

(11) Número de Publicação: **PT 1572095 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/70 (2015.01) **A61K 31/00** (2015.01)
A61K 38/21 (2015.01) **A61P 31/20** (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.09.15	(73) Titular(es):	
(30) Prioridade(s): 2002.09.13 US 410675 P	NOVARTIS AG	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.09.14	 LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL	CH
(45) Data e BPI da concessão: 2015.06.10	(72) Inventor(es):	
200/2015	JEAN-PIERRE SOMMADOSSI	US
	DAVID STANDRING	US
	APRIL L.PATTY	US
	MARIA SEIFFER	US
	(74) Mandatário:	
	MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA	
	RUA DOS BACALHÓEIROS, 4 1100-070 LISBOA	PT

**(54) Epígrafe: Β-L-2'-DESOXINUCLEÓSIDOS PARA TRATAMENTO DE ESTIRPES
RESISTENTES DE VHB**

(57) Resumo:

FOI DESCOBERTO QUE OS Β-L-2'-DESOXINUCLEOSÍDEOS SÃO ATIVOS CONTRA O VÍRUS DA HEPATITE B, COM MUTAÇÕES, RESISTENTE AO FÁRMACO. UM MÉTODO PARA TRATAR VHB RESISTENTE A LAMIVUDINA (M552V) EM UM HOSPEDEIRO É FORNECIDO, O QUAL INCLUI ADMINISTRAR UM Β-L-2'-DESOXINUCLEOSÍDEO OU SEU SAL, ÉSTER OU PRÓ-FÁRMACO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL. ALÉM DISSO, UM MÉTODO PARA IMPEDIR QUE A MUTAÇÃO DO VHB RESISTENTE À LAMIVUDINA (M552V) OCORRA EM UM HOSPEDEIRO SIMPLES É FORNECIDO, O QUAL INCLUI ADMINISTRAR UM Β-L-2'- DESOXINUCLEOSÍDEO OU SEU SAL, ÉSTER OU PRÓ-FÁRMACO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL. UM MÉTODO PARA IMPEDIR E/OU SUPRIMIR O SURGIMENTO DE MUTANTE DUPLO DE VHB (L52 8M/M552V) EM UM HOSPEDEIRO É TAMBÉM FORNECIDO, O QUAL INCLUI ADMINISTRAR UM Β-L-2'-DESOXINUCLEOSÍDEO OU SEU SAL, ÉSTER OU PRÓ-FÁRMACO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL.

DESCRIÇÃO

β-L-2'-DESOXINUCLEÓSIDOS PARA TRATAMENTO DE ESTIRPES RESISTENTES DE VHB

Este Pedido reivindica prioridade para o Pedido Provisório de número 60/410,675, depositado em 13 de setembro de 2002.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção inclui 2'-desoxi-β-L-nucleósidos para tratamento de estirpes de hepatite B que apresentem resistência aos fármacos anti-VHB conhecidos, assim como a terapias combinadas com 2'-desoxi-β-L-nucleósidos com imunomoduladores.

FUNDAMENTO DA INVENÇÃO

O vírus da hepatite B ("VHB") ocupa o segundo lugar, logo a seguir ao tabaco, como causa principal de cancro em seres humanos. O mecanismo através do qual o VHB induz o cancro é desconhecido, embora seja postulado que possa influenciar diretamente ou indirectamente o desenvolvimento de tumores através da inflamação crónica, cirrose e regeneração celular associada à infeção.

O vírus da hepatite B atingiu níveis epidémicos por todo o mundo. Após um período de incubação de dois a seis meses, nos quais o hospedeiro não se percebe da infeção, a infeção por VHB pode conduzir à hepatite aguda e a danos no fígado, que causam dor abdominal, icterícia e elevados níveis de certas enzimas no sangue. O VHB pode provocar hepatite fulminante, uma forma da doença que progride rapidamente e é frequentemente fatal, na qual são destruídas grandes secções do fígado. Os pacientes normalmente recuperam da hepatite viral aguda. Em alguns pacientes, no entanto, persistem no sangue níveis elevados de antígeno viral por

um período prolongado ou indefinido, provocando uma infecção crónica. As infecções crónicas podem conduzir à hepatite crónica persistente. O paciente infetado com o VHB crónica persistente é mais comum em países em desenvolvimento. A hepatite crónica persistente pode provocar fadiga, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular, um cancro de fígado primário. Nos países ocidentais industrializados, os grupos de alto risco para infecção por VHB incluem os que estão em contato com os portadores de VHB ou com as suas amostras de sangue. A epidemiologia do VHB é, de fato, muito similar à da síndrome de imunodeficiência adquirida, o que justifica o porquê da infecção por VHB ser comum entre os pacientes com SIDA ou com infecções associadas ao VIH. No entanto, o VHB é mais contagioso que o VIH.

Até o momento, apenas três fármacos foram aprovados pela FDA para o tratamento da infecção por VHB crónica: interferon alfa, 3TC (Epivir, lamivudina) e adefovir dipivoxil (Hepsera® Gilead Sciences).

Fármacos o tratamento do VHB aprovados pela FDA para:

Nome do Fármaco	Classe do Fármaco	Empresa	Estado na FDA
Intron (interferon α -2b)	Alfa-interferon	Schering-Plough	Aprovado pela FDA
3 TC (lamivudina, Epivir-HBV)	Análogo do nucleosídeo	GlaxoSmithKline	Aprovado pela FDA
Adefovir dipivoxil	Análogo do nucleótido	Gilead Sciences	Aprovado pela FDA

Interferon alfa

Uma forma fabricada de interferon é utilizada para tratar a hepatite B. Este tratamento envolve a administração de interferon por injeção por cerca de quatro meses.

Nem todos os pacientes respondem ao interferon e algumas vezes torna-se necessário um novo tratamento. Em estudos clínicos, apenas 45% dos pacientes com hepatite B que foram tratados com A (Interferon alfa-2b recombinante, Schering Corporation) por injeção, não mostraram evidências do vírus da hepatite B no seu sangue ao longo do tempo. Adicionalmente, a maioria dos pacientes que teve dificuldades em tolerar o tratamento com interferon, apresentou sintomas sérios, similares à gripe, perda de peso e falta de energia e vigor.

3TC

O (-)-enantiómero de BCH-189 (2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina), também conhecido como 3TC (Epivir, lamivudina) é um fármaco antiviral que atua tanto contra o VIH, como contra o VHB. Pertence à classe de fármacos designados inibidores da transcriptase reversa análoga de nucleosídeo (NRTI), que atuam bloqueando a produção da enzima da transcriptase reversa que o VIH e o VHB necessitam para se multiplicarem. A 3TC foi originalmente desenvolvida para o tratamento do VIH, no entanto, os investigadores descobriram que a 3TC também atua contra o vírus da hepatite B. Em dezembro de 1998, a americana Food and Drug Administration (F.D.A.) aprovou o Epivir HVB para o tratamento da infecção por vírus de hepatite B.

Embora a 3TC iniba de forma eficiente a multiplicação do VHB, a eliminação da cinética viral é lenta durante a terapia com 3TC (Nowak, M., S. Bonhoeffer e outros, 1996.

Proc. Natl. Acad. Sei. USA 93:4398-4402) e a variabilidade espontânea do genoma viral conduz ao aparecimento de mutações resistentes aos fármacos, mutações essas que afetam o domínio da transcriptase reversa (RT) (Mason, W. S., J. Cullen e outros. 1998. Virology 245:18-32. Nafa, S., S. Ahmed e outros. 2000. Hepatology 32:1078-1088; Melegari, M., P. P. Scaglioni e J. R. Wands. 1998 Hepatology 27:628-633; Seigneres, B., C. Pichoud e outros. 2000. J. Infect. Dis. 181:1221-1233). Aproximadamente 50% dos pacientes tratados desenvolveram resistência viral após 3 anos de tratamento com 3TC (Leung, N. W., C. L. Lai e outros. 2001. Hepatology 33:1527-1532). A resistência aos análogos de nucleosídeo está associada às substituições na sequência de ácido nucleico do gene da polimerase, provocando mudanças na sequência de aminoácido da RT de VHB, mais concretamente no motivo YMDD no sítio catalítico. A variante mais comum da polimerase é a mudança na "rtL180M-plus-M204V" (de acordo com a mais recente nomenclatura independente de genótipos para variantes de HVB resistentes a fármacos) (Stuyver, L.J., S. A. Locarnini e outros, 2001. Hepatology 33:751-757) que associa uma mutação no sítio catalítico (rtM204V) a uma mutação compensatória no domínio B da RT (rtL180M), que proporciona à variante do sítio catalítico, uma capacidade de multiplicação mais elevada (Allen, M. I., M. Deslauriers e outros. 1998. Hepatology 27:1670-1677. Chayama, K., Y. Suzuki e outros. 1998. Hepatology 27:1711-1716. Melegari, M., P. P. Scaglioni e J. R. Wands. 1998. Hepatology 27:628-633. Ono, S. K., N. Kato e outros. 2001. J. Clin. Investig. 107:449-455. Seigneres, B., S. Aguesse-Germon e outros. 2001. J. Hepatol. 34:114-122).

Adefovir dipivoxil (Hepsera)

A 20 de setembro de 2002, a americana Food and Drug Administration aprovou o adefovir dipivoxil para o

tratamento de hepatite B crónica. O nome comercial para o adefovir dipivoxil é HEPSERA™, um pró-fármaco de diéster de adefovir. O adefovir é um nucleótido acíclico análogo ao monofosfato de adenosina que inibe a polimerase do ADN do vírus da hepatite B (VHB), competindo com o substrato natural de trifosfato de desoxiadenosina e provoca a fim da cadeia de ADN após sua incorporação ao ADN viral. O nome químico do adefovir dipivoxil é 9-[2-[bis[(pivaloiloxy)metoxi]fosfinil]metoxi]-etilo]adenina. O adefovir é fosforilado até ao metabólito ativo, difosfato de adefovir, através de quinase celular. Ver, por exemplo, as Patentes americanas nº 5,641,763 e nº 5,142,051, intituladas "N-phosphonylmethoxyalkyl derivatives of pyrimidine and purine bases and a therapeutical composition therefrom with antiviral activity".

Estirpes resistentes de VHB

A lamivudina é um L-nucleosídeo para tratamento de VHB que frequentemente resulta da seleção de estirpes resistentes do vírus, que podem ser diferenciadas entre o L-nucleosídeo não natural e o D-nucleosídeo, os substratos naturais e, em particular, as mutações simples, mutação YMDD (M552I ou M552V) e L528M, e a mutação dupla (L528M/M552V). Ver as Patentes americanas nº 6,242,187 e nº 6,265,181; e a Publicação Internacional nº WO 01/04358. Ver também: Ahmed e outros, "Early Detection of Viral Resistance by Determination of Hepatitis B Virus Polymerase Mutations in Patients Treated by Lamivudine for Chronic Hepatitis B" Hepatology, **2000**, 32 (5), 1078-1088; Ono e outros, "The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance" Journal of Clinical Investigation, February **2001**, 107 (4), 449-455; Allen, "Identification and Characterization of Mutations in

Hepatitis B Virus Resistant to Lamivudine" *Hepatology*, **1988**, 7(6), 1670-1677; Das e outros, "Molecular Modeling and Biochemical Characterization Reveal the Mechanism of Hepatitis B virus Polymerase Resistance to Lamivudine (3TC) and Emtricitabine (FTC)" *Journal of Virology*, Maio **2001**, 75(10), 4771-4779; Delaney, "Cross-Resistance Testing of Antihepatitis B Viral Compounds using Novel Recombinant Baculoviruses which Encode Drug-Resistant Strains of Hepatitis B Virus" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Junho **2001**, 45(6), 1705-1713; Fu, "Role of Additional Mutations outside the YMDD Motif of Hepatitis B Virus Polymerase in L-(-)-SddC (3TC) Resistance" *Biochemical Pharmacology*, **1998**, 55(10), 1567-1572; Fu, "Sensitivity of L-(-)-2',3'-Dideoxythiacytidine Resistant Hepatitis B Virus to Other Antiviral Nucleoside Analogue" *Biochemical Pharmacology*, **1999**, 57(12), 1351-1359; Gauthier, "Quantitation of Hepatitis B Viremia and Emergence of YMDD Variants in Patients with Chronic Hepatitis B Treated with Lamivudine" *The Journal of Infection Diseases*, Dezembro **1999**, 180, 1757-1762; Kioko, "YMDD Motif in Hepatitis B Virus ADN Polymerase Influences on Replication and Lamivudine Resistance: A Study by In Vitro Full-Length viral ADN Transfection" *Hepatology*, Março **1999**, 29(3), 939-945; Kioko, "Susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to other reverse transcriptase inhibitors" *The Journal of Clinical Investigation*, Junho **1999**, 3(12), 1635-1640; Zoulim, "Drug therapy for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and influence of hepatitis B virus polymerase mutations on the outcome of therapy" *Journal of Hepatology*, **1998**, 29, 151-168; e Ying e outros, *J. Viral Hepat.*, Março **2000**, 7(2), 161-165.

Em estudos clínicos controlados, na lamivudina (100 mg qd) administrada a pacientes infetados por VHB, a prevalência

da mutação YMDD do VHB, foi de 14% a 32% após um ano de tratamento, e até 58% após dois ou três anos de tratamento. A mutação do vírus foi associada à evidência na redução da resposta ao tratamento, em relação aos pacientes tratados com lamivudina sem mutações YMDD. Ono e outros, *The Journal of Clinical Investigation*, 2001, 107 (4), 449-455.

A análise genotípica de vírus isolados obtidos a partir de pacientes com multiplicação renovada de VHB quando tratados com lamivudina sugere que a redução da sensibilidade do VHB à lamivudina está associada às mutações, resultando na substituição de metionina por valina ou por isoleucina no motivo YMDD do domínio catalítico da polimerase do ADN do VHB (posição 552) e uma substituição da leucina por metionina na posição 515 ou 528 (dependendo do genótipo/subtipo de VHB).

Atualmente, não há sistema celular de base da infecção por VHB que possa ser utilizado para avaliar a ação da lamivudina dos agentes antivirais em pacientes, contra células infetadas com VHB resistentes isolados. O modelo *in vitro* de VHB em pato (DVHB) não se mostrou útil na seleção de mutações resistentes ao fármaco, porque os hepatócitos primários de pato utilizados neste modelo não são sustentáveis por mais de algumas semanas em cultura celular. A relevância da seleção das mutações resistentes ao fármaco no modelo *in vivo* de marmota é dúbia, porque o espectro das mutações resistentes à lamivudina na marmota não corresponde ao identificado nos pacientes infetados por VHB.

Interferons

O interferon é uma proteína produzida naturalmente pelo corpo para modular o sistema imune e para regular outras

funções celulares. As classes principais de interferons são o interferon alfa, interferon beta, interferon gama, interferon ómega e interferon tau. Os interferons podem ser modificados para aumentar a estabilidade *in vivo*, e tais modificações podem incluir a peguilação ou outros meios para melhorar a estabilidade da molécula.

Os exemplos da classe de interferons chamada interferon alfa incluem: interferon alfa-2a, interferon alfa-2b, interferon alfa-2a peguilado, interferon alfa-2b peguilado, ROFERON®-A (interferon alfa-2a, Roche), PEGASYS® (interferon alfa-2a peguilado, Roche), INTRON®A (interferon alfa-2b, Schering Corporation), PEG-INTRON® (interferon alfa-2b peguilado, Schering Corporation), interferon de consenso, INFERGEN (interferon alfacon-1) por InterMune, OMNIFERON (interferon natural) por Viragen, ALBUFERON por Human Genome Sciences, Interferon Alfa Oral por Amarillo Biosciences e Superferon (IFN alfa de subtipo múltiplo humano natural, Genetrol, Inc.).

Outros tipos de interferon incluem: interferon beta, interferon gama, interferon tau, interferon ómega, REBIF (interferon beta-la) por Ares-Serono, interferon ómega por BioMedicine, interferon gama-lb por InterMune e HuFeron (IFN-beta humano, Genetrol, Inc.).

Os tratamentos diários com o α -interferon, uma proteína de engenharia genética, pareciam promissores. Uma vacina derivada do soro humano foi também desenvolvida para imunizar pacientes contra o VHB. As vacinas foram também produzidas através de engenharia genética. Embora a vacina tenha sido eficaz, a sua produção apresenta alguns impedimentos, porque o fornecimento de soro humano a partir de portadores crónicos é limitado, e o procedimento de

purificação é longo e dispendioso. Além disso, cada lote de vacina preparado, a partir de um soro diferente, deve ser testado em chimpanzés para assegurar a segurança. Além disso, a vacina não ajuda os pacientes já infetados com o vírus.

Uma etapa essencial no modo de atuação dos nucleosídeos purina e pirimidina contra as doenças virais, e em particular, contra o VHB e o VIH, é a sua ativação metabólica através de quinase celular e viral, para produzir os derivados de mono-, di- e trifosfato. A espécie biologicamente ativa de muitos nucleosídeos é na forma de trifosfato, que inibe a polimerase do ADN ou a transcriptase reversa, ou causa a terminação da cadeia.

Foram identificados vários nucleosídeos sintéticos, os quais apresentam ação contra o VHB. Conforme afirmado anteriormente, o (-)-enantiómero de BCH-189 (2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina), conhecido como 3TC, foi aprovado para o tratamento da Hepatite B. Ver a Patente americana nº 5,532,246, assim como a EPA 0 494119 Al depositada por BioChem Pharma, Inc.

O Adefovir (9-{2-(fosfonometoxi)etilo}adenina, também referido como PMEA ou (ácido{2-(6-amino-9H-purin-9-il)etoxi}metilo fosfônico), também foi aprovado nos Estados Unidos para o tratamento de pacientes infetados com vírus da hepatite B. Ver, por exemplo, as Patentes americanas nº 5,641,763 e nº 5,142,051. Foi detetada resistência ao tratamento com adefovir nos pacientes com o VHB.

β -2-hidroximetilo-5-(5-fluorocitosina-1-il)-1,3-oxatiolano ("FTC"), reivindicada nas Patentes americanas nº 5,814,639 e nº 5,914,331 para Liotta e outros, apresenta ação contra

o VHB. Ver Furman e outros, "The Anti-Hepatitis B Virus Activities, Cytotoxicities, and Anabolic Profiles of the (-) and (+) Enantiomers of cis-5-Fluoro-1-{2-Hydroxymethyl}-1,3-oxathiolane-5-yl}-Cytosine" Antimicrobial Agents and Chemotherapy, dezembro **1992**, 2686-2692; e Cheng e outros, Journal of Biological Chemistry, **1992**, 261(20), 13938-13942.

As Patentes americanas nº 5,565,438, 5,567,688 e 5,587,362 (Chu e outros) divulgam o uso de 2'-fluoro-5-metil-β-L-arabinofuranoliluridila (L-FMAU) para o tratamento da hepatite B e do vírus de Epstein Barr.

O Penciclovir (PCV; 2-amino-1,9-dihidro-9-{4-hidroxi-3-(hidroximetilo)butilo}-6H-purin-6-ona) apresentou ação contra a hepatite B. Ver as Patentes americanas nº 5,075,445 e nº 5,684,153.

A Yale University e a The University of Georgia Research Foundation, Inc., divulgam o uso de L-FDDC (5-fluoro-3'-tia-2',3'-didesoxicitidina) para o tratamento do vírus da hepatite B em WO 92/18517.

Nos fármacos investigados para o tratamento de VHB incluem-se arabinosídeo de adenosina, timosina, aciclovir, fosfonoformato, zidovudina, (+)-cianidanol, quinacrina, e 2'-fluoroarabinosil-5-iodouracil.

As Patentes americanas nº 5,444,063 e nº 5,684,010 para Emory University divulgam o uso de nucleosídeos β-D-1,3-dioxolanopurina enantiomericamente puros para tratar a hepatite B.

A WO 96/40164 depositada por Emory University, UAB Research Foundation, e por The Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), divulga vários β -L-2',3'-didesoxinucleosídeos para o tratamento da hepatite B.

A WO 95/07287 também depositada por Emory University, UAB Research Foundation, e por The Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), divulga os nucleosídeos 2'-ou 3'-desoxi e 2',3'-didesoxi- β -L-pentofuranosil para o tratamento de infecção por VIH.

A WO 96/13512 depositada por Genencor International, Inc., e Lipitek, Inc., divulga a preparação dos nucleosídeos L-ribofuranosil como agentes anti tumor e viricidas.

A WO 95/32984 divulga os ésteres lipídicos de monofosfato de nucleosídeos como fármacos imunossupressores.

A DE 4224737 divulga os nucleosídeos citosina e seus usos farmacêuticos.

Tsai e outros, em Biochem. Pharmacol. **1994**, 48(1), 1477-81, divulga o efeito de agente anti-VIH análogos de 2'- β -D-F-2', 3'-didesoxinucleosídeo no conteúdo celular de ADN mitocondrial e a produção de lactato.

Galvez, J. Chem. Inf. Comput. Sci. **1994**, 35(5), 1198-203, descreve o cálculo molecular de β -D-3'-azido-2',3'-didesoxi-5-fluorocitidina.

Mahmoudian, Pharm. Research **1991**, 8(1), 43-6, divulga a análise da relação quantitativa estrutura-atividade de agentes de VIH tal como β -D-3'-azido-2',3'-didesoxi-5-fluorocitidina.

A Patente americana nº 5,703,058 divulga nucleosídeo (5'-carboximido ou 5-fluoro)-(2',3'-insaturado ou 3'-modificado) pirimidina para o tratamento de VIH ou de VHB.

Lin e outros divulgam a síntese e atividade antiviral de vários análogos de 3'-azido de β -D-nucleosídeos em J. Med. Chem. **1988**, 31(2), 336-340.

A WO 00/3998 depositada por Idenix Pharmaceuticals, Ltd., divulga os métodos de preparação de 6-benzil-4-oxopirimidinas substituídas, e o uso de tais pirimidinas para o tratamento de VIH.

A Idenix Pharmaceuticals, Ltd. divulga o nucleosídeo 2'-desoxi- β -L-eritropentofurano, e o seu uso no tratamento de VHB nas Patentes americanas nº 6,395,716, 6,444,652, 6,566,344 e 6,539,837. Ver também WO 00/09531. É divulgado um método para o tratamento de infecção por hepatite B em seres humanos e outros animais, o qual inclui administrar uma quantidade efetiva de um nucleosídeo 2'-desoxi- β -L-eritropentofurano biologicamente ativo (também referido como β -L-dN ou um β -L-2'-dN) ou um sal, éster ou pró-fármaco farmacêuticamente aceitáveis deste, incluindo β -L-desoxiribotimidina (β -L-dT), β -L-desoxiribocitidina (β -L-dC), β -L-desoxiribouridina (β -L-dU), β -L-desoxiriboguanosina (β -L-dG), β -L-desoxiribouridina (β -L-dA) e β -L-desoxiriboinosina (β -L-dI), administrados sozinhos ou combinados, opcionalmente num portador farmacêuticamente aceitável. Os derivados dos compostos ativos de 5' e N⁴ (citrina) ou N⁶ (adenosina) acilados ou alquilados, ou o 5'-fosfolipídeo ou lipídeos de 5'-éter foram também divulgados.

von Janta-Lipinski e outros, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41(12), 2040-2046 divulga o uso dos L-enantiómeros de 5'-trifosfatos de β -2'-desoxiribonucleosídeos modificados em 3'-fluoro para a inibição das polimerases da hepatite B. Especificamente, os 5'-trifosfatos de 3'-desoxi-3'-fluoro- β -L-timidina (β -p-L-FTTP), 2',3'-didesoxi-3'-fluoro- β -L-citidina (β -L-FdCTP), e 2',3'-didesoxi-3'-fluoro- β -L-5-metilcitidina (β -L-FMethCTP), foram divulgados como inibidores efetivos das polimerases do ADN do VHB. Além disso, von Janta-Lipinski e outros divulgam a ação biológica do trifosfato de β -L-timidina (mas não do β -L-2'-dC) como um inibidor de nucleosídeo das polimerases endógenas de ADN do VHB e do DVHB. Entretanto, apenas o β -L-timidina trifosforilada foi avaliado, e não a forma não fosforilada reivindicada, e não há nenhum comentário no artigo se os β -L-nucleosídeos são fosforilados nas células ou *in vivo* ou, de forma mais preemente, não há nenhum comentário sobre a eficácia de fosforilação do β -L-timidina *in vivo*. Em virtude deste facto, o artigo não referencia que o β -L-timidina teria qualquer ação sobre a hepatite B numa célula ou *in vivo*. Ver também WO 96/1204.

O Pedido de Patente Europeu nº 0 352 248 A1 para Johansson e outros, divulga o uso dos compostos L-ribofuranosil para o tratamento de hepatite B.

Lin e outros, "Synthesis of Several Pyrimidine L-Nucleoside Analogues as Potential Antiviral Agents" *Tetrahedron*, **1995**, 51(4), 1055-1068, debate que a β -L-5-iodo-2'-desoxiuridina (β -L-IUDR, composto 7) é ativa contra infeção por herpes e por diversos outros vírus de ADN, que BVdU e β -L-BV-ara-U são também ativos contra herpes, β -L-BV-ara-U atua contra o vírus da varicela-zoster; e foi

descoberto que a 2',3'-didesoxi-L-azacitidina atua contra o VHB.

A Publicação da Patente americana nº 20030083306 para Idenix Pharmaceuticals, Ltd. divulga os 3'-pró-fármacos de 2'-desoxi-β-L-nucleosídeos para o tratamento de VHB. Ver também WO 01/96353.

A Patente americana nº 4,957,924 para Beauchamp, divulga vários ésteres terapêuticos do aciclovir.

Em 17 a 21 de abril de 2002 m no Encontro da Associação Européia "Study of the Liver", em Madrid, Spain, Suhnel e outros de Gilead Sciences, Inc., apresentaram um póster indicando quais as combinações de adefovir com β-L-2'-desoxitimidina que produzem efeitos antivirais aditivos contra o VHB *in vitro*.

No mesmo encontro, Delaney e outros, de Gilead Sciences, Inc., mostraram uma apresentação oral indicando que estirpes selecionadas de VHB resistente à lamivudina, isto é, o VHB com uma mutação única em L528M (rtL180M) ou M552I(rtM204I), ou com uma mutação dupla em L528M (rtL528M) eM552V (rtM204V), são trans-resistentes a L-dT e a L-dC *in vitro*.

Os tratamentos da infecção por hepatite B estão também descritos em Lok e McMahon, AASLD Practice Guidelines, páginas 1225-1241 (2001) incluindo o tratamento com interferons. As marmotas orientais cronicamente infetadas com o vírus da hepatite da marmota (WHV), foram usadas como um modelo de infecção por VHB para estudar o efeito antiviral de 1-(2-fluoro-5-metil-β-L-arabinofuranosil)-uracil (L-FMAU) e superficial da vacina de antígeno de

WHV. A imunidade humoral e celular associada à combinação de L-FMAU com a vacina assemelham-se ao observado na infecção por WHV auto-limitada. Menne e outros, *J. Virology*, 76(11):5305-5314 (2002).

A WO 98/23285 divulga um método para o tratamento ou profilaxia de infecções por vírus da hepatite B num paciente humano ou animal, que compreende a administração ao paciente de quantidades efetivas ou profiláticas de penciclovir (ou um bioprecursor deste como o fanciclovir) e o alfa-interferon.

Exemplos de agentes antivirais que foram identificados como sendo ativos contra o vírus da hepatite B incluem: agentes atualmente em desenvolvimento clínico onde se incluem:

Nome do fármaco	Classe do fármaco	Companhia	Estado na FDA
Intron A (interferon α -2b)	interferon	Schering-Plough	Aprovado pela FDA
Epivir- VHB(lamivudina, 3TC)	Análogo de nucleosídeo	GlaxoSmithKline	Aprovado pela FDA
Adefovir dipivoxil	Análogo de nucleotídeo	Gilead Sciences	Fase III* (NDA depositado em março de 2002)
Coviracil (emtricitabina; FTC)	Análogo de nucleosídeo	Triangle Pharmaceuticals	Fase III
Entecavir	Análogo de nucleosídeo	Bristol-Myers Squibb	Fase III
Clevudina (L-FMAU)	Análogo de nucleosídeo	Triangle Pharmaceuticals	Fase II
ACH 126, 443(L-Fd4C)	Análogo de nucleosídeo	Achillion Pharmaceuticals	Fase II
AM 365	Análogo de nucleosídeo	Amrad	Fase II (Ásia e Austrália)
DAPD	Análogo de nucleosídeo	Triangle Pharmaceuticals	Fase II

LdT (telbavudina)	Análogo de nucleosídeo	Idenix	Fase II
XTL 001	Anticorpo monoclonal	XTL Biopharm	Fase II (Israel)
Theradigm	Imunoestimulante	Epimmune	Fase II
Zadaxin** (timosina)	Imunoestimulante	SciClone	Fase II com Epivir-VHB
EHT 899	Proteína viral	Enzo Biochem	Fase II (Israel)
Vacina de ADN de VHB	Imunoestimulante	PowderJect (UK)	Fase I
MCC 478	Análogo de nucleosídeo	Eli Lilly	Fase I (Alemanha)
ValLdC (valtocitabina)	Análogo de nucleosídeo	Idenix	Fase I
ICN 2001	Análogo de nucleosídeo	ICN	Pré-clínica
Nucleosódeos L e D fluoro	Análogo de nucleosídeo	Pharmasset	Pré-clínica
Racivir	Análogo de nucleosídeo	Pharmasset	Pré-clínica
Robusta flavona	Análogo de nucleosídeo	Advanced Life Sciences	Pré-clínica

** Zadaxin: aprovação de fármaco órfã nos Estados Unidos.

Terapias pós-exposição e/ou pós-transplante de fígado

BayHepB	Imunoglobulina de VHB	Bayer (EUA)	Aprovada pela FDA
Anti-hepatite B	Imunoglobulina de VHB	Cangene (Canada)	NDA submetido em 2001
Nabi-HB	Imunoglobulina de VHB	Nabi	Aprovada pela FDA

Mark Nelson, MD. Destaques selecionados de "Dru Development for Antiretroviral Therapies" 2001 (Hep DART 2001) de 16 a 20 de dezembro de 2001, Maui, Hawaii; Destaques selecionados de "American Association for the Study of Liver Diseases 52nd Annual Meeting" (52a AASLD), de 9 a 13 de novembro de 2001. Dallas, Texas; "Report on Hepatitis B" a partir de

Digestive Disease Week 2001; de 20 a 23 de maio de 2001, Atlanta, Georgia.

O Pedido americano nº 20020098199, publicado a 25 de julho de 2002, divulga as sequências imunoestimulatórias para o tratamento de VHB e VHC.

A Patente americana nº 6,225,292, cedida aos membros do conselho da Universidade da Califórnia e Dynavax Technologies Corp., divulga os oligonucleotídeos que inibem a atividade imunoestimuladora de ISS-ODN (oligodesoxinucleotídeos de sequência imunoestimuladora) assim como os métodos para sua identificação e utilização. Os oligonucleotídeos divulgados são úteis no controlo da ação do adjuvante ISS-ODN terapeuticamente objetivado, bem como uma atividade indesejada da ISS-ODN exercida por vetores de expressão recombinantes, como os usados na terapia e imunização de gene. Os oligonucleotídeos também possuem uma ação anti-inflamatória, útil na redução da inflamação em resposta à infecção de um hospedeiro com micróbios que contenha ISS-ODN, no controlo de doença autoimune e no aumento das respostas imunes Th2 do hospedeiro a um抗ígenio. A patente também abrange os oligonucleotídeos conjugados farmaceuticamente úteis da invenção (incluindo pares conjugados como抗ígenos e anticorpos).

A Patente americana nº 6,589,940, cedida a Dynavax Technologies Corp., divulga as composições de oligonucleotídeos imunoestimuladores. Estes oligonucleotídeos compreendem uma sequência de octanucleotídeos imunoestimuladores. Estes oligonucleotídeos podem ser administrados em conjunto com um peptídeo ou um抗ígenio imunoestimulador. São também

divulgados os métodos para harmonizar uma resposta imune aquando da administração do oligonucleotídeo. Além disso, é fornecido um método de seleção *in vitro* para identificar oligonucleotídeos com ação imunoestimuladora.

A Patente americana nº 6,562,798, cedida a Dynavax Technologies Corp., divulga as composições de oligonucleotídeos imunomoduladores, incluindo a sequência de hexanucleotídeo imunoestimulador que inclui uma citosina modificada. Estes oligonucleotídeos podem ser administrados em conjunto com um peptídeo ou antigénio imunomodulador. São também divulgados os métodos para harmonizar uma resposta imune aquando da administração do oligonucleotídeo, que inclui uma sequência imunoestimuladora modificada.

A PCT WO 03/014316 A2, cedida a Dynavax Technologies Corp., divulga as composições e os métodos para imunomodulação de indivíduos. A imunomodulação é executada pela administração de complexos de polinucleotídeos/microportadores imunomoduladores (IMO/MC) compreendendo os oligonucleotídeos imunomodulatórios 3-6mer. Os complexos de IMO/MC podem ser co-valentemente ou não co-valentemente ligados. São também divulgadas as composições imunomoduladoras que incluem um IMO 3-6mer encapsulado num MC.

A PCT WO 03/000922 A2, cedida a Dynavax Technologies Corp., divulga os compostos imunomoduladores e os métodos para a imunomodulação de indivíduos utilizando os compostos imunomoduladores.

A PCT WO 02/052002 A2, cedida a Dynavax Technologies Corp., divulga os polinucleotídeos imunomoduladores e os métodos

para a imunomodulação de indivíduos utilizando os polinucleotídeos imunomoduladores.

A PCT WO 01/68144A2 e a PCT W00168143A2 cedidas a Dynavax Technologies Corp., divulgam cas omposições e métodos para a imunomodulação de indivíduos. A imunomodulação é feita através da administração de complexos de polinucleotídeos/microportadores imunomoduladores (IMP/MC). Os complexos de IMP/MC podem ser ligados de forma co-valente ou não co-valente, e apresentam um polinucleotídeo com pelo menos uma sequência ligada a um microportador ou nanoportador biodegradável.

