



\* B R 1 0 2 0 2 4 0 1 6 3 0 4 A 2 \*

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102024016304-4 A2

(22) Data do Depósito: 09/08/2024

(43) Data da Publicação Nacional:  
24/02/2026

(54) **Título:** COMPOSTOS INIBIDORES DE CISTEÍNA PROTEASES, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DOS COMPOSTOS NA PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR CORONAVÍRUS

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/277; A61P 31/14.

(52) **CPC:** A61K 31/277; A61P 31/14.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) **Inventor(es):** CARLOS ALBERTO MONTANARI; ANDREI LEITÃO; JOÃO SANTANA DA SILVA; VINÍCIUS BONATTO; ANWAR SHAMIM; FELIPE CARDOSO PRADO MARTINS.

(57) **Resumo:** COMPOSTOS INIBIDORES DE CISTEÍNA PROTEASES, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DOS COMPOSTOS NA PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR CORONAVÍRUS. A presente invenção se refere a compostos com diferentes substituições em um esqueleto peptídico, úteis no tratamento de infecções virais respiratórias, particularmente causadas por coronavírus, como COVID-19. Ainda, a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo os compostos e ao seu uso na preparação de um medicamento para o tratamento de infecções virais respiratórias.

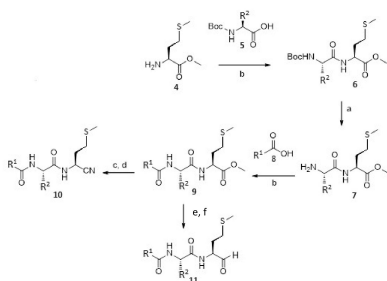


FIGURA 18

**COMPOSTOS INIBIDORES DE CISTEÍNA PROTEASES, COMPOSIÇÃO  
FARMACÊUTICA E USO DOS COMPOSTOS NA PREPARAÇÃO DE UM  
MEDICAMENTO PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR  
CORONAVÍRUS**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[1] A presente invenção se insere no campo da Química Medicinal, especificamente na área de desenvolvimento de compostos com atividade antiviral. Particularmente, a invenção descreve uma série de compostos com diferentes substituições em um esqueleto peptídico úteis no tratamento de infecções virais respiratórias, particularmente causadas por coronavírus, como COVID-19. Ainda, a presente invenção se refere a composições farmacêuticas compreendendo os referidos compostos, bem como ao seu uso na preparação de um medicamento para o tratamento de infecções virais respiratórias, particularmente causadas por coronavírus.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

[2] Os coronavírus são patógenos graves que podem causar estresse moderado a severo no sistema respiratório. Centenas de coronavírus geralmente estão presentes em animais, como morcegos, porcos e camelos. A situação torna-se altamente preocupante quando humanos são infectados (CUI, LI, SHI, 2019). A Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) foi identificada na Ásia em 2003, tendo a pneumonia como seu principal sintoma, e resultou em uma taxa de mortalidade de aproximadamente 10% (DROSTEN et al., 2003). Mais tarde, em 2012, o MERS-CoV, que causa a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS), foi identificado (CORMAN et al., 2012). A maioria dos casos foi observada na Arábia Saudita, e estudos mostram que a transmissão ocorreu a partir de camelos

(FERGUSON; VAN KERKHOVE, 2014). A taxa de mortalidade, neste caso, é de 35%, mas esse número pode estar superestimado devido a não inclusão e contagem de todos os casos leves da doença.

[3] O surto mundial de infecções por coronavírus, com uma pandemia declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), assola-nos desde 2020. Em 2024, no Estado de São Paulo, 177.439 mortes de um total de mais de 6 milhões pessoas infectadas com o vírus haviam sido reportadas. As mortes por COVID-19 ultrapassam 693 mil no Brasil, com mais de 36 milhões de pessoas infectadas com o SARS-CoV-2.

[4] Esse cenário instigou o projeto emergencial em busca de novos inibidores deste vírus, como compostos inibidores da protease principal ( $M^{pro}$ ), principal protease do coronavírus SARS-CoV-2 3CL. A SARS-CoV-2  $PL^{pro}$  também é um alvo relevante para inibidores de cisteína protease (CPs) destinados ao tratamento de infecções causadas por coronavírus. A  $M^{pro}$  emprega dois resíduos de aminoácidos para sua atividade catalítica: uma cisteína (Cys145) e uma histidina (His163) (ZHANG et al., 2020), gerando uma díade catalítica.

[5] Esta enzima é responsável por processar imensos polipeptídeos, ppla e pplab, em proteínas não estruturais maduras, a maioria das quais faz parte do complexo de replicação/transcrição (HILGENFELD, 2014). Assim, a inibição dessa enzima impediria o processamento desses polipeptídeos em proteínas não estruturais, e o processo de replicação ou propagação do vírus, portanto, seria evitado de tal forma que a infecção do organismo cessaria, justificando a seleção dessa enzima como um alvo biológico válido. A  $PL^{pro}$ , assim

como a M<sup>pro</sup>, também está envolvida na formação do complexo responsável pela replicação viral (SHIN et al., 2020).

[6] Ademais, com base na premissa da inibição dupla, em que um inibidor pode atuar em dois alvos biológicos diferentes, a inibição seletiva de catepsina L (CatL) e M<sup>pro</sup> torna-se interessante. Uma explicação para isso é que CatL cliva uma das proteínas do vírus que liga a estrutura viral à membrana da célula hospedeira (HOFFMANN et al., 2020; LIU et al., 2020; SHANG et al., 2020). Assim, ao inibir CatL, essa proteína viral não seria clivada, bloqueando a entrada viral e prevenindo a replicação do vírus no corpo.

[7] Já existem vacinas eficazes contra o SARS-CoV-2 (AMANAT; KRAMMER, 2020), mas novas variantes do vírus são relatadas diariamente em várias partes do mundo (PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2020). Além disso, considerando que muitos desses vírus são transmitidos por animais e, como os humanos transformaram a natureza ao seu redor, por meio da urbanização e desmatamento, por exemplo, não seria surpresa se outras epidemias causadas por coronavírus zoonóticos ocorressem. Assim, a necessidade de desenvolver novos tratamentos eficazes contra essa classe de vírus é mais do que justificada.

[8] O tratamento atual disponível para COVID-19 é o Paxlovid®, desenvolvido pela Pfizer, uma terapia combinada de nirmatrelvir e ritonavir (OWEN et al., 2021). A justificativa para o uso de ritonavir é que ele atua como um inibidor da CYP3A4, a enzima responsável pela metabolização significativa de substâncias estranhas. A combinação de ritonavir com nirmatrelvir diminuiria a taxa de metabolização do nirmatrelvir, aumentando, assim, sua

biodisponibilidade.

[9] Tendo em vista a importância da inibição da Catepsina L para evitar a fusão do vírus e seu papel no processo de digestão de poliproteínas, inibidores com alta seletividade sobre as catepsinas B e S também são relevantes no tratamento de infecções causadas por coronavírus.

#### **ESTADO DA TÉCNICA**

[10] Alguns documentos do estado da técnica descrevem compostos com atividade antiviral potencialmente úteis no tratamento de COVID-19, tais como:

[11] O documento patentário WO 2021/250648, intitulado "*NITRILE-CONTAINING ANTIVIRAL COMPOUNDS*" releva compostos antivirais contendo nitrila úteis na inibição e prevenção de replicação de coronavírus, tal como SARS-Cov-2, sendo os compostos inibidores de proteinase tipo 3C ("3CL").

[12] No entanto, o referido documento não revela especificamente os compostos da presente invenção, tampouco revela compostos compreendendo uma porção derivada de metionina.

[13] O composto 1 da presente invenção apresenta um perfil antiviral superior aos compostos revelados no documento patentário mencionado acima, uma vez que apresenta melhora na viabilidade celular de células infectadas com uma carga viral mais elevada e em concentrações pelo menos 10 vezes menores em comparação ao nirmatrelvir.

[14] Ademais, como visto acima, o nirmatrelvir é um metabólito da CYP3A4, sendo altamente metabolizado, além de ser um inibidor reversível dessa enzima - o que pode contribuir para interações medicamentosas. Para contornar o

problema da metabolização, o composto é administrado em associação ao ritonavir, que é um inibidor da CYP3A4. O composto 1 da presente invenção, por sua vez, não apresenta inibição da CYP3A4, sugerindo uma maior biodisponibilidade, menor toxicidade e menor probabilidade de interações medicamentosas.

[15] Adicionalmente, os compostos de fórmula (I) da presente invenção apresentam uma porção derivada de metionina na posição equivalente à lactama dos compostos revelados na publicação internacional WO 2021/250648. A partir da referida publicação internacional, entende-se que tanto a nitrila quanto a lactama são elementos essenciais para a atividade antiviral contra o SARS-CoV-2 dos compostos ali revelados. Na verdade, a lactama nesta posição é compartilhada por outros compostos que apresentam atividade sobre M<sup>Pro</sup>. Portanto, não seria esperado que a substituição da lactama dos compostos revelados no WO 2021/250648 por uma porção derivada de metionina levasse à manutenção da atividade biológica.

[16] Ainda, o composto 2 da presente invenção também apresenta um efeito aprimorado com relação aos compostos revelados na referida publicação internacional. O composto 2 da presente invenção apresenta um perfil antiviral superior ao nirmatrelvir, pois apresenta melhora na viabilidade celular de células infectadas com uma carga viral mais elevada e em concentrações pelo menos 100 vezes menores. O composto 2 também, diferentemente do nirmatrelvir, não é inibidor da CYP3A4 e apresenta alta seletividade para M<sup>Pro</sup> e CatL, em vista de outras enzimas do metabolismo humano.

[17] O artigo científico intitulado "OLGOTRELVIR, A

*DUAL INHIBITOR OF SARS-COV-2 MPRO AND CATHEPSIN L, AS A STANDALONE ANTIVIRAL ORAL INTERVENTION CANDIDATE FOR COVID-19* versa sobre o fármaco olgotrelvir (STI-1558), que foi concebido como um antiviral de próxima geração direcionado à protease principal do SARS-CoV-2 (M<sup>pro</sup>), uma enzima essencial para a replicação do SARS-CoV-2, e à catepsina L humana (CTSL), uma enzima chave para entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras.

[18] Assim como os compostos revelados na publicação internacional WO 2021/250648, o olgotrelvir também apresenta uma porção lactama, que seria considerada essencial para atividade antiviral. Adicionalmente, o olgotrelvir é um pró-fármaco, em que é liberado um composto compreendendo uma porção aldeído, o que também difere dos compostos da presente invenção. Por fim, o grupo indol presente no olgotrelvir é quimicamente distinto do anel heteroarila de cinco membros dos compostos reivindicados, preferencialmente pirazol, e do padrão de substituição do composto 1 da presente invenção. Tais grupos são substancialmente de classes diferentes e, assim, possuem disposição espacial, grau de flexibilidade, tipo de átomo capaz de realizar as interações com a enzima, propriedades farmacocinéticas envolvidas, polaridade, solubilidade, permeabilidade e estabilidade metabólica distintas.

[19] Os ensinamentos referentes ao olgotrelvir não levam aos compostos da presente invenção, tampouco sugerem os efeitos aprimorados que estes apresentam com relação a outros compostos antivirais.

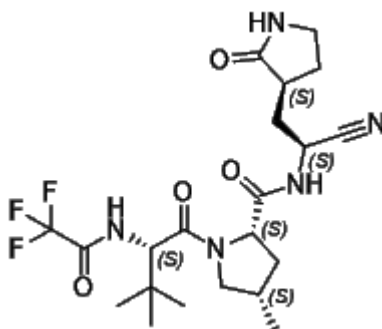
[20] Já o artigo científico intitulado "DUAL INHIBITORS OF MAIN PROTEASE (M<sup>PRO</sup>) AND CATHEPSIN L AS

POTENTANTIVIRALS AGAINST SARS-COV2” revela compostos que apresentam efeito dual sobre M<sup>Pro</sup> e capsina L como potentes antivirais contra SARS-CoV2, ensinando que motivos D-FF que exibem um modo de ligação único no sítio ativo do M<sup>Pro</sup> quando conjugados com uma ogiva eletrofílica direcionada à cisteína no terminal C.

[21] Todavia, os compostos revelados no artigo referenciado acima diferem consideravelmente dos compostos da presente invenção. Os compostos revelados no artigo são tripeptídeos, em contraste com os dipeptídeos da presente invenção. Esta mudança, naturalmente, altera diversos fatores, como maior massa molecular, potencialmente maior quantidade de pontos de metabolização e, possivelmente, podem possuir um perfil menos atraente como candidatos a fármacos por também terem a possibilidade de serem menos seletivos. Além disso, tais compostos possuem como grupo reativo um éster  $\alpha,\beta$ -insaturado, o que por si só já indica um mecanismo de ação distinto dos compostos da presente invenção, uma vez que este éster  $\alpha,\beta$ -insaturado irá atuar inibindo a enzima de maneira irreversível, enquanto os compostos da invenção inibem as enzimas alvos de maneira reversível. Portanto, os ensinamentos deste artigo científico não poderiam motivar a obtenção dos compostos da presente invenção.

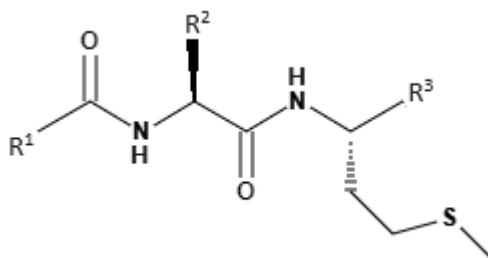
#### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[22] A presente invenção tem por objetivo propor, em uma primeira modalidade, o composto 1 (((2S,4S)-N-((S)-1-ciano-2-((S)-2-oxopirrolidin-3-il)etil)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)butanoil)-4-metilpirrolidina-2-carboxamida):

**Composto 1,**

e sais farmacologicamente aceitáveis do mesmo.

[23] Em uma segunda modalidade, a presente invenção propõe um composto de Fórmula (I):

**Fórmula (I),**

em que:

R<sup>1</sup> é uma heteroarila de 5 membros contendo um ou dois átomos de nitrogênio, opcionalmente substituída com C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila;

R<sup>2</sup> é uma C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila, opcionalmente substituída com uma C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila ou fenila; e

R<sup>3</sup> é -CN ou -CHO;

e sais farmacologicamente aceitáveis do mesmo.

[24] Ainda, a presente invenção propõe uma composição farmacêutica compreendendo o composto 1 ou os compostos de Fórmula (I) da presente invenção e um excipiente farmacologicamente aceitável, além do uso do composto 1 ou dos compostos de Fórmula (I) para preparar um medicamento

para o tratamento de infecções virais respiratórias, particularmente causadas por coronavírus.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[25] Para obter uma total e completa visualização do objetivo desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme segue.

[26] A Figura 1 apresenta os resultados de ensaios de redução do efeito citopático doméstico (CPE) em células Vero E6 com infecção por SARS-CoV-2 em 48 h para o composto 1 ((2S,4S)-N-((S)-1-ciano-2-((S)-2-oxopirrolidin-3-il)etil)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)butanoil)-4-metilpirrolidina-2-carboxamida) (a) e para o nirmatrelvir (estado da técnica) (b).

[27] A Figura 2 apresenta os resultados de ensaios de redução do efeito citopático (CPE) para determinar se o composto 2 (3-(*terc*-butil)-N-((S)-1-((S)-1-ciano-3-(metiltio)propil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida) poderia proteger células (a) A549-ACE2 e (b) Vero E6 da infecção por SARS-CoV-2 em 48 h. Em (a), o composto 2 mantém a viabilidade celular em 100% nas concentrações de 1 e 10 µM com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 (quadrado). Em MOI 0,1 (triângulo), a viabilidade celular é melhor que 80% (o valor de corte é 50%). Em (b), o composto 2 protege as células infectadas com MOIs de 0,1 e 1 nas concentrações de 10 e 100 µM (triângulo e x), sendo que na última concentração a viabilidade celular é total.

[28] A Figura 3 apresenta os resultados de ensaios de redução do efeito citopático doméstico (CPE) em células Vero E6 com infecção por SARS-CoV-2 em 48 h para o composto 2 (3-

(*terc*-butil)-N-((S)-1-(((S)-1-ciano-3-(metiltio)propil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida) (a) e para o nirmatrelvir (estado da técnica) (b).

[29] A Figura 4 apresenta os resultados de ensaios de redução do efeito citopático doméstico (CPE) em células Vero E6 com infecção por SARS-CoV-2 em 48 h para o composto 3 (3-(*terc*-butil)-N-((S)-1-(((S)-1-ciano-3-(metiltio)propil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida) (a) e para o nirmatrelvir (estado da técnica) (b).

[30] A Figura 5 mostra o espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (<sup>1</sup>H RMN) do composto 1 ((2S,4S)-N-((S)-1-ciano-2-((S)-2-oxopirrolidin-3-il)etil)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)butanoil)-4-metilpirrolidina-2-carboxamida).

[31] A Figura 6 mostra o espectro de RMN de carbono (<sup>13</sup>C RMN) do composto 1 ((2S,4S)-N-((S)-1-ciano-2-((S)-2-oxopirrolidin-3-il)etil)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)butanoil)-4-metilpirrolidina-2-carboxamida).

[32] A Figura 7 mostra o cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do composto 1 ((2S,4S)-N-((S)-1-ciano-2-((S)-2-oxopirrolidin-3-il)etil)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)butanoil)-4-metilpirrolidina-2-carboxamida).

[33] A Figura 8 mostra o espectro de ESI-MS (espectrometria de massas por ionização por electrospray) do composto do composto 1 ((2S,4S)-N-((S)-1-ciano-2-((S)-2-

oxopirrolidin-3-il)etil)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)butanoil)-4-metilpirrolidina-2-carboxamida).

[34] A Figura 9 mostra o espectro de RMN de hidrogênio (<sup>1</sup>H RMN) do composto 2 (3-(*terc*-butil)-N-((S)-1-((S)-1-ciano-3-(metiltio)propil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida).

[35] A Figura 10 mostra o espectro de RMN de carbono (<sup>13</sup>C RMN) do composto 2 (3-(*terc*-butil)-N-((S)-1-((S)-1-ciano-3-(metiltio)propil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida).

[36] A Figura 11 mostra o cromatograma de CLAE do composto 2 (3-(*terc*-butil)-N-((S)-1-((S)-1-ciano-3-(metiltio)propil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida).

