2,3-dil diacetato (12b2).** RMN ¹H δ ppm (CDCl₃, 300 MHz): 7.35-7.24 (m, 8H), 7.04 (d, 2H, *J* = 6.2 Hz), 5.66 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz), 5.54 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz), 4.87 (dd, 1H, *J* = 13.7, 5.5 Hz), 4.73 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz), 4.61 (t, 1H, *J* = 4.6 Hz), 4.53 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz), 4.40 (d, 1H, *J* = 4.3 Hz), 4.34-4.32
 15 (m, 1H), 4.06-4.02 (m, 2H), 3.85-3.82 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.67 (dd, 1H, *J* = 9.0, 7.3 Hz), 3.15 (dd, 1H, *J* = 13.9, 5.4 Hz), 3.08 (dd, 1H, *J* = 13.9, 5.4 Hz), 2.12 (s, 3H), 2.05 (s, 3H). RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): 171.2, 169.3, 168.7, 165.9, 165.7, 137.6, 135.2, 129.2, 128.6, 128.4, 127.9, 127.8, 127.3, 86.7, 80.3, 78.9, 72.9, 72.5, 72.2, , 71.8, 70.8, 57.1, 52.6, 52.4, 37.5, 20.5, 20.4. IV ν (cm⁻¹)
 20 KBr: 3287, 3066, 3030, 2953, 2879, 1755, 1657, 1540, 1497, 1436, 1372, 1257, 1204, 1134, 1083, 1057, 962, 747, 699. $[\alpha]_D^{20} +68.2$ (c 0.8, CH₂Cl₂). Aspecto: sólido branco (Pf. 178-180°C). Rendimento: 50% após purificação por coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila). HRMS calculada para C₃₁H₃₆N₂O₁₁ [M + 1]: 612.2319; Encontrada, 613.2689.

25

**Exemplo 18: Obtenção do (2R,3R)-1-((3S,6R)-6-(benziloxi)hexaidrofuro[3,2-
 b]furan-3-ilamino)-4-((S)-1-metoxi-3-metil-1-oxobutan-2-ilamino)-1,4-
 dioxobutano-2,3-dil diacetato (12b3).** RMN ¹H δ ppm (CDCl₃, 300 MHz): 7.34-7.27 (m, 5H), 6.70 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 6.61 (d, 1H *J* = 7.4 Hz), 5.66 (d, 1H,
 30 *J* = 3.1 Hz), 5.56 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz), 4.75 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz), 4.64-4.61 (m, 1H), 4.54 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz), 4.51 (dd, 1H, *J* = 8.8, 4.8 Hz), 4.42-4.40 (m, 1H), 4.30-4.33 (m, 1H), 4.06-4.03 (m, 2H), 3.87-3.82 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.65 (dd, 1H, *J* = 9.0, 7.3 Hz), 2.17 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.13 (s, 1H), 0.89 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 0.85 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz). RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): 171.7, 169.4, 169.0,

166.2, 165.8, 137.6, 128.4, 127.9, 127.8, 86.7, 80.3, 78.9, 72.9, 72.5, 72.4, 71.8, 70.8, 57.1, 56.9, 52.2, 31.0, 20.6, 20.5, 18.2, 17.5. IV ν (cm^{-1}) KBr: 3279, 2963, 2876, 1753, 1654, 1541, 1468, 1373, 1259, 1208, 1144, 1061, 963, 874, 737. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +71.2 (*c* 0.8, CH_2Cl_2). Aspecto: sólido branco (Pf. 84-85°C).

5 Rendimento: 75% após purificação por coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila). HRMS calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{11}$ [$\text{M} + 1$]: 564.2319; Encontrada, 565.2684.