A PCT WO 01/68117 A2, cedida a Dynavax Technologies Corp., divulga os métodos para o tratamento de infeções por vírus do papiloma. É administrado um polinucleotídeo com uma sequência imunoestimuladora a um indivíduo que foi exposto ou infectado por vírus do papiloma. O polinucleotídeo não é administrado com um antigénio do vírus do papiloma. A administração do polinucleotídeo resulta na melhoria dos sintomas da infeção por vírus do papiloma.

A PCT WO 01/68078 A2, cedida a Dynavax Technologies Corp., divulga os métodos para o tratamento de infeções por vírus da hepatite B (VHB) e vírus da hepatite C (VHC). Um polinucleotídeo com uma sequência imunoestimuladora é administrado a um indivíduo que foi exposto ou infectado por VHB e/ou VHC. O polinucleotídeo não é administrado com um antigénio do VHC ou do VHB. A administração do polinucleotídeo resulta na melhoria dos sintomas de infeção por VHB e/ou VHC.

A PCT WO 01/68077 A3, cedida a Dynavax Technologies Corp., divulga os métodos de supressão, prevenção e/ou o

tratamento de infecção por vírus. É administrado um polinucleotídeo com uma sequência imunoestimuladora (uma "ISS") a um indivíduo que está em risco de ser exposto, foi exposto ou está infectado com um vírus. O polinucleotídeo contendo ISS é administrado sem quaisquer抗igénios dos vírus. A administração do polinucleotídeo contendo ISS resulta na ocorrência e/ou agravamento reduzidos de um ou mais sintomas da infecção por vírus.

A PCT WO 01/12223 A2, cedida a Dynavax Technologies Corp., divulga os métodos de modulação de uma resposta imune a um segundo抗igénio que conferem a administração de um primeiro抗igénio e de um polinucleotídeo imunoestimulador. A modulação da resposta imune é geralmente manifestada como um estímulo de uma resposta Th1.

A PCT WO 00/21556 A1, cedida a Dynavax Technologies Corp., divulga as composições imunomoduladoras anti-virais compreendendo os polinucleotídeos imunoestimuladores e os抗igénios do VIH, tal como gp120. São também divulgados os métodos para modular uma resposta imune aquando da administração do oligonucleotídeo e composições de抗igénio.

A PCT WO 00/16804 A1, cedida a Dynavax Technologies Corp., divulga os métodos de tratamento de doenças associadas ao IgE e as composições para uso nesta. Os métodos são particularmente úteis no tratamento de alergias e de doenças relacionadas com a alergia. Os métodos geralmente compreendem a administração de um inibidor de IgE (tal como o anticorpo anti-IgE) e um抗igénio e/ou uma sequência de polinucleotídeo imunoestimulador (ISS). Estes métodos de combinação oferecem vantagens significativas, como permitir

uma terapia mais agressiva e reduzir os efeitos colaterais indesejados, tal como anafilaxia.

A PCT WO 99/62923 A2, cedido a Dynavax Technologies Corp., divulga os oligonucleotídeos que compreendem uma sequência de hexanucleotídeo imunoestimulador compreendendo uma citosina modificada. Estes oligonucleotídeos podem ser administrados em conjunto com um peptídeo ou抗ígenio imunomodulador. São também divulgados os métodos para modular uma resposta imune com a administração do oligonucleotídeo, que inclui uma sequência imunoestimuladora modificada.

A PCT WO 98/55495 A2, cedida a Dynavax Technologies Corp., divulga uma composição de oligonucleotídeo imunoestimulador que inclui uma sequência de octanucleotídeo imunoestimulador. Estes oligonucleotídeos podem ser administrados em conjunto com um peptídeo ou抗ígenio imunoestimulador. São também divulgados os métodos para modular uma resposta imune com a administração do oligonucleotídeo. Além disso, é também divulgado um método de seleção *in vitro* para identificar os oligonucleotídeos com uma atividade imunoestimuladora.

A PCT WO 03/015711 A2, cedido a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga uma classe de ácidos nucléicos imunoestimuladores com pelo menos dois domínios funcionais e estruturais definidos. Esta classe de ácidos nucléicos imunoestimuladores de motivo combinado, ativa uma resposta imune e é útil para tratar uma variedade de doenças imunes relacionadas como o cancro, as doenças infecciosas e as doenças alérgicas. Os ácidos nucléicos também estimulam a ativação de células mortíferas naturais e a produção de interferon tipo 1.

A Patente americana nº 6,406,705, cedida a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga os métodos e produtos que utilizam uma combinação sinérgica de oligonucleotídeos imunoestimuladores que possuem pelo menos um dinucleotídeo CpG não metilado (CpG ODN) e um adjuvante de ácido não nucléico. Tais combinações de adjuvantes podem ser usadas com um抗原 ou sozinhas. São também divulgados os métodos e produtos que utilizam os oligonucleotídeos imunoestimuladores que possuem pelo menos um dinucleotídeo CpG não metilado (CpG ODN) para indução de imunidade celular em crianças.

A Patente americana nº 6,339,068, cedida a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga os vetores da vacina de ADN que podem ser melhorados através da remoção do motivo CpG-N e a adição opcional do motivo CpG-S. Além disso, para níveis de expressão altos e de longa duração, o vetor otimizado deve incluir um promotor/melhorador que não seja regulado pelas citoquinas induzidas pelos motivos CpG imunoestimuladores. São aqui fornecidos os vetores e os métodos de utilização para a imunoestimulação. A invenção também fornece os vetores melhorados de terapia de genes através da determinação dos motivos CpG-N e CpG-S presentes na construção, a remoção de motivos CpG (CpG-S) estimuladores e/ou inserção de motivos CpG (CpG-N) neutralizantes, produzindo assim uma construção de ácido nucléico que fornece uma expressão melhorada do polipeptídeo terapêutico.

A Patente americana nº 6,239,116, cedida a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga sequências de ácido nucléico com dinucleotídeos CpG não metilados que modulam uma resposta imune, incluindo a estimulação de um padrão de ativação imune Th1, a produção de citoquina, atividade de

NK lítico, e a proliferação de célula B. As sequências são também úteis como adjuvantes sintéticos.

A Patente americana nº 6,207,646, cedida a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga os ácidos nucléicos contendo dinucleotídeos CpG não metilados e as utilidades terapêuticas com base na sua capacidade para estimular uma resposta imune e para redirecionar uma resposta Th2 para uma resposta Th1 num indivíduo.

A Patente americana nº 6,194,388, cedida a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga oligonucleotídeos com dinucleotídeos CpG não metilados e as utilidades terapêuticas com base na sua capacidade para estimular uma resposta imune num indivíduo. São também divulgadas as terapias para as doenças associadas à ação do sistema imune num indivíduo, que são despoletadas pelos dinucleotídeos CpG não metilados, compreendendo a administração ao indivíduo de oligonucleotídeos que não contêm sequências CpG não metiladas (isto é, sequências CpG metiladas ou nenhuma sequência CpG) para superar os ácidos nucléicos CpG não metilados para a ligação. São também divulgados dinucleotídeos contendo CpG metilado para uso em terapias antisenso ou como marcadores de hibridização *in vivo*, e oligonucleotídeos imunoinibidores para uso terapêutico antiviral.

A Publicação americana nº 20030091599 A1, cedida a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga os métodos e produtos que utilizam uma combinação sinérgica de oligonucleotídeos imunoestimuladores possuindo pelo menos um dinucleotídeo CpG não metilado (CpG ODN) e um adjuvante de ácido não nucléico. Tais combinações de adjuvantes podem ser usadas com um antigénio ou sozinhas. A Publicação também se refere

a métodos e produtos que utilizam os oligonucleotídeos imunoestimuladores com pelo menos um dinucleotídeo CpG não metilado (CpG ODN), para indução de imunidade celular em crianças.

A PCT WO 03/031573 A2, cedida a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga as composições e os métodos fornecidos para identificar, caracterizar e otimizar os compostos imunoestimuladores, seus agonistas e antagonistas, atuando através de TLR3.

A PCT WO 03/012061 A2, cedida a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga os métodos e composições relativos a uma base de dados da expressão da célula dentrítica.

A PCT WO 02/069369 A2, cedida a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga composições imunoestimuladoras descritas como ácidos nucléicos tipo CpG, incluindo ácidos nucléicos que possuem características de ácido nucléico tipo CpG, ao contrário de certas substituições de C, G, ou C e G do dinucleotídeo CpG. As substituições podem incluir, entre outras, a troca de C metilado por C, inosina por G, e ZpY ou CpG, onde Z é citosina ou espaçador "d" e Y é inosina, 2-aminopurina, nebularina ou espaçador "d". São também debatidos os métodos para induzir uma resposta imune num indivíduo, onde se utilizam os ácidos nucléicos tipo CpG. Os métodos são úteis no tratamento de um indivíduo que possui ou que está em risco de desenvolver uma doença infecciosa, alergia, asma, cancro, anemia, trombocitopenia, ou neutropenia.

A PCT WO 01/95935 A1, cedida a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga os métodos e produtos para induzir uma resposta imune utilizando os ácidos nucléicos

imunoestimuladores. Particularmente, os ácidos nucléicos imunoestimuladores induzem preferencialmente uma resposta imune Th2. A invenção é útil para tratar e prevenir doenças associadas a uma resposta imune de Th1 ou para criar um ambiente Th2 para tratar doenças que são sensíveis às respostas imunes Th2.

A PCT WO 01/22990 A2, cedida a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga os métodos e as composições para alargar a utilidade clínica do IFN-'alfa' ao tratamento de uma variedade de doenças virais e proliferativas. São também divulgados métodos que aumentam a eficácia do tratamento com IFN-'alfa' e reduzem os efeitos colaterais relacionados ao tratamento com IFN-'alfa'. Além disso, os métodos são fornecidos para comportar a sobrevivência e para ativação de células de produção de interferon natural (IPCs) *in vitro* sem IL-3 ou GM-CSF exógenos.

A PCT WO 01/22972 A2, cedida a Coley Pharmaceutical Group, Inc., divulga as composições de ácido nucléico imunoestimulador e os seus métodos de utilização. Os ácidos nucléicos ricos em T contêm sequências de poli-T e/ou possuem mais de 25% de resíduos de nucleotídeo T. Os ácidos nucléicos TG possuem dinucleotídeos TG. Os ácidos nucléicos ricos em possuem pelo menos uma região de poli-C e/ou mais de 50% de nucleotídeos C. Estes ácidos nucléicos imunoestimuladores funcionam de maneira similar aos ácidos nucléicos que contêm os motivos de CpG. A invenção também abrange os ácidos nucléicos tipo CpG como preferenciais.

À luz do fato de o vírus da hepatite B ter alcançado níveis epidémicos por todo o mundo, e de possuir efeitos severos e freqüentemente trágicos no paciente infectado, há ainda uma forte necessidade de fornecer novos agentes farmacêuticos

efetivos para tratar seres humanos com o vírus resistente ao fármaco, isto é, o VHB resistente à lamivudina.

Portanto, é um objetivo da presente invenção fornecer compostos, composições e o seu uso para o tratamento e/ou profilaxia de uma infecção por VHB, que apresente uma mutação no codon 552 resistente à lamivudina num hospedeiro, nomeadamente em pacientes humanos.

É um outro objetivo da presente invenção fornecer compostos, composições e métodos para a prevenção de uma mutação resistente de VHB, o YMDD VHB (M552V), infecção num hospedeiro simples, como os pacientes humanos.

É ainda um outro objetivo da presente invenção fornecer compostos, composições e métodos para o tratamento de pacientes infetados com uma forma de VHB resistente ao fármaco.

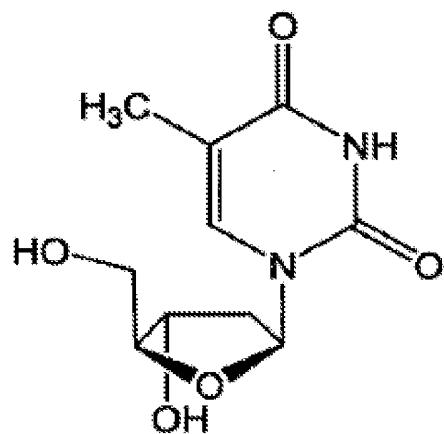
É ainda um outro objetivo da presente invenção fornecer uma combinação efetiva de composições de terapia e/ou supressão, ou prevenção da expressão de estirpes de VHB resistentes num paciente.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Foi descoberto que os β -L-2'-desoxinucleosídeos, e particularmente a β -L-2'-desoxicitidina e a β -L-2'-desoxitimidina são ativas contra o vírus da hepatite B resistente ao fármaco com mutações no códon 552 (M a V), isto é, o códon 204 (M a V) da região da transcriptase reversa do vírus. Com base nesta descoberta, é fornecido um método para tratar VHB resistente à lamivudina (M552V) num hospedeiro, como um mamífero, e particularmente num ser humano, o qual inclui administrar um β -L-2'-

desoxinucleosídeo ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis. Além disso, é fornecido um método para impedir a ocorrência de mutação de VHB resistente à lamivudina (M552V) num hospedeiro simples, tal como um mamífero, e em particularmente num ser humano, o qual inclui administrar um β -L-2'-desoxinucleosídeo ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis. É fornecido um método para impedir e/ou suprimir o surgimento de mutação dupla de VHB (L528M/M552V) num hospedeiro, como um mamífero, e em particularmente num humano, o qual inclui administrar um β -L-2'-desoxinucleosídeo ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis.

Numa forma de realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica para uso no tratamento de um hospedeiro infetado com o vírus da hepatite B resistente ao fármaco com mutações no códon 552 com metionina a valina, na polimerase do ADN, compreendendo a utilização de β -L-2'-desoxinucleosídeo da fórmula:



ou seu sal farmaceuticamente aceitáveis deste, ou um ester 3'ou 5'-aminoácido, incluindo o L-vanil ou um portador ou diluente farmacêuticamente aceitável.

Nas formas de realização da presente invenção, é referida uma estirpe do vírus da hepatite B resistente ao fármaco com mutações no códon 552 com metionina a valina, na polimerase do ADN, é uma forma do vírus da hepatite B resistente à lamivudina que apresenta mutações no códon 552 com metionina a valina, na polimerase do ADN.

Nas formas de realização da presente invenção, a composição farmaceutica comprehende uma série efetiva de compostos anti-virus da hepatite B (anti-VHB), de entre os quais são selecionados outros compostos anti-VHB de entre um grupo de 3TC (2',3'-didesoxi-3'-triacitidina), FTC (β-2-hidroximetilo-5-5-fluorocitocina-1-il)-1,3-oxatiolano), L-FMAU (2'-fluoro-5-metil-βL-arabinofuranoliloridina), DAPD ((-)-β-D-2,6-diaminopurina dioxolano, DXG((-)-beta-D-Dioxolano guanina), famciclovir, penciclovir, BMS-200475 (2-amino-1,9-dihidro-9-[(1S,3R,4S)-4-hidroxi-3-(hidroximetilo-2-metilenociclopentilo]-6H-purina-6-um, monohidrato), bis pom PMEA (adefovir, dipivoxil ou {2-6-amino-9H-purina-9-ilo)etoxi}acido metilofosfónico), lobucavir, ganciclovir, tenofovir, Lfd4C (β-L-5-fluor-2',3'-desidro-2',3'-didesoxicitidina, foscarnet (trisodio fosfonoformato), isoprinosina, levamizole, N-acetilcisteína (NAC), interferon, interferon peguilado, ISS ("Sequencia Imunoestimuladora"), ribavirina, PC1323 (ácido dissulfónico de batocuproína) e um ácido poliadenocíclico poliuridílico.

Numa forma de realização preferencial, pelo menos um dos agentes anti-VHB é o interferon. Numa forma de realização ainda mais preferencial o interferon é selecionado a partir do grupo, onde se inclui: interferon alfa, interferon alfa-peguilado, interferon alfa-2a, interferon alfa-2b, interferon alfa-2a peguilado, interferon alfa-2b peguilado, ROFERON® -A (interferon alfa-2a), PEGASYS® (interferon

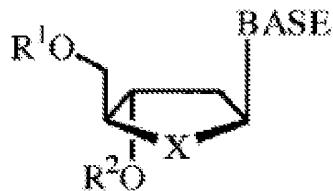
alfa-2a peguilado), INTRON®A (Interferon alfa-2b), PEG-INTRON® (Interferon alfa-2b peguilado), interferon beta, interferon gama, interferon tau, interferon ómega, interferon de união, INFERGEN (interferon alfacon-1), OMNIFERON (interferon natural), REBIF (interferon bet-la), ómega interferon, interferon alfa oral, interferon gama-1b, SuperFeron (IFN-alfa multi-subtipo humano natural), e HUFERON (IFN-beta humano).

A presente invenção proporciona o uso de qualquer um dos compostos farmacêuticos acima descritos, no fabrico de um medicamento para o tratamento de um hospedeiro infetado com uma forma do VHB resistente ao fármaco com mutações no códon 552 com metionina a valina, na polimerase do ADN.

A presente invenção proporciona o uso de qualquer um dos compostos farmacêuticos acima descritos, no fabrico de um medicamento para o tratamento de um hospedeiro infetado com uma forma do VHB resistente ao fármaco com mutações no códon 552 com metionina a valina, na polimerase do ADN e a uma forma do vírus da hepatite B resistente à lamivudina que apresenta mutações no códon 552 com metionina a valina, na polimerase do ADN.

Numa forma de realização, o hospedeiro com necessidade de tratamento é um mamífero, preferencialmente um ser humano.

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona o uso do β -L2'-desoxinucleosídeo, com a fórmula (I):



(I)

Ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, ester ou pró-farmaco, onde:

R^1 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alquilsulfonilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, arilosulfonilo, aralquilosulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di, ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

R^2 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di, ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

X é O, S, SO_2 ou CH_2 ; e

BASE é uma base purina ou pirimidina que pode ser opcionalmente substituída;

e todos os tautómeros e estereoisómeros deste.

Numa forma de realização preferencial, X é O.

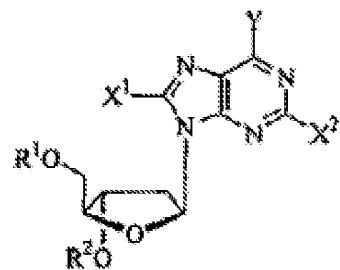
Numa forma de realização, o resíduo de aminoácido consta da fórmula $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, onde:

R⁸ é uma cadeia lateral de um aminoácido e onde, como em prolina, R⁸ pode opcionalmente ser ligado a R¹⁰ para formar uma estrutura em anel; ou alternativamente, R⁸ é uma metade de alquilo, arilo, heteroarilo, heterocíclica;

R⁹ é hidrogénio, alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo; e

R¹⁰ e R¹¹ são independentemente hidrogénio, acilo (incluindo um derivado de acilo ligado a R⁸) ou alquilo (incluindo mas não limitado a metilo, etilo, propilo, e ciclopropilo); e todos os tautómeros e estereoisómeros deste.

Numa outra forma de realização da presente invenção, o β -L-2'-desoxinucleosídeo é uma β -L-2'-desoxipurina da fórmula:



ou sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis deste, onde:

R¹ é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

R² é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

Y é OR³, NR³R⁴ ou SR³; e

X¹ e X² são selecionados independentemente a partir do grupo consistindo de H, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, halogénio, OR⁵, NR⁵R⁶ ou SR⁵; e

R³, R⁴, R⁵ e R⁶ são independentemente H, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquíleno (em particular, dimetilaminometíleno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono-, di- ou trifosfato, ou um derivado de fosfato; e todos os tautómeros e estereoisómeros deste.

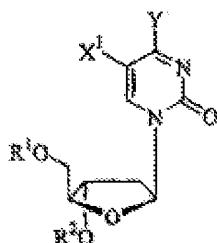
Numa forma de realização, o resíduo de aminoácido consta da fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), onde:

R⁸ é uma cadeia lateral de um aminoácido e onde, como em prolina, R⁸ pode opcionalmente ser ligado a R¹⁰ para formar uma estrutura em anel; ou alternativamente, R⁸ é uma metade de alquilo, arilo, heteroarilo, heterocíclica;

R⁹ é hidrogénio, alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo; e

R¹⁰ e R¹¹ são independentemente hidrogénio, acilo (incluindo um derivado de acilo ligado a R⁸) ou alquilo (incluindo mas não limitado a metilo, etilo, propilo, e ciclopropilo); e todos os tautómeros e estereoisómeros deste.

Numa outra forma de realização da presente invenção, a β -L-2'-desoxinucleosídeo é uma β -L-2'-desoxipirimidina da fórmula:



ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmacêuticamente aceitáveis deste, onde:

R^1 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

R^2 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

Y é OR^3 , NR^3R^4 ou SR^3 ;

X^1 é selecionado a partir do grupo consistindo de H, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, halogénio, OR^5 , NR^5R^6 ou SR^5 , e

R^3 , R^4 , R^5 e R^6 são independentemente hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquíleno (particularmente,

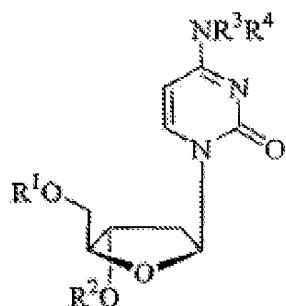
dimetilaminometileno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, resíduo de aminoácido, mono-, di- ou trifosfato, ou um derivado de fosfato; e todos os tautómeros e estereoisómeros deste.

Numa forma de realização, o resíduo de aminoácido consta da fórmula $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, onde:

R^8 é uma cadeia lateral de um aminoácido e onde, como em prolina, R^8 pode opcionalmente ser ligado a R^{10} para formar uma estrutura em anel; ou alternativamente, R^8 é uma metade de alquilo, arilo, heteroarilo, heterocíclica; R^9 é hidrogénio, alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo; e

R^{10} e R^{11} são independentemente hidrogénio, acilo (incluindo um derivado de acilo ligado a R^8) ou alquilo (incluindo mas não limitado a metilo, etilo, propilo, e ciclopropilo); e todos os tautómeros e estereoisómeros deste.

Numa forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxinucleosídeo é a β -L-2'-desoxicitidina da fórmula:



ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis deste, onde:

R^1 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

R^2 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato; e

R^3 e R^4 são independentemente hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquíleno (particularmente, dimetilaminometíleno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato.

Numa forma de realização preferencial, R^1 e/ou R^2 é H.

Numa forma de realização, o resíduo de aminoácido é da fórmula $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, onde:

R^8 é uma cadeia lateral de um aminoácido e onde, como em prolina, R^8 pode opcionalmente ser ligado a R^{10} para formar uma estrutura em anel; ou alternativamente, R^8 é uma metade de alquilo, arilo, heteroarilo, heterocíclica;

R^9 é hidrogénio, alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo; e

R^{10} e R^{11} são independentemente hidrogénio, acilo (incluindo um derivado de acilo ligado a R^8) ou alquilo (incluindo mas não limitado a metilo, etilo, propilo, e ciclopropilo).

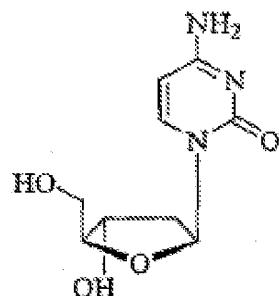
Numa outra forma de realização preferencial, R^1 e/ou R^2 é um resíduo de aminoácido, em particular, o L-valinil.

Numa forma de realização, R^3 é hidrogénio, e R^4 é dimetilaminometileno.

Numa outra forma de realização, R^3 é hidrogénio, e R^4 é acetilo.

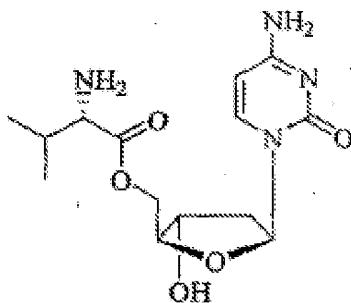
Numa outra forma de realização, R^3 é hidrogénio, e R^4 é L-valinil.

Numa forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxicitidina consta da fórmula:



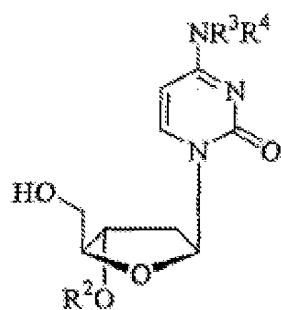
ou um sal, éster ou pró-fármaco farmacêuticamente aceitáveis deste.

Numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxicitidina consta da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

Numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxicitidina consta da fórmula:

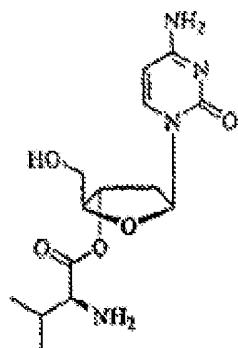


ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis deste, onde:

R^2 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, resíduo de aminoácido, mono-, di- ou trifosfato, ou um pró-fármaco de fosfato; e

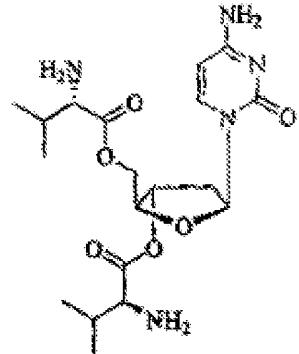
R^3 e R^4 são independentemente H, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, dialquilaminoalquíleno, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um pró-fármaco de fosfato.

Ainda noutra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxicitidina consta da fórmula:



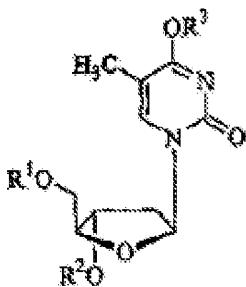
ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

Ainda numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxicitidina consta da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

Numa outra forma de realização, o β -L-2'-desoxinucleosídeo é a β -L-2'-desoxitimidina da fórmula:



ou seu sal, éster ou um pró-fármaco farmaceuticamente aceitável deste, onde:

R^1 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato; e

R^2 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato; e

R^3 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica (especialmente ciclopropilo), acilo, acetilo, butirilo, dialquilaminoalquíleno (particularmente, dimetilaminometíleno), CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato; e todos os tautómeros e estereoisómeros deste.

Numa forma de realização preferencial, R^1 e/ou R^2 é H.

Numa forma de realização, o resíduo de aminoácido consta da fórmula $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, onde:

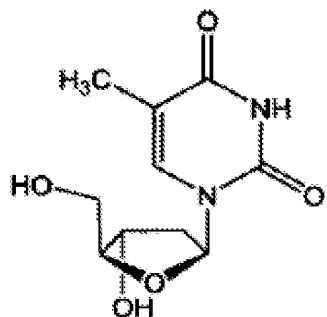
R^8 é uma cadeia lateral de um aminoácido e onde, como em prolina, R^8 pode opcionalmente ser ligado a R^{10} para formar uma estrutura em anel; ou alternativamente, R^8 é uma metade de alquilo, arilo, heteroarilo, heterocíclica;

R^9 é hidrogénio, alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo; e

R^{10} e R^{11} são independentemente hidrogénio, acilo (incluindo um derivado de acilo ligado a R^8) ou alquilo (incluindo mas não limitado a metilo, etilo, propilo, e ciclopropilo); e todos os tautómeros e estereoisómeros deste.

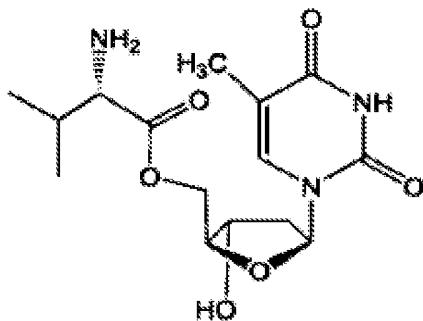
Numa outra forma de realização preferencial, R^1 e/ou R^2 é um resíduo de aminoácido, em particular o L-valinil.

Numa forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxitimidina consta da fórmula:



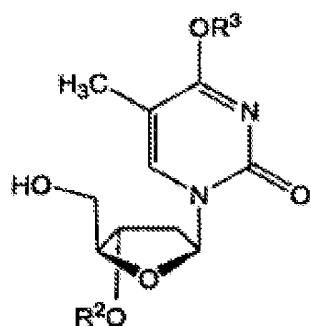
ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis deste.

Numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxitimidina consta da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

Numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxitimidina consta da fórmula:



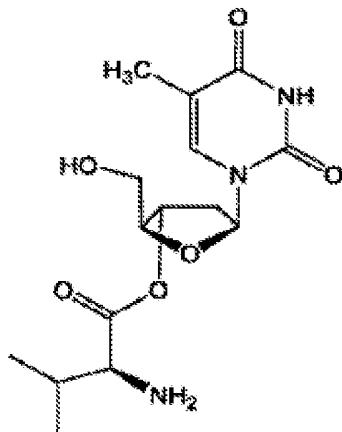
ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis deste, onde:

R^2 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-alquilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilosulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou uma pró-fármaco de fosfato; e

R^3 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-alquilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo,

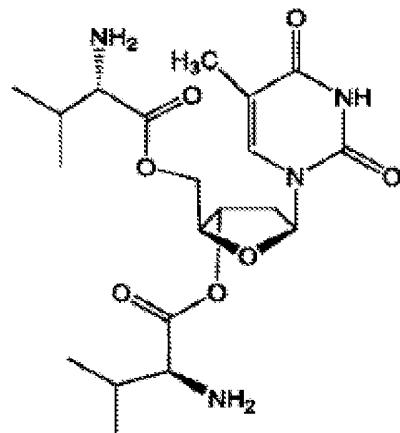
aralquilosulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um pró-fármaco de fosfato.

Ainda numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxitimidina consta da fórmula:



ou um sal farmacêuticamente aceitável.

Ainda numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxitimidina que consta da fórmula



ou um sal farmacêuticamente aceitável.

Numa outra forma de realização preferencial, o β -L-2'-desoxinucleosídeo é pelo menos 90% livre de seus β -D-enanciómeros opostos.

Numa outra forma de realização, a invenção inclui um método para o tratamento em seres humanos infetados com VHB, que inclui administrar uma quantidade de tratamento de VHB de um sal, éster ou pró-fármaco dos derivados de 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleosídeo. Um pró-fármaco, conforme aqui usado, refere-se a um composto que é convertido no nucleosídeo e administrado *in vivo*. Os exemplos, não limitativos, incluem sais farmaceuticamente aceitáveis (também denominados "saís fisiologicamente aceitáveis"), e a 5' e N⁴ (citolina) ou N⁶ (adenosina) aciladas (incluindo um resíduo de aminoácido como o L-valinil) ou derivados alquilados do composto ativo, ou o 5'-fosfolipídeo ou 5'-éter lipídeos do composto ativo.

Numa outra forma de realização, o 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleosídeo é administrado alternado ou combinado com um ou mais outros 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleosídeos ou um ou mais outros compostos que apresentam ação contra o vírus da hepatite B.

A atividade viral anti-hepatite B dos β -L-2'-desoxinucleosídeos aqui fornecidos, e particularmente β -L-2'-dC ou β -L-2'-dT, ou os sais, ésteres, fosfatos ou pró-fármacos farmaceuticamente aceitáveis destes compostos, pode ser melhorada pela administração de dois ou mais destes nucleosídeos em combinação ou em alternância. Alternativamente, por exemplo, um ou mais dos β -L-2'-desoxinucleosídeos aqui fornecidos, em particular o β -L-2'-dC ou o β -L-2'-dT, podem ser administrados em combinação e/ou alternado com um ou mais outros compostos que apresentam ação contra o vírus da hepatite B. Os exemplos não limitativos incluem FTC, L-FMAU, DAPD, DXG, fanciclovir, penciclovir, BMS-200475, bis pom PMEA (adefovir, dipivoxil), lobucavir, ganciclovir, tenofovir,

Lfd4C, interferon, interferon peguilado, ou ribavirina. Noutra forma de realização, os β -L-2'-desoxinucleosídeos aqui fornecidos, em particular o β -L-2'-dC ou o β -L-2'-dT, podem ser administrados combinados e/ou alternados com 3TC.

Numa forma de realização, o 2'-desoxi- β -L-eritropentofuranonucleosídeo é administrado alternado ou combinado com um ou mais imunomoduladores, como uma citoquina TH1, em particular um interferon, preferencialmente um interferon gama para o tratamento de infeção por VHB resistente ou do tipo feroz.

Numa forma de realização da invenção, o imunomodulador é dado na forma de uma proteína. Numa forma de realização alternativa, o imunomodulador é dado na forma de um gene ou fragmento de gene que atesta a proteína imunomoduladora. Numa forma de realização em particular da presente invenção, o imunomodulador é dado na forma de um gene ou de um fragmento de gene, e a entrega é mediada por um adenovírus. Numa forma de realização em particular da presente invenção, o imunomodulador é interferon (como interferon gama) e é dado na forma de um gene ou de um fragmento de gene, mediada por um adenovírus.

O β -L-2'-desoxinucleosídeo administrado combinado e/ou alterando com um interferon, como o interferon alfa ou o interferon gama proporciona uma terapia superior em seres humanos contra o vírus da hepatite B. Numa forma de realização, o interferon é administrado na forma de uma proteína, normalmente de forma direta na veia ou na artéria. Numa forma de realização alternativa da invenção, o interferon é administrado na forma de um ácido nucléico, de um gene ou de fragmento de gene, que é expresso pelo hospedeiro. O ácido nucléico do interferon pode ser dado ao

hospedeiro "nu", isto é, sem um vetor, ou em alternativa, pode ser dado através de um vetor incluído, mas não se limitando a um vetor viral, como um vetor de adenovírus.