[37] A Figura 12 mostra o espectro de ESI-MS do composto do composto 2 (3-(*terc*-butil)-N-((S)-1-((S)-1-ciano-3-(metiltio)propil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida).

[38] A Figura 13 mostra o espectro de RMN de hidrogênio (<sup>1</sup>H RMN) do composto 3 (3-(*terc*-butil)-1-metil-N-((S)-4-metil-1-((S)-4-(metiltio)-1-oxobutan-2-il)amino)-1-oxopentan-2-il)-1H-pirazol-5-carboxamida).

[39] A Figura 14 mostra o espectro de RMN de carbono (<sup>13</sup>C RMN) do composto 3 (3-(*terc*-butil)-1-metil-N-((S)-4-metil-1-((S)-4-(metiltio)-1-oxobutan-2-il)amino)-1-oxopentan-2-il)-1H-pirazol-5-carboxamida).

[40] A Figura 15 mostra o cromatograma de CLAE do composto 3 (3-(*terc*-butil)-1-metil-N-((S)-4-metil-1-((S)-4-(metiltio)-1-oxobutan-2-il)amino)-1-oxopentan-2-il)-1H-

pirazol-5-carboxamida).

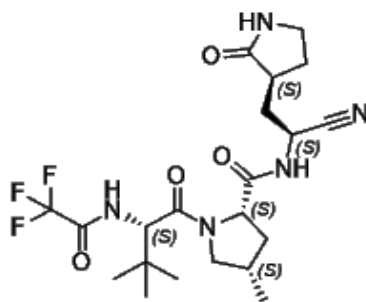
[41] A Figura 16 mostra o espectro de ESI-MS do composto do composto 3 (3-(*terc*-butil)-N-((*S*)-1-(((*S*)-1-ciano-3-(metiltio)propil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida).

[42] A Figura 17 é um esquema sintético para a obtenção do composto 1.

[43] A Figura 18 é um esquema sintético para a obtenção dos compostos de Fórmula (I).

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

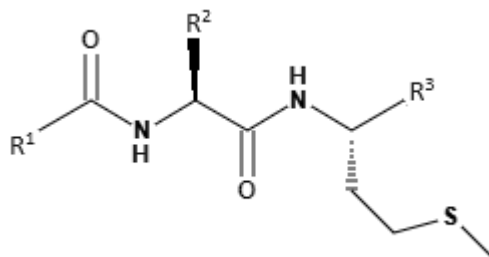
[44] A presente invenção refere-se, em uma primeira modalidade, ao composto 1:



**Composto 1,**

e sais farmacologicamente aceitáveis do mesmo.

[45] Em uma segunda modalidade, a presente invenção se refere a um composto de Fórmula (I):



**Fórmula (I),**

em que:

R<sup>1</sup> é uma heteroarila de 5 membros contendo um ou dois átomos de nitrogênio, opcionalmente substituída com C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>

alquila;

$R^2$  é uma  $C_1$ - $C_6$  alquila, opcionalmente substituída com fenila; e

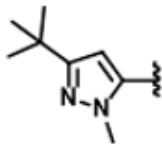
$R^3$  é  $-CN$  ou  $-C(=O)H$ ;

e sais farmacologicamente aceitáveis do mesmo.

[46] Em uma modalidade preferencial,  $R^1$  é uma pirazolila, opcionalmente substituída com uma  $C_1$ - $C_6$  alquila. Em uma modalidade preferencial, a pirazolila é substituída no átomo de nitrogênio e/ou em um átomo de carbono livre. Em uma modalidade ainda mais preferencial, a pirazolila é disubstituída, sendo uma substituição em um átomo de carbono livre e a outra substituição em um átomo de nitrogênio.

[47] Em uma modalidade preferencial,  $R^1$  é uma pirazolila, opcionalmente substituída com uma metila e/ou uma t-butila.

[48] Em uma modalidade ainda mais preferencial,  $R^1$  é

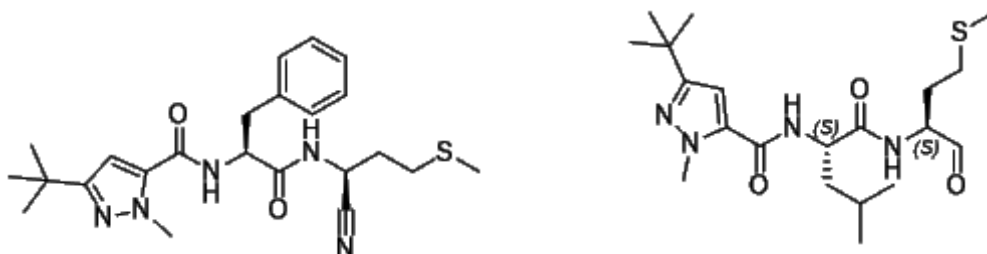


em que  representa o ponto de ligação.

[49] Em uma modalidade preferencial,  $R^2$  é selecionado a partir de metila ou isobutila, opcionalmente substituídas com uma fenila. Em uma modalidade ainda mais preferencial, a metila é substituída com uma fenila, formando uma benzila.

[50] Em uma modalidade preferencial,  $R^3$  é  $-CN$ .

[51] Em uma modalidade ainda mais preferencial, o composto de Fórmula (I) é um dos seguintes compostos, ou um sal farmacologicamente aceitável dos mesmos:



Composto 2

Composto 3

[52] Em uma modalidade ainda mais preferencial, o composto de Fórmula (I) é o composto 2 ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[53] Em uma modalidade ainda mais preferencial, o composto de Fórmula (I) é o composto 3 ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[54] No contexto da invenção, sais farmaceuticamente adequados são sais utilizados comumente na indústria farmacêutica que não apresentam efeitos tóxicos, nocivos ou biologicamente indesejáveis, como, por exemplo, cloridrato, brometo, iodeto, sulfato, besilato, mesilato, fumarato, hemi-fumarato, acetato, trifluoroacetato, citrato, malato, malonato, tartrato, lactato, gluconato, benzoato, olaxato, fosfato, difosfato, trifosfato, succinato, nitrato, benzenossulfato, metanossulfato, p-toluenossulfonato, naftalenodissulfato, salicilato, propionato, piruvato, adipato, ascorbato, hidrocloreto, dentre outros.

[55] No contexto da invenção, "heteroarila" é um anel aromático monocíclico com um ou mais heteroátomos.

[56] No contexto da invenção, "C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>alquila" é uma cadeia alifática contendo 1 a 6 átomos de carbono, reta ou ramificada. Por exemplo, metila, etila, propila, isopropila, butila, sec-butila, terc-butila, isobutila, pentila, sec-pentila, isopentila, hexila, sec-hexila.

[57] No contexto da presente invenção, "opcionalmente substituído(a)" significa que o radical é não-substituído ou é substituído em um de seus átomos de hidrogênio pelo substituinte indicado, de modo que a expressão engloba

radicais substituídos e radicais não-substituídos.

[58] Conforme esquema reacional da Figura 17, o composto 1 pode ser preparado a partir do Boc-4-metil-prolina (4), que é reagido (a) com cloreto de sulfonila para transformação em éster e concomitante desproteção do grupo Boc. A amina obtida (5) é reagida (b) com o Boc-*tert*-butil-leucina e com reagentes ativadores de ácidos carboxílicos, como HATU, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), HOBT (1-hidroxibenzotriazol), etc; acompanhado também de uma base orgânica como *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) ou trietilamina (TEA). O produto desta reação (6) é hidrolisado (c) à sua forma ácida com hidróxido de lítio, e o grupo Boc é removido (d) com ácido trifluoroacético em cloreto de metileno (DCM). A amina obtida é reagida (e) com anidrido trifluoroacético para instauração do grupo trifluoroacetamida, obtendo-se o composto (7). Finalmente, é realizado acoplamento (h) com a forma amino-amida da  $\gamma$ -lactama, e posterior desidratação da amida (i) à nitrila com o reagente de Burgess, obtendo o composto 1 (10). Por sua vez, a amino-amida da  $\gamma$ -lactama é preparada a partir da Boc- $\gamma$ -Lactama metil éster (8), a qual é dissolvida e reagida (f) com uma solução 7 N de amônia em metanol, por 48 horas à temperatura ambiente (cerca de 20°C), para obtenção de sua forma amida; e então remoção do grupo Boc- (g) pela reação com ácido trifluoroacético em diclorometano, para se obter a amina livre (9), que é utilizada na etapa (h).

[59] Os compostos de Fórmula (I) podem ser preparados a partir do *L*-metioninato de metila (4) que é reagido (b) com um ácido carboxílico compreendendo um grupo

amino protegido com Boc (t-butiloxicarbonila) e o substituinte R<sup>2</sup> (5) e com reagentes ativadores de ácidos carboxílicos, como HATU, EDC, HOBT, etc; acompanhado também de uma base orgânica como *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) ou trietilamina (TEA) em dimetilformamida (DMF). O produto desta reação (6) é submetido à desproteção do grupo Boc (a) em cloreto de metileno (DCM) com ácido trifluoroacético (TFA), levando ao composto (7), e posterior reação (b) com um ácido carboxílico substituído com R<sup>1</sup> (8), nas mesmas condições reacionais descritas acima. O composto resultante (9) é submetido a uma reação de amidação do grupo éster (c) utilizando-se uma solução de hidróxido de amônio em metanol, e posterior desidratação da amida (d) com o reagente de Burgess em DCM, para obtenção de uma nitrila (10); ou então, (9) é submetido a uma redução (e) com borohidreto de sódio em metanol para obtenção de um álcool, que é então reoxidado (f) a um aldeído (11) utilizando-se o periodinano de Dess-Martin, conforme esquema reacional representado na Figura 18.

[60] Em uma terceira modalidade, a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo o composto 1 ou um composto de Fórmula (I), ou um sal farmacêuticamente aceitável dos mesmos, e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

[61] O excipiente farmacêuticamente aceitável pode ser selecionado a partir de veículos, agentes de enchimento, aglutinantes, desintegrantes, deslizantes, lubrificantes, umectantes, tampões, conservantes, corantes, aromatizantes, edulcorantes, espessantes, emulsificantes e antioxidantes.

[62] Exemplos de veículos adequados são xarope

simples, sorbitol a 70%, glicerina, água purificada, álcool, óleo de milho, óleo de algodão, álcool isopropílico, óleo mineral, ácido oleico, óleo de amendoim e água para injeção.

[63] Exemplos de agentes de enchimento adequados são lactose, fosfato de cálcio tribásico, amido, manitol, sulfato de cálcio, celulose microcristalina, fosfato de cálcio dibásico, sorbitol, sacarose e glicose.

[64] Exemplos de aglutinantes adequados são etilcelulose, gelatina, metilcelulose, polivinilpirrolidona, amido, amido pré-gelatinizado, hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol e sacarose.

[65] Exemplos de desintegrantes adequados são amido, carboximetilcelulose sódica, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, glicolato de amido sódico e crospovidona.

[66] Exemplos de deslizantes e lubrificantes adequados são dióxido de silício coloidal, talco, ácido esteárico, laurilsulfato de sódio e octadecil fumarato de sódio.

[67] Exemplos de umectantes adequados são glicerina, propilenoglicol, sorbitol e etilenoglicol. Exemplos de tampões adequados são tampões de fosfato, acetato e de citrato.

[68] Exemplos de espessantes adequados são álcool cetílico, cera branca, cera amarela, álcool estearílico, parafina, cera microcristalina, cera de ésteres cetílicos, gomas e pectinas.

[69] Exemplos de emulsificantes adequados são monoestearato de glicerila, álcool cetílico, polissorbato 80, carboximetilcelulose sódica, alginato e pectina.

[70] Exemplos de conservantes e antioxidantes adequados são ácido benzoico, benzoato de sódio, butilparabeno, metilparabeno, propilparabeno, etilparabeno, propionato de sódio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, álcool benzílico, cloreto de cetilpiridíneo, clorobutanol, butilhidroxianisol-BHA, butilhidroxitolueno-BHT, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de ascorbila, metabissulfito de sódio, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), ácido cítrico, cisteína, vitamina C, metabissulfito de sódio, cisteína e tiosulfato de sódio e vitamina E.

[71] Exemplos de corantes adequados são vermelho eosina, azul indigotina, óxido de ferro preto e dióxido de titânio. Exemplos de edulcorantes adequados são aspartame, dextrose, manitol, sorbitol, sacarina, ciclamato sódico, açúcar, acessulfame de potássio, sucralose e esteviosídeo. Exemplos adequados de aromatizantes são baunilha, mentol, óleo de canela, óleo de anis e cacau.

[72] A composição farmacêutica da presente invenção pode estar na forma de comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas, drágeas, pastilhas, de um xarope, suspensões, soluções ou emulsões. Alternativamente, a composição farmacêutica pode estar na forma de um líquido como uma solução ou suspensão para administração intravenosa, intramuscular ou subcutânea.

[73] Em uma modalidade alternativa, as composições farmacêuticas da presente invenção compreendem um ingrediente ativo adicional, como um inibidor de serina protease ou um inibidor de catepsina L. Em uma modalidade alternativa preferencial, a composição farmacêutica

compreende, adicionalmente, um inibidor de serina protease selecionado a partir de mesilato de camostato, mesilato de nafamostato ou mesilato de gabexato, preferencialmente mesilato de camostato.

[74] As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser preparadas por métodos bem conhecidos na técnica.

[75] Em uma quarta modalidade, a presente invenção se refere ao uso do composto 1 ou de um composto de Fórmula (I) na preparação de um medicamento para o tratamento de infecções virais respiratórias.

[76] Em uma modalidade preferencial, a infecção respiratória é causada por um coronavírus, preferencialmente SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 ou HCoV-HKU1. Em uma modalidade ainda mais preferencial, a infecção respiratória é causada por SARS-CoV-2.

[77] Ainda mais preferencialmente, a infecção respiratória é COVID-19. Em uma modalidade ainda mais preferencial, a doença é COVID-19 com alta carga viral.

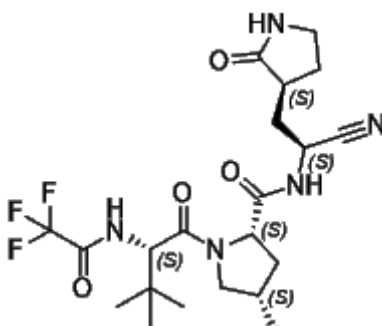
[78] Em uma modalidade alternativa, o uso dos compostos da presente invenção compreende a combinação com um ingrediente ativo adicional, como um inibidor de serina protease ou um inibidor de catepsina L. Em uma modalidade alternativa preferencial, o inibidor de serina protease é selecionado a partir de mesilato de camostato, mesilato de nafamostato ou mesilato de gabexato, preferencialmente mesilato de camostato.

[79] Para demonstrar o potencial da presente invenção, as modalidades elencadas acima serão mais detalhadamente descritas, assim como os resultados obtidos.

Cabe ressaltar que a descrição a seguir tem apenas a finalidade de elucidar o entendimento da invenção proposta e revelar, de forma mais detalhada, a concretização da invenção sem limitá-la aos mesmos. Dessa forma, variáveis similares aos exemplos também estão englobadas no escopo da invenção.

#### EXEMPLOS DE CONCRETIZAÇÃO

**Exemplo 1: Preparação do Composto 1: (2S,4S)-N-((S)-1-ciano-2-((S)-2-oxopirrolidin-3-il)etil)-1-((S)-3,3-dimetil-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)butanoil)-4-metilpirrolidina-2-carboxamida**



[80] O ácido (2S,4S)-1-(*tert*-butoxicarbonil)-4-metilpirrolidina-2-carboxílico (1,15 g, 5,0 mmol, 1,0 eq.) foi inicialmente convertido à sua forma éster pela reação com cloreto de tionila (0,8 mL, 11 mmol, 2,2 eq.) em metanol (7 mL, 0,7 mol.L<sup>-1</sup>), inicialmente a 0 °C, e posteriormente à temperatura ambiente (cerca de 20°C), durante 12 horas. Concomitantemente, considerando que há a formação de HCl no meio reacional, o grupo Boc também foi removido, de tal maneira a obter o produto (2S,4S)-4-metilpirrolidina-2-carboxilato de metila de forma quantitativa. Nenhuma purificação foi conduzida nesta etapa, e a amina livre foi

utilizada na próxima etapa diretamente.

[81] A amina (2*S*,4*S*)-4-metilpirrolidina-2-carboxilato de metila (716 mg, 5,0 mmol, 1,0 eq.) foi então reagida com o ácido (*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3,3-dimetilbutanóico (1,27 g, 5,5 mmol, 1,1 eq.) na presença do sal hexafluorofosfato azabenzotriazol tetrametil urônio (HATU - 2,09 g, 5,5 mmol, 1,1 eq.) e DIPEA (2,6 mL, 15 mmol, 3,0 eq.) em uma mistura de acetonitrila (18 mL) e dimetilformamida (DMF - 2 mL) à temperatura ambiente (cerca de 20°C) por 16 horas. A solução foi diluída com acetato de etila (40 mL) e a fase orgânica foi então lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (10 mL), solução saturada de cloreto de sódio (20 mL) e, então, seca com sulfato de sódio anidro. O produto foi purificado utilizando-se coluna cromatográfica (25 - 45% Hexano(Hex)/Acetato de Etila(EtOAc); Rf: 0,6 a 40% Hex/EtOAc), obtendo-se um sólido branco com 97% de rendimento (1,73 g).

[82] O produto obtido na etapa anterior, o (2*S*,4*S*)-1-((*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metilpirrolidina-2-carboxilato de metila (1,73 g, 4,85 mmol, 1,0 eq.) foi então hidrolisado, para geração do grupo ácido carboxílico, com hidróxido de lítio (348 mg, 14,6 mmol, 3,0 eq.) em uma mistura de THF (5,0 mL) e água (1,1 mL) à temperatura ambiente (cerca de 20°C) por 3 horas. O produto é então obtido por meio da acidificação do meio reacional com uma solução 1 M de ácido clorídrico até atingir pH = 3. A solução aquosa foi então extraída três vezes com acetato de etila (3 x 50 mL) para obtenção do produto como um sólido branco quantitativamente (1,66 g).

[83] O grupo Boc foi então removido do produto obtido

na etapa anterior, o ácido (2*S*,4*S*)-1-((*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3,3-dimetilbutanoil)-4-metilpirrolidina-2-carboxílico (1,66 g, 4,85 mmol, 1,0 eq.), pela reação em DCM (20 mL) com TFA (3 mL, 38,8 mmol, 8,0 eq.) à temperatura ambiente (cerca de 20°C) por 2 horas. Após este tempo, o solvente é continuamente lavado com DCM e removido em um rotaevaporador até obtenção de um sólido quantitativamente (1,18 g).