**Exemplo 19: Obtenção do (2*R*,3*R*)-1-((3*S*,6*R*)-6-(benziloxi)hexaidrofuro[3,2-
10 *b*]furan-3-ilamino)-4-((*R*)-2-(metoxicarbonil)pirrolidin-1-il)-1,4-dioxobutano-
2,3-dil diacetato (12b4).** RMN ^1H δ ppm (CDCl_3 , 300 MHz): 7.36-7.28 (m, 5H), 6.61 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 5.68 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz), 5.54 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz), 4.74 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz), 4.64 (t, 1H, *J* = 4.7 Hz), 4.57 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz), 4.42-4.40 (m, 1H), 4.35-4.33 (m, 2H), 4.08-4.03 (m, 3H), 3.96-3.91 (m, 1H), 3.84-
15 3.84 (m, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.23-2.19 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.04-1.97 (m, 2H). RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): 171.7, 169.5, 169.2, 165.8, 164.7, 137.6, 128.4, 127.9, 127.8, 86.7, 80.3, 78.9, 72.9, 72.5, 71.2, 70.9, 70.3, 59.3, 57.1, 52.2, 46.8, 28.8, 24.6, 20.7, 20.3. IV ν (cm^{-1}) KBr: 3314, 2955, 2880, 1751, 1668, 1538, 1453, 1372, 1212, 1135, 1096, 1070, 961, 881, 742. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$
20 +20.5 (*c* 0.8, CH_2Cl_2). Aspecto: sólido branco (Pf. 53-54°C). Rendimento: 51% após purificação por coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila). HRMS calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{11}$ [$\text{M} + 1$]: 562.2163; Encontrada, 563.2421.

**Exemplo 20: Obtenção do (2*S*)-metil-2-((2*R*,3*R*)-4-((3*S*,6*R*)-6-(benziloxi)hexaidrofuro[3,2-
25 *b*]furan-3-ilamino)-2,3-diidroxi-4-oxobutanamido)-3-fenilpropanoato (13b2).** RMN ^1H δ ppm (CD_3OD , 300 MHz): 7.37-7.18 (m, 10H), 4.76-4.75 (m, 1H), 4.71 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz), 4.70 (t, 1H, *J* = 4.7 Hz), 4.53 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz), 4.44 (d, 1H, *J* = 4.4 Hz), 4.41 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 4.39 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 4.34-4.31 (m, 1H), 4.13 (dd, 1H, *J* = 11.6,
30 6.6 Hz), 4.04 (dd, 1H, *J* = 9.6, 4.8 Hz), 3.87-3.85 (m, 1H), 3.84-3.82 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.64 (dd, 1H, *J* = 9.0, 7.0 Hz), 3.18 (dd, 1H, *J* = 13.8, 5.6 Hz), 3.08 (dd, 1H, *J* = 13.8, 5.6 Hz). RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD): 174.3, 174.0, 173.1, 139.4, 137.6, 130.4, 129.6, 129.4, 129.1, 128.9, 128.0, 88.5, 81.5, 80.7, 74.1,

74.0, 73.5, 71.8, 71.7, 58.2, 54.8, 52.8, 38.6. IV v (cm^{-1}) KBr: 3393, 30663, 3030, 2950, 2879, 1736, 1670, 1648, 1541, 1497, 1454, 1368, 1215, 1139, 1081, 911, 737, 700. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +124.3$ (c 0.6, MeOH). Aspecto: sólido amarelo (Pf. 41-42°C). Rendimento: 92% após purificação por coluna cromatográfica
 5 (eluente: hexano/acetato de etila). HRMS calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9$ $[\text{M} + 1]$: 528.2108; Encontrada, 529.2430.

Exemplo 21: Obtenção do (2S)-metil-2-((2R,3R)-4-((3S,6R)-6-(benziloxi)hexaidrofuro[3,2b]furan-3-ilamino)-2,3-diidroxi-4-