Numa forma de realização, o interferon é o interferon alfa, ou opcionalmente, o interferon alfa peguilado. Numa outra forma de realização, o interferon alfa é selecionado a partir do grupo incluindo, mas não limitado a: interferon alfa-2a, interferon alfa-2b, interferon alfa-2a peguilado, interferon alfa-2b peguilado, ROFERON®-A (interferon alfa-2a, Roche), PEGASYS® (interferon alfa-2a peguilado, Roche), INTRONA®A (interferon alfa-2b, Schering Corporation), PEG-INTRON® (interferon alfa-2b peguilado, Schering Corporation), interferon de consenso, INFERGEN (interferon alfacon-1) por InterMune, OMNIFERON (interferon natural) por Viragen, ALBUFERON por Human Genome Sciences, interferon alfa oral por Amarillo Biosciences e SuperFeron (IFN-alfa multi-subtipo humano natural, Genetrol, Inc.). Numa outra forma de realização, o interferon beta, interferon ómega ou interferon tau. Numa outra forma de realização, o interferon é selecionado a partir do grupo incluindo, mas não limitado a: REBIF (interferon beta-1a) por Ares-Serono, interferon ómega por BioMedicine, interferon gama-1b por InterMune, e HuFeron (IFN-beta humano, Genetrol, Inc.).

Em geral, durante a terapia alternada é administrada em série uma dosagem efetiva de cada agente, enquanto na terapia combinada, as dosagens efetivas de dois ou mais agentes são administradas em conjunto. As dosagens irão depender da absorção, inativação, biodistribuição, metabolismo e taxas de excreção do fármaco, assim como de outros fatores conhecidos dos habilitados na área. Deve notar-se que os valores de dosagem irão também variar com a

severidade da condição a ser aliviada. Deve-se também compreender que para qualquer indivíduo em particular, devem ser ajustados os regimes de dosagem e horários específicos com o tempo, de acordo com a necessidade individual e o juízo profissional da pessoa que está a administrar ou a supervisionar a administração das composições. Os exemplos de faixas de dosagens adequadas podem ser encontrados na literatura científica e em Physicians Desk Reference. Muitos dos exemplos de faixas de dosagens adequadas para os outros compostos aqui descritos, também podem ser encontrados na literatura pública ou podem ser identificados através de procedimentos conhecidos. Estas faixas de dosagens podem ser modificadas conforme o desejado para se alcançar o resultado pretendido.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A **Figura 1a** ilustra um processo geral para obtenção de β -L-eritropentafurano-nucleosídeos (β -L-dN) usando-se L-ribose ou L-xilose como o material inicial. A Figura 1b e 1c são exemplos ilustrativos não limitativos, de acordo com a presente invenção, da síntese de ésteres 3'- e 5'-valinil de 2'-desoxi- β -L-citidina (B-L-dC) a partir de 2'-desoxi- β -L-citidina, respectivamente.

A **Figura 2** é um exemplo ilustrativo não limitativo, de acordo com a presente invenção, da síntese de N4-acetil-2'-desoxi- β -L-citidina a partir de 2'-desoxi- β -L-citidina.

A **Figura 3** é um exemplo ilustrativo não limitativo, de acordo com a presente invenção, da síntese de N⁴-[(dimetilamino)métileno]-2'-desoxi- β -L-citidina a partir de 2'-desoxi- β -L-citidina.

A **Figura 4** é um exemplo ilustrativo não limitativo, de acordo com a presente invenção, da síntese 3',5'-di-O-

acetil-2'-desoxi- β -L-citidina a partir de 2'-desoxi- β -L-citidina.

A **Figura 5** é um exemplo ilustrativo não limitativo, de acordo com a presente invenção, da síntese do éster 3',5'-di-O-valinil de 2'-desoxi- β -L-citidina a partir de 2'-desoxi- β -L-citidina.

A **Figura 6** é um exemplo ilustrativo não limitativo, de acordo com a presente invenção, da síntese de éster N⁴-(Boc-valinil) de 2'-desoxi- β -L-citidina a partir de 2'-desoxi- β -L-citidina.

A **Figura 7** é um exemplo ilustrativo não limitativo, de acordo com a presente invenção, da síntese de 3', 5', N⁴-tri-(L-valinil)-2'-desoxi- β -L-citidina a partir de 3', 5', N⁴-tri-(Boc-L-valinil)-2'-desoxi- β -L-citidina.

A **Figura 8** é um gráfico de linha que descreve uma área de calibragem padrão, útil para a determinação da solubilidade dos vários nucleosídeos. A **Figura 8a** é a curva de calibragem, determinada para a β -D-desoxiribocitosina. A Figura 8b é a curva de calibragem determinada para o éster 3',5'-divalinil de β -L-desoxiribocitosina.

A **Figura 9a** é um exemplo não limitativo de um perfil de HPLC usado para avaliar a estabilidade do éster 3',5'-divalinil de β -L-desoxiribocitosina a um pH de 7,42. O perfil de HPLC indica a presença do éster 3',5'-divalinil de β -L-desoxiribocitosina em conjunto com 3 metabólitos ativos, o éster 3'-valinil de β -L-desoxiribocitosina, o éster 5'-valinil de β -L-desoxiribocitosina e L-dC. A Figura 9b é um gráfico de linhas que descreve as concentrações relativas do éster 3',5'-divalinil de β -L-desoxiribocitosina e dos seus metabólitos por um período de tempo.

As **Figuras 10a e 11a** são exemplos não limitativos de perfis de HPLC usados para avaliar a estabilidade do éster 3',5'-divalinil de β -L-desoxiribocitosina a um pH de 7,20 e 4,51,

respectivamente. Nestes pH's, o perfil de HPLC indica a presença do éster 3',5'-divalinil de β -L-desoxiribocitosina junto com 3 metabólitos ativos, o éster 3'-valinil de β -L-desoxiribocitosina, o éster 5'-valinil de β -L-desoxiribocitosina e L-dC. As **Figuras 10b e 11b** são gráficos de linhas que descrevem as concentrações relativas do éster 3',5'-divalinil de β -L-desoxiribocitosina e dos seus metabólitos durante um período de tempo.

A **Figura 12** é um exemplo não limitativo de um perfil de HPLC usado para avaliar a estabilidade do éster 3',5'-divalinil de β -L-desoxiribocitosina a um pH de 1,23. Neste pH, o perfil de HPLC apenas indica a presença do éster 3',5'-divalinil de β -L-desoxiribocitosina, sem qualquer decomposição de qualquer um de seus 3 metabólitos ativos.

A **Figura 13** é um gráfico de linha descrevendo o metabolismo *in vitro* do éster 3',5'-divalinil de β -L-desoxiribocitosina em plasma humano.

A **Figura 14** é um gráfico de linha que descreve o metabolismo intracelular de β -L-desoxiribocitosina (L-dC) em células HepG2.

A **Figura 15** é um gráfico de linha que descreve o aglomerado intracelular de L-dC em hepatócitos humanos primários.

A **Figura 16** é um gráfico que ilustra o metabolismo de L-dA, L-dC e L-dT em células humanas HepG2 em termos de aglomerado e decomposição. As células foram incubadas com 10 μ M de composto.

DESCRICAÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Foi descoberto que β -L-2'-desoxinucleosídeos, e particularmente a β -L-2'-desoxicitidina e β -L-2'-desoxitimidina atuam contra o vírus da hepatite B resistente ao fármaco com mutação(ões), em particular, a mutação está no códon 552 (M a V), isto é, o códon 204 (M a

V) da região da transcriptase reversa do vírus. Com base nesta descoberta, é fornecido um método para tratar o VHB resistente à lamivudina (M552V) num hospedeiro, como um mamífero, em particular num ser humano, o qual inclui administrar um β -L-2'-desoxinucleosídeo ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis. Além disso, é fornecido um método para impedir a ocorrência da mutação do VHB resistente à lamivudina (M552V) num hospedeiro simples, como um mamífero, em particular num ser humano, o qual inclui administrar um β -L-2'-desoxinucleosídeo ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável. É também fornecido um método para impedir e/ou suprimir o aparecimento da mutação dupla de VHB (L528M/M552V) num hospedeiro, como um mamífero, em particular num ser humano, o qual inclui administrar um β -L-2'-desoxinucleosídeo ou um seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis.

Numa outra forma de realização, o 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleosídeo é administrado alternado ou combinado com um ou mais 2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleosídeos ou um ou mais outros compostos que apresentem ação contra o vírus da hepatite B. Em geral, durante a terapia alternada, é administrada uma dosagem efetiva de cada agente em série, enquanto na terapia combinada uma dosagem efetiva de dois ou mais agentes é administrada em conjunto. As dosagens irão depender das taxas de absorção, inativação e excreção do fármaco assim de como outros fatores conhecidos dos especialistas na área. Deve notar-se que os valores de dosagem irão também variar com a severidade da condição a ser tratada. Deve ser também compreendido que para qualquer indivíduo em particular, os regimes de dosagem específicos e os horários devem ser ajustados com o tempo, de acordo com a necessidade individual e o juízo profissional da pessoa que

está a administrar ou a supervisionar a administração das composições.

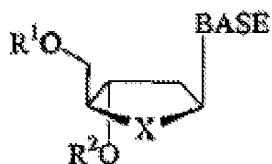
Numa outra forma de realização, a invenção inclui um método para o tratamento de seres humanos infetados com o VHB, que inclui administrar uma quantidade de tratamento de VHB de um pró-fármaco dos derivados de 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleosídeo. Um pró-fármaco, conforme aqui usado, refere-se a um composto que é convertido num nucleosídeo ou num metabólito deste, na administração *in vivo*. Os exemplos não limitativos incluem sais farmaceuticamente aceitáveis (também chamados "saís fisiologicamente aceitáveis"), e a 5' e/ou N⁴ (citidina) e/ou N⁶ (adenosina) aciladas (incluindo um resíduo de aminoácido como o L-valinil) ou derivados alquilados do composto ativo, ou o 5'-fosfolipídeo ou 5'-éter lipídeos do composto ativo.

Numa forma de realização preferencial da presente invenção o método para o tratamento de infecções por VHB em seres humanos ou outros animais hospedeiros, que inclui a administração de uma quantidade efetiva de um ou mais derivados de 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleosídeo selecionado a partir do grupo consistindo de β-L-2'-desoxiadenosina, β-L-2'-desoxicitidina, β-L-2'-desoxiuridina, β-L-2'-guanosina, β-L-2'-desoxiinosina, e β-L-2'-desoxitimidina, ou um pró-fármaco farmaceuticamente aceitável destes, incluindo um fosfato, derivado 5' e/ou N⁶ alquilado ou acilado, ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, opcionalmente num portador farmaceuticamente aceitável. Os compostos desta invenção ou possuem ação anti-VHB, ou são metabolizados a um composto ou compostos que apresentem ação anti-VHB. Numa forma de realização preferencial, o 2'-desoxi-β-L-eritro-pentofuranonucleosídeo é administrado substancialmente na

forma de um único isómero, isto é, pelo menos aproximadamente 95% na estereoconfiguração designada.

I. Compostos definidos pela presente Invenção

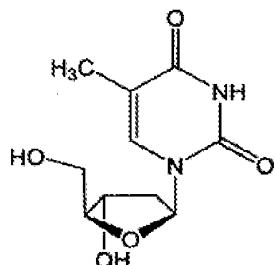
Numa forma de realização, a invenção fornece o uso de β -L-2'-desoxinucleosídeo da fórmula (I):



(I)

ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis deste.

Numa forma de realização, a invenção fornece o uso de β -L-2'-desoxinucleosídeo da fórmula:



ou seu sal farmacêuticamente aceitável, ou um ester 3' ou 5'-aminoácido, incluindo o L-vanil ou um seu ester.

R^1 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-alquilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilosulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

R^2 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

X é O, S, SO_2 ou CH_2 ; e

BASE é uma base de purina ou pirimidina que pode ser opcionalmente substituída; e todas as formas tautoméricas e estereoisoméricas deste.

Numa forma de realização preferencial, X é O.

Numa forma de realização, o resíduo de aminoácido consta da fórmula $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, onde:

R^8 é uma cadeia lateral de um aminoácido e onde, como em prolina, R^8 pode opcionalmente ser fixado a R^{10} para formar uma estrutura em anel; ou alternativamente, R^8 é uma metade de alquilo, arilo, heteroarilo, heterocíclica;

R^9 é hidrogénio, alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo; e

R^{10} e R^{11} são independentemente hidrogénio, acilo (incluindo um derivado de acilo ligado a R^8) ou alquilo (incluindo, mas não limitado a, metilo, etilo, propilo, e ciclopropilo);

e todas as formas tautoméricas e estereoisoméricas deste.

Numa primeira subforma de realização, R^1 e/ou R^2 é $C(O)-$ alquilo (incluindo o alquilo inferior) ou arilo, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa segunda subforma de realização, R^1 e/ou R^2 é $C(O)-$ alquilo inferior e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa terceira subforma de realização, R^1 e/ou R^2 é $C(O)-$ metilo e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa quarta subforma de realização, R^1 e/ou R^2 é $C(O)C(R^3)(H)(NR^{10}R^{11})$, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa quinta subforma de realização, R^1 e/ou R^2 é $C(O)C(R^3)(H)(NR^{10}R^{11})$, R^3 é isopropilo, pelo menos um de R^{10} e R^{11} é hidrogénio, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa sexta subforma de realização, R^1 e/ou R^2 é $C(O)C(R^3)(H)(NR^{10}R^{11})$, R^3 é uma cadeia lateral de aminoácido, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa sétima subforma de realização, R^1 e/ou R^2 é $C(O)C(R^3)(H)(NR^{10}R^{11})$, R^3 é uma cadeia lateral de aminoácido não polar, e BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Exemplos não limitativos de subformas de realização podem ser definidos pela fórmula (I) em que:

- (1) R^1 e/ou R^2 é $C(O)-$ metilo e a BASE é citosina.
- (2) R^1 e/ou R^2 é $C(O)-$ metilo e a BASE é citosina protegida.
- (3) R^1 e/ou R^2 é $C(O)-$ metilo e a BASE é timina.
- (4) R^1 e/ou R^2 é $C(O)C(R^3)(H)(NH^2)$; R^3 é isopropilo e a BASE é citosina.
- (5) R^1 e/ou R^2 é $C(O)C(R^3)(H)(NH^2)$; R^3 é isopropilo e a BASE é citosina protegida.

(6) R^1 e/ou R^2 é $C(O)C(R^8)(H)(NH^2)$; R^8 é isopropílico e a BASE é timina.

Numa oitava subforma de realização, X é O , R^1 e/ou R^2 é $C(O)$ -alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa nona subforma de realização, X é O , R^1 e/ou R^2 é $C(O)$ -alquilo inferior e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa décima subforma de realização, X é O , R^1 e/ou R^2 é $C(O)$ -metilo e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa décima primeira subforma de realização, X é O , R^1 e/ou R^2 é $C(O)C(R^8)(H)(NR^{10}R^{11})$, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa décima segunda subforma de realização, X é O , R^1 e/ou R^2 é $C(O)C(R^8)(H)(NR^{10}R^{11})$, R^8 é isopropilo, pelo menos um de R^{10} e R^{11} é hidrogénio, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa décima terceira subforma de realização, X é O , R^1 e/ou R^2 é $C(O)C(R^8)(H)(NR^{10}R^{11})$, R^8 é uma cadeia lateral de aminoácido, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa décima quarta subforma de realização, X é O , R^1 e/ou R^2 é $C(O)C(R^8)(H)(NR^{10}R^{11})$, R^8 é uma cadeia lateral de aminoácido não polar, pelo menos um de R^5 e R^6 é hidrogénio, e B é citosina, citosina protegida ou timina.

Os exemplos não limitativos de subformas de realização podem ser definidos pela fórmula (I) em que:

- (1) X é O, R¹ e/ou R² é C(O)-metilo e a BASE é citosina.
- (2) X é O, R¹ e/ou R² é C(O)-metilo e a BASE é citosina protegida.
- (3) X é O, R¹ e/ou R² é C(O)-metilo e a BASE é timina.
- (4) X é O, R¹ e/ou R² é C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ é isopropilo e a BASE é citosina.
- (5) X é O, R¹ e/ou R² é C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ é isopropilo e a BASE é citosina protegida.
- (6) X é O, R¹ e/ou R² é C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ é isopropilo e a BASE é timina.

Numa décima quinta subforma de realização, X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)-alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa décima sexta subforma de realização, X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)-alquilo inferior e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa décima sétima subforma de realização, X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)-metilo e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa décima oitava subforma de realização, X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa décima nona subforma de realização, X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ é isopropilo, pelo menos um de R¹⁰ e R¹¹ é hidrogénio, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa vigésima subforma de realização, X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ é uma cadeia lateral de aminoácido, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa vigésima primeira subforma de realização, X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ é uma cadeia lateral de aminoácido, pelo menos um de R⁵ e R⁶ é hidrogénio, e B é citosina, citosina protegida ou timina.

Exemplos não limitativos de subformas de realização podem ser definidos pela fórmula (I) em que:

- (1) X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)-metilo e a BASE é citosina.
- (2) X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)-metilo e a BASE é citosina protegida.
- (3) X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)-metilo e a BASE é timina.
- (4) X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ é isopropilo e a BASE é citosina.
- (5) X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R₈ é isopropilo e a BASE é citosina protegida.
- (6) X é O, R¹ é hidrogénio, R² é C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ é isopropilo e a BASE é timina.

Numa vigésima segunda subforma de realização, X é O, R¹ e R² são, independentemente, C(O)-alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa vigésima terceira subforma de realização, X é O, R¹ e R² são, independentemente, C(O)-alquilo inferior e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa vigésima quarta subforma de realização, X é O, R¹ e R² são independentemente C(O)-metilo e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa vigésima quinta subforma de realização, X é O, R¹ e R² são independentemente C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa vigésima sexta subforma de realização, X é O, R¹ e R² são independentemente C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹); R⁸ é isopropilo, pelo menos um de R¹⁰ e R¹¹ é hidrogénio, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa vigésima sétima subforma de realização, X é O, R¹ e R² são independentemente C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ é uma cadeia lateral de aminoácido, e a BASE é citosina, citosina protegida ou timina.

Numa vigésima oitava subforma de realização, X é O, R¹ e R² são independentemente C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ é uma cadeia lateral de aminoácido não polar, pelo menos um de R⁵ e R⁶ é hidrogénio, e B é citosina, citosina protegida ou timina.

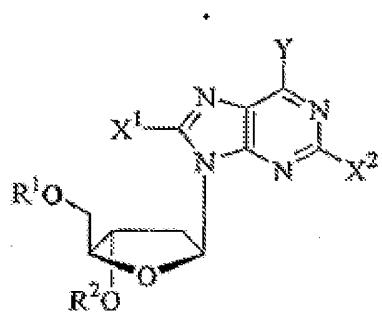
Exemplos não limitativos de subformas de realização podem ser definidos pela fórmula (I), em que:

- (1) X é O, R¹ e R² são independentemente C(O)-metilo e a BASE é citosina.
- (2) X é O, R¹ e R² são independentemente C(O)-metilo e a BASE é citosina protegida.
- (3) X é O, R¹ e R² são independentemente C(O)-metilo e a BASE é timina.
- (4) X é O, R¹ e R² são independentemente C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ é isopropilo e a BASE é citosina.

(5) X é O, R¹ e R² são independentemente C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ é isopropilo e a BASE é citosina protegida.

(6) X é O, R¹ e R² são independentemente C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ é isopropilo e a BASE é timina.

Numa outra forma de realização, a invenção fornece o uso de β -L-2'-desoxipurina da fórmula:



ou seu sal, ester ou pro-farmaco farmaceuticamente aceitáveis deste, onde:

R¹ é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

R² é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

Y é OR³, NR³R⁴ ou SR³; e

X^1 e X^2 são independentemente selecionados a partir do grupo consistindo de H, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, halogénio, OR⁵, NR⁵R⁶ ou SR⁵, e

R³, R⁴, R⁵ e R⁶ são independentemente hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquíleno (particularmente, dimetilaminometíleno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

e todas as formas tautoméricas e estereoisoméricas deste.

Numa forma de realização, o resíduo de aminoácido consta da fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), onde:

R⁸ é uma cadeia lateral de um aminoácido e onde, como em prolina, R⁸ pode opcionalmente ser ligado a R¹⁰ para formar uma estrutura em anel; ou alternativamente, R⁸ é uma metade de alquilo, arilo, heteroarilo, heterocíclica;

R⁹ é hidrogénio, alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo; e

R¹⁰ e R¹¹ são independentemente hidrogénio, acilo (incluindo um derivado de acilo ligado a R⁸) ou alquilo (incluindo mas não limitado a metilo, etilo, propilo, e ciclopropilo);

e todas as formas tautoméricas e estereoisoméricas deste.

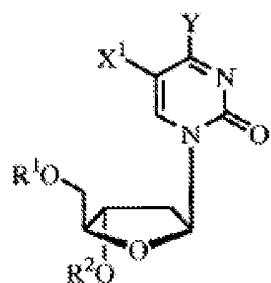
Numa outra forma de realização preferencial, R¹ e/ou R² é um resíduo de aminoácido, e particularmente L-valinil.

Numa forma de realização, R³ é hidrogénio, e R⁴ é dimetilaminometíleno.

Numa forma de realização, R^3 é hidrogénio, e R^4 é acetil.

Numa outra forma de realização, R^3 é hidrogénio e R^4 é L-valinil.

Numa outra forma de realização, a invenção fornece o uso de β -L-2'-desoxipirimidina da fórmula:



ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis deste, onde:

R^1 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

R^2 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

Y é OR^3 , NR^3R^4 ou SR^3 ;

X^1 é selecionado a partir do grupo consistindo de H, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, halogénio, OR⁵, NR⁵R⁶ ou SR⁵; e R³, R⁴, R⁵ e R⁶ são independentemente hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica (especialmente ciclopropilo), dialquilaminoalquíleno (particularmente, dimetilaminometíleno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato; e todas as formas tautoméricas e estereoisoméricas destes.

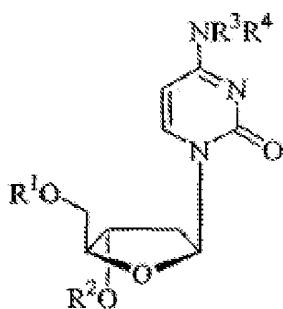
Numa forma de realização, o resíduo de aminoácido consta da fórmula C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹), onde:

R⁸ é uma cadeia lateral de um aminoácido e onde, como em prolina, R⁸ pode opcionalmente ser ligado a R¹⁰ para formar uma estrutura em anel; ou em alternativa, R⁸ é uma metade heterocíclica de alquilo, arilo, heteroarilo;

R⁹ é hidrogénio, alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo; e

R¹⁰ e R¹¹ são independentemente hidrogénio, acilo (incluindo um derivado de acilo ligado a R⁸) ou alquilo (incluindo mas não limitado a metilo, etilo, propilo, e ciclopropilo); e todas as formas tautoméricas e estereoisoméricas deste.

Numa forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxipirimidina é a β -L-2'-desoxicitidina da fórmula:



ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis deste, onde:

R¹ é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, araquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato;

R² é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato; e

R³ e R⁴ são independentemente H, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica (em especial ciclopropilo), dialquilaminoalquíleno (em particular, dimetilaminometíleno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, alquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono-, di- ou trifosfato, ou um derivado de fosfato; e todas as formas tautoméricas e estereoisoméricas deste.

Numa forma de realização preferencial, R¹ e/ou R² é H.

Numa forma de realização, o resíduo de aminoácido consta da fórmula $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, onde:

R^8 é uma cadeia lateral de um aminoácido e onde, como em prolina, R^8 pode opcionalmente ser ligado a R^{10} para formar uma estrutura em anel; ou alternativamente, R^8 é uma metade heterocíclica de alquilo, arilo, heteroarilo;

R^9 é hidrogénio, alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo; e

R^{10} e R^{11} são independentemente hidrogénio, acilo (incluindo um derivado de acilo ligado a R^8) ou alquilo (incluindo mas não limitado a metilo, etilo, propilo, ciclopropilo); e todas as formas tautoméricas e estereoisoméricas deste.

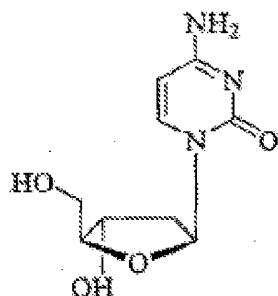
Numa outra forma de realização preferencial, R^1 e/ou R^2 é um resíduo de aminoácido, em particular L-valinil.

Numa forma de realização, R^3 é hidrogénio, e R^4 é dimetilaminometileno.

Numa outra forma de realização, R^3 é hidrogénio, e R^4 é acetil.

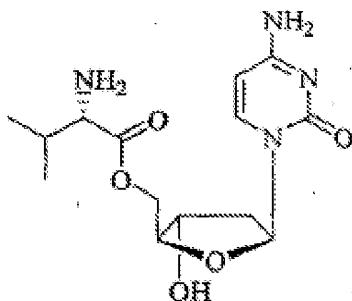
Numa outra forma de realização, R^3 é hidrogénio, e R^4 é L-valinil.

Numa forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxicitidina consta da fórmula:



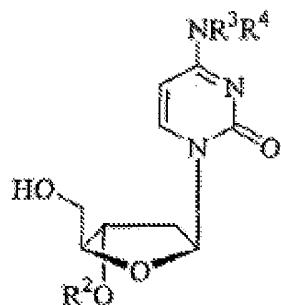
ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis deste.

Numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxicitidina consta da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitáveis deste.

Numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxicitidina consta da fórmula:

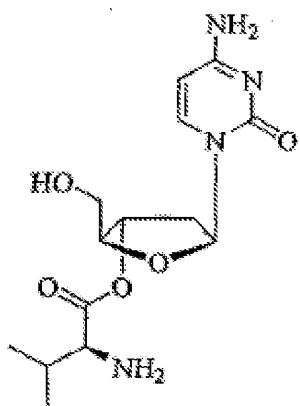


ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis deste, onde:

R^2 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-alquilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilosulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou uma pró-fármaco de fosfato; e

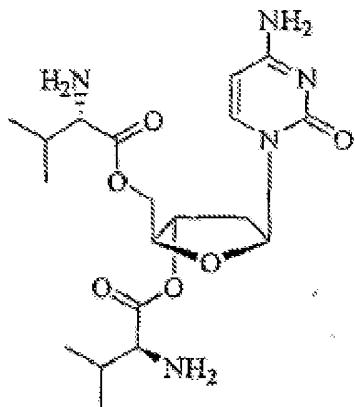
R^3 e R^4 são independentemente H, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cílica, dialquilaminoalquíleno, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfônico, arilsulfônico, araquilsulfônico, resíduo de aminoácido, mono-, di- ou trifosfato, ou uma pró-fármaco de fosfato.

Ainda numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxicitidina que consta da fórmula:



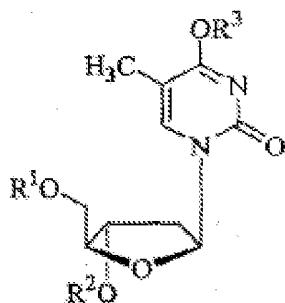
ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

Ainda numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxicitidina que consta da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

Numa outra forma de realização, o β -L-2'-desoxinucleosídeo é β -L-2'-desoxitimidina da fórmula:



ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis deste, onde:

R^1 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato; e

R^2 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato; e

R^3 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica (em especial ciclopropilo), dialquilaminoalquíleno (em particular, dimetilaminometíleno), acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou um derivado de fosfato; e todas as formas tautoméricas e estereoisoméricas deste.

Numa forma de realização preferencial, R^1 e/ou R^2 é H.

Numa forma de realização, o resíduo de aminoácido consta da fórmula $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, onde:

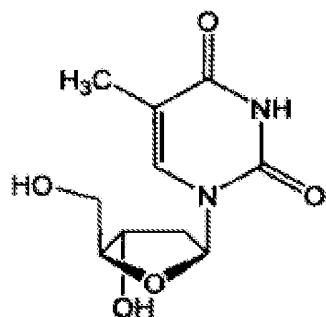
R^8 é uma cadeia lateral de um aminoácido e onde, como em prolina, R^8 pode opcionalmente ser ligado a R^{10} para formar uma estrutura em anel; ou alternativamente, R^8 é uma metade heterocíclica de alquilo, arilo, heteroarilo;

R^9 é hidrogénio, alquilo (incluindo alquilo inferior) ou arilo; e

R^{10} e R^{11} são independentemente hidrogénio, acilo (incluindo um derivado de acilo ligado a R^8) ou alquilo (incluindo mas não limitado a metilo, etilo, propilo, e ciclopropilo); e todas as formas tautoméricas e estereoisoméricas deste.

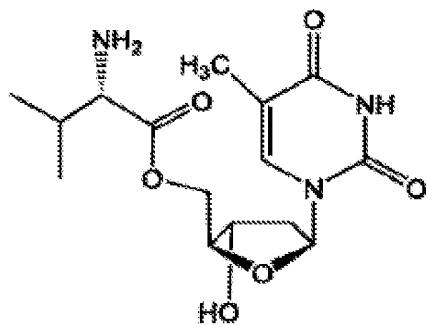
Numa outra forma de realização preferencial, R^1 e/ou R^2 é um resíduo de aminoácido, em particular L-valinil.

Numa forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxitimidina consta da fórmula:



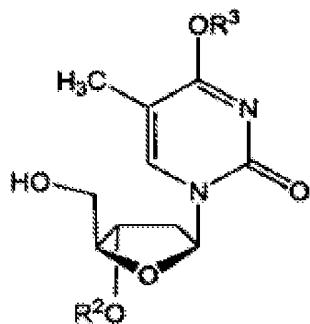
ou um sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis deste; e todas as formas tautoméricas deste.

Numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxitimidina consta da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

Numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxitimidina consta da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, onde:

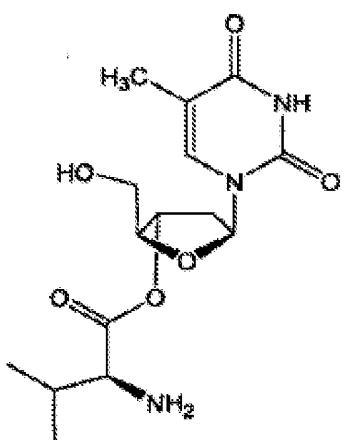
R^2 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-alquilo substituído, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aralquilosulfonilo, resíduo de aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou uma pró-fármaco de fosfato; e

R^3 é hidrogénio, alquilo de cadeia linear, ramificada ou cíclica, dialquilaminoalquíleno, acilo, acetilo, butirilo, CO-alquilo, CO-arilo, CO-alcoxialquilo, CO-ariloxialquilo, CO-arilo substituído, aralquilsulfonilo, resíduo de

aminoácido, mono, di ou trifosfato, ou uma pró-fármaco de fosfato;

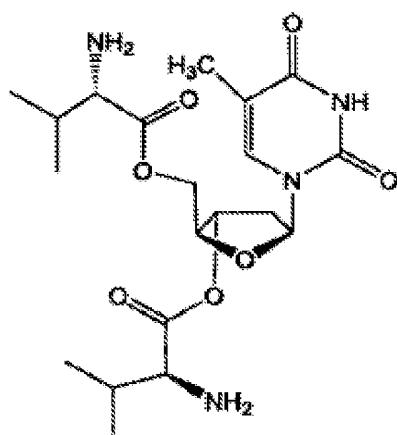
e todas as formas tautoméricas e estereoisoméricas deste.

Ainda numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxitimidina que consta da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

Ainda numa outra forma de realização em particular, a β -L-2'-desoxitimidina consta da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

II. DEFINIÇÕES

Conforme aqui usado, o termo "vírus resistente" refere-se a um vírus que apresenta um aumento de três, e mais frequentemente cinco ou mais vezes, em EC₅₀, quando comparado com o vírus nativo numa linha de células constante, incluindo, mas não estando limitada às células mononucleares periféricas do sangue (PBMCs), ou às células MT2 ou MT4.

Conforme aqui usado, o termo hepatite B e condições relacionadas, referem-se à hepatite B e às condições relacionadas, como condições positivas dos anticorpos anti-VHB e VHB-positivos, inflamação crónica de fígado causada por VHB, cirrose, hepatite aguda, hepatite fulminante, hepatite persistente crónica e fadiga. O método da presente invenção inclui o uso de derivados de 2'-desoxi-β-L-eritropentofuranonucleosídeo na forma profilática, para impedir ou retardar o progresso clínico da doença em indivíduos que são positivos para anticorpo anti-VHB ou antigénio de VHB ou que foram expostos a VHB.

O termo nucleosídeo biologicamente ativo, conforme aqui usado, refere-se a um nucleosídeo que apresenta um EC₅₀ de 15 micromol ou menos quando testado em 2.2.15 células transfectadas com o vírus da hepatite.

Conforme aqui usado, o termo "substancialmente puro" ou "substancialmente na forma de um isómero ótico" refere-se a uma composição de nucleosídeo que inclui pelo menos 95% a 98%, ou mais, preferencialmente entre 99% a 100%, de um enanciómero único do referido nucleosídeo. Numa forma de realização preferencial, o β-L-2'-desoxinucleosídeo é administrado na forma substancialmente pura para qualquer uma das indicações divulgadas.

De forma similar, o termo "isolado" refere-se a um composto que inclui pelo menos 85% ou 90% em peso, preferencialmente 95% a 98% em peso, e mesmo mais, preferencialmente 99% a 100% em peso, do nucleosídeo, sendo o restante de outras espécies químicas ou enanciómeros.

O termo "forma substancialmente pura" é usado em toda a especificação para descrever um composto que inclui aproximadamente 90% ou mais, em alternativa pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou mais de um enanciómero único daquele composto. Quando um nucleosídeo de uma configuração em particular (D ou L) é referido nesta especificação, presume-se que o nucleosídeo é administrado na forma substancialmente pura.