[84] O ácido (2*S*,4*S*)-1-((*S*)-2-amino-3,3-dimetilbutanoil)-4-metilpirrolidina-2-carboxílico reagiu então com anidrido trifluoroacético (0,7 mL, 4,85 mmol, 1,0 eq.) e TEA (2,0 mL, 14,6 mmol, 3,0 eq.) em DCM (29 mL) à temperatura ambiente (cerca de 20°C) por 3 horas para inserção do grupo trifluoroacetato. O sólido branco foi obtido por meio da acidificação do meio com uma solução 1 M de ácido clorídrico até pH = 3, e então lavagem com acetato de etila (3 x 50 mL), para obtenção de um sólido branco com 50% de rendimento (824 mg).

[85] Paralelamente, para inserção do fragmento contendo a lactama na estrutura, o (*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-((*S*)-2-oxopirrolidin-3-il)propanoato de metila (358 mg, 1,25 mmol, 1,0 eq.) foi convertido à sua forma amida pela reação com uma solução de amônia em metanol (7 N - 3,0 mL, 20,9 mmol, 16,7 eq.) à temperatura ambiente (cerca de 20°C) por 48 horas. O produto é obtido quantitativamente pela evaporação do solvente em um rotaevaporador (339 mg).

[86] Similarmente, o grupo Boc foi removido do *tert*-butil ((*S*)-1-amino-1-oxo-3-((*S*)-2-oxopirrolidin-3-il)propan-2-il)carbamato pela reação com TFA (0,8 mL, 10

mmol, 8,0 eq.) em DCM (10 mL) à temperatura ambiente (cerca de 20°C) por 2 horas. O produto foi obtido quantitativamente como um sólido esbranquiçado pela remoção do solvente em um rotaevaporador (214 mg).

[87] Foi então realizada a junção do fragmento dipeptídico obtido anteriormente, o ácido (2*S*,4*S*)-1-((*S*)-3,3-dimetil-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)butanoil)-4-metilpirrolidina-2-carboxílico (467 mg, 1,38 mmol, 1,1 eq.), com o fragmento lactama, o (*S*)-2-amino-3-((*S*)-2-oxopirrolidin-3-il)propanamida (214 mg, 1,25 mmol, 1,0 eq.), promovido por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC - 288 mg, 1,5 mmol, 1,2 eq.), hidroxibenzotriazol (HOBT - 42 mg, 0,31 mmol, 0,25 eq.) e DIPEA (0,7 mL, 3,75 mmol, 3,0 eq.) em DMF (5 mL) à temperatura ambiente (cerca de 20°C) por 16 horas. A solução foi diluída com acetato de etila (40 mL) e a fase orgânica foi então lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (10 mL), solução saturada de cloreto de sódio (20 mL) e então, seca com sulfato de sódio anidro. O produto foi purificado utilizando-se coluna cromatográfica (5 - 20% EtOAc/metanol (MeOH); R<sub>f</sub>: 0,3 a 10% EtOAc/MeOH), obtendo-se um sólido branco com 20% de rendimento (130 mg).

[88] Finalmente, o (2*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-amino-1-oxo-3-((*S*)-2-oxopirrolidin-3-il)propan-2-il)-1-((*S*)-3,3-dimetil-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)butanoil)-4-metilpirrolidina-2-carboxamida (126 mg, 0,26 mmol, 1,0 eq.) foi desidratado para a forma nitrila (composto 1) utilizando-se o reagente de Burgess (215 mg, 0,9 mmol, 3,5 eq.) em DCM (1,5 mL) à temperatura ambiente (cerca de 20°C) por 2,5 horas. O solvente foi então removido em um rotaevaporador, e a mistura

foi purificada utilizando-se coluna cromatográfica (100% EtOAc - 20% EtOAc/MeOH; Rf: 0,5 a 10% EtOAc/MeOH), obtendo-se um sólido branco com 65% de rendimento (80 mg). O composto foi identificado por  $^1\text{H}$  RMN (Figura 5) e  $^{13}\text{C}$  RMN (Figura 6), o ponto de fusão determinado (201-202°C), a pureza verificada por CLAE (Coluna ChiralPak IC, 250 mm x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ; gradiente 5-100% de B em 30 minutos; A: água destilada, B: acetonitrila; fluxo: 0,5 mL/min; volume de injeção: 20  $\mu\text{L}$ ; pureza: 95.6%; Tempo de retenção: 19,58 min., Figura 7) e a massa molecular confirmada por ESI-MS (Figura 8).

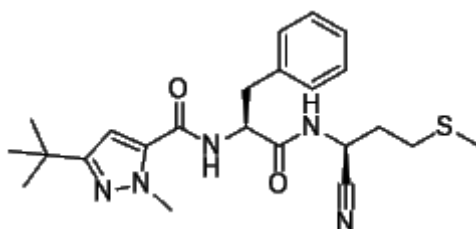
**$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Clorofórmio-*d*):**

[89]  $\delta$  8,41 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 4,82 (ddd, J = 11,5, 6,6, 4,9 Hz, 1H), 4,65 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 4,28 (dd, J = 10,0, 7,4 Hz, 1H), 3,98 - 3,93 (m, 1H), 3,38 - 3,36 (m, 1H), 3,36 - 3,34 (m, 1H), 3,18 (t, J = 10,2 Hz, 1H), 2,68 - 2,59 (m, 1H), 2,43 (ddt, J = 12,3, 5,4, 2,7 Hz, 1H), 2,40 - 2,36 (m, 1H), 2,36 - 2,32 (m, 1H), 2,32 - 2,25 (m, 1H), 2,01 (m, 1H), 1,87 (ddt, J = 12,6, 10,9, 9,2 Hz, 1H), 1,75 - 1,67 (m, 2H), 1,12 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 1,03 (s, 9H).

**$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, Clorofórmio-*d*):**

[90]  $\delta$  179,60, 171,78, 168,50, 118,33, 61,21, 57,62, 55,89, 40,56, 39,47, 37,89, 37,18, 36,71, 34,03, 33,78, 29,69, 28,61, 26,29, 16,20.

**Exemplo 2: Preparação do Composto 2: 3-(*terc*-butil)-N-((S)-1-((S)-1-ciano-3-(metiltio)propil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida**



[91] (*tert*-butoxicarbonil)-*L*-metionina (1,25 g, 5,0 mmol, 1,0 eq.) foi dissolvido em DMF seco (15 mL), e então foi resfriado a -30 °C. DIPEA (2,28 mL, 13,0 mmol, 2,6 eq.) foi adicionada à solução, e então adicionou-se cloroformato de isobutila (0,75 mL, 5,5 mmol, 1,1 eq.) lentamente. Após agitar por 30 minutos a -30 °C, uma solução aquosa de cloreto de amônio (2 M, 2,75 mL, 5,5 mmol, 1,1 eq.) foi adicionada ao meio reacional, o qual foi então colocado sob agitação à temperatura ambiente (cerca de 20 °C) por 20 horas. Após tal tempo, o solvente foi removido sob pressão reduzida em um rotaevaporador e a reação foi então diluída com acetato de etila (100 mL), lavada com solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio (3 x 50 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (3 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida para se obter o produto como um sólido branco com 92% de rendimento (1,14 g).

[92] O *tert*-butil (*S*)-(1-amino-4-(metiltio)-1-oxobutan-2-il)carbamato (1,1 g, 4,4 mmol, 1,0 eq.) obtido na etapa anterior foi dissolvido em diclorometano seco (15 mL) e foi adicionado TFA (4,0 mL, 35,2 mmol, 8,0 eq.). A solução foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente (cerca de 20 °C). O solvente foi removido sob pressão reduzida em um rotaevaporador para se isolar o produto quantitativamente.

[93] O (*S*)-2-amino-4-(metiltio)butanamida (593 mg, 4,0 mmol, 1,0 eq.) obtido reagiu com (*tert*-butoxicarbonil)-*L*-fenilalanina (1,38 g, 5,2 mmol, 1,3 eq.), HATU (1,98 g,

5,2 mmol, 1,3 eq.) e DIPEA (1,6 mL, 9,8 mmol, 2,5 eq.) em DMF (20 mL) à temperatura ambiente por 16 horas. A solução foi diluída com acetato de etila (50 mL) e a fase orgânica foi então lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 20 mL), solução saturada de cloreto de sódio (3 x 20 mL) e então, seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido sob pressão reduzida em um rotaevaporador e o sólido obtido foi recristalizado com acetato de etila para se obter um sólido branco com 95% de rendimento (1,5 g).

[94] O composto *tert*-butil ((*S*)-1-((*S*)-1-amino-4-(metiltio)-1-oxobutan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamato (1,84 g, 4.6 mmol, 1,0 eq.) foi dissolvido em tetrahidrofurano seco (TFH - 20 mL) a 0 °C, e então foi adicionado DIPEA (2,0 mL, 12,3 mmol, 2,7 eq.). Sobre esta solução, em um intervalo de 5 minutos, foi adicionado anidrido tricloroacético (TCAA - 1,04 mL, 5,72 mmol, 1,25 eq.) e então agitado à temperatura ambiente (cerca de 20°C) por 2 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida em um rotaevaporador, e então a reação foi diluída com água (50 mL). O produto foi extraído com acetato de etila (3 x 50 mL). A fase orgânica foi então lavada com uma solução 1 M de hidrogenosulfato de potássio (3 x 30 mL), com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio (3 x 30 mL) e com uma solução saturada de cloreto de sódio (3 x 30 mL). O solvente foi removido e o produto obtido foi usado na próxima etapa sem purificação necessária.

[95] O *tert*-butil ((*S*)-1-((*S*)-1-ciano-3-(metiltio)propil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamato (717 mg, 1,9 mmol, 1,0 eq.) foi dissolvido em diclorometano seco (20 mL) e foi adicionado TFA (1,8 mL, 15,2 mmol, 8,0

eq.). A solução foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente (cerca de 20°C). O solvente foi removido sob pressão reduzida em um rotaevaporador para se isolar o produto quantitativamente.

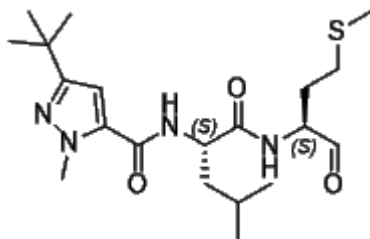
[96] O (S)-2-amino-N-((S)-1-ciano-3-(metiltio)propil)-3-fenilpropanamida (100 mg, 0,36 mmol, 1,0 eq.) obtido reagiu com o ácido 3-(*tert*-butil)-1-metil-1*H*-pirazol-5-carboxílico (87 mg, 0,47 mmol, 1,3 eq.), HATU (180 mg, 0,47 mmol, 1,3 eq.) e DIPEA (0,16 mL, 0,9 mmol, 2,5 eq.) em DMF (7 mL) à temperatura ambiente (cerca de 20°C) por 16 horas. A solução foi diluída com acetato de etila (50 mL) e a fase orgânica foi então lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 20 mL), solução saturada de cloreto de sódio (3 x 20 mL) e então seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido sob pressão reduzida em um rotaevaporador. O produto foi purificado utilizando-se coluna cromatográfica (35 - 40% Hex/EtOAc; Rf: 0,6 a 50% EtOAc/MeOH), obtendo-se um sólido branco com 60% de rendimento (95 mg). O composto obtido foi identificado por <sup>1</sup>H RMN (Figura 9) e <sup>13</sup>C RMN (Figura 10), o ponto de fusão determinado (67,9-68,9°C), a pureza verificada por CLAE (Coluna ChiralPak IB, 250 mm x 4.6 mm, 5µm; gradiente 5-100% de B em 30 minutos; A: hexano, B: isopropanol; fluxo: 0,5 mL/min; volume de injeção: 15 µL; pureza: 95.4%; Tempo de retenção: 12,64 min., Figura 11) e a massa molecular confirmada por ESI-MS (Figura 12).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**

[97] 7,33 - 7,20 (m, 5H), 6,64 (s, 1H), 4,99 - 4,93 (m, 1H), 4,65 (dt, *J* = 15,6, 12,0 Hz, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,34 (s, 1H), 3,19 (dd, *J* = 13,6, 7,1 Hz, 1H), 3,03 (dd, *J*

= 13,6, 8,4 Hz, 1H), 2,57 (td,  $J = 7,2, 3,9$  Hz, 2H), 2,12 - 2,02 (m, 5H), 1,28 (s, 9H).

**Exemplo 3: Preparação do Composto 3: 3-(*tert*-butil)-1-metil-N-((S)-4-metil-1-((S)-4-(metiltio)-1-oxobutan-2-il)amino)-1-oxopentan-2-il)-1H-pirazol-5-carboxamida**



[98] O *L*-metioninato de metila (600 mg, 3,0 mmol, 1,0 eq.) foi dissolvido em DMF (15 mL) e então HATU (1,48 g, 3,9 mmol, 1,3 eq.) e DIPEA (2,1 mL, 12 mmol, 4,0 eq.) foram adicionados. Nitrogênio foi utilizado para inertização do frasco reacional por 15 minutos. (*tert*-butoxicarbonil)-*L*-leucina foi então adicionada à solução, a qual foi agitada por 16 horas à temperatura ambiente (cerca de 20°C). A solução foi então diluída com acetato de etila, e lavada com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio (3 x 20 mL) e uma solução saturada de cloreto de sódio (3 x 20 mL). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro, e o solvente foi removido sob pressão reduzida em um rotaevaporador. O produto foi purificado utilizando-se coluna cromatográfica (30 - 50% Hex/EtOAc;  $R_f$ : 0,6 a 40% Hex/EtOAc), obtendo-se um sólido branco com 84% de rendimento (949 mg).

[99] O (*tert*-butoxicarbonil)-*L*-leucil-*L*-metioninato de metila obtido na etapa anterior (585 mg, 1,55 mmol, 1,0 eq.) foi dissolvido em diclorometano seco (10 mL). TFA foi então adicionado lentamente (3,0 mL, 12,4 mmol, 8,0 eq.). A

reação foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente (cerca de 20°C). O solvente foi então removido sob pressão reduzida em um rotaevaporador, e o produto utilizado na próxima etapa diretamente.

[100] O *L*-leucil-*L*-metioninato de metila (214 mg, 0,78 mmol, 1,0 eq.) foi dissolvido em DMF (6,0 mL), e então foram adicionados HATU (380 mg, 1,0 mmol, 1,3 eq.) e DIPEA (0,7 mL, 3,1 mmol, 4,0 eq.). Nitrogênio foi utilizado para inertização do frasco reacional por 15 minutos. Então, foi adicionado o ácido 3-(*tert*-butil)-1-metil-1*H*-pirazol-5-carboxílico (182 mg, 1,0 mmol, 1,3 eq.) à reação, a qual foi agitada por 16 horas à temperatura ambiente (cerca de 20°C). A solução foi então diluída com acetato de etila, e lavada com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio (3 x 20 mL) e uma solução saturada de cloreto de sódio (3 x 20 mL). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro, e o solvente foi removido sob pressão reduzida em um rotaevaporador. O produto foi purificado utilizando-se coluna cromatográfica (30 - 50% Hex/EtOAc; Rf: 0,4 a 40% Hex/EtOAc), obtendo-se um sólido branco com 79% de rendimento (269 mg).

[101] O composto (3-(*tert*-butil)-1-metil-1*H*-pirazol-5-carbonil)-*L*-leucil-*L*-metioninato de metila (266 mg, 0,6 mmol, 1,0 eq.) foi dissolvido em MeOH (3,0 mL), e então borohidreto de sódio (227 mg, 6,0 mmol, 10 eq.) foi adicionado. A reação foi agitada por 3 horas à temperatura ambiente (cerca de 20°C). Água foi adicionada ao meio reacional, e então o produto foi extraído com acetato de etila (3 x 15 mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de cloreto de sódio (3 x 10 mL), seca com sulfato

de sódio anidro, e o solvente foi removido sob pressão reduzida para gerar o produto com 88% de rendimento (218 mg), que foi utilizado na próxima etapa.

[102] O 3-(*tert*-butil)-*N*-((*S*)-1-(((*S*)-1-hidróxi-4-(metiltio)butan-2-il)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)-1-metil-1*H*-pirazol-5-carboxamida (218 mg, 0,53 mmol, 1,0 eq.) foi dissolvido em diclorometano seco (10 mL) e então foi adicionado o periodinano de Dess-Martin (272 mg, 0,64 mmol, 1,2 eq.). A reação foi agitada por 3 horas à temperatura ambiente (cerca de 20°C). A mistura reacional foi então concentrada em um rotaevaporador e diretamente purificada. O produto foi purificado utilizando-se coluna cromatográfica (30 - 50% Hex/EtOAc; Rf: 0,5 a 40% Hex/EtOAc), obtendo-se um sólido branco com 65% de rendimento (141 mg). O composto foi identificado por <sup>1</sup>H RMN (Figura 13) e <sup>13</sup>C RMN (Figura 14), o ponto de fusão determinado (69-70°C), a pureza verificada por CLAE (Coluna ChiralPak IB, 250 mm x 4.6 mm, 5µm; gradiente 5-100% de B em 30 minutos; A: hexano, B: isopropanol; fluxo: 0,5 mL/min; volume de injeção: 20 µL; pureza: 100%; Tempo de retenção: 10,54 min., Figura 15 ) e a massa molecular confirmada por ESI-MS (Figura 16).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Clorofórmio-*d*):**

[103] 9,62 (d, *J* = 12,2 Hz, 1H), 6,49 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 6,41 (s, 1H), 4,71 - 4,63 (m, 1H), 4,59 (dtd, *J* = 9,1, 7,1, 5,2 Hz, 1H), 4,10 (d, *J* = 2,9 Hz, 3H), 2,56 (dd, *J* = 7,1, 3,7 Hz, 1H), 2,53 (dd, *J* = 7,0, 2,4 Hz, 1H), 2,28 (dtd, *J* = 14,2, 7,0, 5,2 Hz, 1H), 2,05 (d, *J* = 10,2 Hz, 3H), 1,99 (dt, *J* = 14,1, 7,1 Hz, 1H), 1,77 (ddd, *J* = 14,4, 5,8, 3,7 Hz, 2H), 1,73 - 1,62 (m, 2H), 1,29 (s, 9H), 0,99 (t, *J* = 6,4 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, Clorofórmio-*d*):**

[104]  $\delta$  197,93, 172,33, 172,24, 160,37, 160,22, 141,67, 134,39, 133,06, 131,60, 127,95, 103,00, 58,12, 58,08, 51,60, 51,50, 41,15, 41,07, 38,99, 31,95, 30,47, 29,91, 29,80, 28,20, 28,10, 24,93, 24,86, 22,86, 22,80, 22,16, 22,09, 15,34.