10 **oxobutanamido)-3-metil butanoato (13b3).** RMN ^1H δ ppm (CD_3OD , 300 MHz): 7.38-7.26 (m, 5H), 4.70-4.69 (m, 2H), 4.54 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz), 4.49 (d, 1H $J = 1.7$ Hz), 4.47 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz), 4.43 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 4.41 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz), 4.34-4.32 (m, 1H), 4.14 (dd, 1H, $J = 11.6, 6.6$ Hz), 4.05 (dd, 1H, $J = 9.6, 4.8$ Hz), 3.89-3.86 (m, 1H), 3.85-3.82 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.55 (dd, 1H, $J = 9.0, 7.0$ Hz), 2.21-2.14 (m, 1H), 0.96 (d, 3H, $J = 4.0$ Hz), 0.94 (d, 3H, $J = 4.0$ Hz). RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD): 174.3, 174.0, 173.2, 139.4, 129.4, 129.1, 128.9, 88.5, 81.8, 80.7, 74.1, 74.0, 73.9, 73.5, 71.8, 58.7, 58.2, 52.7, 32.4, 19.3, 18.3. IV v (cm^{-1}) KBr: 3387, 2961, 2877, 1751, 1655, 1638, 1541, 1438, 1371, 1272, 1210, 1141, 1023, 735, 699. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +96.0$ (c 0.9, MeOH). Aspecto: sólido
 15 amarelo (Pf. 44-45°C). Rendimento: 74% após purificação por coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila). HRMS calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9$ $[\text{M} + 1]$: 480.2108; Encontrada, 481.2320.

Exemplo 22: Obtenção do (2R)-metil-1-((2R,3R)-4-((3S,6R)-6-(benziloxi)hexaidrofuro[3,2b]furan-3-ilamino)-2,3-diidroxi-4-

25 **oxobutanoil)pirrolidina-2-carboxylato (13b4).** RMN ^1H δ ppm (CD_3OD , 300 MHz): 7.36-7.28 (m, 5H), 4.74 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz), 4.71-4.69 (m, 2H), 4.54 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz), 4.51-4.43 (m, 1H), 4.42 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 4.39-4.28 (m, 2H), 4.14 (dd, 1H, $J = 13.5, 7.0$ Hz), 4.07-4.03 (m, 1H), 3.91-3.89 (m, 1H), 3.86-3.82
 30 (m, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.66-3.63 (m, 2H), 2.27-2.17 (m, 2H), 2.07-1.91 (m, 2H). RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD): 174.3, 172.4, 172.2, 139.4, 129.4, 129.1, 128.9, 88.5, 81.8, 80.7, 74.1, 73.9, 73.5, 73.3, 71.7, 60.9, 58.3, 52.8, 46.6, 30.4, 25.8. IV v (cm^{-1}) KBr: 3356, 2880, 1714, 1681, 1651, 1614, 1538, 1455, 1312, 1227,

1198, 1138, 1025, 911, 883, 742, 699. $[\alpha]_D^{20} +79.6$ (c 0.6, MeOH). Aspecto: sólido branco (Pf. 47-48°C). Rendimento: 90% após purificação por coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila). HRMS calculada para $C_{23}H_{30}N_2O_9$ [M + 1]: 478.1951; Encontrada, 479.2291.

5

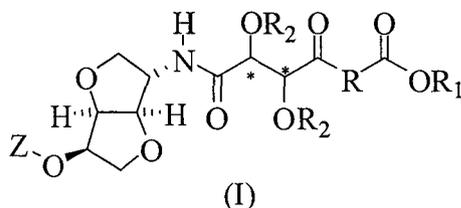
A descrição acima da presente invenção bem como os exemplos que foram apresentados atua com o propósito de ilustração e não limitam a invenção à forma aqui revelada e exemplificada. Em consequência; variações e modificações compatíveis com os ensinamentos acima; e a habilidade ou conhecimento da técnica relevante; estão dentro do escopo da presente invenção. As modalidades acima descritas e exemplificadas têm a intenção de melhor explicar os modos conhecidos para a prática da invenção e para permitir que os técnicos na área utilizem a invenção em tais; ou outras; modalidades e com várias modificações necessárias pelas aplicações específicas ou usos da presente invenção. É a intenção que a presente invenção inclua todas as modificações e variações da mesma; dentro do escopo descrito no relatório e nas reivindicações anexas.

10
15

REIVINDICAÇÕES

1-Compostos inibidores de polimerases e serina proteases **caracterizados por** possuírem a fórmula geral I,

5



onde R é definido como aminoésteres derivados dos aminoácidos L-fenilalanina (L-Phe), L-valina (L-Val), L-glicina (L-Gly), L-prolina (L-Pro), L-arginina (L-Arg) e L-lisina (L-Lys). Sendo Z igual à benzila (-Bn), carboxibenzila (-Cbz) ou carboxi-*t*-butila (-Boc), hidrogênio, alquil ou aril:

10

2-Compostos de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado por** Z ser preferencialmente benzil.