O termo "independentemente" é aqui usado para indicar que a variável que é independentemente aplicada varia independentemente de aplicação para aplicação. Assim, num composto tal como R"XYR", onde R" é "independentemente carbono ou nitrogénio", tanto R" pode ser carbono como R" pode ser nitrogénio, ou um dos R" pode ser carbono e o outro R" pode ser nitrogénio.

O termo "alquilo", conforme aqui usado, a menos que seja especificado de outra forma, refere-se a um hidrocarboneto linear, ramificado ou cílico, primário, secundário ou terciário, saturado de normalmente C₁ a C₁₈, tal como C₁ a C₁₀, preferencialmente de C₁ a C₆, e especificamente inclui metilo, trifluorometilo, CCl₃, CFCl₂, CF₂C₁, etilo, CH₂CF₃, CF₂CF₃, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, t-pentilo, neopentilo, amilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, e 2,3-dimetilbutilo. O termo inclui

tanto grupos alquilo substituídos como os grupos alquilo não substituídos. As metades do grupo alquilo que podem ser substituídas são selecionadas a partir do grupo composto de halogénio (flúor, cloro, bromo ou iodo), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcóxido, ariloxido, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, ou fosfonato, ou desprotegidos, ou protegidos conforme necessário, como conhecidos dos especialistas na área, por exemplo, conforme ensinado em Greene e outros, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, segunda edição, 1991.

O termo "alquilo inferior", conforme aqui usado, e a menos que seja especificado de outra forma, refere-se ao grupo alquilo de C₁ a C₄, linear, ramificado ou se apropriado, cíclico (por exemplo, ciclopropilo), saturado, incluindo tanto formas substituídas quanto formas não substituídas. A menos que declarado de outra forma nesta especificação, quando o alquilo é uma metade adequada, o alquilo inferior é o preferível. De forma similar, quando o alquilo ou alquilo inferior é uma metade adequada, o alquilo não substituído ou alquilo inferior é o preferível.

O termo "arilo", conforme aqui usado, e a menos que especificado de outra forma, refere-se a fenilo, bifenilo, ou naftilo, e preferencialmente a fenilo. O termo inclui tanto as metades substituídas como as metades não substituídas. O grupo arilo pode ser substituído por uma ou mais metades selecionadas a partir do grupo consistindo de halogénio (flúor, cloro, bromo ou iodo), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcóxido, ariloxido, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, ou fosfonato, desprotegidos ou protegidos conforme necessário, como reconhecido pelos especialistas na área, por exemplo,

e conforme ensinado em Greene e outros, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edição, 1991.

O termo "acilo" refere-se a um éster de ácido carboxílico da fórmula $-C(O)R'$ em que a metade não-carbonila do grupo éster (isto é, R') é selecionada a partir de alquilo ou alquilo inferior, linear, ramificado ou cíclico, alcoxialquilo incluindo metoximetilo, alcarilo, aralquilo ou aralquilo (incluindo benzilo ou benzilo substituído), ariloxialquilo tal como fenoximetilo, arilo incluindo fenilo opcionalmente substituído com halogénio (por exemplo, F, Cl, Br ou I), alquilo de C₁ a C₄ ou alcóxido C₁ a C₄, resíduo de aminoácido ou de heteroaromático. Os grupos arilo nos ésteres compreendem, de forma ideal, um grupo fenilo. O termo acilo inclui de forma específica mas não está limitado a acetilo, propionilo, butirilo, pentanol, 3-metilbutiril, hidogensucinilo, 3-clorobenzoil, benzol, acetilo, pivalol, mesilato, propionilo, valerilo, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico e oleico. Em alternativa, os ésteres sulfonatos tais como alquilo ou aralquilo sulfonilo incluindo metanossulfonilo, o éster mono-, di- ou trifosfato, tritilo ou monometoxitritilo, trialquilsililo (por exemplo, dimetilo-t-butilsililo) ou difenilmetilsililo estão também incluídos. O termo "acilo inferior" refere-se a um grupo acilo no qual a metade não-carbonila é alquilo inferior.

Conforme aqui usado, o termo "purina" ou "base pirimidina", inclui, mas não está limitado a, 6-alquilo purina e N⁶-alquilo purinas, N⁶-acilo purinas, N⁶-benzilo purina, 6-halopurina, N⁶-vinilo purina, N⁶-acetilénico purina, N⁶-acilo purina, N⁶-hidroxialquilo purina, N⁶-tioalquilo

purina, N²-alquilo purinas, N⁴-alquilo pirimidinas, N⁴-acilo pirimidinas, 4-benzilo pirimidina, N⁴-halo pirimidinas, N⁴-acetilénico pirimidinas, 4-acilo e N⁴-acilopirimidinas, 4-hidroxialquilo pirimidinas, 4-tioalquilo pirimidinas, timina, citosina, 6-azapirimidina, incluindo 6-azacitosina, 2- e/ou 4-mercaptop pirimidina, uracilo, C⁵-alquilo pirimidinas, C⁵-benzilo pirimidinas, C⁵-halo pirimidinas, C⁵-vinil pirimidina, C⁵-acetilénico pirimidina, C⁵-acil pirimidina, C⁵-hidroxialquil purina, C⁵-amidopirimidina, C⁵-ciano pirimidina, C⁵-nitro pirimidina, C⁵-amino pirimidina, N²- alquilo purinas, N²-alquil-6-tiopurinas, 5-azacitosina, 5-azauracil, triazolo piridina, imidazolo piridina, pirrol pirimidina e pirazole pirimidina. Os grupos funcionais de oxigénio e nitrogénio na base podem ser protegidos conforme seja necessário ou desejado. Os grupos protetores adequados são bem conhecidos dos especialistas na área, e incluem trimetilsililo, dimetilhexilsililo, t-butildimetilsililo, e t-butildifenilsililo, tritilo, grupos alquilo, grupos acilo tais como acetilo e propionilo, metanossulfonilo e p-toluenossulfonilo.

As bases preferenciais incluem citosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, 5-iodocitosina, uracilo, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-iodouracil, 5-metiluracil, timina, adenina, guanina, inosina, xantina, 2,6-diaminopurina, 6-aminopurina, 6-cloropurina e 2,6-dicloropurina, 6-bromopurina, 2,6-dibromopurina, 6-iodopurina, 2,6-di-iodopurine, 5-bromovinilcitosina, 5-bromoviniluracil, 5-bromoetenilcitosina, 5-bromoeteniluracil, 5-trifluorometilcitosina, 5-trifluorometiluracil.

Conforme aqui usado, o termo "resíduo de aminoácido" inclui, mas não está limitado aos enantiómeros L ou D ou qualquer mistura destes, incluindo uma mistura racêmica,

todas as configurações tautoméricas e estereoquímicas, de alanilo, valinil, leucinil, isoleucinil, prolinilo, fenilalaninil, triptofanil, metioninol, glicinil, serinil, treoninil, cisteinil, tirosinil, asparaginil, glutaminil, aspartoil, glutaoil, lisinil, argininil, e histidinil. Os aminoácidos preferenciais estão na estereoconfiguração L, e a metade de aminoácido preferencial é L-valinil.

As abreviaturas dos aminoácidos aqui usadas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1

Aminoácido		Códons					
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU	
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU			
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU	GAC	GAU	
Ácido glutâmico	Glu	E	GAA	GAG			
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU			
Glicina	Gly	G	GGA	GCG	GGG	GGU	
Histidina	His	H	CAC	CAU			
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU		
Lisina	Lys	K	AAA	AAG			
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	
			CUG	GUU			
Metionina	Met	M	AUG				
Arparagina	Asn	N	AAC	AAU			
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU	
Glutamina	Gin	Q	CAA	CAG			
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	
			CGG	CGU			
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG
			UCU				
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU	

Valina	Vai	V	GUA	GUC	GUG	GUU
Triptofano	Trp	W	UGG			
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU		

O termo "imunomodulador" ou "modular uma resposta imune", conforme aqui usado, refere-se a uma quimoquina ou citoquina que regula ou diretamente ou indiretamente uma resposta imune, incluindo os efeitos imunoestimuladores assim como os imunossupressores. A imunomodulação é, principalmente, uma alteração qualitativa a uma resposta imune total, embora possam também ocorrer mudanças quantitativas em conjunto com a imunomodulação. A imunomodulação pode envolver uma resposta imune que é alternada em direção a uma resposta imune "tipo-Th1", em oposição a uma resposta imune "tipo-Th2". As respostas tipo-Th1 são normalmente consideradas como respostas do sistema imune celular (por exemplo, linfócitos citotóxicos), enquanto as respostas tipo-Th2 são geralmente "humorais", ou baseadas em anticorpos. As respostas imunes tipo-Th1 são normalmente caracterizadas pelas reações de "tipo atraso da hipersensibilidade" a um抗原, e podem ser detectadas ao nível bioquímico elevando-se os níveis de citoquinas associadas a Th1 tais como IFN- γ , IL-2, IL-12, e TNF- beta, assim como IFN- α e IL-6, embora a IL-6 possa também estar associada com as respostas tipo-Th2. As respostas tipo-Th1 estão geralmente associadas com a produção de linfócitos citotóxicos (CTLs) e níveis baixos ou produção transitória de anticorpo. As respostas imunes tipo-Th2 estão geralmente associadas com níveis mais altos de produção de anticorpos, incluindo produção de IgE, uma ausência ou a produção mínima de CTL, assim como a expressão de citoquinas associadas a Th2 tal como IL-4. Consequentemente, a imunomodulação em uma modalidade pode ser reconhecida, por exemplo, através de um aumento em IFN-

gama e/ou um decréscimo na produção de IgE num indivíduo tratado de acordo com os métodos da invenção quando comparado com a ausência de tratamento.

Os agentes imunomoduladores incluem, mas não estão limitados a, uma molécula, como uma quimoquina ou citoquina que afeta direta ou indiretamente uma resposta imune. Os exemplos não limitativos de imunomoduladores incluem citoquinas TH1, em particular, interferon, interferon- α , interferon- α purificado interferon- α 2a, interferon- α 2b, interferon- β , interferon- γ , interferon de consenso, interferon peguilado, interferon- α peguilado, fator de estímulo de colónia de granulócito macrófago, interleucina, interleucina-2, e interleucina-12. Numa forma de realização, o imunomodulador é o interferon, por exemplo, o interferon- γ .

As abreviaturas, conforme aqui usadas, referem-se ao seguinte:

Ad IFN	Vetor de adenovírus expressando interferon gama de marmota
Ad RFP	Vetor de adenovírus sem o gene de interferon gama de marmota
CCC ADN	Forma viral circular co valentemente fechada de ADN
ADN	ácido desoxirribonucléico
FTC	(-)- β -2',3'-didesoxi-5-fluoro-3'-tiacitidina
GFP	proteína fluorescente verde
VHB	vírus da hepatite B
IFN	Interferon
L-FMAU	1-(2-fluoro-5-metil- β ,L-arabinofuranosil)timina
M1, M2	Mês 1 ou 2, respectivamente, após o início do tratamento

PCNA	Antigénio nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia de polimerase
Pfu	Unidade de formação de placa
RFP	Proteína fluorescente vermelha
RI	Intermediários de replicação
RT	Transcrição reversa
TUNEL	Ensaio de marcação da extremidade de dUTP mediada por desoxinucleotidiltransferase terminal (TdT)
WBV	Vírus da hepatite B em marmota

Conforme aqui usado, "tratamento" é uma bordagem para obtenção dos resultados benéficos ou desejados, incluindo os resultados clínicos. Para os propósitos desta invenção, os resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados a, o alívio ou a melhoria de um ou mais sintomas, diminuição da extensão da doença, estado estacionário (ou seja, que não piora) da doença, prevenção do alastramento da doença, atraso ou retardação da progressão da doença, melhoria ou alívio do estado da doença, e remissão (caso seja parcial ou total), se detectável ou não detectável. "Tratamento" pode também significar prolongar a sobrevivência quando comparado à sobrevivência esperada caso não houve recepção do tratamento.

O termo hospedeiro, conforme aqui usado, refere-se a um organismo unicelular ou multicelular no qual o vírus se pode replicar, incluindo linhas de célula e animais, e preferencialmente um ser humano. Em alternativa, o hospedeiro pode transportar uma parte do genoma viral da hepatite B, cuja replicação ou função pode ser alterada pelos compostos da presente invenção. O termo hospedeiro refere-se de forma mais específica a células infectadas, células transfectadas com todo ou parte do genoma de VHB em

animais, em particular primatas (incluindo chimpanzés) e seres humanos. Na maioria das aplicações em animais da presente invenção, o hospedeiro é um paciente humano. As aplicações veterinárias em certas indicações, entretanto, são claramente antecipadas pela presente invenção (tais como em chimpanzés).

III. Formulações de Sal ou Pró-fármaco de Nucleotídeo

O termo "sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitáveis" é usado em toda a especificação para descrever qualquer forma farmaceuticamente aceitável (tal como um éster, éster de fosfato, sal de um éster ou um grupo relacionado) de um composto de nucleosídeo que, ao ser administrado a um paciente, fornece diretamente ou indiretamente, o β -L-2'-desoxinucleosídeo, ou apresenta ele próprio atividade. Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os derivados de bases e de ácidos inorgânicos ou orgânicos farmaceuticamente aceitáveis. Os pró-fármacos farmaceuticamente aceitáveis referem-se a um composto que é, por exemplo metabolizado, hidrolisado ou oxidado, no hospedeiro para formar o composto da presente invenção. Os exemplos comuns de pró-fármacos incluem compostos que possuem grupos protetores biologicamente variáveis numa metade funcional do composto ativo. Os pró-fármacos incluem compostos que podem ser oxidados, reduzidos, aminados, desaminados, hidroxilados, desidroxilados, hidrolisados, desidrolisados, alquilados, desalquilados, acilados, desacilados, fosforilados e desfosforilados para produzir o composto ativo. Os compostos desta invenção possuem ação antiviral contra o VHB, em particular contra o VHB resistente à lamivudina (M552V), ou são metabolizados num composto que apresenta tal atividade.

Conforme aqui usado, o termo "sal ou complexo farmaceuticamente aceitável" refere-se a um sal ou complexo do β -L-2'-desoxinucleosídeo que possui a atividade biológica desejada do composto-mãe e apresenta efeitos toxicológicos indesejados mínimos, se existirem. Os exemplos não limitativos de tais sais são (a) sais de adição de ácido, formados por ácidos inorgânicos (por exemplo, ácido hidroclórico, ácido hidrobrômico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido bicarbónico, ácido carbónico etc.), e sais formados por ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido oxálico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido lático, ácido pirúvico, ácido maleico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzólico, ácido tântico, ácido palmólico, ácido algínico, ácido poliglutâmico, ácido tósico, ácido metanossulfônico, ácido cítrico, ácido malônico, ácido α -cetoglutárico, ácido α -glicerofosfônico, ácidos naftalenossulfônicos, ácidos naftaleno-dissulfônicos, e ácido poligalacturônico; (b) sais de adição de base, formados por catiões, como sódio, potássio, zinco, cálcio, bismuto, bário, magnésio, alumínio, cobre, cobalto, níquel, cádmio, sódio, potássio, etc., ou por um catião orgânico formado a partir de N,N-dibenzil-etenodiamina, amônio, ou etilenodiamina; ou (c) combinações de (a) e (b), por exemplo, um sal tanato de zinco ou semelhante.

Qualquer um dos nucleosídeos aqui descritos e/ou dos compostos que aqui são descritos para uso em terapias combinadas ou alternadas, podem ser administrados como um pró-fármaco de nucleotídeo para aumentar a ação, biodisponibilidade, estabilidade ou, de outra forma, alterar as propriedades do nucleosídeo. São conhecidos vários ligantes de pró-fármaco nucleotídeo. Em geral, a

alquilação, acilação ou outra modificação lipofílica do mono-, di- ou trifosfato do nucleosídeo irá aumentar a estabilidade do nucleotídeo. Os exemplos de grupos substituintes que podem substituir um ou mais hidrogénios na metade fosfato são alquilo, arilo, esteróides, carbohidratos, incluindo açúcares, 1,2-diacilglicerol e álcoois. Muitos são descritos em R. Jones e N. Bischofberger, Antiviral Research, 1995, 27, 1-17. Qualquer um destes pode ser usado em combinação com os nucleosídeos divulgados para alcançar um efeito desejado.

Numa forma de realização, as posições 5' e/ou 3'-O e/ou a posição N⁴ do β -L-2'-desoxinucleosídeo são aciladas, alquiladas ou fosforiladas (incluindo os ésteres mono-, di- e trifosfato assim como os fosfatos e os fosfolipídeos estabilizados). Numa forma de realização, o grupo acilo é um éster de ácido carboxílico em que a metade não carbonila do grupo éster é selecionada a partir do alquilo linear, ramificado ou cíclico, alcoxialquilo incluindo metoximetilo, aralquilo incluindo benzilo, ariloxialquilo incluindo fenoximetilo, arilo incluindo fenilo opcionalmente substituído por halogénio, alquilo, alquilo ou alcoxi, ésteres sulfonato, tais como alquilo ou aralquilo sulfonilo incluindo metanossulfonilo, tritilo ou monometoxitritilo, benzilo substituído, trialquilsililo ou difenilmetilsililo. Os grupos arilo nos ésteres compreendem, na forma ideal, um grupo fenilo. O grupo alquilo pode ser linear, ramificado ou cíclico e é preferencialmente de C₁ a C₁₈.

O β -L-2'-desoxinucleosídeo pode ser convertido num éster farmaceuticamente aceitável através da reação com um agente esterificante apropriado, por exemplo, um haleto ácido ou anidrido. O nucleosídeo ou um seu pró-fármaco

farmaceuticamente aceitável pode ser convertido num sal farmaceuticamente aceitável deste de uma maneira convencional, por exemplo, pelo tratamento com uma base ou ácidos apropriados. O éster ou sal pode ser convertido no nucleosídeo-mãe, por exemplo, por hidrólise. As modificações dos compostos ativos, especificamente nas posições 5' e/ou 3'-O e/ou na posição N⁴, podem afetar a biodisponibilidade e a taxa de metabolismo das espécies ativas, fornecendo assim um controlo sobre a entrega das espécies ativas. Uma modificação preferencial é um éster de 3' e/ou 5'-aminoácido, incluindo o éster L-valinil.

O nucleosídeo ativo pode também ser fornecido como um 5'-fosfo-éter lipídeo ou um 5'-éter lipídeo, conforme divulgado nas seguintes referências: Kucera, L. S., N. Iyer, E. Leake, A. Raben, Modest E. K., D. L. W., e C. Piantadosi, "Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious VIH-1 production and induce defective virus formation". AIDS Res. Hum. Retro Viruses, **1990**, 6, 491-501; Piantadosi, C., J. Marasco C. J., S. L. Morris- Natschke, K. L. Meyer, F. Gumus, J. R. Surles, K. S. Ishaq, L. S. Kucera, N. Iyer, C. A. Wallen, S. Piantadosi, e E. J. Modest, "Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-VIH activity". J. Med. Chem., **1991**, 34, 1408-1414; Hosteller, K. Y., D. D. Richman, D. A. Carson, L. M. Stuhmiller, G. M. T. van Wijk, e H. van den Bosch, "Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3,-deoxythymidine". Antimicrob. Agents Chemother. **1992**, 36, 2025-2029; Hosetler, K. Y., L. M. Stuhmiller, H. B. Lenting, H. van den Bosch, e D. D. Richman, "Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of

azidothymidine and other antiviral nucleosides". J. Biol. Chem., **1990**, 265, 61127.

Os exemplos não limitativos das Patentes americanas que divulgam os substituintes lipofílicos adequados que podem ser convenientemente incorporados no nucleosídeo, preferencialmente na posição 5'-OH do nucleosídeo ou preparações lipofílicas, incluem as Patentes americanas nº 5,149,794 (22 de setembro de 1992, Yatvin e outros), 5,194,654 (16 de março de 1993, Hostetler e outros), 5,223,263 (29 de junho de 1993, Hostetler e outros), 5,256,641 (26 de outubro de 1993, Yatvin e outros), 5,411,947 (2 de maio de 1995, Hostetler e outros), 5,463,092 (31 de outubro de 1995, Hostetler e outros), 5,543,389 (6 de agosto de 1996, Yatvin e outros), 5,543,390 (6 de agosto de 1996, Yatvin e outros), 5,543,391 (6 de agosto de 1996, Yatvin e outros) e 5,554,728 (10 de setembro de 1996, Basava e outros). Os Pedidos de Patente Estrangeira que divulgam os substituintes lipofílicos que podem ser ligados aos nucleosídeos da presente invenção, ou as preparações lipofílicas, incluem WO 89/02733, WO 90/00555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO 94/26273, WO 96/15132, EP 0 350 287, EP 93917054.4, e WO 91/19721.

Os exemplos não limitativos de pró-fármacos de nucleotídeo estão descritos nas seguintes referências: Ho, D. H. W. "Distribution of Kinase and deaminase of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and mouse". Cancer Res., **1973**, 33, 2816-2820; Holy, A. "Isopolar phosphorous-modified nucleotide analogues", em: De Clercq (Ed.), JAI Press, Advances in Antiviral Drug Design, **1992**, Vol. I, 179-231; Hong, C. I., Nechaev, A., e West, C. R. "Synthesis and antitumor activity of 1- β -D-arabino-

furanosylcytosine conjugates of cortisol and cortisone". Biochem. Biophys. Rs. Commun., **1979a**, 88, 1223-1229; Hong, C. I., Nechaev, A., Kirisits, A. J. Buchheit, D. J. e West, C. R. "Nucleoside conjugates as potential antitumor agents. 3. Synthesis and antitumor activity of 1-(β -D-arabinofuranosyl)cytosine conjugates of corticosteroids and selected lipophilic alcohols". J. Med. Chem., **1980**, 28, 171-177; Hosteller, K. Y., Stuhmiller, L. M., Lenting, H. M. van den Bosch, H. e Richman, J. Biol. Chem., 265, 6112-6117; Hosteller, K. Y., Carson, D. A. e Richman, D. D. "Phosphatidylazidothymidine: mechanism of antiretroviral action in CEM cells", J. Biol. Chem., **1991**, 266, 11714-11717; Hosteller, K. Y., Korba, B. Sridhar, C., Gardener, M. "Antiviral activity of phosphatidyl-dideoxycytidine in hepatitis B-infected cells and enhanced hepatic uptake in mice". Antiviral Res., **1994a**, 24, 59-67; Hosteller, K. Y., Richman, D. D., Sridhar. C. N. , Felgner, P. L., Felgner, J., Ricci, J. , Gardener, M. F., Selleseth, D. W. e Ellis, M. N., "Phosphatidylazidothymidine and phosphatidyl-ddC: Assessment of uptake in mouse lymphoid tissues and antiviral activities in human immunodeficiency virus-infected cells and in rauscher leukemia virus-infected mice". Antimicrobial Agents Chemother, **1994b**, 38, 2792-2797; Hunston, R. N. , Jones, A. A., McGuigan, C., Walker, R. T., Balzarini, J., e DeClercq, E., "Synthesis and biological properties of some cyclic phosphotriesters derived from 2'-deoxy-5-fluorouridine". J. Med. Chem., **1984**, 27, 440-444; Ji, Y. H., Moog, C., Schmitt, G., Bischoff, P. e Luu, B., "Monophosphoric acid esters of 7- β -hydroxycholesterol and of pyrimidine nucleoside as potential antitumor agents: synthesis and preliminary evaluation of antitumor activity". J. Med. Chem., **1990**, 33, 22 64-2270; Jones, A. S., McGuigan, C., Walker, R. T., Balzarini, J. e DeClercq, E., "Synthesis, properties, and

biological activity of some nucleoside cyclic phosphoramidates". J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, **1984**, 1471-1474; Juodka, B. A. e Smart, J., "Synthesis of diribonucleoside phosph (P→N) amino acid derivatives". Coll. Czech. Chem. Comm., **1974**, 39, 363-968; Kataoka, S., Imai, J., Yamaji, N., Kato, M., Saito, M., Kawada, T. e Imai, S., "Alkylated cAMP derivatives; selective synthesis and biological activities". Nucleic Acids Res. Sym. Ser., **1989**, 21, 1-2; Kataoka, S., Uchida, (cAMP) benzyl and methyl triesters". Heterocycles 32, 1351-1356; Kinchington, D., Harvey, J. J., O'Connor, T. J., Jones, B. C. N. M., Devine, K. G., Taylor-Robinson D., Jeffries, D. J. e McGuigan, C., "Comparison of antiviral effects of zidovudine phosphoramidate and phosphorodiamidate derivatives against VIH and ULV in vitro". Antiviral Chem. Chemother., **1992**, 3, 107-112; Kodama, K., Morozumi, M., Saithoh, K. I., Kuninaka, H., Yosino, H. e Saneyoshi, M., "Antitumor activity and pharmacology of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine-5'-stearylphosphate; an orally active derivative of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine". Jpn. J. Cancer Res., **1989**, 80, 679-685; Korty, M. e Engels, J., "The effects of adenosine-and guanosine 3',5'phosphoric and acid benzyl esters on guinea-pig ventricular myocardium". Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **1979**, 310, 103-111; Kumar, A., Goe, P. L., Jones, A. S., Walker, R. T., Balzarini, J. E DeClercq, E., "Synthesis and biological evaluation of some cyclic phosphoramidate nucleoside derivatives". J. Med. Chem., **1990**, 33, 2368-2375; LeBec, C., e Huynh-Dinh, T., "Synthesis of lipophilic phosphate triester derivatives of 5-fluorouridine na arabinocytidine as anticancer prodrugs". Tetrahedron Lett. **1991**, 32, 6553-6556; Lichtenstein, J. Barner, H. D. e Cohen, S. S., "The metabolism of exogenously supplied nucleotides by Escherichia coli". J Biol. Chem., **1960**, 235, 457- 465;

Lucthy, J. Von Daeniken, A., Friederich, J. Manthey, B., Zweifel, J., Schlatter, C. e Benn, M. H., "Synthesis and toxicological properties of three naturally occurring cyanoepithioalkanes". *Mitt. Geg. Lebensmittelunters. Hvg.*, **1981**, 72, 131-133 (Chem. Abstr. 95, 127093); McGigan, C. Tollerfield, S. M. e Riley, P. a., "Synthesis and biological evaluation of some phosphate trimester derivatives of the anti-viral drug Ara.", *Nucleic Acids Res.*, **1989**, 17, 6065-6075; McGuigan, C., Devine, K. G., O'Connor, T. J., Galpin, S. A., Jeffries, D. J. e Kinchington, D., "Synthesis and evaluation of some novel phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) as anti-VIH compounds", *Antiviral Chem. Chemother.*, **1990a**, 1, 107-113; McGuigan, C., O'Connor, T. J., Nicholls, S. R., Nickson, C. e Kinchington, D., "Synthesis and anti-VIH activity of some novel substituted dialkyl phosphate derivatives of AZT and ddCyd.", *Antiviral Chem. Chemother.*, **1990b**, 1, 355-360; McGuigan, C., Nicholls, S. R., O'Connor, T. J., e Kinchington, D., "Synthesis of some novel dialkyl phosphate derivative of 3'-modified nucleosides as potential anti-SIDA drugs", *Antiviral Chem. Chemother.*, **1990c**, 1, 25-33; McGuigan, C., Devin, K. G., O'Connor, T. J., e Kinchington, D., "Synthesis and anti-VIH activity of some haloalkyl phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT); potent activity of the trichloroethyl methoxyalaninyl compound", *Antiviral Res.*, **1991**, 15, 255-263; McGuigan, C., Pathirana, R. N., Mahmood, N., Devine, K. G. e Hay, A. J. "Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against VIH-1 in cell lines which are resistant to the action of AZT", *Antiviral Res.*, **1992**, 17, 311-321; McGuigan, C., Pathirana, R. N., Choi, S. M., Kinchington, D. e O'Connor, T. J., "Phosphoramidate derivatives of AZT as inhibitors of VIH; studies on the carboxyl terminus". *Antiviral Chem. Chemother.*, **1993a**,

4, 97-101; McGuigan, C., Pathirana, R. N., Balzarini, J. e DeClercq, E., "Intracellular delivery of bioactive AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT", *J. Med. Chem.*, **1993b**, 36, 1048-1052.

Os derivados de alquilo hidrogenofosfato do AZT como agente anti-VIH podem ser menos tóxicos que o análogo do nucleosídeo-mãe. *Antiviral Chem. Chemother.* 5, 271-277; Meyer, R. B., Jr., Shuman, D. A. e Robins, R. K. "Synthesis of purine nucleoside 3',5'-cyclicphosphoramidates". *Tetrahedron Lett.* **1973**, 269-272; Nagyvary, J. Gohil, R. N., Kirchner, C. R. e Stevens, J. D. "Studies on neutral esters of cyclic AMP", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, 55, 1072-1077; Namane, A. Gouyette, C., Pillion, M. P., Fillion, G. e Huynh-Dinh, T. "Improved brain delivery of AZT using a glycosyl phosphotriester prodrug", *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3039-3044; Nargeot, J. Nerbonne, J. M. Engels, J. e Leser, H. A., *Natl. Acad. Sei. Americana A.* **1983**, 80, 2395-2399; Nelson, K. A., Bentruide, W. G. Stser, W. N. e Hutchinson, J. P., "The question of chair-twist equilibria for the phosphate rings of nucleoside cyclic 3',5'-monophosphates. XHNMR and x-ray crystallographic study of the diastereomers of thymidine phenyl cyclic 3',5'-monophosphate". *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 4058-4064; Nerbonne, J. M., Richard, S., Nargeot, J. e Lester, H.A. "New photoactivatable cyclic nucleotides produce intracellular jumps in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations". *Nature* **1984**, 301, 74-76; Neumann, J. M., Herv, M., Debouzy, J. C., Guerra, F. I., Gouyette, C., Dupraz, B. e Huynh-Dinh, T., "Synthesis and transmembrane transport studies by NMR of a glucosyl phospholipid of thymidine", *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4270-4277; Ohno, R., Tatsumi, N., Hirano, M., Imai, K. Mizoguchi, H., Nakamura, T., Kosaka, M., Takatuski, K., Yamaya, T., Toyama

K. , Yoshida, T., Masaoka, T., Hashimoto, S., Ohshima, T., Kimura, I., Yamada, K. e Kimura, J. "Treatment of myelodysplastic syndromes with orally administered 1- β -D-arabinouranosylcytosine-5'-stearylphosphate". Oncology **1991**, 48, 451-455. Palomino, E., Kessle, D. e Horwitz, J. P. "A dihydropyridine carrier system for sustained delivery of 2',3'-dideoxynucleosides to the brain". J. Med. Chem. **1989**, 32, 22-625; Perlkins, R. M., Barney, S. Wittrock, R., Clark, P. H., Levin, R., Lambert, D. M., Petteway, S. R., Serafinowska, H. T., Bailey, S. M., Jackson, S., Harden, M. R. Ashton, R., Sutton, D., Harvey, J.J. e Brown, A.G. "Activity of BRL47923 and its oral prodrug, SB203657A against a rauscher murine leukemia virus infection in mice". Antiviral Res. **1993**, 20 (Suppl. I), 84; Piantadosi, C., Marasco, C. J., Jr., Norris-Natschke, S. L., Meyer, K. L., Gumus, F., Surles, J. R., Ishaq, K. S., Kucera, L. S., Iyer, N. , Wallen, C. A., Piantadosi, S. e Modest, E. J., "Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-VIH-1 activity", J. Med. Chem. **1991**, 34, 1408-1414; Pompon, A., Lefebvre, I., Imbach, J. L., Kahn, S. e Farquhar, D., "Decomposition pathways of the mono- and bis (pivaloyloxymethyl) esters of azidothymidine-5'-monophosphate in cell extract and in tissue culture medium; an application of the 'on-line ISRP-cleaning HPLC technique". Antiviral Chem. Chemother. **1994**, 5, 91-98; Postemark, T. "Cyclic AMP and cyclic GMP". Annu. Rev. Pharmacol. **1974**, 14, 23-33; Prisbe, E. J., Martin, J. C. M., McGhee, D. P. C., Barker, M. F., Smee, D. F., Duke, A.E., Matthews, T. R. e Verheyden, J. P. J. "Synthesis and antiherpes virus activity of phosphate and phosphonate derivatives of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine". J. Med. Chem. **1986**, 29, 671-675; Pucch, F., Gosselin, G., Lefebvre, I., Pompon, a., Aubertin, A. M. Dirn, e Imbach, J. L. "Intracellular delivery of nucleoside monophosphate

through a reductase-mediated activation process". Antiviral Res. **1993**, 22, 155-174; Pugaeva, V. P., Klochkeva, S. I., Mashbits, F. D. e Eizengart, R. S. "Toxicological assessment and health Standard ratings for ethylene sulfide in the industrial atmosphere". Gig. Trf. Prof. Zabol. **1969**, 14, 47-48 (Chem. Abstr. 72, 212); Robins, R. K. "The potential of nucleotide analogs as inhibitors of Retro viruses and tumors". Pharm. Res. **1984**, 11-18; Rosowsky, A., Kim. S. H., Ross e J. Wick, M. M. "Lipophilic 5'-(alkylphosphate) esters of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine and its N⁴-acyl and 2,2'-anhydro-3'-O-acyl derivatives as potential prodrugs". J. Med. Chem. **1982** 25, 171-178; Ross, W. "Increased sensitivity of the walker turnout towards aromatic nitrogen mustards carrying basic side chains following glucose pretreatment". Biochem. Pharm. **1961**, 8, 235-240; Ryu, E. K., Ross, R. J. Matsushita, T., MacCoss, M., Hong, C. I. e West, C.R. "Phospholipid-nucleoside conjugates. 3. Synthesis and preliminary biological evaluation of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine 5'-diphosphate[-],2-diacylglycerols". J. Med. Chem. **1982**, 25, 1322-1329; Saffhill, R. e Hume, W.J. "The degradation of 5-iododeoxyuridine and 5-bromoethoxyuridine by serum from different sources and its consequences for the use of these compounds for incorporation into ADN". Chem. Biol. Interact. 1986, 57, 347-355; Saneyoshi, M., Morozumi, M., Kodama, K., Machida, J., Kuninaka, A. e Yoshino, H., "Synthetic nucleosides and nucleotides. XVI. Synthesis and biological evaluations of a series of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine 5'-alky or arylphosphates". Chem. Pharm. Bull. **1980**, 28, 2915-2923; Sastry, J. K., Nehete, P. N., Khan, S., Nowak, B. J., Plunkett, W., Arlinghaus, R. B. e Farquhar, D. "Membrane-permeable dideoxyuridine 5'-monophosphate analogue inhibits human immunodeficiency virus infection". Mol. Pharmacol. **1992**, 41, 441-445; Shaw,

J. P., Jones, R. J., Arimilli, M. N., Louie, M. S., Lee, W. A. e Cundy, K. C. "Oral bioavailability of PMEA from PMEA prodrugs in male Sprague-Dawley rats". 9th Annual AAPS Meeting, 1994, San Diego, CA (Resumo). Shuto, S., Ueda, S., Imamura, S., Fukukawa, K., Matsuda, A. e Ueda, T. "A facile one-step synthesis of 5'phosphatidiyl nucleosides by an enzymatic two-phase reaction". Tetrahedron Lett. **1987**, 28, 199-202; Shuto, S., Itoh, H., Ueda, S., Imamura, S., Fukukawa, K., Tsujino, M., Matsuda, A. e Ueda, T., Pharm. Bull. **1988**, 36, 209-217. Um exemplo de um grupo de pró-fármacos de fosfato útil é o grupo S-acil-2-tioetil, também chamado "SATE".