**Exemplo 4: Ensaio de Inibição de Catepsinas Humanas**

[105] Os compostos 2 e 3 foram submetidos a ensaios de inibição das catepsinas L, B e S humanas.

**Catepsina-L**

[106] **Inibidor** - Concentração inicial de 10 $\mu$ M na placa, onde são preparadas 7 soluções com fator de diluição igual a 0,5. 8  $\mu$ L das soluções são adicionados na placa, sendo que ao último poço é adicionado somente DMSO (dimetilsulfóxido).

[107] **Enzima** - Concentração no poço de 1,9 nM, sendo que na solução de enzima é adicionado 0,014% de Triton e 7 mM de DTT. Após a preparação, a enzima é ativada no gelo durante 20 minutos. 142  $\mu$ L da solução são adicionados em cada poço. Solução preparada em tampão acetato de sódio 100mM, NaCl 300mM e 5mM de EDTA, pH 5,5.

[108] **Substrato (Z-FR-AMC)** - A concentração de substrato será igual ao valor de  $K_m$  da enzima, onde o  $K_m$  irá variar entre 3-6  $\mu$ M. Solução preparada em tampão pH 5,5. 50  $\mu$ L de substrato é adicionado em cada poço.

[109] Para o ensaio de determinação do  $K_m$ , a concentração inicial do substrato no poço é de 30  $\mu$ M, são preparadas 8 soluções com fator de diluição de 0,5.

**Catepsina-K**

[110] **Inibidor** - Concentração inicial de 10 $\mu$ M na

placa, onde são preparadas 7 soluções com fator de diluição igual a 0,5. 8 µL das soluções são adicionados na placa, sendo que ao último poço é adicionado somente DMSO.

[111] **Enzima** - Concentração no poço de 0,29 nM, sendo que na solução de enzima é adicionado 0,014% de Triton e 7mM de DTT. Após a preparação, a enzima é ativada a 37°C por 30 minutos. 142 µL da solução são adicionados em cada poço. Solução preparada em tampão acetato de sódio 100mM, NaCl 300mM e 5mM de EDTA, pH 5,5.

[112] **Substrato (Z-Leu-Arg-AMC)** - A concentração de substrato será igual ao valor de Km da enzima, onde o Km irá variar entre 1-3 µM. Solução preparada em tampão pH 5,5. 50 µL de substrato são adicionados em cada poço.

[113] Para o ensaio de determinação do Km, a concentração inicial do substrato no poço é de 30 µM, deverão ser preparadas 8 soluções com fator de diluição de 0,5.

#### **Catepsina-S**

[114] **Inibidor** - Concentração inicial de 10µM na placa, onde são preparadas 7 soluções com fator de diluição igual a 0,5. 8 µL das soluções serão adicionados na placa, sendo que o último poço será adicionado somente DMSO.

[115] **Enzima** - Concentração no poço de 1,1 nM, sendo que na solução de enzima é adicionado 0,014% de Triton e 7mM de DTT. Após a preparação, a enzima é ativada a 37°C por 1 hora. 142 µL da solução são adicionados em cada poço. Solução preparada em tampão citrato de sódio (100mM), NaCl (50mM) e EDTA (2mM) pH 6,0.

[116] **Substrato (Z-FR-AMC)** - A concentração de substrato não será igual ao valor de Km da enzima. A concentração do substrato será igual ao km dividido por 1,5,

com o fator de diluição permanecendo 4, como é para o restante das enzimas. O  $K_m$  irá variar entre 30-40  $\mu\text{M}$ . Solução preparada em tampão pH 6,0. 50  $\mu\text{L}$  de substrato são adicionados em cada poço.

[117] Para o ensaio de determinação do  $K_m$ , a concentração inicial do substrato no poço é de 80  $\mu\text{M}$ , são ser preparadas 8 soluções com fator de diluição de 0,5.

#### **Catepsina-B**

[118] Concentração do substrato no ensaio de  $K_m = 100\mu\text{M}$  no poço diluição de 0,7.

[119] **Inibidor** - Concentração inicial de 10 $\mu\text{M}$  na placa, onde são preparadas 7 soluções com fator de diluição igual a 0,5. 8  $\mu\text{L}$  das soluções serão adicionados na placa, sendo que ao último poço é adicionado somente DMSO.

[120] **Enzima** - Concentração no poço de 0,7 nM, sendo que na solução de enzima deve ser adicionado 0,014% de Triton e 7mM de DTT. Após a preparação, a enzima é ativada a 37°C por 30 min. 142  $\mu\text{L}$  da solução são adicionados em cada poço. Solução preparada em tampão fosfato de sódio (100mM), NaCl (100mM) e EDTA (5mM) pH 6,0.

[121] **Substrato (Z-FR-AMC)** - A concentração de substrato não será igual ao valor de  $K_m$  da enzima. A concentração do substrato será igual ao  $K_m$  dividido por 1,4, com fator de diluição permanecendo 4, como é para o restante das enzimas. O  $K_m$  irá variar entre 90-110  $\mu\text{M}$ . Solução preparada em tampão fosfato pH 6,0. 50  $\mu\text{L}$  de substrato são adicionados em cada poço.

[122] Para o ensaio de determinação do  $K_m$ , a concentração inicial do substrato no poço é de 100  $\mu\text{M}$ , deverão ser preparadas 8 soluções com fator de diluição de

0,7.

[123] A **Tabela 1** abaixo apresenta os valores de pKi observados.

**Tabela 1:** Inibição das catepsinas L (CatL), B (CatB) e S (CatS) pelos compostos 2 e 3

Composto	pKi <sup>CatL</sup>	pKi <sup>CatB</sup>	pKi <sup>CatS</sup>
2	8,8 ± 0,02	5,4 ± 0,01	7,1 ± 0,01
3	8,7 ± 0,07	7,5 ± 0,02	8,9 ± 0,05

[124] A inibição da catepsina L é importante para atividade antiviral dos compostos, pois evita a invasão das células pelo SARS-CoV-2. A catepsina L é uma das enzimas responsáveis pela clivagem da proteína *spike* do vírus, que facilita a fusão das membranas virais e celulares, permitindo a entrada do vírus na célula. Assim, a inibição da catepsina L está associada à prevenção da entrada do vírus nas células humanas, levando a uma redução da carga viral. Ademais, a inibição da catepsina L também pode levar a uma redução da severidade da doença, particularmente em populações de risco como idosos e com comorbidades.

**Exemplo 5: Ensaio de Redução do Efeito Citopático em Células Vero E6**

[125] O efeito dos compostos 1, 2 e 3, bem como do composto nirmatrelvir, do estado da técnica, sobre a viabilidade de células Vero E6 infectadas com SARS-CoV-2 em 48 h foi avaliado.

*5.1 Cultura de células da linhagem Vero E6*

[126] Células da linhagem Vero E6, distribuídas comercialmente e obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA), foram cultivadas em frascos de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated, EUA) em meio de cultura

Dulbecco (D-MEM, Gibco, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% Piruvato de sódio, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina (Life Technologies, EUA). Na subconfluência da cultura, foi adicionada solução de tripsina a 0,25% (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção da suspensão de células. Em seguida foi realizado o plaqueamento na densidade de  $3 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços (Corning), as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sup>2</sup> e 95% de ar atmosférico, até atingir 90-95% de confluência (aproximadamente  $6 \times 10^4$  células/poço).

## 5.2 *Infecção com o SARS-Cov-2*

[127] Todos os procedimentos envolvendo o vírus SARS-CoV-2 foram realizados no laboratório de biossegurança nível 3 (NB3) do Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O SARS-Cov-2 utilizado foi isolado de uma amostra nasofaríngea de um paciente confirmado de Covid-19 no Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

### 5.2.1 *Produção viral*

[128] Para a produção viral (estoques virais de trabalho) duas garrafas de 175 cm<sup>2</sup> foram plaqueadas com células VERO E6 até atingir 95% de confluência. Em seguida, o meio contido nas garrafas foi desprezado e as culturas celulares infectadas e incubadas por 1 hora a 37°C para a etapa de adsorção sob agitação constante. Completada esta etapa, foram adicionados 75 mL de diluente (meio D-MEM, 2% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina, 1% piruvato de sódio). Ao atingir o melhor dia de pico produtivo, todo o sobrenadante com conteúdo viral contido nas 2 garrafas foi

coletado e centrifugado a 2000 rpm. Em seguida a suspensão viral foi fracionada em criotubos e as alíquotas imediatamente congeladas a -70 °C.

### 5.2.2 *Título viral*

[129] Para quantificação do vírus, foi realizada a titulação viral por PFU (Unidades Formadoras de Placa) que mede a capacidade dos vírus de formar placas infecciosas por unidade de volume. Para a realização da titulação, os vírus foram submetidos a diluições seriadas em D-MEM, 2% de SFB e inoculados em células VERO E6, crescidas em placas de 48 poços por 1 h sob agitação constante a temperatura ambiente (cerca de 20°C). Em seguida, foi adicionada a solução carboxi-metilcelulose (CMC) a 2% (*overlay*) que impede a infecção e destruição da monocamada celular. Após 5 dias de incubação, as placas foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com cristal violeta 1%. As placas foram contadas usando o seguinte cálculo:

$$\text{Pfu/mL} = \text{Média \#placas} / \text{Fator de diluição} \times \text{volume para diluir o vírus}$$

### 5.3 *Ensaio de MTT*

Foi realizado o ensaio de proteção do efeito citopático por meio do (MTT) brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]. Para isso, as células Vero E6 na densidade de 90-95% foram infectadas 1 vez com MOI 1, 0.1, 0.01, do SARS-CoV-2, em seguida foram adicionados os compostos na concentração de 1 µM, 10 µM e 100 µM por 48 h, as placas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sup>2</sup> e 95% de ar atmosférico. A concentração das células vivas foi determinada pela densidade óptica de 570 nm.

[130] A inibição do vírus SARS-CoV-2 é avaliada com base na capacidade dos compostos de reverterem o efeito citopático viral induzido (CPE). A infecção viral e a replicação levam à perda de viabilidade celular hospedeira. A viabilidade da célula hospedeira é determinada em 24, 48 e 72 horas, a depender da viabilidade observada. No ensaio de redução de CPE, a replicação viral e a infecção são avaliadas via mecanismos moleculares que incluem a inibição direta da entrada viral ou processos enzimáticos em diferentes multiplicidades de infecção (MOI), sendo 1 o maior nível de infecção em que a célula hospedeira mantém sua viabilidade celular por certo tempo. Quando os compostos com atividade antiviral protegem as células hospedeiras do CPE do vírus, há aumento da viabilidade celular.

[131] Conforme Figuras 1 e 3, os compostos 1 e 2 apresentam um perfil de viabilidade celular melhor do que o nirmatrelvir e demonstram, nas três concentrações estudadas, 100% de viabilidade celular em MOIs 0,01 e 0,1. Em 10 e 100  $\mu\text{M}$ , os compostos 1 e 2 também mostram 100% de viabilidade celular em MOI 1. O composto Nirmatrelvir, por sua vez, tem 100% de viabilidade celular na concentração de 10  $\mu\text{M}$  para 0,01 e 0,1 MOIs e apenas a 100  $\mu\text{M}$  para MOI 1.

[132] Como pode ser visto na Figura 4, o composto 3, por sua vez, apresenta um perfil superior ou similar ao nirmatrelvir em infecções com baixa carga viral (MOIs 0,01 e 0,1).

#### **Exemplo 6: Ensaio de Redução do Efeito Citopático em Células A549-ACE2**

[133] O efeito do composto 2 sobre a viabilidade celular de células A549-ACE2 infectadas com SARS-CoV-2 em 48

h também foi avaliado. O procedimento foi realizado conforme descrito no Exemplo 5, porém usando células A549-ACE2.

[134] Conforme se observa na Figura 2(b), o composto 2 protege as células infectadas com MOIs de 0,1 e 1 nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$  (triângulo e x), sendo que na última concentração a viabilidade celular é total.

[135] Com base na Figura 2, observa-se que o composto 2 não é citotóxico para as células hospedeiras, pois possui um valor igual a 100% de viabilidade como controle negativo, o que é um excelente indicativo primário de sua atividade antiviral. As respostas para diferentes concentrações do composto 2 seguem uma relação contração-resposta, onde quanto maior a concentração em uma mesma MOI (taxa de infecção, ou concentração do vírus utilizado na infecção), maior a viabilidade celular. Além disso, quanto maior a concentração de vírus utilizada na infecção (MOI), menor a porcentagem de células vivas para uma mesma condição de tratamento. Na Figura 2(b), a linha pontilhada é utilizada como padrão de comparação para todas as outras curvas que tiveram a adição do composto. Quanto maior a curva do composto em relação à linha pontilhada, maior a sobrevivência das células hospedeiras.

[136] Considerando os excelentes resultados apresentados pelo composto 2, foi avaliada uma combinação equimolar com o camostato (um inibidor de serina protease), foi observado que nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$ , a viabilidade celular permaneceu acima de 80 % para os três MOIs de 0,01, 0,1 e 1. A uma concentração de 1  $\mu\text{M}$ , há sobreposição completa com a curva de controle.

#### **Exemplo 7: Ensaio de Inibição da $M^{\text{Pro}}$ de SARS-CoV-2**

[137] Os compostos 1, 2 e 3 foram avaliados quanto à sua capacidade de inibição da enzima M<sup>Pro</sup> do SARS-CoV-2.

*Determinação do Km*

[138] Concentração do substrato 10 µM com 8 diluições e fator de diluição 0,5. Concentração da proteína a 30 nM usando tampão de ensaio: 20 mM Tris pH 7.5 1 mM EDTA, 150 mM de NaCl 0,014% de Triton-X100 na solução de proteína. Para a determinação de Ki da M<sup>Pro</sup> o inibidor "padrão" usado foi o próprio nirmatrelvir, cujo valor de pKi é igual a 8,5. A concentração inicial dos inibidores foi 10 µM, fazendo-se 7 diluições. A concentração do substrato foi igual ao valor de Km obtido. A concentração da M<sup>Pro</sup> foi 30 nM em tampão 20 mM Tris pH 7.5 1 mM EDTA, 0,014% Triton-X100.

[139] Os dados de inibição estão na Tabela 2 abaixo.

**Tabela 2:** Inibição da M<sup>Pro</sup> pelos compostos 1, 2 e 3

Composto	pK <sub>i</sub> M <sup>Pro</sup>
1	6,7
2	5,7
3	7,4

**Exemplo 8: Ensaio de Inibição de CYP em Microssomas Hepáticos Humanos**

[140] Nesses ensaios foram testados os compostos 1 e 2 quanto à inibição de enzimas do citocromo P450 (CYPs) humanas (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4) diretamente em soluções extraídas de microssomas humanos.

[141] Inicialmente, foi preparada uma solução tampão utilizando-se 100 mM de tampão fosfato de potássio e 30,0 mM de cloreto de magnésio.

[142] As soluções dos substratos foram assim preparadas: 20,0 mM de fenacetina em metanol; 10,0 mM de

diclofenaco em metanol; 20,0 mM de (S)-(+)-mefenitoína em metanol; 20,0 mM de dextrometorfano em metanol; e 10,0 mM de midazolam em metanol. Tais soluções foram diluídas para se obter, respectivamente, as seguintes concentrações finais: 10,0 µM, 5,00 µM, 30,0 µM, 5,00 µM e 2,00 µM.

[143] As soluções de inibidores também foram preparadas de acordo: 3,00 mM de alpha-naftoflavona em DMSO; 3,00 mM sulfafenazol em DMSO; 1,00 mM de (S)-(+)-N-3-benzilnirvanol em DMSO; 3,00 mM de quinidina em DMSO; e 3,00 mM de cetoconazol em DMSO. Tais soluções foram posteriormente diluídas com metanol, obtendo-se, respectivamente, as seguintes concentrações finais: 3,00 µM, 3,00 µM, 1,00 µM, 3,00 µM e 3,00 µM.

[144] Os compostos 1 e 2 foram fornecidos em soluções 10,0 mM em DMSO. A partir destas soluções mães, foi realizada uma diluição seriada utilizando-se 1:1 DMSO:MeOH, obtendo-se as seguintes concentrações finais para os testes dos compostos: 50,0 µM, 15,0 µM, 5,00 µM, 1,50 µM, 0,500 µM, 0,150 µM e 0,0500 µM.

[145] Retiraram-se os microssomas do freezer a -80,0°C para descongelar em gelo, foi etiquetada a data e colocado de volta no freezer imediatamente após o uso. Foram, então, adicionados 20,0 µL das soluções de substratos aos poços correspondentes e 20,0 µL de tampão de fosfato aos poços em branco, 2,00 µL dos compostos de teste e da solução de trabalho dos controles positivos aos poços correspondentes, e 2,00 µL de solvente aos poços sem inibidor e aos poços em branco.

[146] Para a preparação da solução de trabalho de microssomas de fígado humano, um volume de 0,784 mL de

microssomas de fígado humano foi misturado com 61,216 mL de tampão fosfato para alcançar a concentração desejada. A concentração de trabalho da solução preparada de microssomas de fígado humano foi de 0,253 mg/mL. A solução final foi ajustada para uma concentração de 1,27 vezes para atingir a concentração final de 0,200 mg/mL.

[147] Em seguida, foram adicionados 158 µL da solução de trabalho microssomas de fígado humano a todos os poços da placa de incubação. A placa foi, então, pré-aquecida por cerca de 10 minutos em banho-maria a 37,0°C.

[148] Para a preparação da solução de cofator NADPH, pesou-se 135,8 mg de NADPH, que foi dissolvido em 16,0 mL de MgCl<sub>2</sub> 33,0 mM para obter a concentração desejada. A concentração final de NADPH na solução preparada foi de 10,0 mM.

[149] A solução foi ajustada para uma concentração 10,0 vezes para atingir a concentração final de 1,00 mM.

[150] Então, foram adicionados 20,0 µL de cofator NADPH a todos os poços de incubação. As placas foram então misturadas e incubadas por 10 minutos para todas as CYPs em banho-maria a 37,0°C.