15

3-Composições farmacêuticas **caracterizadas por** conter uma quantidade farmacêuticamente aceitável em suas formulações, como ingredientes ativos, os compostos descritos nas reivindicações 1 e 2, assim como seus derivados e/ou sais isolados ou combinados.

20

4-Composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 3 **caracterizadas por** apresentarem uma concentração ativa dos compostos inibidores de serina proteases e DNA e RNA polimerases, compreendida entre 10µM a 400µM.

25

5-Composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 4 **caracterizadas por** apresentarem uma concentração preferencial de 10µM a 400 µM.

6-Composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 3 **caracterizadas pelos** excipientes empregados serem: adjuvantes, edulcorantes, solventes, estabilizantes, antioxidantes, conservantes, tampões, flavorizantes, tensoativos, umectantes, lubrificantes, dispersantes.

30

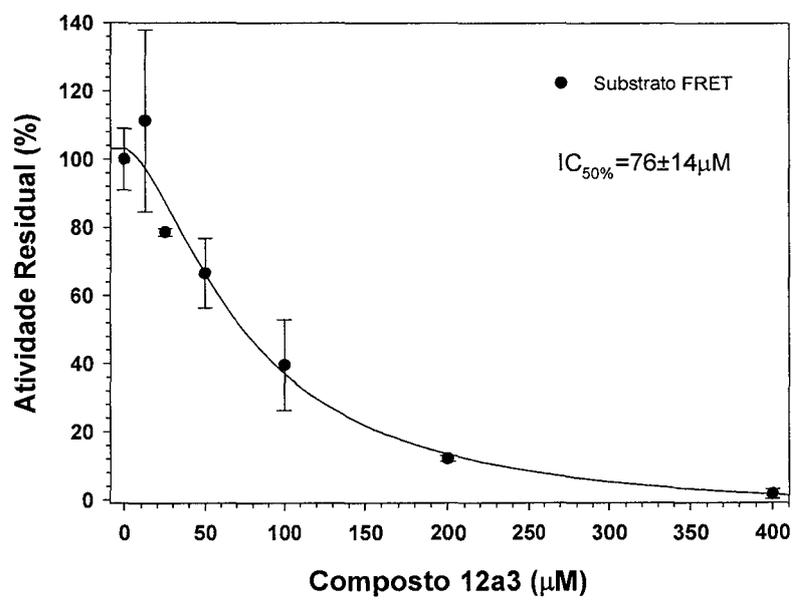
7-Composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 3 **caracterizada pelos** excipientes empregados serem dotados para produção de medicamentos antivirais nas formas farmacêuticas destinadas ao uso externo, oral ou parenteral.

8- Composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** serem empregadas no preparo de medicamentos para o tratamento de doenças causadas por vírus da família *flaviviridae*, compreendendo os vírus dessa família os vírus da hepatite C, da dengue, da febre amarela, da febre do oeste ou febre do Nilo.

9-Composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 9, **caracterizadas por** serem empregadas, mais especificamente, no tratamento de doenças causadas pelo vírus da hepatite C (HCV) e vírus da Dengue.

Figuras

Figura 1



Resumo

COMPOSTOS PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DERIVADOS DO ÁCIDO
TARTÁRICO POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA VÍRUS DA HEPATITE C E
5 COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO TAIS COMPOSTOS

A presente invenção se refere a compostos peptídeo miméticos derivados do ácido tartárico potencialmente ativos contra vírus da hepatite C e composição farmacêutica contendo tais compostos, desenhados como
10 inibidores de polimerases e serina protease do vírus da Hepatite C (HCV), sintéticos, caracterizados por possuir, uma estrutura do tipo 1,4:3,6-dianidromanitol e um cerne do tipo ácido tartárico. As porções laterais são caracterizadas por possuir ligações peptídeo miméticas provenientes do acoplamento com diversos aminoésteres.

15