IV. Terapia Combinada ou Alternada

Foi reconhecido que as variações do VHB resistentes ao fármaco podem surgir após um tratamento prolongado com um agente antiviral. A resistência ao fármaco ocorre mais frequentemente por mutação de um gene que codifica uma enzima usada no ciclo de vida viral, e mais frequentemente no caso do VHB, a polimerase do ADN. Recentemente, foi demonstrado que a eficácia de um fármaco contra uma infecção por VHB pode ser prolongada, aumentada ou restaurada através da administração do composto de forma combinada ou alternada com um segundo, terceiro, quarto, etc. composto antiviral que induz uma mutação diferente da causada pelo fármaco inicial. Em alternativa, a farmacocinética, a biodistribuição ou outro parâmetro do fármaco pode ser alterado por terapia combinada ou alternada. As dosagens irão depender de fatores como taxas de absorção, biodistribuição, metabolismo e excreção para cada fármaco, assim como de outros fatores conhecidos dos especialistas na área. Deve salientar-se que os valores de dosagem irão também variar com a severidade da condição a ser aliviada. Deve ser também compreendido que para qualquer indivíduo em

particular, os regimes de dosagem específicos e horários devem ser ajustados com o tempo, de acordo com a necessidade individual e a decisão profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições. Os exemplos de faixas de dosagem para compostos anti-VHB podem ser encontrados na literatura científica e em "Physicians Desk Reference". Muitos dos exemplos de faixas de dosagem adequadas para outros compostos aqui descritos, são também encontrados na literatura pública ou podem ser identificados no uso de procedimentos conhecidos. Estas faixas de dosagens podem ser modificadas conforme desejado para alcançar um resultado desejado.

Em geral, durante a terapia combinada, as dosagens efetivas de dois ou mais agentes são administrados em conjunto, enquanto na terapia alternada, uma dosagem efetiva de cada agente é administrada em série. Na terapia alternada, por exemplo, um ou mais primeiros agentes podem ser administrados numa quantidade efetiva por um período de tempo efetivo para tratar a infecção viral, e então um ou mais segundos agentes substituem os primeiros agentes na rotina da terapia e de forma semelhante são fornecidos numa quantidade efetiva por um período de tempo efetivo. Em geral, a terapia combinada é normalmente preferencial sobre a terapia alternada, porque induz pressões múltiplas simultâneas no vírus.

Em qualquer uma das formas de realização aqui descritas, se o β -L-2'-nucleosídeo da presente invenção é administrado combinado ou alternado, com um segundo nucleosídeo ou inibidor da transcriptase reversa do não nucleosídeo que é fosforilado a uma forma ativa, é preferível que um segundo composto seja fosforilado por uma enzima diferente da que

fosforila o β -L-2'-desoxinucleosídeo selecionado da presente invenção *in vivo*. Os exemplos de enzimas de quinase são timidina quinase, citosina quinase, guanosina quinase, adenosina quinase, desoxicitidina quinase, 5'-nucleotidase e desoxiguanosina quinase.

A atividade viral anti-hepatite B contra a estirpe do tipo feroz ou resistente de VHB, dos β -L-2 desoxinucleosídeos aqui fornecidos, em particular β -L- 2'-dC ou β -L-2'-dT, ou os sais, ésteres, fosfatos ou pró-fármacos farmaceuticamente aceitáveis destes compostos, pode ser aperfeiçoada através da administração de dois ou mais destes nucleosídeos combinados ou alternados. Em alternativa, por exemplo, um ou mais dos β -L-2'-desoxinucleosídeos aqui fornecidos, em particular o β -L-2'-dC ou β -L-2'-dT, podem ser administrados combinados e/ou alternados com um ou mais outros compostos que apresentam ação contra o vírus da hepatite B. Exemplos não limitativos incluem FTC, L-FMAU, DAPD, DXG, fanciclovir, penciclovir, BMS-200475, bis pom PMEA (adefovir, dipivoxil), lobucavir, ganciclovir, tenofovir, Lfd4C, foscamet (trissódiofosfonoformato), isoprinosina, levamizol, N-acetilcistina (NAC), interferon, interferon peguilado, ribavirina, PC1323 ou ácido poliadenocíclico ou poliuridílico. Numa forma de realização, os β -L-2'-desoxinucleosídeos aqui fornecidos, em particular β -L-2'-dC ou β -L-2'-dT, podem ser administrados combinados e/ou alternados com 3TC.

Exemplos de agentes que foram identificados como sendo ativos contra o vírus da hepatite B, e portanto podem ser usados combinados e/ou alternados com a composição da presente invenção, incluem:

Nome do fármaco	Classe do fármaco	Companhia	Estado na FDA
Intron A (interferon α -2b)	Interferon	Schering-Plough	Aprovada pela FDA
Epivir-VHB (lamivudina, 3TC)	Análogo de nucleosídeo	GlaxoSmithKline	Aprovada pela FDA
Adefovir dipivoxil	Análogo de nucleotídeo	Gilead Sciences	Aprovada pela FDA
Coviracil (emtricitabina; FTC)	Análogo de nucleosídeo	Gilead Sciences	Fase III
Entecavir	Análogo de nucleosídeo	Bristol-Myers Squibb	Fase III
Clevudina (L-FMAU)	Análogo de nucleosídeo	Gilead Sciences	Fase II
ACH 126, 443 (L-Fd4C)	Análogo de nucleosídeo	Achillion Pharmaceuticals	Fase II
AM 365	Análogo de nucleosídeo	Amrad	Fase II (Ásia e Austrália)
DAPD	Análogo de nucleosídeo	Gilead Sciences	Fase II
LdT (telbavudina)	Análogo de nucleosídeo	Idenix	Fase II
XTL 001	Anticorpo monoclonal	XTL Biopharm	Fase II (Israel)
Theradigm	Imunoestimulante	Epimmune	Fase II
Zadaxin** (timosina)	Imunoestimulante	SciClone	Fase II com Epivir-VHB
EHT 899	Proteína viral	Enzo Biochem	Fase II (Israel)
Vacina de ADN de VHB	imunoestimulante	PowderJect (UK)	Fase I
MCC 478	Análogo de nucleosídeo	Eli Lilly	Fase I (Alemanha)

VallLdC (valtocitabina)	Análogo de nucleosídeo	Idenix	Fase II
ICN 2001	Análogo de nucleosídeo	ICN	Pré-clínica
Nucleosódeos L e D fluoro	Análogo de nucleosídeo	Pharmasset	Pré-clínica
Racivir	Análogo de nucleosídeo	Pharmasset	Pré-clínica
Robustaflavona	Análogo de nucleosídeo	Advanced Life Sciences	Pré-clínica

** Zadaxin: aprovação de fármaco órfã nos Estados Unidos.

Terapias pós-exposição e/ou pós-transplante de fígado

BayHepB	Imunoglobulina de VHB	Bayer (US)	Aprovada pela FDA
Anti-hepatite B	Imunoglobulina de VHB	Cangene (Canada)	NDA submetido em 2001
Nabi-HB	Imunoglobulina de VHB	Nabi	Aprovada pela FDA

Fontes:

Hepatitis B Foundation Drug Watch. "Compounds in Development for Hepatitis B". www.hepb.org, Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. Mark Nelson, MD. Destaques selecionados de "Drug Development for Antiretroviral Therapies", 2001 (Hep DART 2001) de 16 a 20 de dezembro de 2001, Maui, Hawaii; Destaques selecionados de "American Association for the Study of Liver Diseases", 52nd Annual Meeting (52nd AASLD), de 9 a 13 de novembro de 2001. Dallas, Texas; "Report on Hepatitis B" de Digestive Disease Week 2001; de 20 a 23 de maio de 2001, Atlanta, Georgia.

Numa forma de realização, o 2'-desoxi-β-L-eritropentofuranonucleosídeo é administrado alternado ou

combinado com um ou mais agentes imunoestimuladores e/ou imunomoduladores, tal como citoquina TH1, em particular um interferon, preferencialmente interferon gama para o tratamento da estirpe tipo feroz ou resistente do VHB, e/ou para a supressão ou prevenção da expressão de uma estirpe resistente do VHB. Por exemplo, as sequências imunoestimuladoras podem ser usadas, como as aqui descritas acima, assim como em: Krieg e outros (1989) *J. Immunol.* 143:24482451; Tokunaga e outros (1992) *Microbiol. Immunol.* 36:55-66; Kataoka e outros (1992) *Jpn' J. Cancer Res.* 83:244-247; Yamamoto e outros (1992) *J. Immunol.* 148:4072-4076; Mojckik e outros (1993) *Clin. Immuno. e Immunopathol.* 67:130-136; Branda e outros (1993) *Biochem. Pharmacol.* 45:2037-2043; Pisetsky e outros (1994) *Life Sei.* 54(2):101-107; Yamamoto e outros (1994a) *Antisense Research and Development.* 4:119-122; Yamamoto e outros (1994b) *Jpn. J. Cancer Res.* 85:775-779; Raz e outros (1994) *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 91:9519-9523; Kimura e outros (1994) *J. Biochem. (Toquio)* 116:991-994; Krieg e outros (1995) *Nature* 374:546549; Pisetsky e outros (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sei.* 772:152-163; Pisetsky (1996a) *J. Immunol.* 156:421-423; Pisetsky (1996b) *Immunity* 5:303-310; Zhao e outros (1996) *Biochem. Pharmacol.* 51:173-182; Yi e outros (1996) *J. Immunol.* 156:558-564; Krieg (1996) *Trends Microbiol.* 4(2):73-76; Krieg e outros (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6:133-139; Klimnan e outros (1996) *Proc. Nad. Acad. Sei. USA.* 93:2879-2883; Raz e outros (1996); Sato e outros (1996) *Science* 273:352-354; Stacey e outros (1996) *J. Immunol.* 157:2116-2122; Bailas e outros (1996) *J. Lab. Clin. Med.* 128:329338; Sonehara e outros (1996) *J. Interferon and Cytokine Res.* 16:799-803; Klimnan e outros (1997) *J. Immunol.* 158:3635-3639; Sparwasser e outros (1997) *Eur. Immunol.* 27:16711679; Roman e outros (1997);

Carson e outros (1997) *J. Exp. Med.* 186:1621-1622; Chace e outros (1997) *Clin. Immunol. and Immunopathol.* 84:185-193; Chu e outros (1997) *J. Exp. Med.* 186:1623-1631; Lipford e outros (1997a) *Eur. J. Immunol.* 27:2340-2344; Lipford e outros (1997b) *Eur. J. Immunol.* 27:3420-3426; Weiner e outros (1997) *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 94:10833-10837; Macfarlane e outros (1997) *Immunology* 91:586-593; Schwartz e outros (1997) *J. Clin. Invest.* 100:68-73; Stein e outros (1997), *Antisense Technology*, capítulo 11, páginas 241-264, C. Lichtenstein and W. Nellen, Eds., IRL Press; Wooldridge e outros (1997) *Blood* 89:29942998; Leclerc e outros (1997) *Cell. Immunol.* 179:97-106; Kline e outros (1997) *J. Invest. Med.* 45(3):282A; Yi e outros (1998a) *J. Immunol.* 160:1240-1245; Yi e outros (1998b) *Immunol.* 160:4755-4761; Yi e outros (1998c) *Immunol.* 160:5898-5906; Yi e outros (1998d) *J. Immunol.* 161:4493-4497; Krieg (1998) *Applied Antisense Oligonucleotide Technology*, capítulo 24, páginas 431-448, C. A. Stein and A. M. Krieg, Eds., Wiley-Liss, Inc.; Krieg e outros (1998a) *Trends Microbiol.* 6:23-27; Krieg e outros (1998b) *J. Immunol.* 161:2428-2434; Krieg e outros (1998c) *Proc. Nad. Acad. Sei. USA* 95:12631-12636; Spiegelberg e outros (1998) *Allergy* 53(45S): 9397; Homer e outros (1998) *Cell. Immunol.* 190:77-82; Jakob e outros (1998) *J. Immunol.* 161:3042-3049; Redford e outros (1998) *J. Immunol.* 161:3930-3935; Weeratna e outros (1998) *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 8:351-356; McCluskie e outros (1998) *J. Immunol.* 161(9):4463-4466; Grarnzinski e outros (1998) *Mol. Med.* 4:109-118; Liu e outros (1998) *Blood* 92:3730-3736; Moldoveanu e outros (1998) *Vaccine* 16:1216-1224; Brazolot Milan e outros (1998) *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 95:15553-15558; Briode e outros (1998) *Immunol.* 161:7054-7062; Briode e outros (1999) *Jnt. Arch. Allergy Immunol.* 118:453-456; Kovarik e outros (1999) *J. Immunol.* 162:1611-1617; Spiegelberg e outros (1999) *Pediatr. Pulmonol. Suppl.*

18:118-121; Martin-Orozco e outros (1999) Int. Immunol. 11:1111-1118, EP 468.520, WO 96/02555, WO 97/28259, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/37919, WO 01/68116 PCT/US01/07839, WO 99/33488, WO 99/51259 e WO 99/62923. Ver também Zimmermann e outros (1998) J. Immunol. 160:3627-3630; Krieg (1999) Trends Microbiol. 7:64-65; Patentes americanas nº 5,663,153, 5,723,335, 5,849,719, e 6,174,872. Veja também WO 99/56755, WO 00/06588, WO 00/16804, WO 00/21556, WO 00/67023 e WO 01/12223.

Foi mostrado nos modelos da marmota e do rato transgénio, que a expressão intra-hepática das citoquinas TH1 incluindo IFN gama, TNF alfa, e Interleucina 12 pode induzir uma inibição da replicação viral através de uma direcção não citolítica. (Guidotti, L. G., P. Borrow, A. Brown, H. McClary, R. Koch, e F. V. Chisari "Noncytopathic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from the hepatocyte", J. Exp. Med. 1999, 189, 1555-1564; Guo, J. T., Zhou, C. Liu, C. Aldrich, J. Saputelli, T. Whitaker, M.I. Barrasa, W. S. Mason, e C. Seeger, "Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recover from transient hepatitis B virus infections", J. Virol. 2000, 74, 1495-1505.

Numa outra forma de realização, os β -L-2'-desoxinucleosídeos fornecidos aqui, em particular o β -L-2'-dC ou β -L-2'-dT, podem ser administrados combinados e/ou alternados com um interferon, como interferon alfa ou interferon gama, fornecendo uma terapia superior em seres humanos contra o vírus da hepatite B, ou a estirpe do tipo feroz ou resistente, e/ou para a prevenção ou supressão da expressão do VHB resistente. Numa forma de realização, o interferon é administrado na forma de uma proteína, por exemplo, diretamente na veia ou artéria. Numa forma de realização alternativa da invenção, o interferon é

administrado na forma de um ácido nucléico, gene ou fragmento de gene, que é expresso pelo hospedeiro. O ácido nucléico do interferon pode ser entregue ao hospedeiro "nu", isto é, sem um vetor, ou em alternativa, pode ser entregue através de um vetor, incluindo, mas não limitado a, um vetor viral como um vetor de adenovírus. Numa forma de realização em particular da presente invenção, o imunomodulador é entregue na forma de um gene ou fragmento de gene deste, e a entrega é mediada por um adenovírus. Numa forma de realização em particular da presente invenção, o imunomodulador é interferon (tal como interferon gama) e é entregue na forma de um gene ou fragmento de gene, mediada por um adenovírus.

Numa forma de realização, o interferon é o interferon alfa, opcionalmente, interferon alfa peguilado. Numa outra forma de realização, o interferon é selecionado a partir do grupo, incluindo, mas não limitado a: interferon alfa-2a, interferon alfa-2b, interferon alfa-2a peguilado, interferon alfa-2b peguilado, ROFERON®-A (interferon alfa-2a, Roche), PEGASYS® (interferon alfa-2a peguilado, Roche), INTRON®A (Interferon alfa-2b, Schering Corporation), PEG-INTRON® (Interferon alfa-2b peguilado, Schering Corporation), interferon de consenso, INFERGEN (interferon alfacon-1) por InterMune, OMNIFERON (interferon natural) por Viragen, ALBUFERON por Human Genome Sciences, Interferon alfa oral por Amarillo Biosciences, e SuperFeron (IFN-alfa multi-subtipo humano natural, Genetrol, Inc.). Numa forma de realização alternativa, o interferon é interferon gama. Ainda numa outra forma de realização, o interferon é interferon beta, interferon gama ou interferon tau. Numa outra forma de realização, o interferon é selecionado a partir do grupo, incluindo, mas não limitado a: REBIF (interferon beta-la) por Ares-Serono, interferon

ómega por BioMedicine, interferon gama-1b por InterMune, e HuFeron (IFN-beta humano, Genetrol, Inc.).

Sequências Imunoestimuladoras

O termo "ISS" ou "sequência imunoestimuladora" conforme aqui utilizado, refere-se a sequências de polinucleotídeos, individuais e/ou em complexos com MC, que produzem uma resposta imune mensurável conforme medido *in vitro*, *in vivo* e/ou *ex vivo*. Os exemplos de respostas imunes mensuráveis incluem, mas não estão limitados, à produção de anticorpos específicos para抗原, secreção de citoquinas, ativação ou expansão de populações de linfócitos como células NK, linfócitos CD4+T, linfócitos CD8+T, linfócitos B e similares. Preferencialmente, as sequências ISS ativam uma resposta do tipo Th1. Um polinucleotídeo para utilização na invenção contém pelo menos uma ISS. Conforme aqui utilizado, ISS é também um termo aplicado a um polinucleotídeo contendo ISS.

Um polinucleotídeo compreendendo uma ISS (ou uma composição compreendendo tal polinucleotídeo) pode ser utilizado nos métodos e composições aqui divulgados. O polinucleotídeo imunomodulador pode conter pelo menos uma ISS ou múltiplas ISSs. As ISSs podem estar adjacentes ao polinucleotídeo ou podem ser separadas por bases de nucleotídeos dentro do polinucleotídeo. Alternativamente, múltiplas ISSs podem ser distribuídas como polinucleotídeos individuais.

A ISS tem sido descrita na área e pode ser prontamente identificada através de ensaios padrão que indicam os diversos aspectos da resposta imune, como secreção de citoquina, produção de anticorpos, ativação de célula NK e proliferação de célula T. Ver, por exemplo, WO 97/28259; WO 98/16247; WO 99/11275; Krieg e outros (1995); Yamamoto e

outros (1992); Bailas e outros (1996); Klinman e outros (1997); Sato e outros (1996); Pisetsky (1996a); Shimada e outros (1986); Jpn. Cancer Res. 77:808-816; Cowdery e outros (1996) J. Immunol. 156:4570-4575; Roman e outros (1997) e Lipford e outros (1997a).

A ISS pode ser de um qualquer comprimento superior a 6 bases ou pares de base, e geralmente compreende as sequências 5'-citosina, guanina-3', preferencialmente superiores a 15 bases ou pares de bases, mais preferencialmente superiores a 20 bases ou pares de base em comprimento. Conforme é bem conhecido na área, a citosina da sequência 5'-citosina, guanina-3' é não metilada. Uma ISS pode também compreender a sequência 5'-purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina, C, G-3'. Uma ISS pode também compreender a sequência 5'-purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina, C, C3'. Conforme indicado nas sequências de polinucleotídeos abaixo, uma ISS pode compreender (isto é, conter um ou mais) da sequência 5'-T, C, G-3'. Em algumas formas de realização, uma ISS pode compreender a sequência 5'-C, G, pirimidina, pirimidina, C, G-3' (como 5'-CGTCG-3'). Em algumas formas de realização, uma ISS pode compreender a sequência 5'-C, G, pirimidina, pirimidina, C, G, purina, purina-3'. Em algumas formas de realização, uma ISS compreende a sequência 5'-purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina-3' (como 5'-AACGTT-3').

Em algumas formas de realização, uma ISS pode compreender a sequência 5'-purina, T, C, G, pirimidina, pirimidina-3'.

Em algumas formas de realização, um polinucleotídeo contendo ISS é inferior a cerca de qualquer um dos seguintes comprimentos (em bases ou pares de base): 10.000; 5.000; 2.500; 2.000; 1.500; 1.250; 1.000; 750; 500; 300;

250; 200; 175; 150; 12 5; 10 0; 75; 50; 25; 10. Em algumas modalidades, um polinucleotídeo contendo ISS é superior a cerca de qualquer um dos seguintes comprimentos (em bases ou pares de base): 8; 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1.000; 2.000; 5.000; 7.500; 10.000; 20.000; 50.000. Em alternativa, a ISS pode ser de qualquer faixa de tamanho possuindo um limite superior de 10.000; 5.000; 2.500; 2.000; 1.500; 1.250; 1.000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 50; 25 ou 10 e um limite inferior independentemente selecionado de 8; 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1.000; 2.000; 5.000; 7.500, onde o limite mais baixo é menor que o limite superior.

Em algumas formas de realização, a ISS inclui qualquer uma das seguintes sequências:

GACGCTCC; GACGTCCC; GACGTTCC; GACGCCCC; AGCGTTCC; AGCGCTCC; AGCGTCCC; AGCGCCCC; AACGTCCC; AACGCCCC; AACGTTCC; AACGCTCC; GGCGTTCC; GGCGCTCC; GGCGTCCC; GGCGCCCC; GACGCTCG; GACGTCCC; GACGCCCG; GACGTTCG; AGCGCTCG; AGCGTTGC; AGCGTCCG; GCGCCCG; AACGTCCG; AACGCCCG; AACGTTCG; AACGCTCG; GGCGTTCG; GGCGCTCG; GGCGTCCG; GGCGCCCC. Formas DE realização, o polinucleotídeo imunomodulador inclui a sequência 5'-TGACTGTGAAACGTTCGAGATGA-Y (ID de SEQ nº 1).

Em algumas formas de realização, a ISS inclui qualquer uma das seguintes sequências:

GACGCU, GACGUC, GACGUU, GACGUT, GACGTU, AGCGUU, AGCGCU, AGCGUC, AGCGUT, AGCGTU, AACGUC, AACGUU, AACGCU, AACGUT, AACGTU, GGCGUU, GGCGCU, GGCGUC, GGCGUT, GGCGTU.

Em algumas formas de realização, a ISS inclui qualquer uma das seguintes sequências:

GABGCTCC; GABGTCCC; GABGTTCC; GABGCCCC; AGBGTTCC; AGBGCTCC;
AGBGTCCC; AGBGCCCC; AABGCTCC; AABGCCCC; AABGTTCC; AABGCTCC;
GGBGTTCC; GGBGCTCC; GGBGTCCTC; GGBGCCCC; GABGCTCG; GABGTCCG;
GABGCCCG; GABGTTCG; AGBGCTCG; AGBGTTCG; AGBGTCCG; GBGCCCCG;
AABGTCCG; AABGCCCG; AABGTTCG; AABGCTCG; GGBGTTCG; GBGCTCG;
GGBGTCCG; GGBGCCCG; GABGCTBG; GABGTCBG; GABGCCBG; GABGTTBG;
AGBGCTBG; AGBGTTBG; AGBGTCBG; AGBGCCBG; AABGTCBG; AABGCCBG;
AABGTTBG; AABGCTBG; GGBGTTBG; GGBGTCBG; GGBGTCBG; GGBGCCBG,
onde B é 5-bromocitosina.

Em algumas formas de realização, a ISS inclui qualquer uma das seguintes sequências:

GABCUCC; GABGUCCC; GABGUTCC; GABGTUCC; GABGUUCC; GBGUUCC;
AGBGTUCC; AGBGUTCC; AGBGUUCC; AGBGUCCC; AABGUUCC; ABGUUCC;
AABGUTCC; AABGTUCC; AABGUUCC; GGBGUUCC; GGBGUTCC; GBGTUCC;
GGBGUUCC; GGBGUCCC; GABGCUCG; GABGUCCG; GABGUUCG; ABGUTCG;
GABGTUCG; AGBGCUCG; AGBGUUCG; AGBGUTGC; AGBGTUCG; AGBGUCCG;
AABGUCCG; AABGUTCG; AABGTUCG; AABGCUCG; GGBGUUCG; GGBGUTCG;
GGBGTUCG; GGBGCUCG; GABGTUBG; AGBGCUBG; AGBGUUBG; AGBGUCBG;
AGBGUTBG; AGBGTUBG; AABGUCBG; AABGUUBG; AABGUTBG; AABGTUBG;
AABGCUBG; GGBGUUBG; GGBGUTBG; GGBGTUBG; GGBGCUBG; GGBGUCBG,
onde B é 5-bromocitosina.

Em outras modalidades, a ISS comprehende qualquer uma das sequências:

5'-TGACCGTGAAACGTTGAGATGA-3'; 5'-TCATCTCGAACGTTCCACAGTCA-
3'; 5'-TGACTGTGAACGTTCCAGATGA-3'; 5'-
TCCATAACGTTCGCCTAACGTTGTC-3';
5'-TGACTGTGAABGTTCCAGATGA-3', onde B é 5-bromocitosina,
5'-TGACTGTGAABGTTGAGATGA-3', onde B é 5-bromocitosina e
5'-TGACTGTGAABGTTBGAGATGA-3', onde B é 5-bromocitosina.

Uma ISS, ou polinucleotídeo contendo ISS, pode conter modificações. As modificações de ISS incluem uma qualquer

reconhecida na área, mas não estão limitadas a, modificações do grupo 3'-OH ou 5'-OH, modificações da base de nucleotídeo, modificações da componente açúcar e modificações do grupo fosfatam. Os exemplos de tais modificações são descritos abaixo.

Uma ISS pode ser um ADN de filamento simples ou de filamento duplo, assim como um ARN de filamento simples ou duplo ou outros polinucleotídeos modificados. Uma ISS pode ou não incluir uma ou mais regiões palindrómicas, que podem estar presentes nos motivos descritos acima ou podem estender-se para além do motivo. Uma ISS pode compreender sequências de Ranking adicionais, algumas das quais são aqui descritas. Uma ISS pode conter bases que ocorrem naturalmente ou modificadas, que não ocorrem naturalmente, e podem conter açúcar, fosfato e/ou terminações modificadas. Por exemplo, modificações de fosfatos incluem, mas não estão limitadas a, fosfonato de metila, fosforotioato, fosforamidato (ligando e não ligando), fosfotriester e fosforoditioato e podem ser utilizadas em qualquer combinação. Outras ligações não fosfato podem ser também utilizadas. Os oligonucleotídeos podem compreender cadeias principais de fosforotioato. As modificações de açúcar conhecidas na área, como análogos de 2'-alcoxi-ARN, análogos de 2'-amino-ARN e quimeras de 2'-alcoxi- ou amino-ARN/ADN e outras aqui descritas, podem ser também produzidas e combinadas com qualquer modificação de fosfato. Exemplos de modificações de base incluem, mas não estão limitados a, adição de uma metade que capta elétron ao C-5 e/ou C-6 de uma citosina da ISS (por exemplo, 5-bromocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-iodocitosina).

A ISS pode ser sintetizada utilizando-se áreas e equipamento de síntese de ácido nucléico que são bem

conhecidos na área incluindo, mas não limitados a, métodos enzimáticos, métodos químicos e à degradação de sequências de oligonucleotídeos maiores. Ver, por exemplo, Ausubel e outros (1987); e Sambrook e outros (1989). Quando unidas enzimaticamente, as unidades individuais podem ser ligadas, por exemplo, com uma ligase como ADN T4 ou ARN ligase. Patente americana nº 5,124,246. A degradação do oligonucleotídeo pode ser atingida através da exposição de um oligonucleotídeo a uma nuclease, conforme a Patente americana nº 4,650,675.

A ISS pode ser também isolada utilizando-se os procedimentos de isolamento de polinucleotídeo convencionais. Tais procedimentos incluem, mas não estão limitados a, hibridização de marcadores da bibliotecas genómica ou cADN para detectar sequências de nucleotídeo compartilhadas, seleção de anticorpos de bibliotecas de expressão para detectar características estruturais compartilhadas e sínteses de sequências nativas particulares pela reação em cadeia de polimerase.

A ISS circular pode ser isolada, sintetizada através de métodos recombinantes ou quimicamente sintetizada. Seja a ISS circular obtida através de isolamento ou através de métodos recombinantes, a ISS será preferencialmente um plasmídeo. A síntese química de oligonucleotídeos circulares menores pode ser executada utilizando-se qualquer método descrito na literatura. Ver, por exemplo, Gao e outros (1995) Nucleic Acids Res. 23:2025-2029 e Wang e outros (1994) Nucleic Acids Res. 22:2326-2333.

As técnicas para a produção de oligonucleotídeos e oligonucleotídeos modificados são conhecidas na área. O ADN ou ARN que ocorrem naturalmente, contendo ligações de

fosfodiéster, são geralmente sintetizados pela ligação sequencial do fosforamidito nucleosídeo ao grupo 5'-hidroxi do oligonucleotídeo em crescimento fixado a um suporte sólido na extremidade 3', seguido pela oxidação do triéster de fosfato a um triéster de fosfato. Uma vez que a sequência de oligonucleotídeo desejada foi sintetizada, o oligonucleotídeo é removido do suporte, os grupos triéster de fosfato são desprotegidos para diéster de fosfato e as bases nucleosídeo são desprotegidas utilizando-se amônia aquosa ou outras bases. Ver, por exemplo, Beaucage (1993) "Oligodeoxyribonucleotide Synthesis" em *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, ed.) Humana Press, Totowa, NJ; Warner e outros (1984) ADN 3:401 Patente americana nº 4,458,066.

A ISS pode também conter oligonucleotídeos de fosfato modificado. A síntese de polinucleotídeos com ligações de fosfato modificado ou ligações de não fosfato é também conhecida na área. Para uma revisão ver Matteucci (1997) "Oligonucleotide Analogs: an Overview" em *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*, (D. J. Chadwick e G. Cardew, ed.) John Wiley and Sons, New York, NY. O derivado de fósforo (ou grupo fosfato modificado) que pode ser fixado ao açúcar ou metade análoga de açúcar nos oligonucleotídeos da presente invenção podendo ser um monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfonato, fosforoditioato ou similar. A preparação dos análogos observados acima e sua incorporação nos nucleotídeos, nucleotídeos modificados e oligonucleotídeos, por si própria, é também conhecida e não necessita ser aqui descrita em detalhes. Peyrottes e outros (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:1841-1848; Chaturvedi e outros (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:2318-2323 e Schultz e outros (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:2966-2973. Por exemplo, a síntese de oligonucleotídeos de fosforotioato é similar à

descrita acima para oligonucleotídeos que ocorrem naturalmente, exceto que a etapa de oxidação é substituída por uma etapa de sulforização (Zon (1993) "Oligonucleoside Phosphorothioates" em *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, ed.) Humana Press, pp. 165-190). De forma similar, a síntese de outros análogos de fosfato, como fosfotriéster (Miller e outros (1971) *JACS* 93:6657-6665), fosforamidatos de não ligação (Jager e outros (1988) *Biochem.* 27:7247-7246), fosforamidatos N3' a P5' (Nelson e outros (1997) *JOC* 62:7278-7287) e fosforoditioatos (Patente americana nº 5,453,496) foram também descritos. Outros oligonucleotídeos modificados não baseados em fósforo podem ser também utilizados (Stirchak e outros (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:6129-6141). Os oligonucleotídeos com cadeias principais de fosforotioato podem ser mais imunogénicos que aqueles com cadeias principais de fosfodiéster e parecem ser mais resistentes à degradação após a injeção no hospedeiro. Braun e outros (1988) *J Immunol.* 141:2084-2089 e Latimer e outros (1995) *Mol. Immunol.* 32:1057-1064.

Os polinucleotídeos contendo ISS utilizados na invenção podem compreender ribonucleotídeos (contendo a ribose como o único ou principal componente de açúcar), desoxirribonucleotídeos (contendo a desoxirribose como o principal componente de açúcar) ou, conforme conhecido na área, os açúcares modificados ou análogos de açúcar podem ser incorporados na ISS. Assim, em adição à ribose e desoxirribose, a metade de açúcar pode ser pentose, desoxipentose, hexose, desoxihexose, glucose, arabinose, xilose, lixose e um grupo ciclopentil "análogo" de açúcar. O açúcar pode estar sob a forma de piranosil ou de furanosil. Na ISS, a metade açúcar é, preferencialmente, o furanosídeo de ribose, desoxirribose, arabinose ou 2'-O-

alquil-ribose e o açúcar pode ser fixado às bases heterocíclicas respectivas em uma configuração α - ou β -anomérica. As modificações de açúcar incluem, mas não estão limitadas a, análogos de 2'-alcoxi-ARN, análogos de 2'-amino-ARN e quimeras de 2'-alcoxi- ou amino-ARN/ADN. A preparação destes açúcares ou análogos de açúcar e os respectivos "nucleosídeos" onde tais açúcares ou análogos são fixados a uma base heterocíclica (base de ácido nucléico) por si mesma é conhecida e não precisa ser aqui descrita, exceto no ponto de que para tal preparação pode ser pertinente em qualquer exemplo específico. As modificações de açúcar podem ser também produzidas e combinadas a qualquer modificação de fosfato na preparação de uma ISS.