[151] Nesse momento, encerrada a reação, foram adicionados 400 µL de solução de parada a frio (200 ng/mL de tolbutamida e labetalol em acetoneitrila).

[152] As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos para precipitar a proteína. Em seguida, foram transferidos 200 µL de sobrenadante para 100 µL de água de HPLC e agitados por 10 minutos.

#### *Análise de dados*

[153] XL fit ou SigmaPlot foram utilizados para

representar graficamente a percentagem de controle de veículo *versus* as concentrações do composto de teste e para análise de regressão não linear dos dados. Os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados usando equação logística de 3 ou 4 parâmetros. Os valores de IC<sub>50</sub> foram relatados como ">50,0 µM" quando a % de inibição na concentração mais alta (50,0 µM) é inferior a 50,0%.

[154] Os compostos 1 e 2 se mostraram inativos ou altamente seletivos em comparação com a M<sup>pro</sup> ou CatL em concentrações de até 50 µM, conforme Tabela 3 a seguir.

**Tabela 3:** Inibição das CYPs pelos compostos 1 e 2

Composto	IC <sub>50</sub> (µM)				
	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4
Composto 1	>50,0	>50,0	>50,0	>50,0	>50,0
Composto 2	40,3	23,2	15,6	25,4	>50,0

[155] Para efeitos de comparação, o nirmatrelvir é um inibidor reversível e dependente do tempo da CYP3A, mas não inibe a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 ou CYP2D6; além disso, ele é um indutor das enzimas CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 e CYP3A4.1

[156] O composto 1 mostrou-se ser inativo contra as CYPs testadas, inclusive contra a CYP3A, da qual o nirmatrelvir é um inibidor. Esta diferença potencialmente representa uma maior biodisponibilidade do composto 1, bem como menor toxicidade, uma vez que a inibição das CYPs pode causar efeitos tóxicos no organismo humano.

[157] Já o composto 2, apesar de inibir algumas CYPs, ainda possui altos índices de seletividade tanto para a M<sup>pro</sup> (IC<sub>50</sub> = 2 µM, garantindo um índice de seletividade de ~10 vezes contra todas as CYPs) quanto para a CatL (IC<sub>50</sub> = 1,6

nM, garantindo índices de seletividade maiores que 1000). Ademais, o composto 2 também é inativo contra a CYP3A4.

#### REFERÊNCIAS:

[158] CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, Berlin, v. 17, n. 3, p. 181-192, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.

[159] DROSTEN, C.; GÜNTHER, S.; PREISER, W.; VAN DER WERF, S.; BRODT, H.-R.; BECKER, S.; RABENAU, H.; PANNING, M.; KOLESNIKOVA, L.; FOUCHIER, R. A. M.; BERGER, A.; BURGUIÈRE, A.-M.; CINATL, J.; EICKMANN, M.; ESCRIOU, N.; GRYWNA, K.; KRAMME, S.; MANUGUERRA, J.-C.; MÜLLER, S.; RICKERTS, V.; STÜRMER, M.; VIETH, S.; KLENK, H.-D.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; SCHMITZ, H.; DOERR, H. W. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 348, n. 20, p. 1967-1976, 2003.

[160] CORMAN, V. M.; ECKERLE, I.; BLEICKER, T.; ZAKI, A.; LANDT, O.; ESCHBACHBLUDAU, M.; VAN BOHEEMEN, S.; GOPAL, R.; BALLHAUSE, M.; BESTEBROER, T. M.; MUTH, D.; MÜLLER, M. A.; DREXLER, J. F.; ZAMBON, M.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. M.; DROSTEN, C. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 17, n. 39, p. 1-6, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2807/ese.17.39.20285-en>.

[161] FERGUSON, N. M.; VAN KERKHOVE, M. D. Identification of MERS-CoV in dromedary camels. **The Lancet Infectious Diseases**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 93-94, 2014.

[162] ZHANG, L.; LIN, D.; SUN, X.; CURTH, U.; DROSTEN,

C.; SAUERHERING, L.; BECKER, S.; ROX, K.; HILGENFELD, R. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved a-ketoamide inhibitors. **Science**, Washington, v. 368, n. 6489, p. 409-412, 2020.

[163] HILGENFELD, R. From SARS to MERS: crystallographic studies on coronaviral proteases enable antiviral drug design. **The FEBS journal**, Chesterton, v. 281, n. 18, p. 4085-4096, 2014.

[164] SHIN, D.; MUKHERJEE, R.; GREWE, D.; BOJKOVA, D.; BAEK, K.; BHATTACHARYA, A.; SCHULZ, L.; WIDERA, M.; MEHDIPOUR, A. R.; TASCHER, G.; GEURINK, P. P.; WILHELM, A.; VAN DER HEDEN VAN NOORT, G. J.; OVAA, H.; MÜLLER, S.; KNOBELOCH, K. P.; RAJALINGAM, K.; SCHULMAN, B. A.; CINATL, J.; HUMMER, G.; CIESEK, S.; DIKIC, I. Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity. **Nature**, Berlin, v. 587, n. 7835, p. 657-662, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2601-5>.

[165] HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; SCHROEDER, S.; KRÜGER, N.; HERRLER, T.; ERICHSEN, S.; SCHIERGENS, T. S.; HERRLER, G.; WU, N. H.; NITSCHKE, A.; MÜLLER, M. A.; DROSTEN, C.; PÖHLMANN, S. SARS-CoV-2 Cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, Cambridge, v. 181, n. 2, p. 271-280.e8, 2020.

[166] LIU, T.; LUO, S.; LIBBY, P.; SHI, G. P. Cathepsin L-selective inhibitors: A potentially promising treatment for COVID-19 patients. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 213, n. February, p. 107587, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107587>.

[167] SHANG, J.; WAN, Y.; LUO, C.; YE, G.; GENG, Q.;

AUERBACH, A.; LI, F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 117, n. 21, 2020.

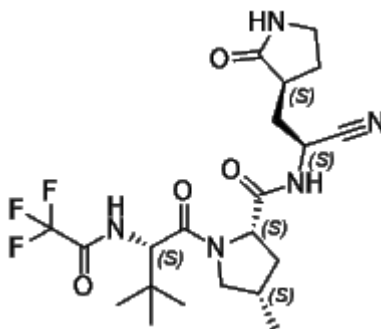
[168] AMANAT, F.; KRAMMER, F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. **Immunity**, Cambridge, v. 52, n. 4, p. 583-589, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.007>.

[169] PUBLIC HEALTH ENGLAND. Investigation of novel SARS-CoV-2 variant variant of concern 202012 / 01 Technical briefing 2: Nomenclature of variants in the UK Current epidemiological findings. p. 1-12, 2020.

[170] OWEN, D. R.; ALLERTON, C. M. N.; ANDERSON, A. S.; ASCHENBRENNER, L.; AVERY, M.; BERRITT, S.; BORAS, B.; CARDIN, R. D.; CARLO, A.; COFFMAN, K. J.; DANTONIO, A.; DI, L.; ENG, H.; FERRE, R. A.; GAJIWALA, K. S.; GIBSON, S. A.; GREASLEY, S. E.; HURST, B. L.; KADAR, E. P.; KALGUTKAR, A. S.; LEE, J. C.; LEE, J.; LIU, W.; MASON, S. W.; NOELL, S.; NOVAK, J. J.; OBACH, R. S.; OGILVIE, K.; PATEL, N. C.; PETTERSSON, M.; RAI, D. K.; REESE, M. R.; SAMMONS, M. F.; SATHISH, J. G.; SINGH, R. S. P.; STEPPAN, C. M.; STEWART, A. E.; TUTTLE, J. B.; UPDYKE, L.; VERHOEST, P. R.; WEI, L.; YANG, Q.; ZHU, Y. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. **Science**, Washington, v. 374, n. 6575, p. 1586-1593, 2021.

**REIVINDICAÇÕES**

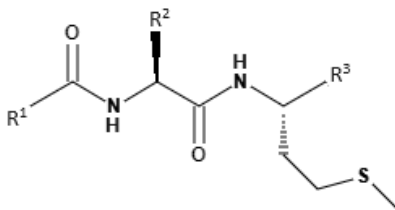
1. Composto, caracterizado pelo fato de ser o composto 1:



Composto 1,

ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

2. Composto, caracterizado pelo fato de ser um composto de Fórmula (I):



Fórmula (I),

em que:

R<sup>1</sup> é uma heteroarila de 5 membros contendo um ou dois átomos de nitrogênio, opcionalmente substituída com C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila;

R<sup>2</sup> é uma C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila, opcionalmente substituída com fenila; e

R<sup>3</sup> é -CN ou -C(=O)H;

ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que R<sup>1</sup> é uma pirazolila, opcionalmente substituída com uma C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila.

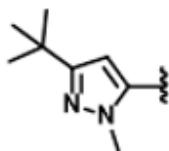
4. Composto, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a pirazolila é substituída no


átomo de nitrogênio e/ou em um átomo de carbono livre.

5. Composto, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que a pirazolila é di-substituída, sendo uma substituição em um átomo de carbono livre e a outra substituição em um átomo de nitrogênio.

6. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 5, caracterizado pelo fato de que a pirazolila é substituída com uma metila e/ou uma t-butila.

7. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que R<sup>1</sup> é

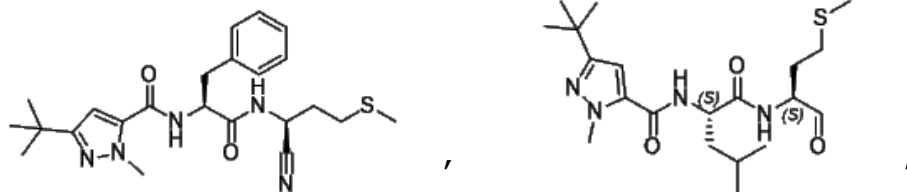


em que  representa o ponto de ligação.

8. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que R<sup>2</sup> é metila ou isobutila, opcionalmente substituída com uma fenila.

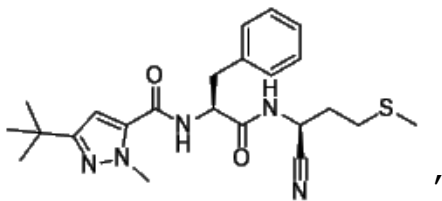
9. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que R<sup>2</sup> é uma metila substituída com uma fenila.

10. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é selecionado a partir de:



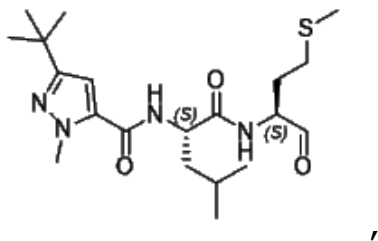
ou um sal farmacologicamente aceitável dos mesmos.

11. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou 10, caracterizado pelo fato de que é:



ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

12. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou 10, caracterizado pelo fato de que é:



ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

13. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o composto, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, e um excipiente farmacologicamente aceitável.

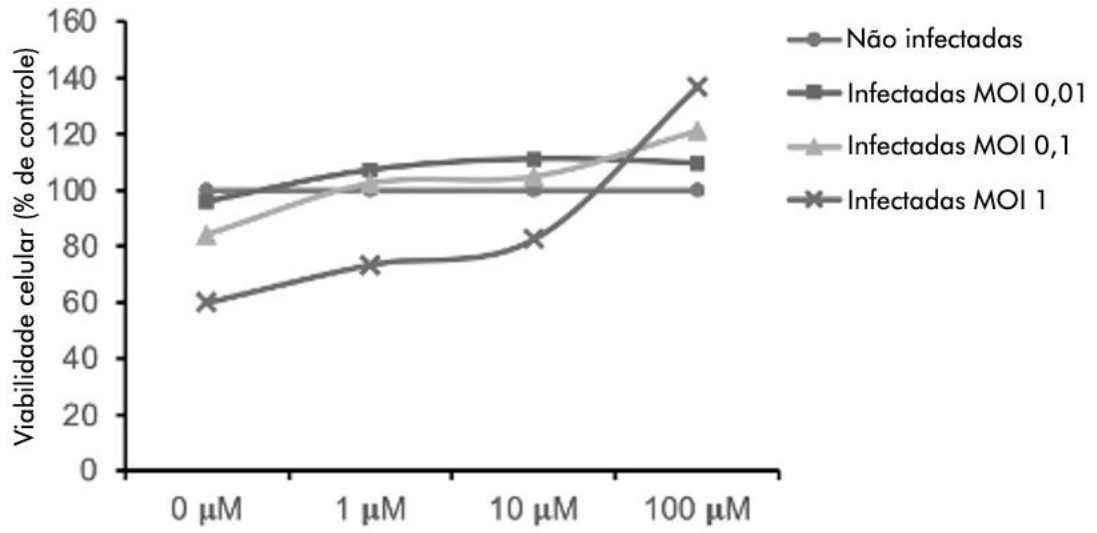
14. Uso do composto, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para o tratamento de infecções virais respiratórias.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a infecção viral respiratória é causada por um coronavírus.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o coronavírus é SARS-CoV, MERS-CoV ou SARS-CoV-2.

17. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 16, caracterizado pelo fato de que a infecção viral respiratória é COVID-19.

(a)



(b)

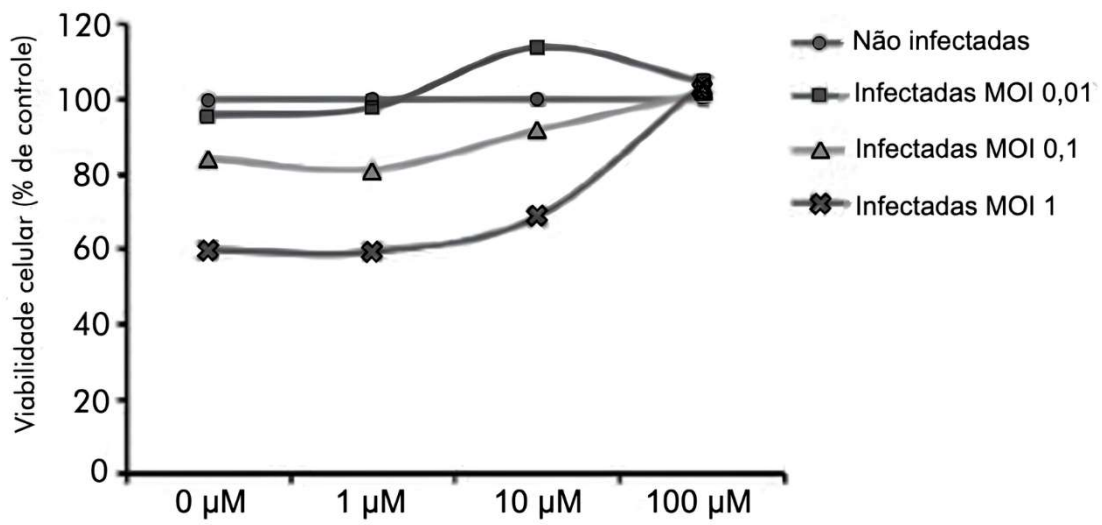
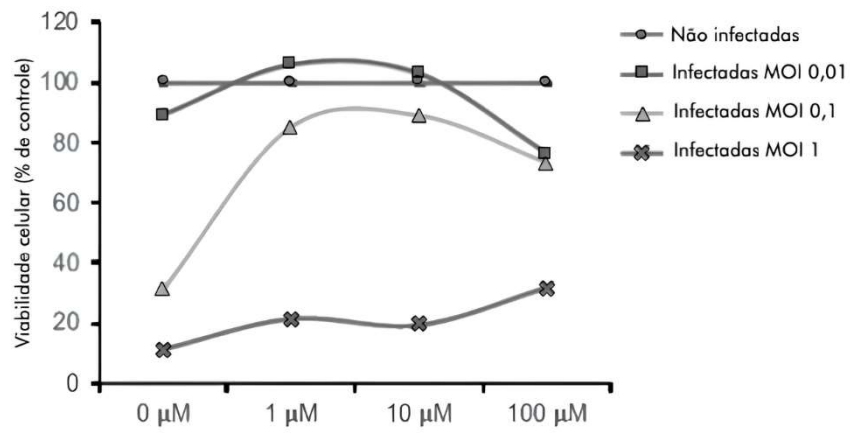


FIGURA 1

(a)



(b)

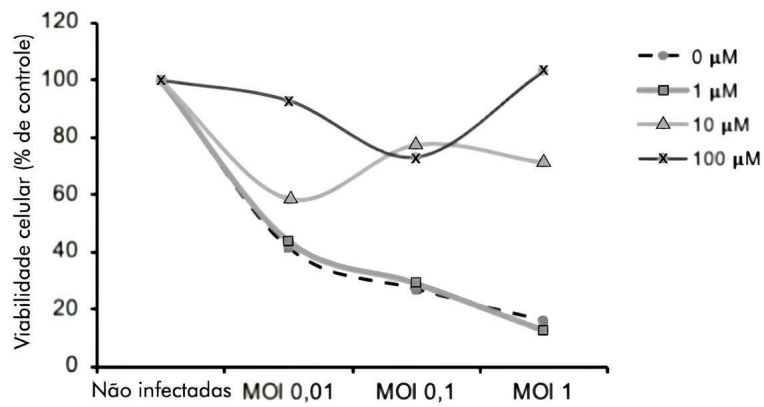
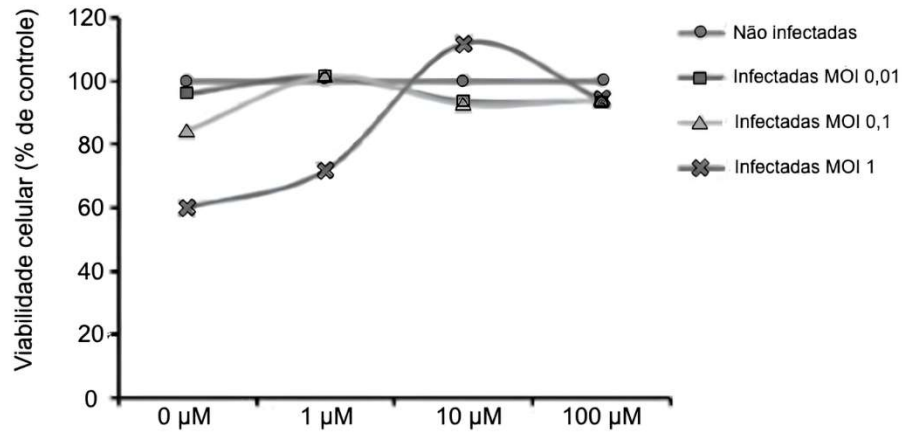