As bases heterocíclicas, ou bases de ácido nucléico, que estão incorporadas na ISS, podem ser bases principais de purina e pirimidina que ocorrem naturalmente (isto é, uracila ou timina, citosina, adenina ou guanina, conforme mencionado acima) assim como ocorrências naturais ou modificações sintéticas das referidas bases principais.

Os especialistas na área reconhecerão que um grande número de nucleosídeos não naturais "sintéticos" compreendendo diversas bases heterocíclicas e diversas metades açúcar (e análogos de açúcar), estão disponíveis na área e que desde que outros critérios da presente invenção sejam satisfeitos, a ISS pode incluir uma ou diversas bases heterocíclicas que não os cinco componentes principais de base de ácidos nucléicos de ocorrência natural. Preferencialmente, entretanto, a base heterocíclica da ISS inclui, mas não está limitada a, grupos uracil-5-il, citosina-5-il, adenina-7-il, adenina-8-il, guanina-7-il, guanina-8-il, 4-amino-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il, 2-

amino-4-oxopirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il, 2-amino-4-oxopirrolo[2,3-d]pirimidin-3-il, onde as purinas são ligadas à metade açúcar da ISS através da posição 9, as pirimidinas através de posição 1, as pirrolopirimidinas através da posição 7 e as pirazolopirimidinas através da posição 1.

A ISS e/ou IMP pode compreender pelo menos uma base modificada conforme descrito, por exemplo, no Pedido Internacional comumente cedido WO 99/62923. Conforme aqui utilizado, o termo "base modificada" é sinónimo "análogo de base", por exemplo, "citosina modificada" é sinónimo do "análogo de citosina". De forma similar, nucleosídeos ou nucleotídeos "modificados" são aqui definidos como sendo sinónimos aos "análogos" de nucleosídeo ou nucleotídeo. Exemplos de modificações de base incluem, mas não estão limitados a, adição de uma metade que capta elétron ao C-5 e/ou C-6 de uma citosina da ISS. Preferencialmente, a metade que capta o eletrão é um halogénio. As citosinas modificadas podem incluir, mas não estão limitadas a, azacitosina, 5-bromocitosina, 5-clorocitossina, citosina clorinada, ciclocitosina, citosina arabinosídeo, 5-fluorocitosina, fluoropirimidina, 5,6-dihidrocitosina, 5-iodocitosina, 5-nitroxitosina, 5-hidroxicitosina e qualquer outro análogo de pirimidina ou pirimidina modificada. Uracilas modificadas preferenciais são modificadas em C-5 e/ou C-6, preferencialmente com um halogénio e incluem, não estão limitados a, bromouracil como 5-bromouracil, clorouracil como 5-clorouracil, fluorouracil como 5-fluorouracil, iodouracil como 5-iodouracil e hidroxiuracil. Ver também, Kandimalla e outros, 2001, *Bioorg. Med. Chem.* 9:807-813. Ver, por exemplo, o Pedido de Patente Internacional nº WO 99/62923. Outros exemplos de modificações de base incluem a adição de um ou mais grupos

tiol à base, incluindo, mas não limitados a, 6-tio-guanina, 4-tio-timina e 4-tiouracil. Adicionalmente, alguns IMPs podem compreender bases modificadas, como 7-desazaguanosina, no lugar de qualquer resíduo de guanosina, ou uma citosinamodificada, selecionada a partir de N4-etilcitosina ou N4-metilcitosina no lugar de qualquer resíduo de citosina, incluindo a citosina de 5'-CG-3'.

A preparação de nucleosídeos de base modificada e a síntese de oligonucleotídeos modificados utilizando-se os referidos nucleosídeos de base modificada como precursores foi descrita, por exemplo, nas Patentes americanas nº 4,910,300, 4,948,882 e 5,093,232. Estes nucleosídeos de base modificada foram projetados de forma que os mesmos consigam ser incorporados por síntese química em posições terminais ou internas de um oligonucleotídeo. Tais nucleosídeos de base modificada, presentes em posições terminais ou internas de um oligonucleotídeo, podem servir como pontos de ligação de um peptídeo ou outro antigénio. Os nucleosídeos modificados nas suas metades de açúcar foram também descritos (incluindo, mas não limitado, por exemplo, às Patentes americanas nº 4,849,513, 5,015,733, 5,118,800, 5,118,802) e podem ser utilizados de forma similar.

A ISS utilizada nos métodos da invenção pode ser produzida como complexo microportador de ISS. Os complexos microportador de ISS compreendem polinucleotídeos contendo ISS ligadaos a um microportador (MC). OS complexos ISS-MC compreendem uma ISS ligada à superfície de um microportador (isto é, a ISS não está encapsulada no MC), absorvida no interior de um microportador (por exemplo, absorvida em contas de PLGA) ou encapsulada no interior de um MC (por exemplo, encapsulada no interior de lipossomos).

Os oligonucleotídeos contendo ISS ligados a micropartículas (contas SEPHAROSE®) possuem atividade imunoestimuladora *in vitro* (Liang e outros, (1996), J Clin. Invest. 98:1119-1129). Entretanto, resultados recentes mostram que oligonucleotídeos contendo ISS ligadas a ouro, látex e partículas magnéticas não são possuem ação para estimular a proliferação de células 7TD1, que se proliferaram em resposta aos oligonucleotídeos contendo ISS (Manzele outros, (1999) Antisense Nucl. Acid Drug Dev. 9:459-464).

Os microportadores não são solúveis em água pura e possuem menos de 50 a 60 μ m em tamanho, preferencialmente menos que cerca de 10 μ m em tamanho, mais preferencialmente cerca de 10 μ m, 25nm a cerca de 5 μ m, 50nm a cerca de 4,5 μ m ou 1,0 μ m a cerca de 2,0 μ m de tamanho. Os microportadores podem possuir uma qualquer forma, como esférica, elipsoidal, em bastões e similares, embora sejam normalmente preferenciais os microportadores esféricos. Os microportadores preferenciais possuem tamanhos de ou cerca de 50nm, 200nm, 1 μ m, 1,2 μ m, 1,4 μ m, 1,5 μ m, 1,6 μ m, 1,8 μ m, 2,0 μ m, 2,5 μ m ou 4,5 μ m. O "tamanho" de um microportador é geralmente o "tamanho do desenho" ou o tamanho pretendido para as partículas, declarado pelo fabricante. O tamanho pode ter uma dimensão aferida diretamente, como um diâmetro médio ou máximo, ou pode ser determinado por um ensaio indireto, como um ensaio de seleção por filtragem. A medição direta do tamanho do microportador é normalmente realizada por microscopia, geralmente microscopia leve ou microscopia de varredura de elétron (SEM), em comparação a partículas de tamanhos conhecidos ou por referência a um micrómetro. À medida que surgem variações menores no tamanho durante o processo de fabrico, os microportadores são considerados como sendo do tamanho declarado, se as medidas mostrarem que os

microportadores possuem \pm cerca de 5% a 10% da medição declarada. As características do tamanho podem ser também determinadas pela difusão de luz dinâmica. Em alternativa, o tamanho do microportador pode ser determinado através ensaios de seleção por filtragem. Um microportador é menor que um tamanho declarado se, pelo menos 97% das partículas passam através de um filtro "em tela" (isto é, um filtro no qual as partículas retidas ficam à superfície do filtro, como filtros de policarbonato ou poliétersulfona, ao contrário de um filtro "de profundidade", no qual as partículas retidas se acumulam no interior do filtro) do tamanho declarado. Um microportador é maior que o tamanho declarado se pelo menos cerca de 97% das partículas de microportador são retidas por um filtro em tela do tamanho declarado. Assim, pelo menos 97% dos microportadores de cerca de 10 nm a cerca de 10 nm em tamanho passam através de um filtro de poro em tela de 10 μm e ficam retidas por um filtro de tela de 10 nm.

Como a discussão acima indica, a referência a um tamanho ou faixa de tamanho de um microportador inclui de forma implícita, as variações aproximadas e aproximações do tamanho e/ou faixa do tamanho declarado. Isto é refletido pela utilização do termo "cerca", quando em referência a um tamanho e/ou faixa de tamanho e em referência a um tamanho ou faixa de tamanho sem referência a "cerca" não significa que 10 o tamanho e/ou faixa de tamanho seja exato(a).

Os microportadores podem ser de fase sólida (por exemplo, contas de poliestireno) ou de fase líquida (por exemplo, lipossomos, micelas ou gotículas de óleo numa emulsão de óleo e água). Os microportadores de fase líquida incluem lipossomos, micelas gotículas de óleo e outras partículas lipídicas ou baseadas em óleo. Um microportador de fase

líquida preferido é composto de gotículas de óleo em uma emulsão de óleo em água. Preferencialmente, emulsões de óleo em água utilizadas como microportadores compreendem substituintes biocompatíveis, como esqualeno. Os microportadores de fase líquida são normalmente considerados não biodegradáveis, mas microportadores de fase líquida biodegradáveis podem ser produzidos pela incorporação de um ou mais polímeros biodegradáveis na composição do microportador líquido. Numa forma de realização preferencial, o microportador consiste de gotículas de óleo em uma emulsão de óleo em água preparada pela emulsificação de esqualeno, trioleato de sorbitano, TWEEN 80® em um tampão de pH aquoso.

Os microportadores de fase sólida para utilização em complexos de microportadores de ISS podem ser produzidos a partir de materiais biodegradáveis ou materiais não biodegradáveis e podem incluir ou excluir microportadores de agarose ou de agarose modificada. Microportadores biodegradáveis de fase sólida úteis incluem, mas não estão limitados a, poliésteres biodegradáveis, como ácido poliláctico, ácido poliglicólico e copolímeros (incluindo copolímeros em bloco) dos mesmos, assim como copolímeros em bloco de ácido poliláctico e polietileno glicol, poliortoésteres, como os polímeros baseados em 3,9-dietilideno-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5,5]undecano (DETOSU), polianidridos como polímeros de polianidrido baseados em ácido sebálico, *P*-(carboxifenoxi)propano ou *P*-(carboxifenoxi)hexano, imidas de polianidrido como os polímeros de polianidrido baseados em monómeros derivados de ácido sebálico incorporando aminoácidos (isto é, ligado a ácido sebálico por ligações de imida através do nitrogénio aminoterminal) como glicina ou alanina, ésteres de polianidrido, polifosfazenos, especialmente

polifosfazenos que contêm grupos éster sensíveis à hidrólise que podem catalisar a degradação da cadeia principal do polímero através da regeneração de grupos de ácido carboxílico (Schacht e outros (1996) Biotechnol Bioeng. 1996:102) e poliamidas como ácido poliláctico-colisina. Uma ampla variedade de materiais não biodegradáveis adequados para a fabrico de microportadores é igualmente conhecida, incluindo, mas não limitados a, poliestireno, polietileno, látex, ouro e materiais ferromagnéticos e paramagnéticos. Os microportadores de fase sólida podem ser modificados de forma covalente para incorporar uma ou mais metades para utilização na ligação de ISS, por exemplo, pela adição de grupos amina para ligação covalente utilizando-se agentes de entrecruzamento reativos a amina.

Os complexos de microportadores ISS podem estar ligados de forma covalente ou não covalente. Os complexos de MC de ISS ligados de forma covalente podem ser ligados diretamente ou por uma metade de entrecruzamento de um ou mais átomos (normalmente o resíduo de um agente de entrecruzamento). A ISS pode ser modificada para permitir ou aumentar a ligação ao MC (por exemplo, pela incorporação de um sulfidril livre para entrecruzamento covalente ou adição de metades hidrofóbicas como lipídios, esteróides, esteróis como colesterol, e terpenos, para uma ligação hidrofóbica), embora a ISS não modificada possa ser utilizada para a formação de complexo de MC de ISS não covalente por interação eletrostática ou por emparelhamento de base (por exemplo, emparelhamento de base de pelo menos uma porção da ISS com um oligonucleotídeo complementar ligado ao microportador). Os polinucleotídeos contendo ISS podem estar ligados a microportadores de fase sólida ou a outras metades químicas para facilitar a formação do complexo de MC de ISS utilizando-se a tecnologia convencional conhecida

na área, como a utilização de agentes de entrecruzamento hetero-bifuncionais disponíveis (por exemplo, succimidil 4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilato ou seus sulfo-derivados para ligação covalente de um microportador derivado de amina a uma ISS modificada para conter um sulfidril livre) ou pela adição de compostos como colesterol (por exemplo, pelo método de Godard e outros (1995) Eur. J Biochem. 232:404-410), para facilitar a ligação a microportadores hidrofóbicos como gotículas de óleo em emulsões de óleo em água. Em alternativa, os nucleosídeos modificados ou nucleosídeos, como conhecidos na área, podem ser incorporados em ambas as terminações ou em posições internas na ISS. Estes podem conter grupos funcionais bloqueados que, quando desbloqueados, são reativos com uma variedade de grupos funcionais que podem estar presentes ou ligados ao microportador ou a uma metade que facilitaria a ligação a um microportador. Certas modalidades de complexos de MC de ISS ligados de forma não covalente utilizam um par de ligação (por exemplo, um anticorpo e seu antigénio cognato ou biotina e estreptavidina ou avidina), onde um membro do par de ligação está ligado à ISS e o microportador é derivado com o outro membro do par de ligação (por exemplo, ISS biotinilada e um microportador derivado de estreptavidina podem ser combinados para formar um complexo de MC de ISS ligados de forma não covalente).

Complexos de MC de ISS não covalentes ligados por ligação eletrostática normalmente exploram a carga altamente negativa da cadeia principal do polinucleotídeo. Desta forma, os microportadores para utilização em complexos de MC de ISS ligados de forma não covalente, são geralmente carregados positivamente em pH fisiológico (por exemplo, pH de cerca de 6,8 a 7,4). O microportador pode,

intrinsecamente, possuir uma carga positiva, mas os microportadores produzidos a partir de compostos que normalmente não possuem uma carga positiva podem ser derivados ou de outra forma modificados para se tornarem positivamente carregados. Por exemplo, o polímero utilizado para a produção do microportador pode ser derivado para adicionar os grupos carregados positivamente, como aminas primárias. Em alternativa, compostos carregados positivamente podem ser incorporados à composição do microportador durante o fabrico (por exemplo, tensoativos carregados positivamente podem ser utilizados durante o fabrico dos copolímeros de ácido poliláctico/ácido poliglicólico) para conferirem uma carga positiva às partículas de microportador resultantes.

As microesferas de fase sólida são preparadas utilizando-se as áreas conhecidas na área. Por exemplo, as mesmas podem ser preparadas pela área de extração/vaporização de solvente de emulsão. Geralmente, nesta área, os polímeros biodegradáveis como os polianidratos, polialquil- α -cianoacrilatos e poli(α -hidroxiesteres), por exemplo, o ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) e poli(caprolactona), são dissolvidos em um solvente orgânico adequado, como cloreto de metileno, para constituírem a fase dispersa (DP) da emulsão. A DP é emulsificada por homogeneização de alta velocidade em volume excessivo de fase contínua aquosa (CP) que contém um tensoativo dissolvido, por exemplo, álcool polivinílico (PVA) ou polivinilpirrolidona (PVP). O tensoativo em CP garante a formação de gotículas de emulsão distintas e de tamanho adequado. O solvente orgânico é então extraído na CP e subsequentemente evaporado, elevando-se a temperatura do sistema. As micropartículas sólidas são então separadas por centrifugação ou filtragem e secas, por exemplo, por

liofilização ou aplicação de vácuo, antes de serem armazenadas a 4°C.

Geralmente, para preparar microesferas catiónicas, lipídios ou polímeros catiónicos, por exemplo, 1,2-dioleil-1,2,3-trimetilamoniopropano (DOTAP), brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) ou polilisina, são adicionados ou por DP ou CP, conforme suas solubilidades nestas fases.

Podem ser determinadas as características físico-químicas como tamanho médio, distribuição de tamanho e carga de superfície de microesferas secas. As características de tamanho são determinadas, por exemplo, pela área de difusão de luz dinâmica e a carga de superfície foi determinada medindo-se o potencial zeta.

Geralmente, os polinucleotídeos contendo ISS podem ser absorvidos nas microesferas catiónicas por incubação aquosa de ISS e das partículas a 4°C durante a noite. As microesferas são caracterizadas por tamanho e carga de superfície antes e depois da associação de ISS. Os lotes selecionados podem ser então avaliados quanto à atividade conforme aqui descrito.

Um polinucleotídeo contendo ISS pode ser administrado antes, durante e/ou depois a exposição ao vírus. Um polinucleotídeo de ISS pode também ser administrado antes, durante e/ou após a infecção por um vírus. Um polinucleotídeo de ISS pode ser também administrado antes ou após o início dos sintomas de infecção viral. Desta forma, a administração de polinucleotídeo contendo ISS pode ocorrer em vários momentos em relação à exposição a, infecção por e/ou início dos sintomas por infecção por vírus. Ainda, pode haver uma ou mais administrações. Se o

polinucleotídeo contendo ISS for administrado em várias ocasiões, a ISS pode ser administrada em qualquer programação selecionada pelo médico, como diariamente, em dias alternados, a cada três dias, a cada quatro dias, a cada cinco dias, a cada seis dias, semanalmente, a cada duas semanas, mensalmente ou mesmo em intervalos maiores (que podem ou não permanecer os mesmos durante o decurso do tratamento). Quando múltiplas administrações são dadas, o polinucleotídeo contendo ISS pode ser dado em 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais administrações em separado. Geralmente, mas não necessariamente, é necessário um intervalo de pelo menos cerca de três dias para permitir que os polinucleotídeos contendo ISS atuem.

Quando o polinucleotídeo contendo ISS é administrado num indivíduo em risco de exposição ao vírus (por exemplo, antes da infecção), o polinucleotídeo contendo ISS é preferencialmente administrado menos de 14 dias antes da exposição ao vírus, preferencialmente menos de 10 dias antes da exposição ao vírus, mais preferencialmente cerca de 7 dias antes da exposição ao vírus, ainda mais preferencialmente menos que cerca de 5 dias antes da exposição ao vírus. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo contendo ISS é administrado cerca de 3 dias antes da exposição ao vírus.

Numa forma de realização adicional, o polinucleotídeo contendo ISS é administrado após a exposição ao vírus, mas antes do aparecimento dos sintomas. Preferencialmente, o polinucleotídeo contendo ISS é administrado menos de três dias após a exposição, mais preferencialmente menos de um dia, 12 horas, seis horas ou duas horas após a exposição, se o momento da exposição é conhecido ou suspeito.

Em outra modalidade, o polinucleotídeo contendo ISS é administrado após a aparição de pelo menos um sintoma de infecção viral. Por exemplo, o polinucleotídeo contendo ISS é administrado no período de 28, 21, 14, 7, 5 ou 3 dias após o aparecimento de um sintoma de infecção viral. Entretanto, alguns dos 10 indivíduos infetados, que apresentam sintomas, já se terão submetido a um ou mais cursos de tratamento com outra terapia. Em tais indivíduos ou em indivíduos que erraram ao avaliar o significado dos seus sintomas, o polinucleotídeo contendo ISS pode ser administrado em qualquer ponto da infecção que segue.

Adicionalmente, os tratamentos com um polinucleotídeo contendo ISS podem ser também empregues em conjunto com outros tratamentos ou como tratamento de "segunda linha" empregue após o fracasso de um tratamento de "primeira linha".

Os polinucleotídeos de ISS podem ser formulados de qualquer forma conhecida na área, como formulações de pó seco, semi-sólidas ou líquidas. Para administração parenteral, os polinucleotídeos de ISS são preferencialmente administrados com uma composição líquida, embora as composições sólidas ou semi-sólidas possam ser também aceitáveis, particularmente se o polinucleotídeo de ISS é formulado sob a forma de depósito de liberação lenta. Os polinucleotídeo de ISS são geralmente formulados na forma líquida ou de pó seco para administração tópica, embora formulações semi-sólidas possam ocasionalmente ser úteis.

As formulações de polinucleotídeo de ISS podem conter componentes adicionais como sais, tampões, agentes de volume, osmólitos, antioxidantes, detergentes, tensoativos e outros excipientes farmaceuticamente aceitáveis conforme

conhecido na área. Geralmente, as formulações de polinucleotídeo de ISS líquidas produzidas são em água USP para injeção e são estéreis, isotónicas e de pH tamponado a um pH fisiologicamente aceitável, como um pH de cerca de 6,8 a 7,5.

Os polinucleotídeos contendo ISS podem ser formulados em portadores de entrega como lipossomo, emulsão de óleo/água ou formulações de depósito de liberação lenta. Os métodos para composição de polinucleotídeos em tais formas são bem conhecidos na área.

As formulações de polinucleotídeo contendo ISS podem incluir ou excluir agentes imunomoduladores como adjuvantes e citoquinas imunoestimuladoras, que são bem conhecidos na área.

Uma faixa de dosagem adequada ou efetiva é aquela que proporciona a redução desejada de sintomas e/ou supressão de infecção viral e depende de diversos fatores, incluindo o vírus respiratório em particular, a sequência ISS do polinucleotídeo, peso molecular do polinucleotídeo e meio de administração. As dosagens são geralmente selecionadas pelo médico ou por outro profissional de saúde, de acordo com uma variedade de parâmetros conhecidos na área, como gravidade dos sintomas, histórico do paciente e similares. Geralmente para um polinucleotídeo contendo ISS de cerca de 20 bases, pode ser selecionada uma faixa de dosagem a partir, por exemplo, de um limite inferior selecionado independentemente, como cerca de 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 200, 300, 400 ou 500 µm/kg até um limite superior selecionado independentemente, maior que o limite inferior, de cerca de 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000,

7.000, 8.000, 9.000 ou 10.000 $\mu\text{m}/\text{kg}$. Por exemplo, uma dose pode ser de cerca de qualquer dos seguintes: 0,1 a 100 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 0,1 a 50 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 0,1 a 25 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 0,1 a 10 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 1 a 500 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 100 a 400 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 200 a 300 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 1 a 100 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 100 a 200 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 300 a 400 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 400 a 500 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 500 a 1.000 $\mu\text{m}/\text{kg}$, 500 a 5.000 $\mu\text{m}/\text{kg}$ ou 500 a 10.000 $\mu\text{m}/\text{kg}$. Geralmente, os meios parenterais de administração podem exigir dosagens maiores de ISS comparados com as aplicações mais diretas ao tecido infectado, como acontece a polinucleotídeos contendo ISS de comprimento crescente.

Os polinucleotídeos compreendendo uma ISS podem ser administrados por administração sistémica (por exemplo, parenteral) ou local (por exemplo, tópica).

Numa forma de realização, os polinucleotídeos contendo ISS são administrados de forma tópica, como na mucosa respiratória (como passagens nasais ou pulmão). As vias de administração nasofaringeal e pulmonar incluem, mas não estão limitadas a, vias intranasal, de inalação, transbronquial e transalveolar. O polinucleotídeo contendo ISS pode assim ser administrado pela inalação de aerossóis, líquidos atomizados ou pós. Os dispositivos adequados para a administração de composições contendo ISS por inalação incluem, mas não estão limitados a, nebulizadores, atomizadores, vaporizadores e inaladores dosimetrados. Nebulizadores, atomizadores vaporizadores e inaladores dosimetrados preenchidos com ou empregando reservatórios contendo formulações compreendendo o(s) polinucleotídeo(s) contendo ISS, estão entre uma variedade de dispositivos adequados para utilização no fornecimento de inalação do(s) polinucleotídeo(s) contendo ISS. Outros métodos para fornecimento à mucosa respiratória incluem o fornecimento de formulações líquidas, como gotas nasais.

Noutras formas de realização, o polinucleotídeo contendo ISS é administrado de forma parenteral. As vias parenterais de administração incluem, mas não estão limitadas a, transdérmica, transmucosa e injeção direta. A administração parenteral por injeção pode ser por qualquer via de injeção parenteral, incluindo, mas não limitada a, via intravenosa (IV), intraperitoneal (IP), intramuscular (IM), subcutânea (SC) e intradérmica (ID).

As administrações transdérmicas e transmucosas podem ser executadas, por exemplo, através da inclusão de um portador (por exemplo, dimetilsulfóxido, DMSO), pela aplicação de impulsos elétricos (por exemplo, iontoforese) ou por uma combinação destes. Diversos dispositivos estão disponíveis para administração transdérmica e que podem ser utilizados de acordo com a invenção. Devido ao fato dos vírus respiratórios afetarem as células do trato respiratório, as vias que fornecem polinucleotídeos de ISS ao trato respiratório, como por fornecimento por inalação e intranasal (discutidos acima), são consideradas vias locais de administração ao invés de vias sistémicas de administração, ainda que o fornecimento através destas vias seja normalmente considerado como administração por vias parenterais sistémicas.

As administrações IV, IP, IM e ID podem ocorrer através de administração de bolus ou infusão. Para administração SC, a administração pode ser de bolus, infusão ou por dispositivo implantável, como uma mini-bomba implantável (por exemplo, mini-bomba osmótica ou mecânica) ou implante de liberação lenta. Os polinucleotídeos ISS podem ser também ser libertados por uma composição de liberação lenta adaptada para as administrações IV, IP, IM, ID ou SC. A

administração por inalação é preferencialmente realizada em doses individuais (por exemplo, através de um inalador dosimetrado), embora seja possível atingir o fornecimento similar a uma infusão através da utilização de um nebulizador. A administração através das vias transdérmica e transmucosa pode ser contínua ou pulsátil.

Outros Agentes

Outros agentes terapêuticos que podem ser utilizados no método e composições aqui descritos, incluindo Ribavirin (Ribapharm, Inc.), imunoglobulina de hepatite B (Nabi-HB intravenosa, Nabi Pharmaceuticals), ZADAXIN™ (timosina alfa 1, SCV-07 (SciClone Pharmaceuticals), Theradigm (Epimmune), produto hiperimune anti-hepatite B (Cangene Corp), RC-529 (Corixa/Rhein Biochem), HYB2055 (Hybridon), ViroKine (proteínas antivirais humanas, Genetrol, Inc.), Levovirin (Ribapharm, Inc.), interleucina-2 (IL-2), fator alfa de necrose tumoral, interleucina 1-beta, interleucina-12 (IL-12), fator estimulante de colónia de macrófago-granulócito (GM-CSF), ácido poliadenílico e poliuridílico, timosina alfa, Ampligen® (Hemispherx BioPharma), Polyadenur™ (ARN poli A: poli U, Hemispherx BioPharms), Oragen™ (Hemispherx BioPharms), Linfócitos T citotóxicos específicos ao vírus da hepatite B (VHB) (CTL) (CellExSys, Inc.), vacina terapêutica contra hepatite B (Epimmune), vacina profilática de ADN de Hepatite B PJ (Powderject Pharmaceuticals), interleucina 4, interleucina 6, interleucina 7, fator estimulante de colónia de granulócito.

As vacinas de antigénio de superfície contra o vírus de hepatite B podem ser utilizadas nos métodos e composições da invenção aqui divulgada. Numa forma de realização, um FTC e uma vacina de antigénio de vírus de hepatite B, como

uma vacina de antigénio de superfície, são administrados combinados ou alternadamente num hospedeiro numa quantidade efetiva para o tratamento ou profilaxia de uma infecção por vírus de hepatite B, opcionalmente com outro agente terapêutico, como interferon.

Outras vacinas que podem ser administradas incluem Engerix-B® (GlaxoSmithKline), Recombivax HB® (Merck), vacina contra hepatite B (recombinante), vacina terapêutica de ADN de Hepatite B PJ (Powderject Pharmaceuticals), Hepavax-Gene® (vacina contra hepatite B de ADN recombinante, grupo BeARN Biotech), Gen H-B Vax™ (Chiron Corporation), Hepatavax-B® (Merck Sc Co.), Hevac B® (Pasteur), KGC® (Korea Green Cross), TGP 943™ (Takeda Chem, Japão), Gen Hevac B® (Pasteur, França), Bio-Hep-B™/Sci-B-Vac™ (Bio-Technology General, Israel), AG-3™, Hepagene™, Hepacare™ (Medeva, GB, Evans GB).

V. Terapia de gene

Outro aspecto da presente invenção é utilizar métodos de terapia genética *in vivo* para fornecer imunomoduladores em combinação e/ou alteARNção com β-L-2'-desoxinucleosídeo da presente invenção, com diferentes métodos de ação e/ou efeitos sinérgicos para tratar o VHB. Os métodos de terapia genética relacionam-se com a introdução de sequências de ácido nucléico (ADN, ARN e ADN e ARN antisenso) num hospedeiro, como um animal e, em particular, um ser humano, para aumentar a expressão do imunomodulador que pode estar ligado de forma operacional a um promotor e/ou quaisquer outros elementos genéticos necessários para sua dispressão pelo tecido alvo. Tais áreas e métodos para fornecimento e terapia genética são conhecidos na área. Ver, por exemplo, WO 90/11092, WO 98/11779, Patentes americanas nº 5,693,622, 5,705,151, 5,580,859, Tabata H. e outros (1997) Cardiovasc.

Res. 35(3):470-479, Chao J. e outros (1997) Pharmacol. Res. 35(6):517-522, Wolff J. A. (1997) Neuromuscul. Disord. 7 (5):314-318, Schwartz B. e outros (1996) Gene Ther. 3(5):405-411, Tsurumi Y. e outros (1996) Circulation 94(12):3281-3290.

São preferenciais as construções de vetor de polipeptídeo utilizadas no método da terapia de gene que não estejam integradas no genoma do hospedeiro ou que contenham sequências que permitam a replicação. Qualquer promotor forte, como é conhecido pelos especialistas na área, derivado da expressão do ADN, pode ser utilizado.

As construções de vetor de polipeptídeo podem ser fornecidas por qualquer método que forneça materiais injetáveis das células de um animal, como injeção no espaço intersticial dos tecidos (coração, músculo, pele, pulmão, fígado, intestino e similares). As construções de polipeptídeo podem ser fornecidas num líquido farmaceuticamente aceitável ou portador aquoso.

A construção de polipeptídeo pode ser fornecida em um espaço intersticial de tecidos em um animal, incluindo o músculo, pele, cérebro, pulmão, fígado, baço, medula óssea, timo, coração, linfa, sangue, osso, cartilagem, pâncreas, rim, vesícula biliar, estômago, intestino, testículos, ovário, útero, reto, sistema nervoso, olho, glândula e tecido conectivo. O espaço intersticial dos tecidos compreende o fluido intercelular, matriz do mucopolissacarídeo entre as fibras reticulares dos tecidos dos órgãos, fibras elásticas nas paredes de vasos ou câmaras, fibras de colágeno de tecidos fibrosos ou a mesma matriz no interior de tecido conectivo revestindo células musculares ou nas lacunas do osso. É, de forma similar, o

espaço ocupado pelo plasma da circulação e o fluido linfático dos canais linfáticos. As mesmas podem ser convenientemente fornecidas por injeção no interior dos tecidos compreendendo estas células. São preferencialmente fornecidas e expressas em células persistentes que não se dividam, que são diferenciadas, embora o fornecimento e a expressão possam ser acançados em células não diferenciadas ou menos completamente diferenciadas como, por exemplo, células-tronco de fibroblastos de sangue ou pele.

Numa forma de realização adicional da invenção, as células que são geneticamente trabalhadas para expressarem o imunomodulador são administradas num paciente *in vivo*. Tais células podem ser obtidas do paciente ou de um doador MHC compatível e podem incluir, mas não estão limitadas a, fibroblastos, células de medula óssea, células sanguíneas (por exemplo, linfócitos), adipócitos, células musculares, células endoteliais, etc. As células são trabalhadas geneticamente *in vitro*, utilizando-se áreas de ADN recombinante para introduzir as sequências de codificação de polipeptídeos do imunomodulador ou, em alternativa, pela transdução (utilizando-se vetores virais, e preferencialmente vetores que integrem o transgene no genoma celular) ou procedimentos de transfecção, incluindo, mas não limitados ao uso de plasmídeos, cosmídeos, YACs, ADN nu, eletroporação, lipossomos, etc. A sequência de codificação do imunomodulador pode ser colocada sob o controlo de um promotor ou promotor/melhorador constitutivo ou indutível para se atingir a expressão do imunomodulador e, preferencialmente, a secreção. As células trabalhadas que expressam e que preferencialmente segregam o imunomodulador podem ser introduzidas no paciente de forma sistémica, por exemplo, na circulação ou por meio intraperitoneal.

Em alternativa, as células podem ser incorporadas numa matriz e implantadas no corpo, por exemplo, as células endoteliais trabalhadas geneticamente podem ser implantadas como parte de um enxerto linfático ou vascular. (Ver, por exemplo, Anderson e outros, Patente americana nº 5,399,349 e Mulligan e Wilson, Patente americana nº 5,460,959).

Quando as células a serem administradas são células não-autólogas ou MHC não-compatíveis, as mesmas podem ser administradas utilizando-se técnicas bem conhecidas que evitem o desenvolvimento de uma resposta imune pelo hospedeiro contra as células introduzidas. Por exemplo, as células podem ser introduzidas sob a forma encapsulada que, enquanto permite uma troca de componentes com o ambiente extracelular imediato, não permite que as células introduzidas sejam reconhecidas pelo sistema imunitário do hospedeiro.

As células eucariontes que podem ser transduzidas com as partículas virais infecciosas contendo um ácido nucléico, gene ou fragmento de gene das mesmas para a expressão de um imunomodulador incluem, mas não estão limitadas a, células primárias, como células sanguíneas nucleadas primárias, como leucócitos, granulócitos, monócitos, macrófagos, linfócitos (incluindo linfócitos T e linfócitos B), células-tronco totipotentes e linfócitos de infiltragem tumoral (células TIL), células de medula óssea, células endoteliais, células epiteliais, queratinócitos, células-tronco, hepatócitos, incluindo células precursoras de hepatócitos, fibroblastos, células mesenquimais, células mesenteliais e células parenquimais.

Numa forma de realização, as células podem ser direcionadas a um local específico, onde as células funcionem como um agente terapêutico no referido local. Em alternativa, as células podem ser células que não são direcionadas a um local específico e tais células funcionam como um agente terapêutico sistémico.

As células transduzidas podem ser utilizadas, por exemplo, no tratamento de VHB por introdução nas células hospedeiras, como células sanguíneas que foram removidas de um paciente e expandidas em cultura de partículas virais infecciosas de acordo com a presente invenção que contêm genes que codificam um imunomodulador. As células podem ser expandidas em quantidade antes ou depois da transdução com as partículas virais infecciosas, contendo os genes desejados. Assim, o procedimento é executado de tal maneira que aquando da injeção no paciente, as células transformadas produzirão um imunomodulador no corpo de paciente.

O gene ou ácido nucléico transportado pelas células transduzidas compreende, especificamente, a sequência para um imunomodulador, mas pode igualmente compreender qualquer sequência que melhore direta ou indiretamente os efeitos terapêuticos das células. O gene transportado pelas células transduzidas pode também incluir sequências que permitam às células transduzidas exercerem um efeito terapêutico que as mesmas não possuiriam normalmente, como um gene para codificar um fator de coagulação útil no tratamento de hemofilia. O gene pode codificar um ou mais produtos, possuindo efeitos terapêuticos. Exemplos de genes ou ácidos nucléicos adequados incluem aqueles que codificam citoquinas como TNF, interleucinas (interleucinas 1 a 14), interferons (interferons alfa, beta, e gama), proteínas

receptoras de célula T e receptores Fc para domínios de anticorpos ligando抗原, como as imunoglobulinas. Os exemplos adicionais de genes adequados incluem genes que modificam células para as "direcionarem" para um local no corpo para o qual as células não estariam normalmente "direcionadas", assim possibilitando a utilização das propriedades terapêuticas da célula naquele local. Por exemplo, células do sangue como células TIL podem ser modificadas, por exemplo, introduzindo-se uma porção Fab de um anticorpo monoclonal nas células, assim possibilitando que as células reconheçam um抗原 escolhido.

É normal, embora não seja obrigatório, para fornecer o ácido nucléico à célula utilizar-se um portador conhecido como um "vetor". Os tipos mais comuns de vetores utilizados na terapia genética são vírus. Os cientistas utilizam vírus porque os mesmos possuem uma capacidade única de penetrarem no ADN da célula. Os vírus utilizados como vetores em terapia genética são geneticamente desligados; os mesmos não são capazes de se reproduzirem. A maioria das tentativas clínicas de terapia genética baseia-se em retrovírus de camundongo para fornecer o gene desejado. Outros vírus utilizados como vetores incluem adenovírus, vírus adeno-associados, vírus da varíola e vírus do herpes.

Por exemplo, células do paciente são removidas e desenvolvidas em laboratório. As células são expostas ao vírus que porta o gene desejado. O vírus penetra nas células e o gene desejado torna-se parte do ADN da célula. As células desenvolvem-se no laboratório e depois retornam ao paciente. Este tipo de terapia genética é chamado *ex vivo*, que significa "fora do corpo". O gene é transferido para as células do paciente enquanto as células estão fora do corpo do paciente. Em outros estudos, os vetores ou lipossomos (partículas de gordura) são utilizados para

fornecer o gene desejado às células no corpo do paciente. Esta forma de terapia genética é chamada *in vivo*, porque o gene é transferido para as células no interior do corpo do paciente.

Quando os vetores virais são utilizados para transportar genes no corpo, eles podem alterar mais do que as células pretendidas. Outro risco é que o novo gene possa ser inserido no lugar errado do ADN e, possivelmente, provocar cancro ou outro dano. Adicionalmente, quando o ADN é injetado diretamente ou quando um sistema de fornecimento por lipossomo é utilizado, há a possibilidade de que o ADN possa ser introduzido em células reprodutivas, produzindo modificações hereditárias.

Outras preocupações incluem a possibilidade de que os genes transferidos possam "expressar-se para além do necessário", produzindo uma ausência da proteína em quantidade tamanha, ao ponto de ser prejudicial; que o vetor viral provoque inflamação ou uma reação imune; e que o vírus possa ser transmitido do paciente a outros indivíduos ou ao ambiente.

Existem muitos vetores conhecidos na área. Qualquer vetor conhecido pode ser utilizado na presente invenção. Numa forma de realização preferencial da presente invenção, o vetor pode estar direcionado para um tipo específico de célula e para o fornecimento de gene específico.

Vetores Adenovirais

Quaisquer vetores adenovirais podem ser utilizados para transferir as células e/ou linhas celulares para expressar e/ou segregar um imunomodulador. Os adenovírus são vírus não envelopados contendo um genoma de ADN de filamento duplo linear. Enquanto existem mais de 40 filamentos de

sorotipo de adenovírus, a maioria dos quais provoca infecções do trato respiratório benignas em seres humanos, os sorotipos 2 ou 5 do subgrupo C são predominantemente utilizados como vetores. O ciclo de vida não envolve, normalmente, a integração no genoma do hospedeiro e em vez disso, os mesmos multiplicam-se como elementos episomais no núcleo da célula hospedeira e consequentemente não há risco de mutagénese insercional. O genoma do adenovírus do tipo feroz possui aproximadamente 35kb, dos quais aproximadamente 30kb podem ser substituídos com ADN estranho (Smith, 1995, Verma e Somia, 1997). Existem quatro unidades transpcionais anteriores (Elm E2, E3 e E4) que possuem funções reguladoras, e um transcrito posterior, que codifica as proteínas estruturais. Os vetores progenitores possuem o gene El ou E3 desativado, com o gene ausente sendo fornecido em trans por um vírus ajudante, plasmídeo ou integrado no genoma de uma célula ajudante (células renais fetais humanas, linha 293, Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. L. E Nairn, R. (1997) General Virology 36:59- 72). Os vetores de segunda geração utilizam, adicionalmente, um mutante sensível á temperatura E2a (Engelhardt, J. F., Litsky, L., e Wilson, J. M. (1994) Human Gene Therapy 5:1217-1229.) ou uma deleção de E4 (Armentano, D., Zabner, J., e outros (1997). Journal of Virology 71:2408-2416). Os vetores "sem vísceras" mais recentes contêm apenas as repetições terminais invertidas (ITRs) e uma sequência de empacotamento ao redor do transgene, todos os genes virais necessários sendo fornecidos em trans por um vírus ajudante (Chen, H., Mack, L. M., Kelly, R., e outros (1997) Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 94:1645-1650).

Os vetores adenovirais são muito eficientes em transduzir células alvo *in vitro* ou *in vivo* e podem ser produzidos em

alta titulação ($>10^{11}/\text{mL}$). Com a exceção de Geddes, B. J., Harding, T. C., Lightman, S. L. e Uney, J. B. (1997). *Nature Medicine* 3:1402-1404), que revelaram expressões transgénicas prolongadas em cérebros de ratos com a utilização de um vetor de deleção E1, a expressão transgénica *in vivo* a partir dos vetores progenitores tende a ser transitória (Verma, I. M. e Somia, N. (1997) *Gene therapy-promises, problems and prospects*. *Nature* 389:239-242). Após a injeção intravenosa, 90% do vetor administrado é degradado no fígado por um mecanismo mediado não imune (Worgall, S., Wolff, G., Falck-Pedersen, E. e Crystal, R. (1997) *Human Gene Therapy* 8:37-44). A partir disto, uma resposta imune restrita MHC classe I ocorre, utilizando CD8+ CTLs para eliminar as células infectadas pelo vírus e células CD4+ para segregar IFN alfa que resulta no anticorpo anti-adenoviral (Yang, Y. e Wilson, J. M. (1995) *Journal of Immunology* 155:2564-2569). A alteração do vetor adenoviral pode remover alguns epitopos CTL, entretanto, os epitopos reconhecidos se diferem com o haplotipo de MHC (Sparer, T.E., Wynn, S. G., Clark e outros (1997) *Journal of Virology* 71:2277-2284; Jooss, K., Ertl, H. C. J. e Wilson, J. M. (1998). *Journal of Virology* 72:2945-2954). Os restantes vetores naquelas células que não estão destruídas, têm seus promotores desativados (Armentano, D., Zabner, J., e outros (1997) *Journal of Virology* 71:2408-2416) e o anticorpo persistente evita a subsequente administração do vetor.

As abordagens para evitar a resposta imune envolvendo terapias imunossupressivas transitórias tem todo sucesso em prolongar a expressão transgénica e em atingir uma transferência de gene secundária (Jooss, K., Yang, Y. e Wilson, J. M. (1996) *Human Gene Therapy* 7:1555-1566; Kay, M. A., Meuse, L. e outros (1997) *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the U.S.A. 94:4686-4691). Um método menos intervencionista tem sido o de induzir tolerância oral alimentando-se o hospedeiro com o vetor desativado por UV (Kagami, H., Atkinson, J. C. e outros (1998). Human Gene Therapy 9:305-313). Entretanto, é desejável manipular o vetor ao invés do hospedeiro. Embora apenas sejam utilizados vetores com multiplicação deficiente, as proteínas virais são expressas a um nível muito baixo, as quais são apresentadas ao sistema imune. O desenvolvimento de vetores contendo menos genes, culminando em vetores "sem vísceras" que não contêm sequências de codificação viral, resultou em expressão transgénica *in vivo* prolongada em tecido hepático (Schiedner, G., Morral, N. e outros (1998). Nature Genetics 18:180-183). O fornecimento inicial de grandes quantidades de ADN empacotado nas proteínas de adenovírus, a maioria das quais se degradará e será apresentada ao sistema imune, pode ainda causar problemas para os testes clínicos. Além disso, a população humana é heterogénea em relação ao haplotípico de MHC e uma proporção da população já terá sido exposta à estirpe adenoviral (Gahry-Sdard, H., Molinier-Frenkel, V. e outros (1997) Journal of Clinical Investigation 100:2218-2226).

Até recentemente, o mecanismo pelo qual o adenovírus se direcionava à célula hospedeira era superficialmente compreendido. Uma expressão específica de tecido era, assim, apenas possível utilizando-se promotores/melhoradores celulares, por exemplo, o promotor da cadeia 1 leve da miosina (Shi, Q., Wang, Y. e Worton, R. (1997) Human Gene Therapy 8:403-410) e o promotor da célula muscular lisa SM22a (Kim, S., Lin, H. e outros (1997) Journal of Clinical Investigation 100:1006-1014) ou por fornecimento direto a uma área local (Rome, J. J., Shayani,

V. e outros (1994). *Human Gene Therapy* 5:1249-1258). A absorção da partícula de adenovírus mostrou-se um processo de dois estágios envolvendo uma interação inicial de uma proteína de revestimento de fibra no adenovírus com um receptor ou receptores celulares, que incluem a molécula MHC classe I (Hong, S. S., Karayan, L. e outros (1997). *EMBO Journal* 16:2294-2306) e o receptor de vírus/adenovírus coxsackie (Bergelson, J. M., Cunningham, J. A. e outros (1997). *Science* 275:1320-1323). A proteína penton base da partícula de adenovírus então se liga à família integrina dos heterodímeros da superfície da célula (Wickham, T. J., Mathias, P. e outros (1993) *Cell* 73:309-319.) permitindo a internalização através de endocitose mediada pelo receptor. A maioria das células expressam os receptores primários para a proteína de revestimento de fibra, entretanto, a internalização é mais seletiva (Harris, J. D. e Lemoine, N. R. (1996). *Trends in Genetics* 12:400-404). Métodos para aumentar a absorção viral incluem estimular as células alvo para expressarem uma integrina apropriada (Davison, E., Diaz, R. M. e outros (1997). *Journal of Virology* 71:6204-6207.) e conjugar um anticorpo com especificidade do tipo da célula alvo para o adenovírus (Wickham, T. J., Lee, G. M, e outros (1997b) *Journal of Virology* 71:7663-7669; Goldman, K., Rogers, B. E. e outros (1997). *Cancer Research* 57:1447-1451). A utilização de anticorpos, entretanto, aumenta as dificuldades de produção do vetor e o risco potencial de ativar o sistema complementar. Incorporando-se motivos de ligação de receptor na proteína de revestimento de fibra, Wickham e outros (Wickham, T. J., Tzeng, E. e outros (1997a) *Journal of Virology* 71:8221-8229.) foram capazes de redirecionar o vírus para se ligar à integrina expressa pelas células endoteliais danificadas ou de músculos lisos, ou receptores de sulfato de heparina que são expressos por diversos tipos de célula.

Qualquer um dos vetores virais adeno-associados pode ser utilizado para transfectar células e/ou linhas celulares para expressar e/ou segregar um imunomodulador. Os vírus adeno-associados (AAV) são parvovírus humanos não patogénicos, dependentes de um vírus ajudante, geralmente um adenovírus, para se proliferarem. Eles são capazes de infectar as células que se dividem ou não e, na ausência de um integrado de vírus ajudante num ponto específico do genoma do hospedeiro (19q 13-qter) em alta freqüência (Kotin, R. M., Siniscalco, M. e outros (1990). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 87:2211-2215). O tipo feroz de genoma é uma molécula de ADN de filamento único, consistindo de dois genes; *rep*, codificando proteínas que controlam a multiplicação viral, expressão genética estrutural e integração no genoma hospedeiro, e *cap*, que codifica proteínas estruturais capsídicas. Em ambas as extremidades do genoma numa repetição terminal (TR) 145 bp, contendo um promotor.

Quando utilizados como um vetor, os genes *rep* e *cap* são substituídos pelo transgene e suas sequências reguladoras associadas. O comprimento total da inserção não pode exceder em muito 4,7 kb, do comprimento do genoma do tipo feroz (Smith, A. E. (1995). *Annual Review of Microbiology* 49:807-838.). A produção do vetor recombinante exige que *rep* e *cap* sejam fornecidos em *trans*, juntamente com os produtos genéticos de vírus ajudante (Ela, Elb, E2a, E4 e ARN VA do genoma do adenovírus). O método convencional é co- transfectar dois plasmídeos, um para o vetor e outro para *rep* e *cap*, em 293 células infectadas com adenovírus (Samulski, R.J., Chang, L., e Shenk, T. (1989). *Journal of Virology* 63:3822-3828.). Este método, entretanto, é lento, de baixo rendimento (<10⁴ partículas/mL) e propenso a

contaminação com adenovírus e AAV do tipo feroz. Uma das razões para o baixo rendimento é o efeito inibidor do produto do gene rep em multiplicação adenoviral (Vincent, K. A, Piraino, S. T. e Wadsworth, S. C. (1997). *Journal of Virology* 71:1897-1905.). Protocolos mais recentes removem todos os genes estruturais adenovirais e utilizam plasmídeos resistentes ao rep (Xiao, X., Li, J. e Samulski, R. J. (1998) *Journal of Virology* 72:2224-2232.) ou conjugam um plasmídeo de expressão rep ao vírus maduro antes da infecção (Fisher, K. J., Kelley, W. M, Burda, J. F. e Wilson, J. M. (1996) *Human Gene Therapy* 7:2079-2087.).

Na ausência de rep, o vetor AAV irá apenas integrar-se de forma aleatória, como um provírus simples ou concatâmeros do início ao fim, uma vez que as repetições de terminal foram ligeiramente degradadas (Rutledge, E. A. e Russell, D. W. (1997). *Journal of Virology* 71:8429-8436.). O interesse em vetores AAV deve-se à sua integração ao genoma do hospedeiro, permitindo expressão transgénica prolongada. A transferência de genes em células epiteliais vasculares (Maeda, Y., Ikeda, U. e outros (1997). *Cardiovascular Research* 35:514-521.), músculos estriados (Fisher, K. J., Jooss, K. e outros (1997). *Nature Medicine* 3:306-316. Herzog, R. W. e outros (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94:5804-5809.) e células hepáticas (Snyder, R. O., Miao, C. H. e outros (1997). *Nature Genetics* 16:270-275.) foi reportada, com expressão prolongada quando o transgene não é derivado de uma espécie diferente. Neutralizar o anticorpo para o capsídeo de AAV pode ser detectável, mas não evita uma nova administração do vetor ou atividade do promotor de desligamento. É possivelmente devido à simplicidade do capsídeo viral que a resposta imune é tão contida. À medida que anticorpos AAV estejam presentes na população humana, será exigida uma

investigação adicional. Não houve tentativa de se objetivar tipos de células particulares que não por fornecimento de vetor localizado.

Em particular, os vetores adeno-associados divulgados na Patente americana nº 5,693,531, podem ser utilizados, incluindo AAVp5neo, pSV-β-Galactosidase, TRF169, LZ11, pSP72, pSP72nLacZ, pAdRSV4, pAdRSVnLacZ, AAVmLac, SV40, pBluescriptSK, pSV40 ori AAV1 e pKMT11.

Vetores Retrovirais

Qualquer vetor retroviral pode ser utilizado para transfetar células e/ou linhas celulares para expressar e/ou segregar um imunomodulador. Os retrovírus são uma classe de vírus envelopados contendo uma molécula de ARN de filamento único como genoma. Após a infecção, o genoma viral sobre transcrição reversa para ADN de filamento duplo, que se integra no genoma hospedeiro e é expresso como proteínas. O genoma viral possui aproximadamente 10kb, contendo pelo menos três genes: gag (codificação de proteínas de núcleo), pol (codificação de transcriptase reversa) e env (codificação de proteína de envelope viral). Em cada extremidade do genoma estão repetições de terminal longa (LTRs) que incluem regiões de promotor/melhorador e sequências envolvidas em integração. Adicionalmente há sequências que exigem empacotamento do ADN viral (psi) e locais de junção de ARN no gene env. Alguns retrovírus contêm protooncogenes, que quando mutados podem causar cancro, no entanto, na produção de vetores estes são removidos. Os retrovírus podem também transformar as células integrando-se próximos a um protooncogene celular e gerando uma expressão inapropriada a partir do LTR, ou rompendo um gene de supressão de tumor. Este evento, chamado de mutagénese insercional, ainda que extremamente

raro, pode ocorrer quando se utiliza retrovírus como vetores.

Os vetores retrovirais são frequentemente baseados no vírus da leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), que é um vírus "anfotrófico", capaz de infectar células de camundongo, possibilitar desenvolvimento de vetores em modelos de camundongo, e células humanas, possibilitando tratamento humano. Os genes virais (gag, pol e env) são substituídos pelo transgene de interesse e expressos em plasmídeos na linha celular de empacotamento. Devido ao fato de que genes não essenciais carecem de sequência de empacotamento (psi) os mesmos não são incluídos na partícula vírion. Para evitar a recombinação resultando na multiplicação de retrovírus competentes, todas as regiões da homologia com a cadeia principal do vetor devem ser removidas e os genes não essenciais devem ser expressos por pelo menos duas unidades transcricionais (Markowitz, D., Goff, S. e Bank, A. (1988). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *Journal of Virology* 62:1120-1124.). Ainda assim, a multiplicação de retrovírus competentes ocorre a uma frequência baixa.

As regiões essenciais incluem os LTRs 5' e 3' e a sequência de empacotamento residindo no sentido da LTR 5'. A expressão de transgene pode ser acionada pela região de promotor/melhorador no LTR 5' ou por promotores virais (por exemplo, citomegalovírus, vírus do sarcoma de Rous) ou celulares (por exemplo, beta actina, tirosina) alternativos. A análise mutacional mostrou que até toda a sequência de codificação gag e a região imediatamente no sentido contrário podem ser removidas sem efetuar empacotamento viral ou expressão de transgene (Kim, S. H., Yu, S. S. e outros (1998) *Journal of Virology* 72:994-1004).

Entretanto, o posicionamento exato do códon de início do transgene e pequenas alterações da expressão transgénica de influência LTR 5' (Rivire, I., Brose, K. e Mulligan, R. C. (1995). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 92:6733-6737.). Para auxiliar na identificação de marcadores selecionáveis de células transformadas, como neomicina e beta galactosidase, podem ser incluídos e expressão de transgenes pode ser melhorada com a adição de sítios de ribossomo internos (Saleh, M. (1997) *Human Gene Therapy* 8:979-983.). A capacidade de transporte disponível para vetores retrovirais é de aproximadamente 7,5kb (Verma, I. M. e Somia, N. (1997) *Nature* 389:239-242.), o que é muito pouco para alguns genes, mesmo que o CADN fosse utilizado.

O envelope retroviral interage com uma proteína celular específica para determinar a faixa de célula alvo. Alterar o gene env ou seu produto foi bem sucedido na manipulação da faixa celular. Abordagens incluíram a modificação direta do local de ligação entre a proteína de envelope e o receptor celular, entretanto estas abordagens tendem a interferir na internalização subsequente da partícula viral (Harris, J.D. e Lemoine, N. R. (1996) *Trends in Genetics* 12:400-404.). Substituindo-se uma porção do gene env com 150 códons da proteína eritropoietina (EPO), Kasahara e outros (Kasahara, N., Dozy, A. M. e Kan, Y. W. (1994). *Science* 266:1374- 1376.) foram capazes de se direcionar para células portando o receptor de EPO com alta afinidade. Ligar um anticorpo à partícula viral com afinidade por um anticorpo específico da segunda célula através de uma ponte de estreptovadina, melhora a absorção viral, mas a internalização tende a levar a um a degradação viral (Roux, P., Jeanteur, P., e Piechaczyk, M. (1989). *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 86:9079-9083.).

Neda e outros (Neda, H., Wu, C. H., e Wu. G. Y. (1991) *The Journal of Biological Chemistry* 266:14143-14146.) trataram partículas virais com lactose, o que resultou na absorção pelas células, principalmente hepatócitos, expressando receptores de asialoglicoproteína. Posteriormente, houve expressão de transgene viral eficiente, possivelmente devido à acidificação do endossomo, permitindo fusão do envelope viral à membrana do endossomo.

Os vírus diferem em relação a seus tropismos, desta forma, ao se substituir o gene env co mo de outro vírus, a faixa do hospedeiro pode ser estendida, em uma área conhecida como pseudotipo. A proteína do vírus G da estomatite vesicular foi incluída em vetores derivados de Mo-MLV (Burns, J. C., Matsubara, T. e outros (1994) *Developmental Biology* 165:285-289.), que são também mais estáveis quando purificados por ultracentrifugação. Recentemente, Qing (Qing, K., Bachelot, T., Mukherjee, P. e outros (1997). *Journal of Virology* 71:5663- 5667.) a transdução melhorada em diversas linhas celulares, primeiramente tratando as células receptoras com um vetor adeno-associado (discutido abaixo) expressando o receptor celular para a proteína de envelope retroviral.

A exigência para integração retroviral e expressão de genes virais, é de que a células alvo devem ser divididas. Isto limita a terapia genética a células proliferantes *in vivo* ou *ex vivo*, onde as células são removidas do corpo, tratadas para estimular a multiplicação e depois transduzidas com o vetor retroviral, antes de serem devolvidas ao paciente. As células *ex vivo* podem ser mais eficientemente transduzidas devido à exposição a títulos de vírus superiores e fatores de desenvolvimento (Glimm, H., Kiem, H. P. e outros (1997). *Human Gene Therapy* 8:2079-

2086.). Além disso, as células tumorais tratadas *ex vivo* irão se associar à massa tumoral e podem dirigir efeitos tumoricidas (Oldfield, E. H. e Ram, Z. (1995) *J Human Gene Therapy* 6:55-85. Abdel-Wahab, Z., Weltz, C. e outros (1997). *Cancer* 80:401-412.).

Os lentivírus são uma subclasse de retrovírus que é capaz de infectar tanto células proliferantes quanto não proliferantes. Eles são consideravelmente mais complicados que simples retrovírus, contendo seis proteínas adicionais, tat, rev, vpr, vpu, nef e vif. As atuais linhas celulares de empacotamento possuem plasmídeos separados para um gene de pseudotípico env, uma construção de transgene e uma construção de empacotamento fornecendo os genes estruturais e reguladores em trans (Naldini, L., Blmer, U. e outros (1996). *Science* 272:263-267.). Resultados iniciais utilizando genes marcadores foram promissores, mostrando expressão *in vivo* prolongada em tecido muscular, hepático e neuronal (Blmer, U., Naldini, L. e outros (1997). *Journal of Virology* 71:6641-6649. Miyoshi, H., Takahashi, M., Gage, F. H. e Venna, I. M. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94:10319-10323. Kafri, T., Blmer, U., e outros (1997). *Nature Genetics* 17:314-317). Curiosamente, os transgenes são acionados por um promotor de citomegalovírus trabalhado internamente que, diferentemente de vetores MoMLV, não está desativado. Isto pode ser devido à resposta inflamatória limitada à injeção de vetor, que era igual em magnitude ao controlo salino (Blmer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. M. e Gage, F. H. (1997) *Journal of Virology* 71:6641-6649). Os vetores lentivirais utilizados são derivados do vírus da imunodeficiência humana (VIH) e estão a ser avaliados quanto à segurança, com vista à remoção de alguns dos genes reguladores não essenciais. Os mutantes de vpr e vif são

capazes de infectar neurónios com eficiência reduzida, mas não células musculares ou hepáticas (Blmer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. M. e Gage, H. (1997). Journal of Virology 71:6641-6649; Kafri, T., Blmer, U., e outros (1997). Nature Genetics 17:314-317.).

Numa forma de realização em particular, os vetores retrovirais pLXIN, pSIR, pLXSH, pLNCX, pLAPSN, pFB e pFB-Neo são utilizados.

Vetores Virais de Herpes Simples

Qualquer um dos vetores virais da herpes simples pode ser utilizado para transfectar células e/ou linhas celulares para expressar e/ou segregar um imunomodulador. O vírus da Herpes Simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus neurotrópico humano, consequentemente o interesse tem sido amplamente focalizado na utilização de HSV-1 como um vetor para a transferência de genes para o sistema nervoso. O vírus HSV-1 do tipo feroz é capaz de infectar neurónios e continuar com um ciclo de vida lítico ou persistir como um epissozo em estado latente. Os Neurónios infetados de forma latente funcionam normalmente e não são rejeitados pelo sistema imune. Embora o vírus latente seja quase silencioso de forma transcricional, o mesmo não possui promotores específicos a neurônios que sejam capazes de funcionar durante a latência. Anticorpos para HSV-1 são comuns na população humana, entretanto complicações devido à infecção por herpes, como encefalite, são muito raras.

O genoma viral é uma molécula de ADN de filamento duplo linear de 152kb. Existem duas regiões únicas, longa e curta (chamadas UL e US) que estão ligadas em ambas as orientações por sequências de repetição interna (IRL e IRS). Na extremidade não ligante das regiões únicas são

repetições terminais (TRL e TRS). Existem até 81 genes (Marconi, P., Krisky, D. e outros (1996) *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 93:11319-11320.), dos quais, aproximadamente metade não é essencial ao desenvolvimento em cultura celular. Uma vez que estes genes não essenciais foram removidos, 40 a 50kb de ADN estranho podem ser acomodados no interior do vírus (Glorioso, J. C., DeLuca, N. A. e Fink, D. J. (1995). *Annual Review of Microbiology* 49:675-710.). Três classes principais de genes de HSV-1 foram identificadas, que são os genes imediatamente-anteriores (IE ou alfa), genes anteriores (E ou beta) e genes posteriores (L ou gama).

Após a infecção em células suscetíveis, a multiplicação lítica é regulada por uma sequência co-ordenada de transcrição de gene. Vmw65 (uma proteína estrutural de tegumento) ativa os genes anteriores imediatos (IPO, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP477) que estão transativando fatores permitindo a produção de genes anteriores. Os genes anteriores codificam genes para metabolismo de nucleotídeos e multiplicação de ADN. Genes posteriores são ativados pelos genes anteriores e codificam proteínas estruturais. Todo o ciclo leva menos de 10h e invariavelmente resulta na morte da célula.

Os eventos moleculares que levam ao estabelecimento da latência não foram completamente determinados. A expressão genética durante a latência é acionada pela transcrição associada à latência (LATs) localizada na região IRL do genoma. Dois LATs (2,0 a 1,5 kb) são transcritos na direção oposta à do gene IE ICPO. Os LATs possuem um papel da reativação do HSV-1 da latência (Steiner, I., Spivack, J. G., e outros (1989). *EMBO Journal* 8:505-511.) e o estabelecimento da latência (Sawtell, N. M. e Thompson, R.

L. (1992). *Journal of Virology* 66:2157-2169.). Dois promotores ativos de latência que acionam a expressão dos LATs foram identificados (Marconi, P., Krisky, D. e outros (1996) *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 93:11319-11320.) e podem se mostrar úteis para a expressão de transgene de vetor.

Duas abordagens básicas têm sido utilizadas para a produção de vetores de HSV-1, que são amplicons e vírus HSV-1 recombinantes. Os amplicons são plasmídeos produzidos de forma bacteriana contendo col El ori (uma origem de multiplicação de *Escherichia coli*), OriS (a origem de multiplicação de HSV-1), sequência de empacotamento de HSV-1, o transgene sob o controlo de um promotor imediatamente anterior e um marcador selecionável (Federoff, H. J., Geschwind, M. D., Geller, A. I. e Kessler, J. A. (1992). *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S. A.* 89:1636-1640.). O amplicon é transfectado numa linha celular contendo um vírus ajudante (um mutante sensível à temperatura) que fornece os genes estruturais e reguladores em falta em trans. Tanto o ajudante quanto o amplicon contendo partículas virais, são fornecidos ao receptor. Os amplicons mais recentes incluem uma sequência derivada do vírus Epstein-Barr para manutenção epissomal de plasmídeo (Wang, S. e Vos, J. (1996) *Journal of Virology* 70:8422-8430.).

Os vírus recombinantes são produzidos deficientes em multiplicação pela deleção de um dos genes imediatamente anteriores, por exemplo, ICP4, que é fornecido em trans. Embora eles sejam menos patogénicos e possam dirigir expressão de transgene em tecido cerebral, eles são tóxicos aos neurônios em cultura (Marconi, P., Krisky, D. e outros (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences*

U.S.A. 93:11319-11320). A deleção de um número de genes imediatos-anteriores reduz substancialmente a citotoxicidade e também permite a expressão pelos promotores que seria silenciada no vírus latente do tipo feroz. Estes promotores podem ser úteis em estimular expressão de genes de longa duração.

Na replicação condicionada as mutações são capazes de se replicarem apenas em certas linhas celulares. Linhas celulares permissivas são totalmente proliferantes e fornecem uma enzima celular para complementar uma deficiência viral. Os mutantes incluem timidina quinase (During, M. J., Naegele, J. R., OMalley, K. L. e Geller, A. I. (1994). Science 266:1399-1403.), ribonuclease redutase (Kramm, C. M., Chase, M. e outros (1997). Human Gene Therapy 8:2057-2068.), UTPase ou o fator de neurovirulência g34.5 (Kesari, S., Randazzo, B. P. e outros (1995). Laboratory Investigation 73:636-648.).

Vetores Não Virais

Todos os vetores virais induzem uma resposta imunológica de um certo grau e podem acarretar riscos de segurança (como mutagénese insercional e problemas de toxicidade). Adicionalmente, sua capacidade é limitada e a produção em larga escala pode ser difícil de ser alcançada. Portanto, numa forma de realização da invenção, os métodos não virais de transferência de genes são utilizados, os quais podem exigir apenas um pequeno número de proteínas, possuir uma capacidade virtualmente infinita, não possuir capacidade infecciosa ou mutagênica e a produção em larga escala é possível utilizando-se áreas farmacêuticas. Existem três métodos de transferência de ADN não viral, que são: ADN nu, lipossomos e conjugados moleculares.