FIGURA 2

(a)



(b)

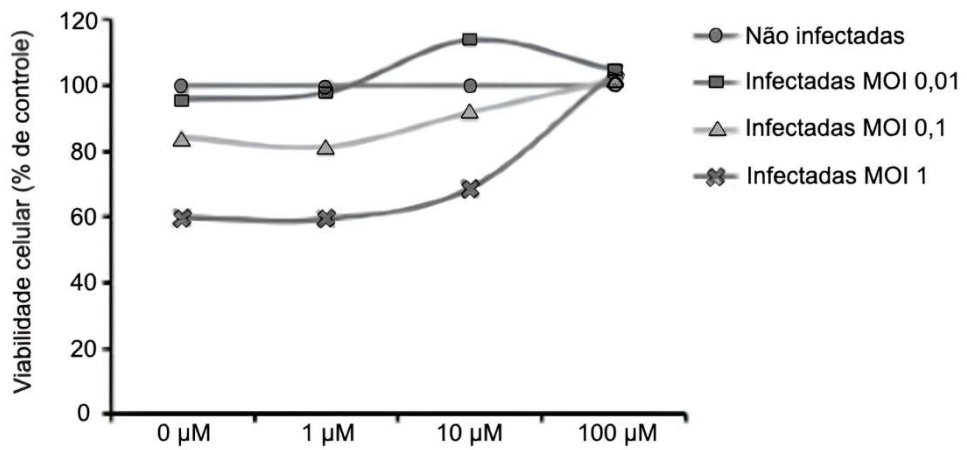
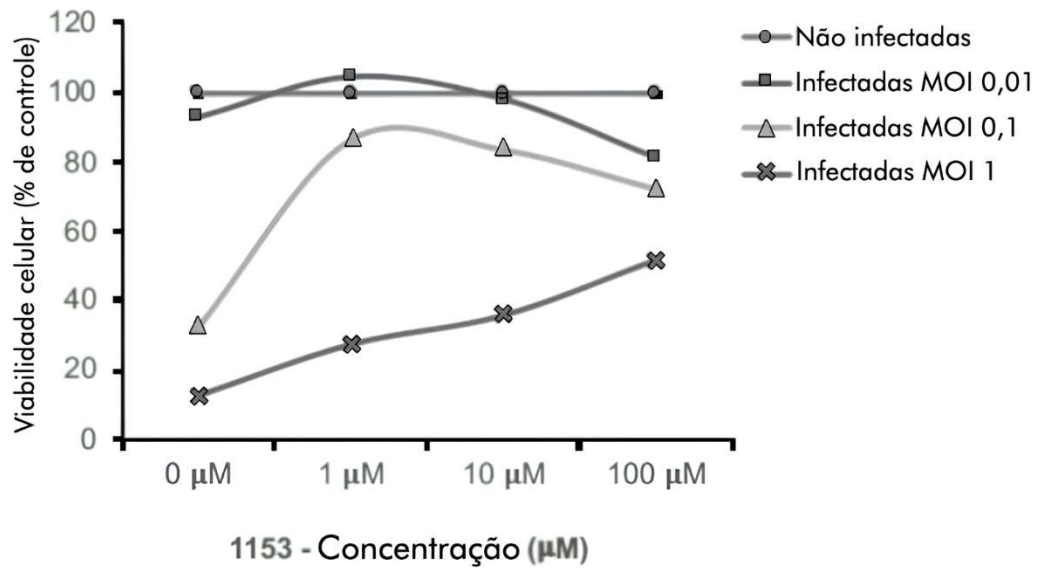


FIGURA 3

(a)



(b)

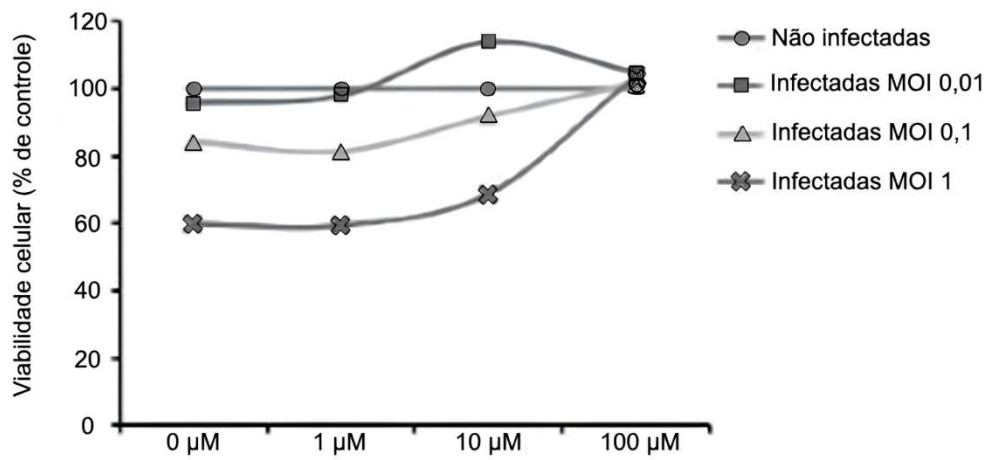


FIGURA 4

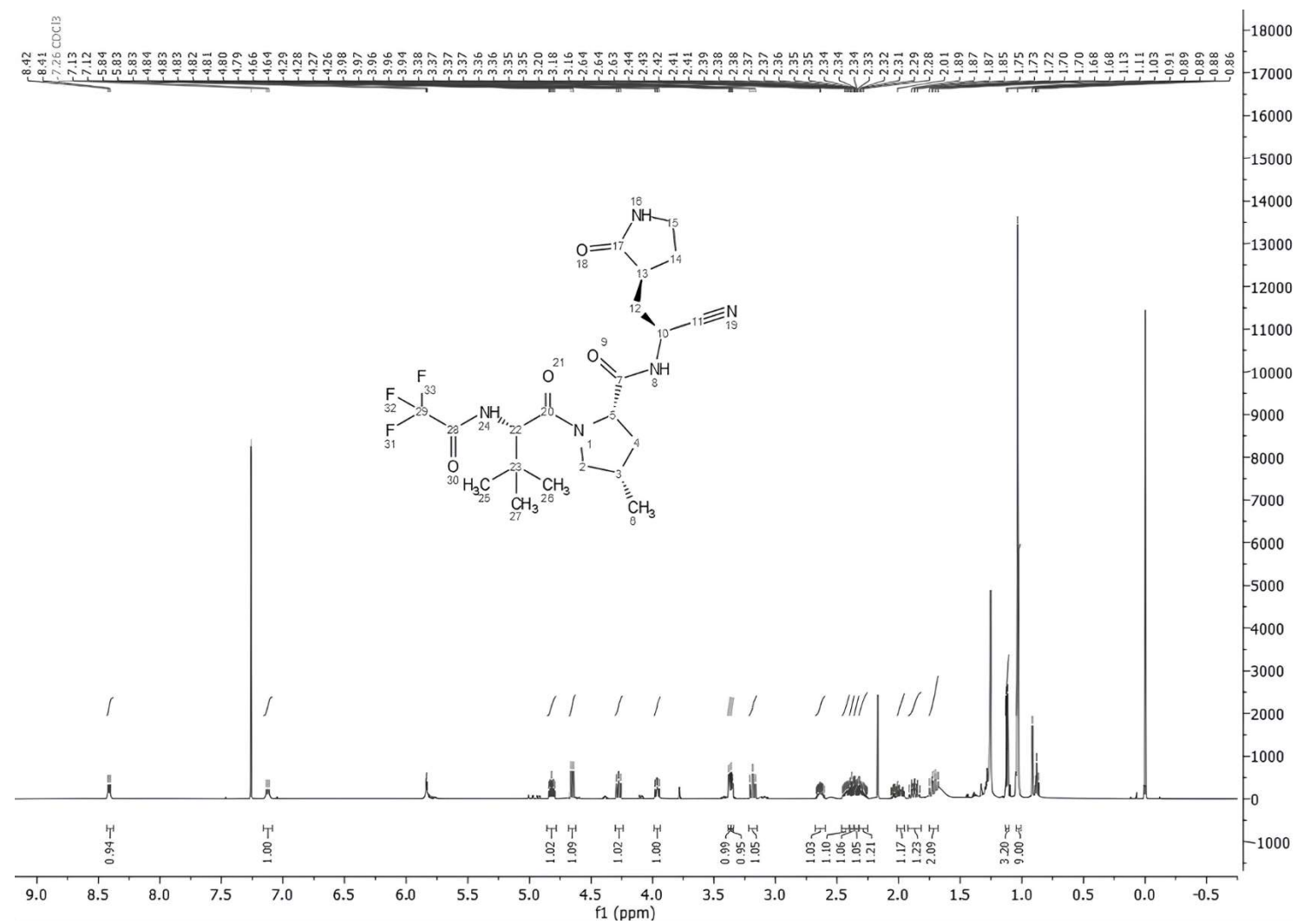


FIGURA 5

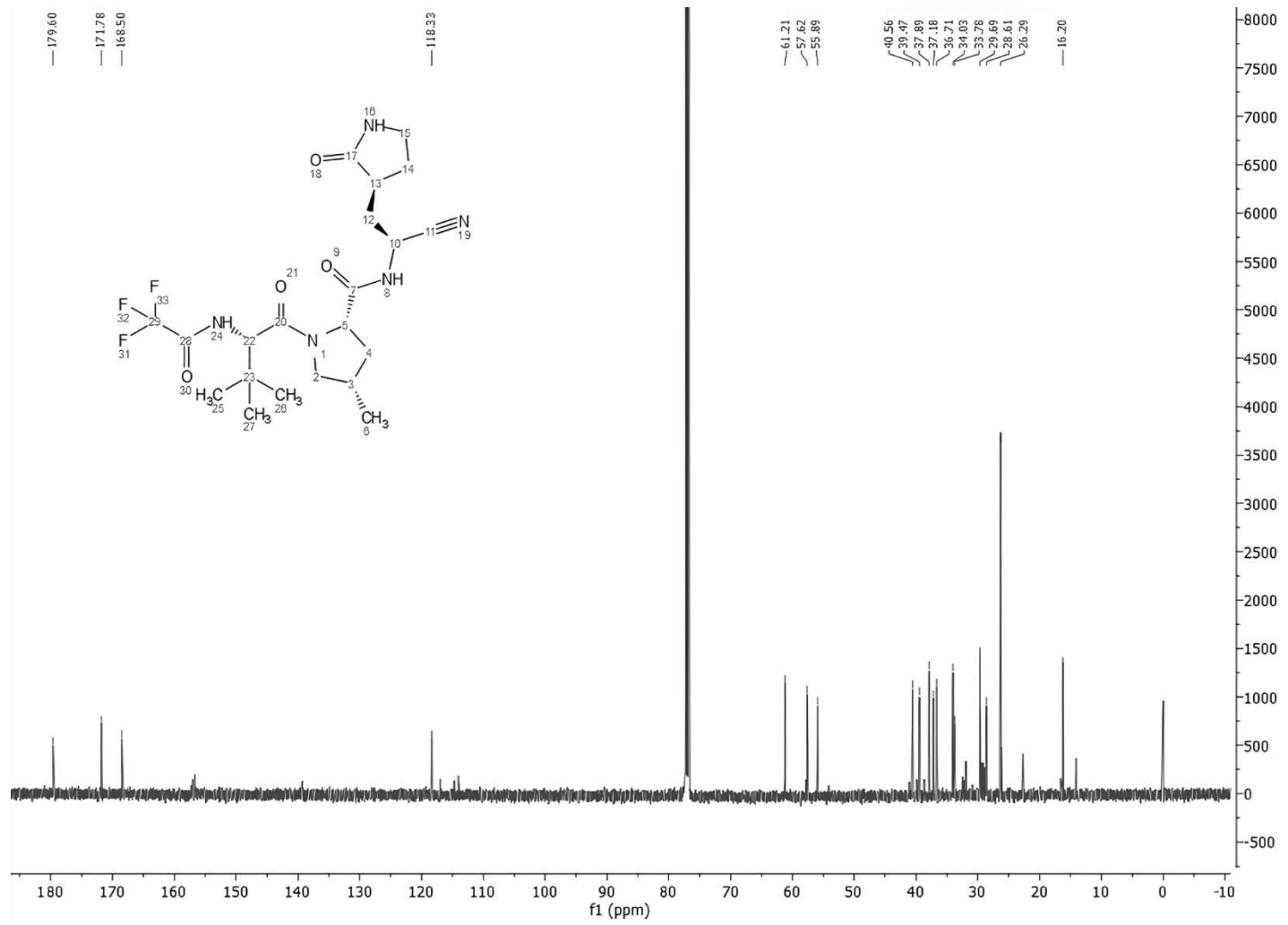
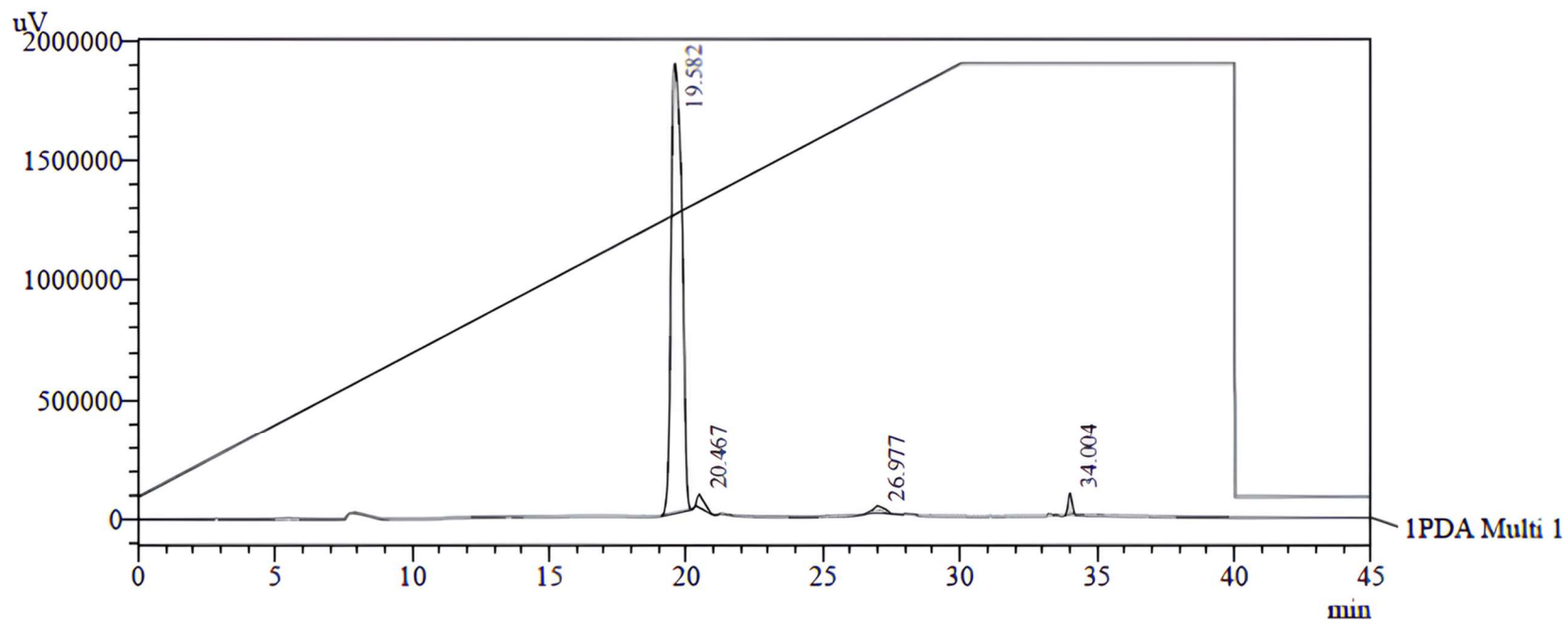


FIGURA 6



1 PDA Multi 1 / 201nm 4nm

FIGURA 7

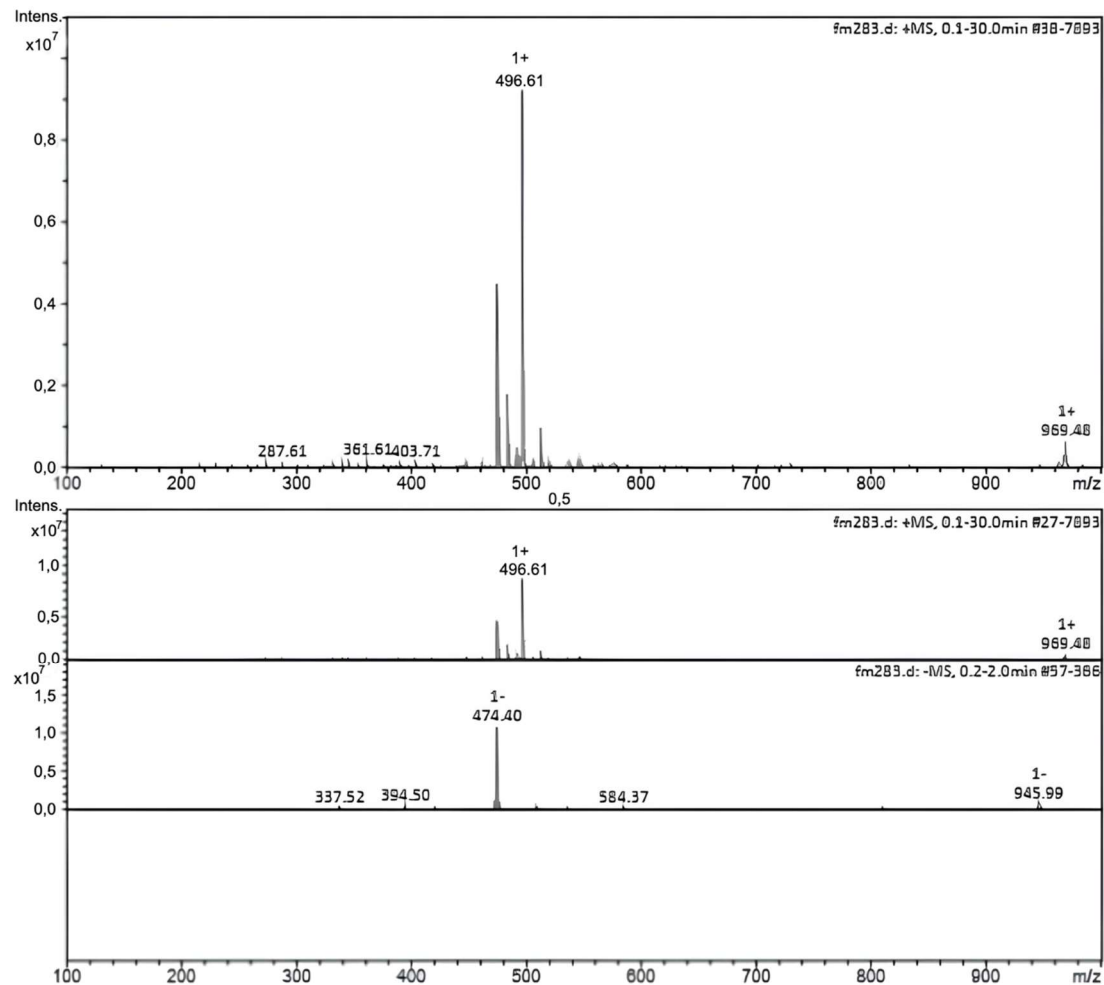


FIGURA 8

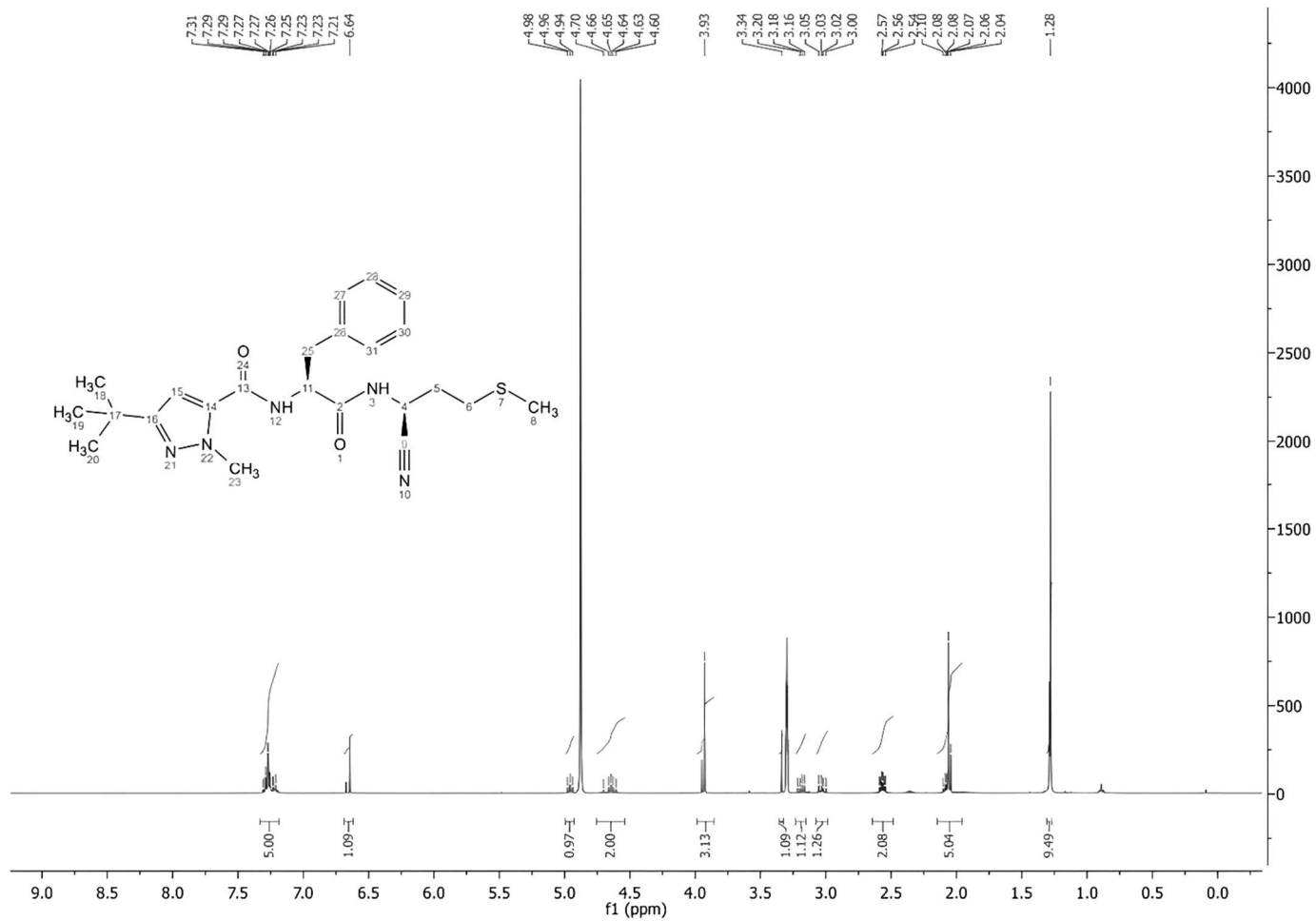


FIGURA 9

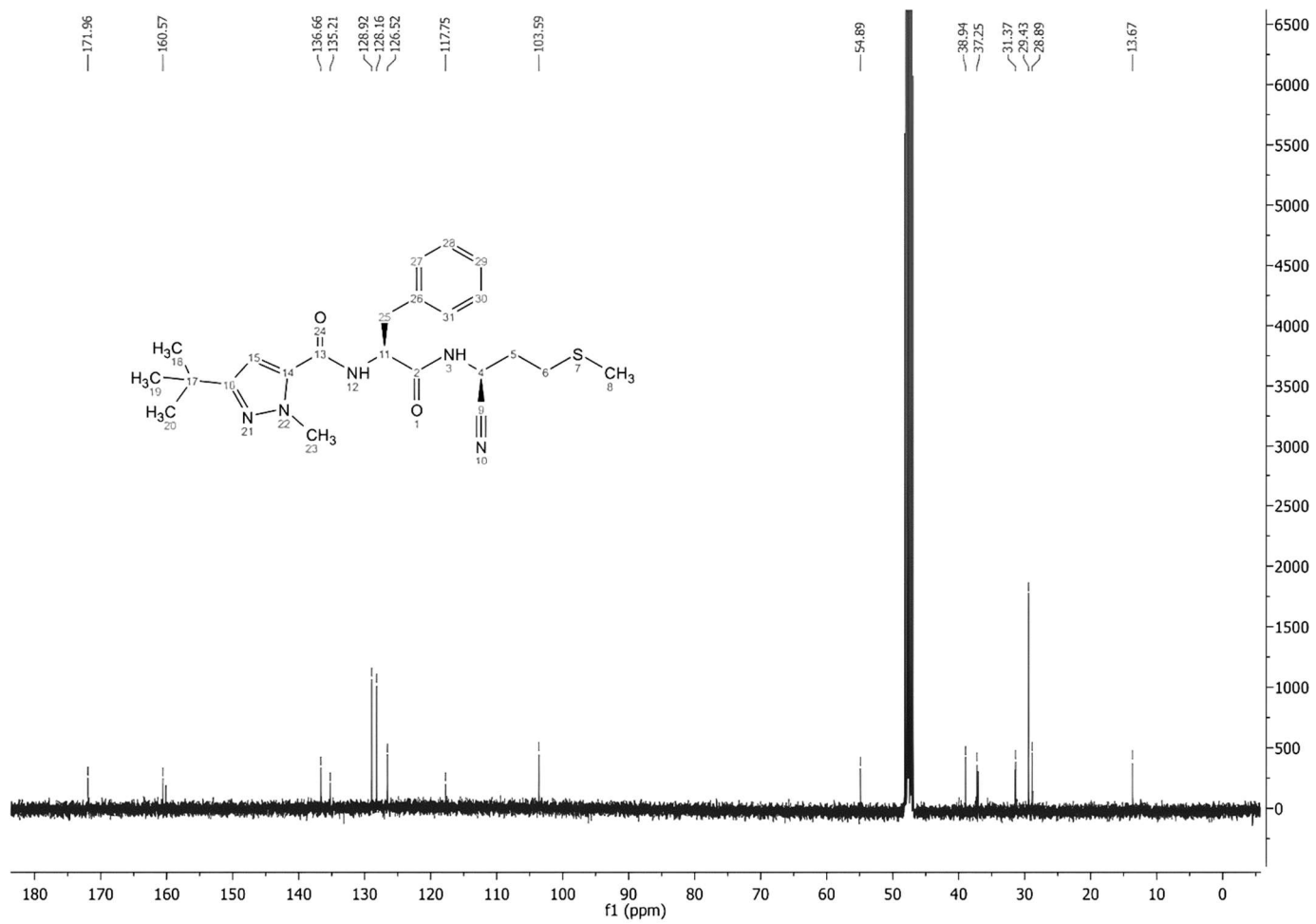
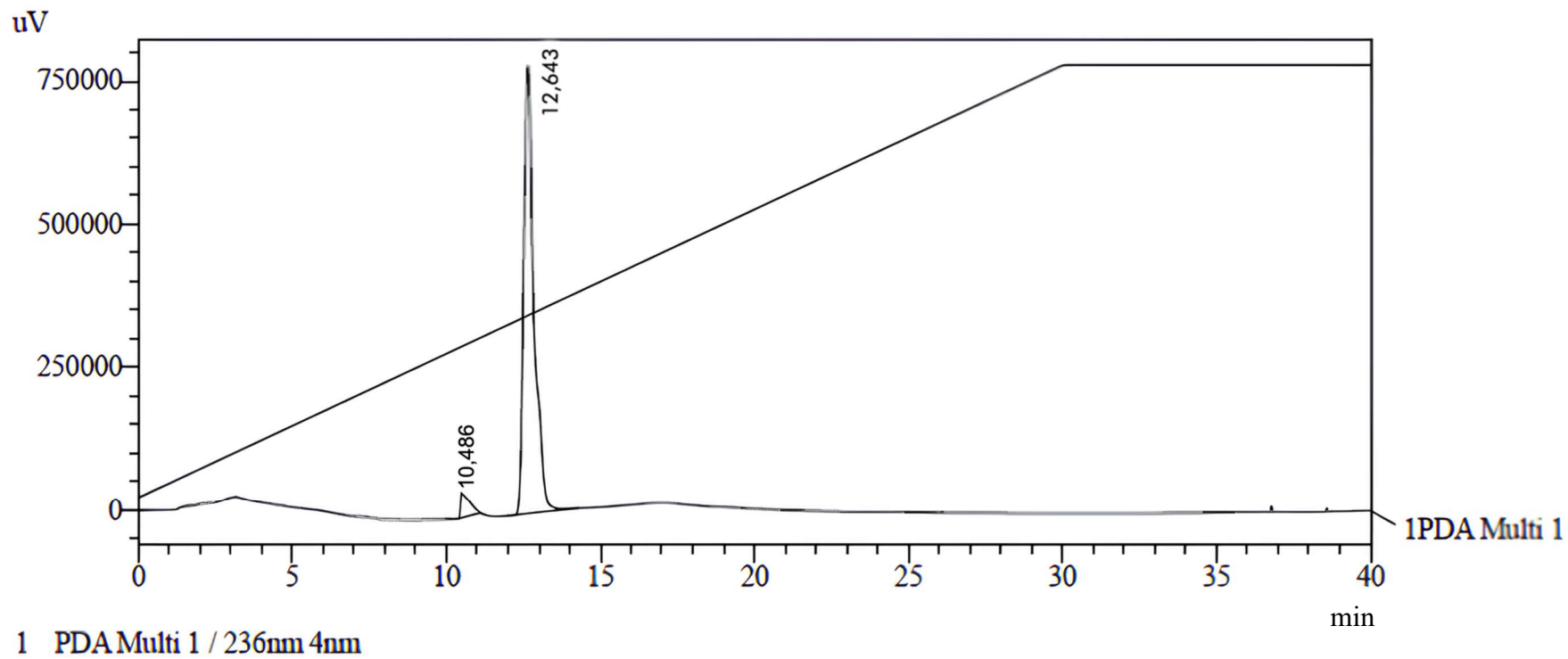


FIGURA 10



1 PDA Multi 1 / 236nm 4nm

FIGURA 11

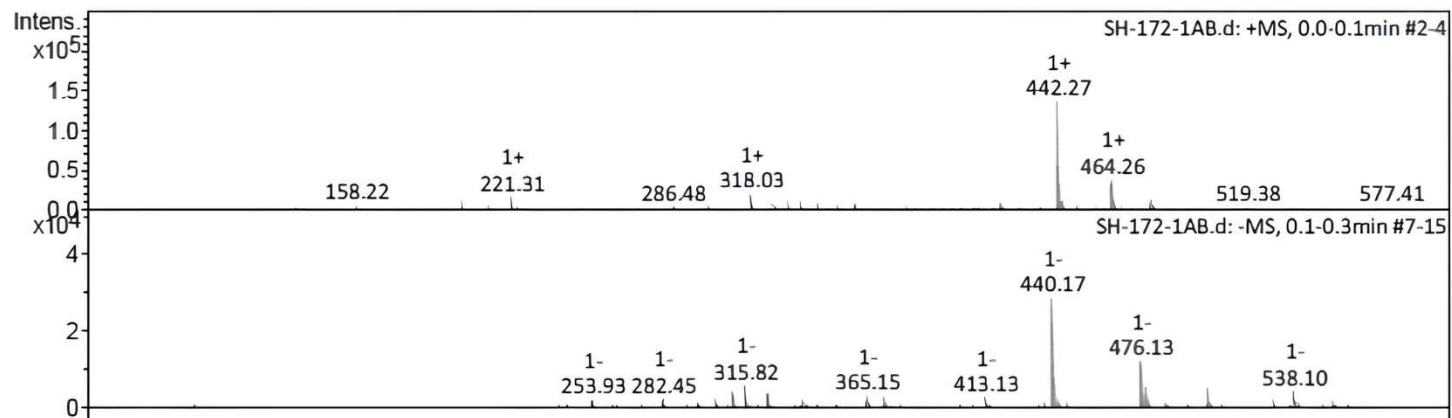
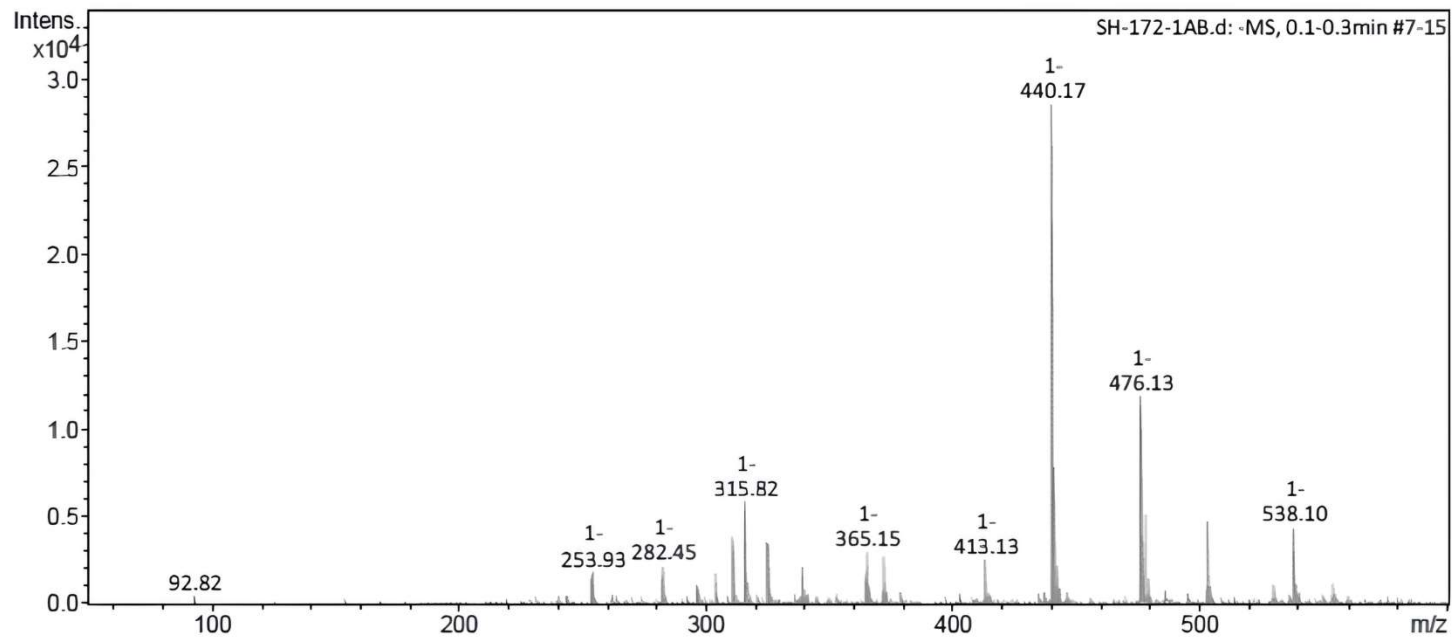


FIGURA 12

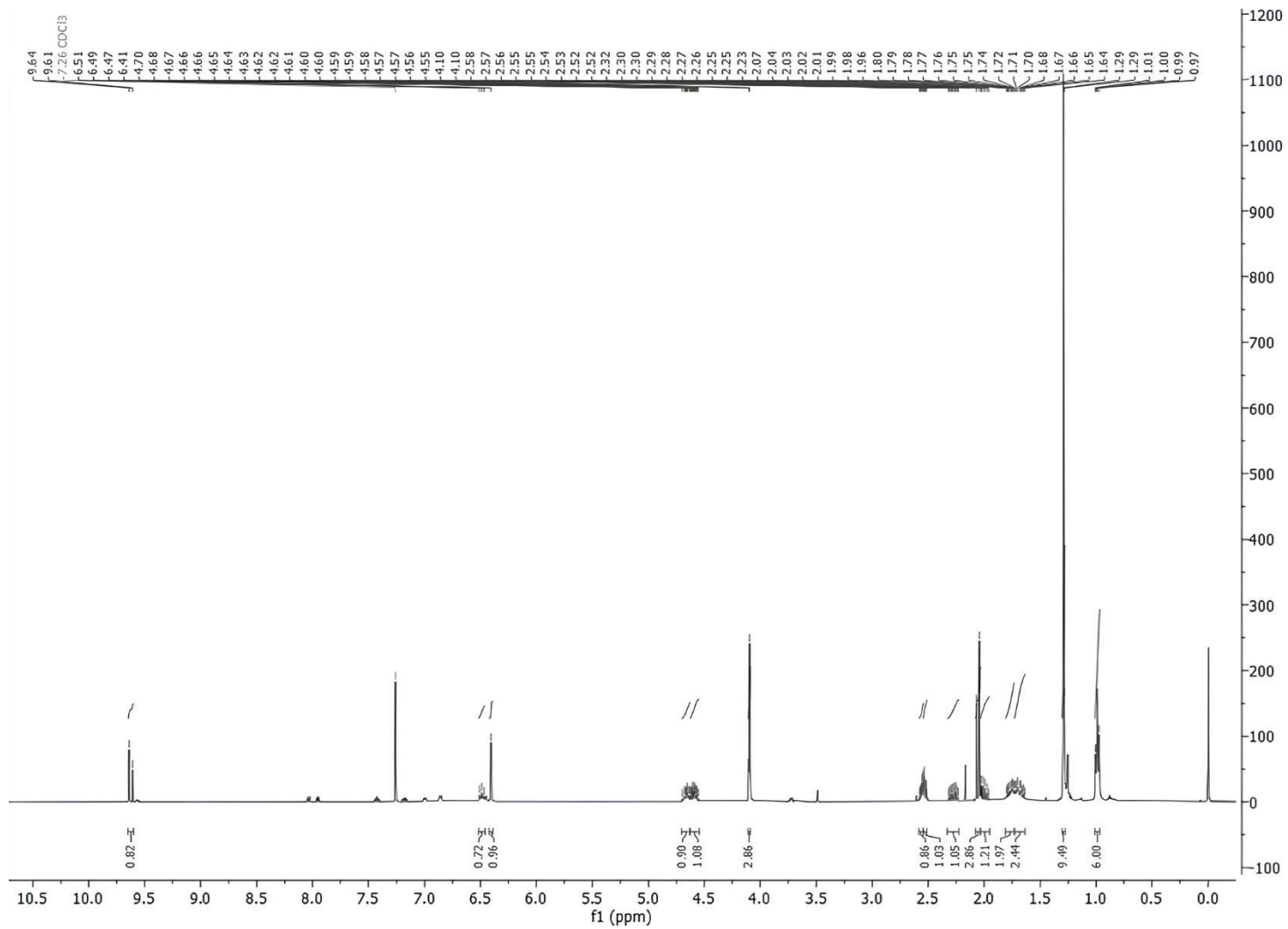


FIGURA 13

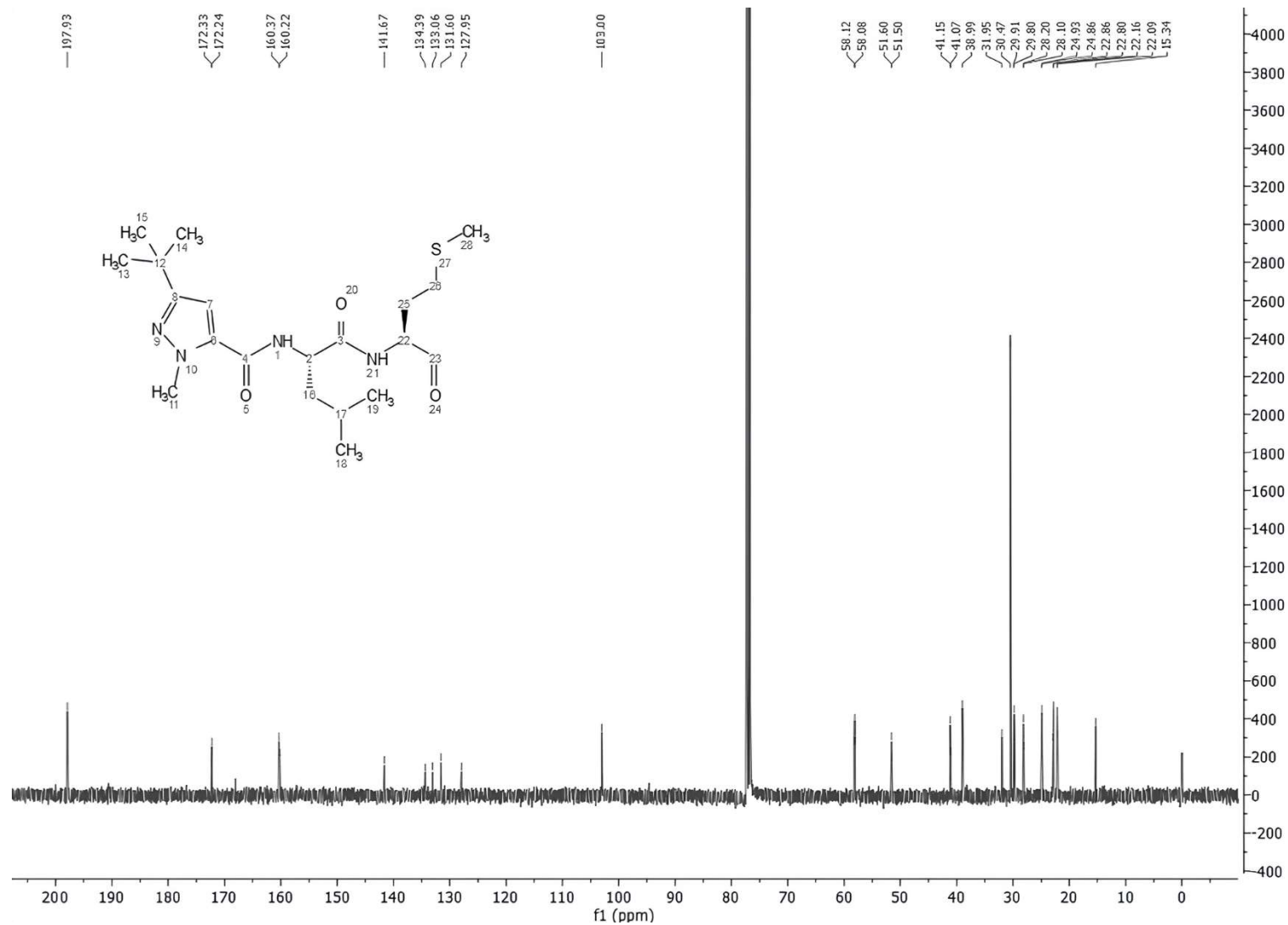
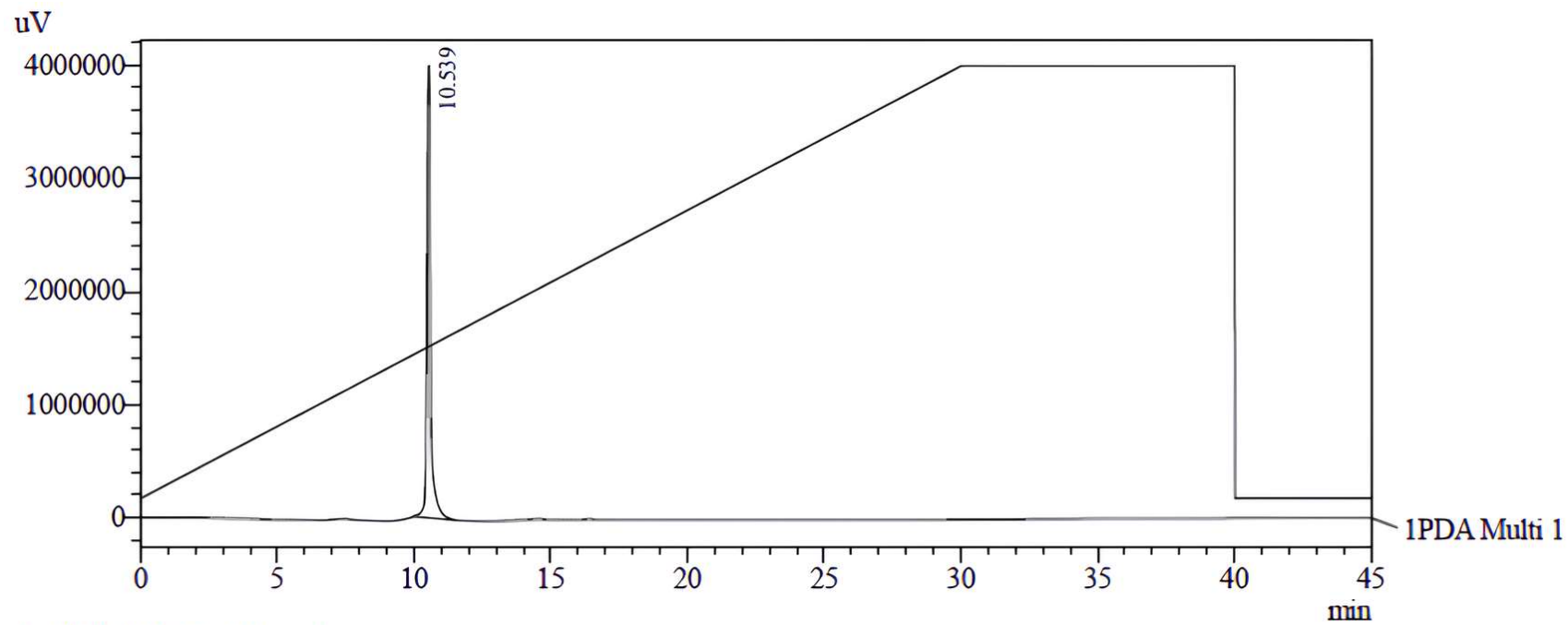


FIGURA 14



1 PDA Multi 1 / 217nm 4nm

FIGURA 15

MW: 410.23516

[M+H]<sup>+</sup>: 411.24243

erro: 7ppm

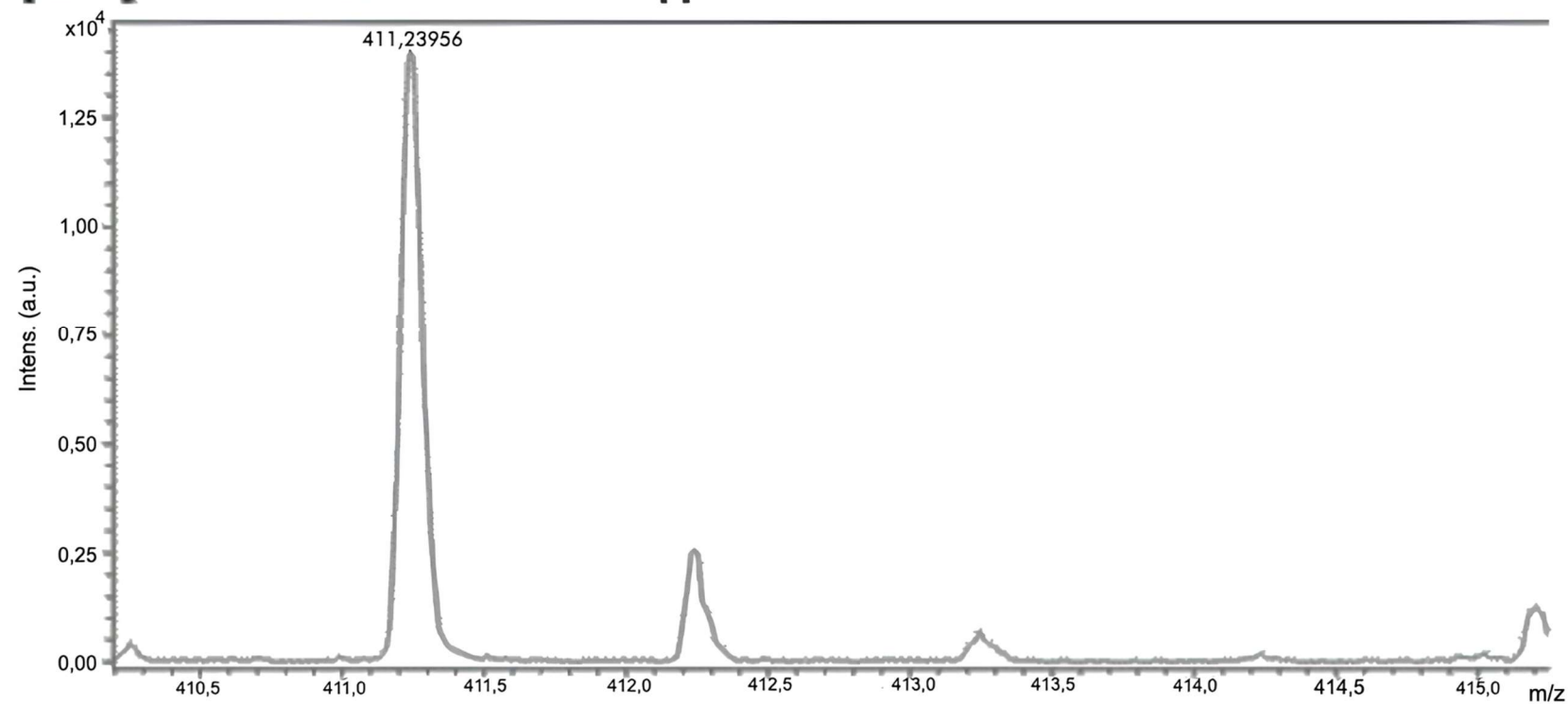


FIGURA 16

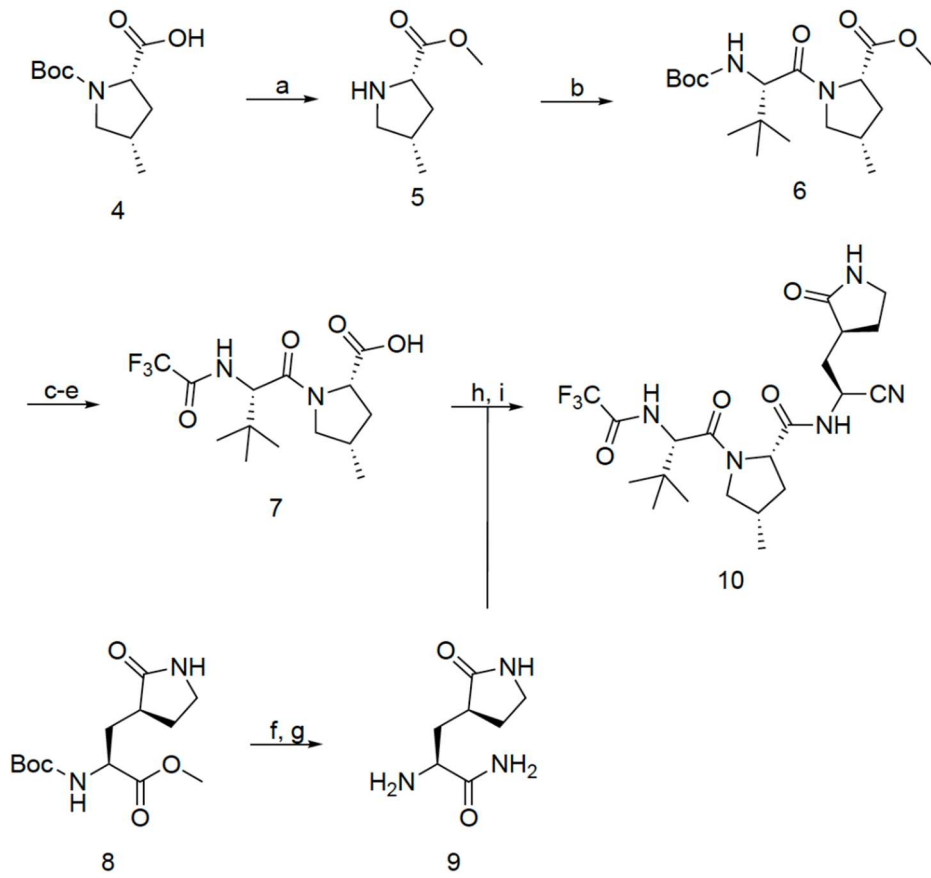


FIGURA 17

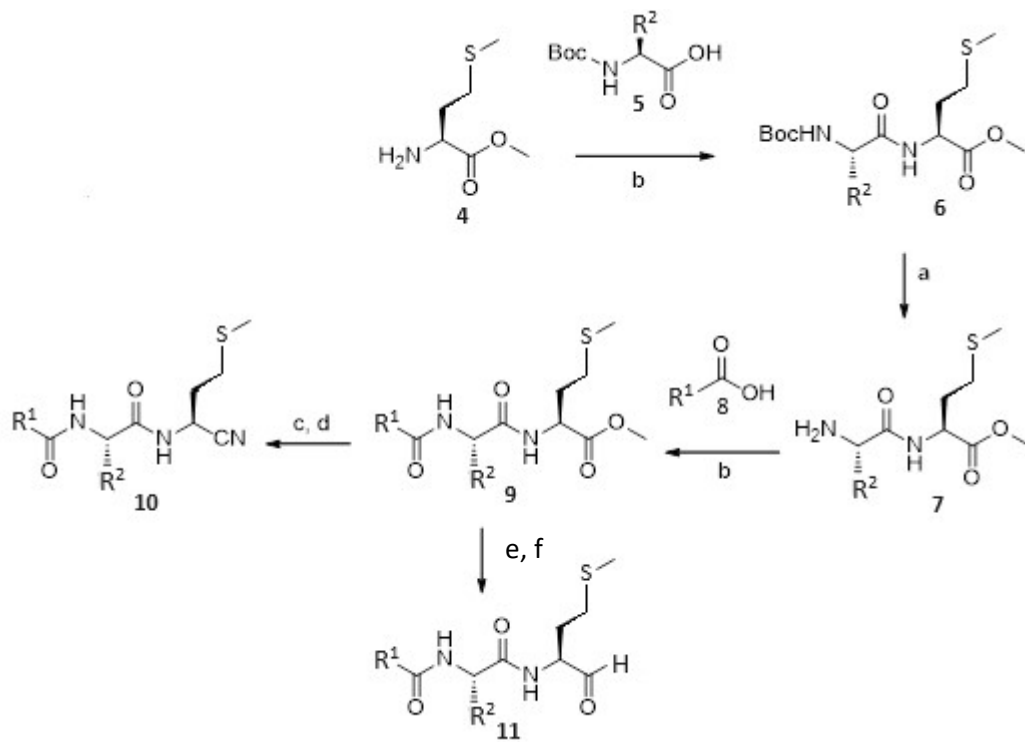


FIGURA 18

RESUMO

**COMPOSTOS INIBIDORES DE CISTEÍNA PROTEASES, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DOS COMPOSTOS NA PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR CORONAVÍRUS**

A presente invenção se refere a compostos com diferentes substituições em um esqueleto peptídico, úteis no tratamento de infecções virais respiratórias, particularmente causadas por coronavírus, como COVID-19. Ainda, a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo os compostos e ao seu uso na preparação de um medicamento para o tratamento de infecções virais respiratórias.