Ácidos Nucléicos Nus

ADN e os ácidos nucléicos nus podem ser utilizados para fornecer o imunomodulador ao hospedeiro. Pode ser fornecido, por exemplo, sob a forma de um plasmídeo que pode ser injetado diretamente nas células musculares (Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. e Felgner, P. L. (1990). *Science* 247:1465-1468.) ou fixados a partículas de outro que são bombardeadas no tecido (Cheng, L., Ziegelhoffer, P. R. e Yang, N. S. (1993) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the America A.* 90:4455-4459.). O termo ácido nucléico, ADN ou ARN "nus", referem-se a sequências que são livres de qualquer portador de distribuição que atue para auxiliar, promover ou facilitar a entrada na célula, incluindo sequências virais, partículas virais, formulações de lipossomo, lipofectina ou agentes de precipitação e similares. Embora não sejam muito eficientes, isto pode resultar num baixo nível de expressão prolongada *in vivo*. Diferentemente de outras áreas de terapia genética, uma maior vantagem de se introduzir sequências de ácido nucléico nu na célula alvo é a natureza transitória da síntese de imunomodulador nas células. Estudos mostraram que sequências de ADN não replicantes podem ser introduzidas em células para fornecer produção do imunomodulador desejado por períodos de até seis meses. A simplicidade deste método e expressão sustentada levaram ao desenvolvimento de vacinas de ADN. Comparadas a vacinas convencionais atenuadas e baseadas em proteína, elas não são afetadas pela imunidade pré-existente, por exemplo, devido aos anticorpos da mãe, relativamente são relativamente baratas e podem fornecer diversos antigénios de patógenos em um único plasmídeo (Manickan, E., Karem, K. L. e Rouse, B. T. (1997). *Critical Reviews in Immunology* 17:139-154). Vacinas de ADN estão sendo desenvolvidas para

aqueles patógenos para os quais não existe vacina, por exemplo, VIH (Lekutis, C., SVIHer, J. W., Liu, M. A. e Letvin, L. N. (1997). *The Journal of Immunology* 158:4471-4477.) ou a vacina atual não totalmente efetiva, por exemplo, gripe influenza (Maclclin, M. D., McCabe, D. e outros (1998). *Journal of Virology* 72:1491-1496.). Utilizando-se um gene altamente conservado, Ulmer e outros (Ulmer, J. B., Donnelly, J. J. e outros (1993). *Science* 254:1745-1749.) foram capazes de imunizar camundongos contra duas estirpes de vírus influenza sorologicamente distintas. Na maioria dos casos, entretanto, as vacinas de ADN não se têm mostrado melhores do que as vacinas existentes (Macklin, M. D., McCabe, D. e outros (1998) *Journal of Virology* 72:1491-1496.). O tipo atual de resposta imune pode ser controlado pela co-transformação de um gene codificando a citoquina apropriada (Xiang, Z. e Ertl, H. C. (1995) *Immunity* 2:129- 135.) e este método pode se mostrar útil para redirecionar respostas imunes inapropriadas (Manickan, E., Karem, K. L., e Rouse, B. T. (1997). *Criticai Reviews in Immunology* 17:139-154.). Outras utilizações para o ADN nu incluem imunopotencialização de cancro (discutida abaixo, Corr. M., Tighe, H., Lee, D., Dudler, J. e outros (1997). *The Journal of Laboratory Investigation* 159:4999-5004.), reparo da função de insulina pancreática (Goldfine, I. D., German, M. S., Tseng, H. e outros (1997). *Nature Biotechnology* 15:1378-1382.), e estímulo do desenvolvimento de vaso sanguíneo colateral (Takeshita, S., Tsurumi, Y. e outros (1996) *Laboratory Investigation* 75:487-501.). A expressão do produto de gene em tecidos musculares pode ser melhorada pela co-administração de colágeno, papaverina e condições isquêmicas (Budker, V., Zhang, G., Danko, I., Williams, P. e Wolff, J. (1998). *Gene Therapy* 5:272-276.). A utilização de um promotor específico de músculo (Skarli, M. , Kiri, A.

e outros (1998). Gene Therapy 5:514-520.) e outras sequências reguladoras intragene, como a sequência de terminação de transcrição e poli-A (Hartikka, J., Sawdey, M. e outros (1996). Human Gene Therapy 7:1205-1217.) também melhorarão a expressão de transgene.

Para a injeção de polipeptídeo nu, uma dosagem efetiva de ADN ou ARN estará na faixa de cerca de 0,05 g/kg de peso corporal a cerca de 50mg/kg de peso corporal. Preferencialmente, a dosagem será de cerca de 0,005 mg/kg a cerca de 20 mg/kg e mais preferencialmente de cerca de 0,05mg/kg e cerca de 5mg/kg. Claro, como os especialistas na área perceberão, esta dosagem poderá variar de acordo com o local de tecido da injeção. A dosagem apropriada e efetiva de sequência de ácido nucléico pode ser prontamente determinada por um qualquer especialista na área e pode depender da condição a ser tratada e da via de administração. A via de administração é pela via parenteral de injeção no espaço intersticial dos tecidos ou outras vias parenterais podem ser igualmente utilizadas, como inalação de uma composição de aerossol particularmente para distribuição nos pulmões ou tecidos bronquiais, garganta ou membranas mucosas do nariz. Adicionalmente, construções de polipeptídeos nus podem ser distribuídas a artérias durante uma angioplastia pelo cateter utilizado no procedimento.

O imunomodulador pode ser também distribuído em formulações de lipossomo (como aquelas ensinadas em Felgner, P. L. e outros (1995) Ann. NY Acad. Sei. 772:126-139 e Abdallah, B. e outros (1995) Biol. Cell 85(1):1-7) que podem ser preparadas por métodos bem conhecidos pelos especialistas na área. Os lipossomos são duas camadas lipídicas aprisionando uma fração de fluido aquoso. O ADN irá associar-se espontaneamente à superfície externa dos

lipossomos catiônicos (em virtude da sua carga) e estes lipossomos irão interagir com a membrana celular (Felgner, J. H., Kumar, R. e outros (1994). *Journal of Biological Chemistry* 269:2550-2561.). *In vitro*, até 90% de certas linhas celulares podem ser transfectadas. Incluindo-se uma pequena quantidade de lipídio aniónico num lipossomo outrora catiônico, o ADN pode ser incorporado na superfície interna do lipossomo, protegendo-o assim da degradação enzimática (Crespo e outros (1996), citado em Alio, S. F. (1997). *Biochemical Pharmacology* 54:9-13.). Para facilitar a absorção na célula como endossomos, foram incluídas proteínas alvo nos lipossomos, por exemplo, anticorpo anti-MHC (Wang, C. e Huang, L. (1987). *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 84:7851-7855.) transferrina (Stavridis, J. C., Deliconstantinos, G. e outros (1986). *Experimental Cell Research* 164:568-572.), e o vírus Sendai ou sua proteína F (Dzau, J. V., Mann, M. J, Morishita, R. e Kaneda, Y. (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 93:11421-11425.). O vírus Sendai permite, adicionalmente, que o ADN do plasmídeo escape do endossomo para dentro o citoplasma, assim evitando a degradação. A inclusão de uma proteína ligante de ADN (proteína do grupo 1 de alta mobilidade de 28 kDa) melhora a transcrição trazendo o plasmídeo no interior do núcleo (Dzau e outros 1997 *Am. J. Cardiol.* 6 de Nov de 1997; 80(9A):33I-39I).

As conjugações moleculares consistem de proteína ou ligantes sintéticos aos quais foi fixado um agente de ligação de ADN. A distribuição à célula pode ser melhorada utilizando-se áreas similares àquelas dos lipossomos. As proteínas alvo incluem asialoglicoproteína (Wagner, E., Cotten, M., Foisner, R. e Birnstiel, M. L. (1991). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

U.S.A. 88:4255-4259.), transferrina (Wu, C. H., Wilson, J. M. e Wu., G. Y. (1989). Journal of Biological Chemistry 264:16985-16987), IgA polimérico (Ferkol, T., Kaetzel, C. S. e Davis, P. B. (1993). Journal of Clinical Investigation 92:2394-2400.) e adenovírus (Madon, J. e Blum, H. E. (1996). Hepatology 24:474-481.). A expressão de transgene tende a ser transitória e está limitada pela degradação do endossomo/lisossomo.

VI. Composições Farmacêuticas

Seres humanos que padeçam de qualquer uma das doenças aqui descritas, incluindo hepatite B, podem ser tratados com a administração de uma quantidade efetiva de um β -2'-desoxi- β -L-eritro-pentofuranonucleosídeo, por exemplo, β -L-2'-desoxiadenosina, β -L-2'-desoxicitidina, β -L-2'-desoxiuridina, β -L-2'-desoxiguanosina ou β -L-2'-desoxitimidina ou uma pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitáveis deste na presença de um portador ou diluente farmaceuticamente aceitável. Os materiais ativos podem ser administrados por qualquer meio apropriada, por exemplo, oralmente, de forma parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutânea ou tópica, na forma líquida ou sólida.

O composto ativo está incluso no portador ou diluente farmaceuticamente aceitável em uma quantidade suficiente para entregar a um paciente uma quantidade efetiva de forma farmacêutica do composto para inibir a replicação viral *in vivo*, sem causar sérios efeitos tóxicos no paciente tratado. Por "quantidade inibitória" quer-se dizer uma quantidade do ingrediente ativo suficiente para exercer um efeito inibitório conforme medido, por exemplo, por um ensaio tal como os aqui descritos.

Uma dose preferencial do composto para todas as condições acima mencionadas estará na faixa de cerca de 1 a cerca de 50mg/kg, preferencialmente de 1 a 20mg/kg, de peso corpóreo por dia, mais geralmente de 0,1 a cerca de 100mg por quilograma de peso corpóreo do receptor por dia. A faixa de dosagem efetiva da pró-fármaco farmaceuticamente aceitável pode ser calculada com base no peso do nucleosídeo-mãe a ser entregue. Se o pró-fármaco apresenta ação própria, a dosagem efetiva pode ser estimada conforme acima referido, usando-se o peso do pró-fármaco, ou através de outros meios conhecidos pelos especialistas na área.

O composto é convenientemente administrado em qualquer forma de dosagem unitária, incluindo mas não limitado a, um contendo de 7 a 3.000mg, preferencialmente de 70 a 1.400mg de ingrediente ativo por forma de dosagem unitária. A dosagem oral de 50 a 1.000 mg é frequentemente conveniente.

Idealmente, o ingrediente ativo deve ser administrado para alcançar concentrações de plasma máximas do composto ativo de cerca de 0,2 a 70 μ M, preferencialmente de cerca de 0 a 10 μ M. Isto pode ser alcançado, por exemplo, pela injeção intravenosa de uma solução de 0,1 a 5% do ingrediente ativo, opcionalmente em solução salina, ou administrada como um bolus do ingrediente ativo.

A concentração do composto ativo na composição do fármaco irá depender das taxas de absorção, inativação e excreção do fármaco assim como de outros fatores conhecidos dos especialistas na área. Deve-se notar que os valores de dosagem irão também variar com a severidade da condição a ser aliviada. Deve ser também compreendido que para qualquer indivíduo particular, os regimes de dosagem específicos devem ser ajustados com o tempo de acordo com a

necessidade individual do julgamento profissional da pessoa que está a administrar ou a supervisionar a administração das composições, e que as faixas de concentração aqui expostas são exemplares apenas e não estão objetivadas para limitar o escopo ou prática da composição reivindicada. O ingrediente ativo pode ser administrado de uma única vez, ou pode ser dividido em várias doses menores a serem administradas em intervalos variados de tempo.

Uma forma preferencial de administração do composto ativo é a oral. As composições orais irão geralmente incluir um diluente inerte ou um portador comestível. Podem ser envoltos em cápsulas de gelatina ou em forma de comprimidos. Para o propósito da administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser incorporado com excipientes e usado na forma de comprimidos, pastilhas ou cápsulas. Agentes de ligação farmaceuticamente compatíveis, e/ou materiais adjuvantes podem ser inclusos como parte da composição.

Os comprimidos, pílulas, cápsulas, pastilhas e etc. podem conter qualquer um dos ingredientes a seguir, ou compostos de uma natureza similar: um ligante tal como uma celulose microcristalina goma tragacanto ou gelatina; um excipiente tal como amido ou lactose, um agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, ou amido de milho; um lubrificante tal como estearato de magnésio ou "Sterotes"; um glidante tal como dióxido de silício coloidal; um agente adoçante tal como sacarose ou sacarina; ou um agente flavorizante tal como hortelã, salicilato de metila ou flavorizante de laranja. Quanto a forma unitária de dosagem é uma cápsula que pode conter, além do material do tipo acima, um portador líquido tal como um óleo graxo. Além disso, as formas de dosagem unitárias podem conter vários

outros materiais que modificam a forma física da unidade de dosagem, por exemplo, revestimentos de açúcar, goma-laca ou outros agentes entéricos.

O composto pode ser administrado como um componente de um elixir, suspensão, xarope, biscoito, goma de mascar ou semelhante. Um xarope pode conter, além dos compostos ativos, sacarose como um agente adoçante e certos preservativos, pigmentos e corante e flavorizantes.

O composto ou um derivado ou sal farmaceuticamente aceitável deste pode também ser misturado com outros materiais ativos que não prejudiquem a ação desejada, ou com materiais que suplementam a ação desejada, tal como antibióticos, antifúngicos, antiinflamatórios, inibidores de protease, ou outros agentes antivirais de nucleosídeo ou não nucleosídeo. Soluções ou suspensões usadas para aplicação parenteral, intradermal, subcutânea ou tópica podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bisulfito de sódio; agentes quelantes tais como o ácido etilenodiaminotetracético; tampão, como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes, para ajuste ou tonicidade tais como cloreto de sódio ou dextrose. A preparação parenteral pode ser envolta em ampolas, seringas descartáveis ou recipientes de múltiplas doses de vidro ou plástico.

Quando administrado de forma intravenosa, os portadores preferenciais são solução salina fisiológica ou solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Numa forma de realização preferencial, os compostos ativos são preparados com portadores que irão proteger o composto contra a rápida eliminação no corpo, tal como uma composição de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas de entrega microencapsulados. Podem ser usados polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, tais como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido poliacético. Métodos para a preparação de tais formulações serão evidentes para os especialistas na área. Os materiais podem ser também obtidos comercialmente a partir de Alza Corporation.

Suspensões lipossomais (incluindo lipossomos objetivados para células infectadas com anticorpos monoclonais para抗igénios virais) são também preferenciais como portadores farmaceuticamente aceitáveis. Estes podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos dos especialistas na área, como por exemplo, conforme o descrito na Patente americana nº 4,522,811. Por exemplo, as formulações de lipossomo podem ser preparadas dissolvendo-se o (s) lipídeo(s) apropriado(s) (como estearoilfosfatidil etanolamina, estearil fosfatidil colina, aracadoilfosfatidil colina e colesterol) num solvente orgânico que é então evaporado, deixando para trás uma fina película de lipídeo seco na superfície do recipiente. Uma solução aquosa do composto ativo ou seus derivados de monofosfato, difosfato e/ou trifosfato é então introduzida no recipiente. O recipiente é então mexido manualmente para liberar o material lipídico dos lados do recipiente e para dispersar os agregados lipídicos, formando assim a suspensão lipossomal.

VII. Formulações de Liberação Controlada

Todas as Patentes americanas citadas nesta seção relacionam-se com formulações de liberação.

O campo dos polímeros biodegradáveis desenvolveu-se rapidamente desde que a síntese e biodegradabilidade do ácido polilático foi relatada por Kulkarni e outros. ("Polylactic acid for surgical implants", Arch. Surg., **1966**, 93, 839). Exemplos de outros polímeros, que foram relatados como materiais de matriz, úteis para dispositivos de entrega, incluem polianidridos, poliésteres tais como poliglicolídeos e poliactídeo-co-glicolídeos, poliaminoácidos tais como polilisina, polímeros e copolímeros de óxido de polietileno, óxido de polietileno com terminação acrílica, poliamidas, poliuretanas, poliortoésteres, poliacrilonitrilas e polifosfazenos. Veja, por exemplo, as Patentes americanas nº 4,891,225 e 4,906,474 para Langer (polianidridos), 4,767,628 para Hutchinson (polilactídeo, ácido poliactídeo-co-glicolídeos), e 4,530,840 para Tice e outros (polilactídeo, poliglicolídeo, e copolímeros). Ver também Patente americana nº 5,626,863 para Hubbell e outros que descreve hidrogéis biodegradáveis fotopolimerizáveis como materiais em contato com tecido e portadores de liberação controlada (hidrogéis de macrômeros polimerizados e entrecruzados compreendendo oligômeros hidrofílicos possuindo extensões monoméricas ou oligoméricas biodegradáveis, que são monômeros ou oligômeros de extremidade protegida capazes de polimerização e entrecruzamento), e PCT WO 97/05185 depositado por Focal, Inc., direcionado aos hidrogéis biodegradáveis em multibloco para uso como agentes de liberação controlada para entrega de fármaco e agentes de tratamento de tecido.

Materiais degradáveis de origem biológica são bem conhecidos, por exemplo, gelatina entrecruzada. O ácido hialurônico foi entrecruzado e usado como um polímero passível de inchação biodegradável para aplicações biomédicas (Patente americana nº 4,957,744 para Delia Valle e outros; "Surface modification of polymeric biomaterials for reduced thrombogenicity", Polym. Mat. Sci. Eng., **1991**, 62, 731-735]).

Muitos sistemas de dispersão estão atualmente em uso, ou a ser investigados para uso como portadores de substâncias, em particular, compostos biologicamente ativos. Sistemas de dispersão usados para formulações farmacêuticas e cosméticas podem ser classificados como suspensões ou emulsões. As suspensões são definidas como partículas sólidas variando em tamanho de alguns nanômetros a centenas de micra, dispersas em um meio líquido usando agentes de suspensão. As partículas sólidas incluem microesferas, microcápsulas e nanoesferas. As emulsões são definidas como dispersões de um líquido em outro, estabilizadas por um filme interfacial de emulsificantes tais como tensoativos e lipídeos. As formulações de emulsão incluem emulsões de água em óleo e de óleo em água, emulsões múltiplas, microemulsões, microgotas e lipossomos. As microgotas são vesículas de fosfolipídeo unilamelares que consistem de uma camada de lipídeo esférica com uma fase de óleo interna, conforme definido nas Patentes americanas nº 4,622,219 e 4,725,442 emitida para Haynes. Os lipossomos são vesículas de fosfolipídeos preparadas misturando-se lipídeos polares insolúveis em água com uma solução aquosa. A entropia desfavorável causada pela misturação do lipídeo insolúvel na água produz uma montagem altamente ordenada de membranas fechadas concêntricas de fosfolipídeo com solução aquosa capturada.

A Patente americana nº 4,938,763 para Dunn e outros, divulga um método para formação de um implante in situ dissolvendo-se um polímero termoplástico insolúvel em um solvente solúvel em água biocompatível para formar um líquido, colocar os líquidos dentro do corpo, e permitir que o solvente se dissipe para produzir um implante sólido. A solução polimérica pode ser colocada no corpo através de uma seringa. O implante pode assumir a forma de sua cavidade circundante. Numa forma de realização alternativa, o implante é formado de polímeros oligoméricos líquidos reativos que não contêm solvente e que curam em vez de formarem sólidos, freqüentemente com a adição de um catalisador de cura.

Várias patentes divulgam sistemas de entrega de fármacos que podem ser usadas para administrar um β -L-2'-desoxinucleosídeo ou um nucleotídeo ou outro pró-fármaco definido desta. A Patente americana nº 5,749,847 divulga um método para a entrega de nucleotídeos em organismos por eletroforação. A Patente americana nº 5,718,921 divulga microesferas compreendendo polímero e fármaco dispersos dentro destas. A Patente americana nº 5,629,009 divulga um sistema de entrega para a liberação controlada de fatores bioativos. A Patente americana nº 5,578,325 divulga nanopartículas e micropartículas de copolímeros de multibloco hidrofóbicos e hidrofílicos não lineares. A Patente americana nº 5,545,409 divulga um sistema de entrega para liberação controlada de fatores bioativos. A Patente americana nº 5,494,682 divulga microcápsulas poliméricas cruzadas ionicamente ligadas.

A Patente americana nº 5,728,402 para Andrx Pharmaceuticals, Inc., descreve uma composição de liberação controlada que inclui uma fase interna que compreende uma

fármaco ativa, seu sal, éster ou pró-fármaco, em mistura com um hidrogel formando o agente, e uma fase externa que compreende um revestimento que resiste à dissolução no estomago. As Patentes americanas nº 5,736,159 e 5,558,879 para Andrx Pharmaceuticals, Inc., divulgam uma composição de liberação controlada para fármacos com pouca solubilidade em água em que uma passagem é formada *in situ*. A Patente americana nº 5,567,441 para Andrx Pharmaceuticals, Inc., divulga uma composição de liberação controlada uma vez por dia. A Patente americana nº 5,508,040 divulga um sistema de entrega de fármaco pulsátil multiparticulado. A Patente americana nº 5,472,708 divulga um sistema de entrega de fármaco baseado em partícula pulsátil. A Patente americana nº 5,458,888 descreve uma composição em comprimido de liberação controlada que pode ser feita usando uma combinação com uma fase interna contendo fármaco que compreende um pol de polietileno glicol que possui um peso molecular ponderal médio de 3.000 a 10.000. A Patente americana nº 5,419,917 divulga métodos para a modificação da taxa de liberação de um fármaco que forma o hidrogel que é baseada no uso de uma quantidade efetiva de um composto farmaceuticamente ionizável que é capaz de fornecer uma taxa de liberação de fármaco substancialmente de ordem zero a partir do hidrogel. A Patente americana nº 5,458,888 divulga uma composição em comprimido de liberação controlada.

A Patente americana nº 5,641,745 para Elan Corporation plc, divulga uma composição farmacêutica de liberação controlada que compreende o fármaco ativo em um polímero biodegradável para formar microesferas ou nanoesferas. O polímero biodegradável é adequadamente poli-D,L-lactídeo ou uma combinação de poli-D,L-lactídeo e poli-D,L-lactídeo-co-glicolídeo. A Patente americana nº 5,616,345 para Elan

Corporation plc descreve uma composição de absorção controlada para uma administração uma vez ao dia que inclui o composto ativo em associação com um ácido orgânico, e uma membrana de multicamada circundando o núcleo e contendo uma maior proporção de um polímero sintético insolúvel em água, de formação de filme, farmaceuticamente aceitável e uma proporção menos de um polímero sintético solúvel em água, de formação de filme, farmaceuticamente aceitável. A Patente americana nº 5,641,515 divulga uma composição de liberação controlada baseada em nanopartículas biodegradáveis. A Patente americana nº 5,637,320 divulga uma composição de absorção controlada para administração uma vez ao dia. As Patentes americanas nº 5,580,580 e 5,540,938 estão direcionadas para as formulações e o seu uso no tratamento de doenças neurológicas. A Patente americana nº 5,533,995 está direcionada para um dispositivo transdérmico passivo com entrega de fármaco controlada. A Patente americana nº 5,505,962 descreve uma composição farmacêutica de liberação controlada.

VIII. Preparação dos Compostos Ativos

Os β -L-2'-desoxinucleosídeos da presente invenção são conhecidos na área e podem ser preparados de acordo com o método descrito por Holy, Collect. Czech. Chem. Commun., 1972, 37(12), 4072-87 e Mol. Phys. 1967, 3(4), 386-95.

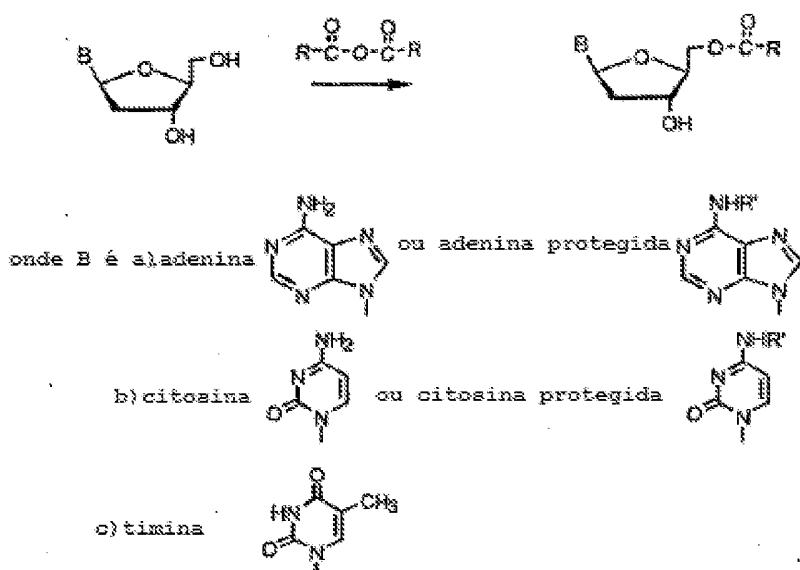
Um processo geral para se obter os β -L-2'-desoxinucleosídeos (β -L-dN) está mostrado na Figura 1, usando-se L-ribose ou L-xilose como o material inicial.

Derivados de mono, di e trifosfato dos nucleosídeos ativos podem ser preparados conforme descrito de acordo com os métodos publicados. O monofosfato pode ser preparado de acordo com o procedimento de Imai e outros, J. Org.

Chem., junho de 1969, 34(6), 1547-1550. O difosfato pode ser preparado de acordo com o procedimento de Davisson e outros, J. Org. Chem., 1987, 52(9), 1794-1801. O trifosfato pode ser preparado de acordo com o procedimento de Hoard e outros, J. Am. Chem. Soc., 1965, 87(8), 1785-1788.

Método para a preparação de derivados β -L-5' de β -L-nucleosídeos

Os derivados β -L-5' de um β -L-nucleosídeo podem ser feitos através de quaisquer meios conhecidos na área, em particular por métodos conhecidos para proteger álcoois primários com metades acil, isto é, através de um anidrido ou com a ajuda de um agente de ligação. Como um exemplo não limitativo, os derivados β -L-5'- podem ser preparados de acordo com a seguinte sequência de reação:



R é um grupo alquil ou aril

R' é um grupo de proteção comumente utilizado

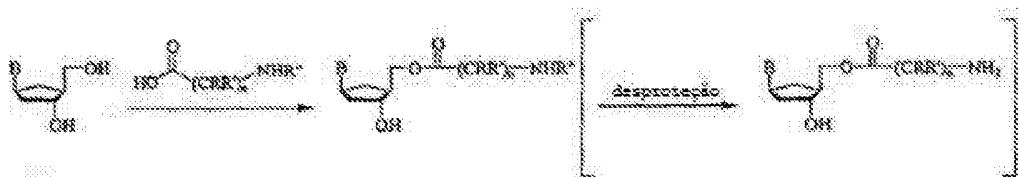
Numa forma de realização preferencial, o derivado-5' é derivado a partir de uma metade aminoacil. O material

inicial principal para este processo é um β -L-nucleosídeo apropriadamente substituído. O β -L-nucleosídeo pode ser comprado ou pode ser preparado por quaisquer meios conhecidos incluindo reações de ligação padrões com uma metade L-açúcar, tal como desoxirribose. Os derivados de aminoacil podem ser feitos ligando-se de forma seletiva um aminoácido a um β -L-nucleosídeo, preferencialmente sem qualquer proteção adicional do nucleosídeo. A reação de ligação pode ser alcançada usando-se os reagentes de ligação apropriados que promovem a ligação. Alguns exemplos não limitativos de reagentes de ligação são reagentes do tipo Mitsunobu (por exemplo, azodicarboxilatos de dialquila tais como azodicarboxilato de diisopropila e azodicarboxilato de dietila) com trifenil fosfino ou vários tipos de carbodiimidas.

A reação de ligação pode ser executada a qualquer temperatura que alcance os resultados desejados, isto é, que seja adequada para que a reação aconteça a uma velocidade aceitável sem promover a decomposição ou produtos secundários excessivos.

Qualquer solvente de reação pode ser selecionado, o qual pode alcançar a temperatura necessária e que pode solubilizar os componentes de reação. Exemplos não limitativos são, qualquer solvente aprótico incluindo, mas não limitado a solventes de alquil ou haloalquil tais como tolueno, acetona, acetato de etila, ditianos, YHF, dioxano, acetonitrila, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida ou qualquer combinação destes.

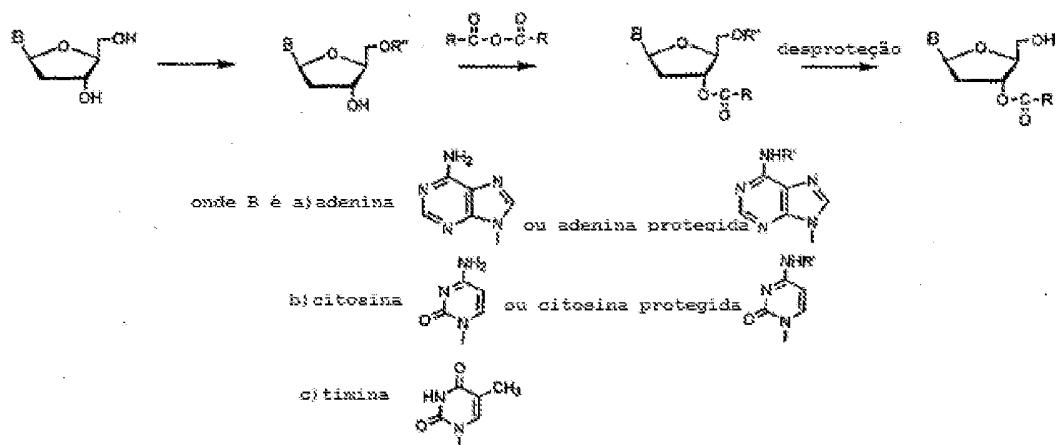
O esquema 1 é um exemplo não limitativo da preparação do β -L-5'-aminoacil-nucleosídeo derivado de L-desoxiribonucleosídeo.



Esquema 1

Método para a preparação de derivados β -L-3' de β -L-nucleosídeos

Os derivados β -L-3' de 2'-desoxinucleosídeo podem ser feitos através de quaisquer meios conhecidos na área, particularmente por métodos conhecidos para proteger álcoois secundários com metades acil, isto é, através de um anidrido ou com a ajuda de um agente de ligação. Como um exemplo não limitativo, os derivados-3' podem ser preparados de acordo com a seguinte sequência de reação:



R é um grupo alquil ou aril

R' e R'' são grupos de proteção comumente utilizados

Em alternativa, o derivado-3' é derivado de uma metade aminoacil. O material inicial principal para este processo é um β -L-nucleosídeo apropriadamente substituído. O β -L-

nucleosídeo pode ser comprado ou pode ser preparado por quaisquer meios conhecidos incluindo reações de ligação padrões com uma metade L-açúcar.

Estes derivados de aminoacil podem ser feitos protegendo primeiro o grupo 5'-hidroxil com um grupo protetor de oxigénio adequado, tal como um grupo protetor de acil ou silih, e opcionalmente protegendo-se qualquer amina livre na base heterocíclica ou heteroaromática. De forma subsequente, o grupo 3'-hidroxil livre pode ser ligado a um α ou β aminoácido protegido em N.

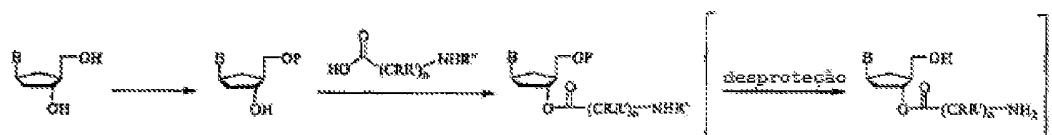
De forma subsequente, o β -L-nucleosídeo é ligado ao aminoacil usando-se reagentes de ligação padrão que promovem a ligação. Alguns exemplos não limitativos de reagentes de ligação são reagentes do tipo Mitsunobu (por exemplo, azodicarboxilatos de dialquila tais como azodicarboxilato de diisopropila e azodicarboxilato de dietila) com trifenil fosfino ou vários tipos de carbodiimidas.

A reação de ligação pode ser executada a qualquer temperatura que alcance os resultados desejados, isto é, que seja adequada para que a reação aconteça a uma velocidade aceitável sem promover a decomposição ou produtos secundários excessivos.

Qualquer solvente de reação pode ser selecionado o qual pode alcançar a temperatura necessária e que pode solubilizar os componentes de reação. Exemplos não limitativos são qualquer solvente aprótico incluindo, mas não limitado a solventes de alquil ou haloalquil tais como hexano, ciclohexano, diclorometano ou dicloroetano, tolueno, acetona, acetato de etila, ditianos, YHF, dioxano,

acetonitrila, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida ou qualquer combinação destes.

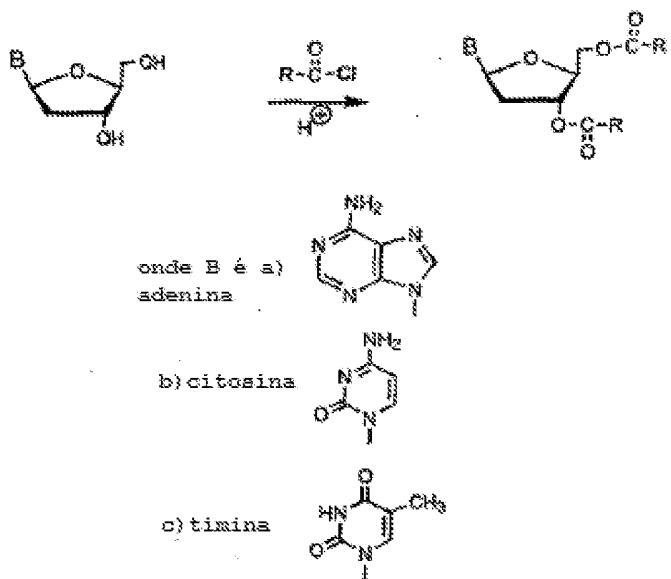
O Esquema 2 é um exemplo não limitativo da preparação de um β -L-3'-aminoacil-nucleosídeo derivado de L-desoxiribonucleosídeo.



Esquema 2

Método para a preparação de derivados β -L-3',5'-bis-O- de β -L-nucleosídeos

Os derivados β -L-3',5'-bis-O- de β -L-nucleosídeo podem ser feitos através de quaisquer meios conhecidos na área, particularmente por métodos conhecidos para proteger álcoois primários e secundários com metades acil, isto é, através de um anidrido ou com a ajuda de um agente de ligação. Como um exemplo não limitativo, os derivados 3',5'- bis-O- podem ser preparados de acordo com a seguinte sequência de reação:



R é um grupo alquil ou aril

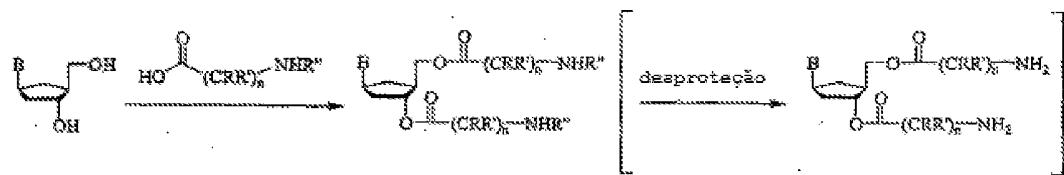
Numa forma de realização preferencial, o derivado 3',5'-bis-O- é derivado a partir de uma metade aminoacil. O material inicial principal para este processo é um β -L-nucleosídeo apropriadamente substituído. Os derivados 3',5'-bis-O- dos β -L-nucleosídeos podem ser comprados ou podem ser preparados por quaisquer meios conhecidos incluindo reações de ligação padrões com uma metade L-açúcar, tal como desoxirribose. De forma subseqüente, os grupos 3'- e 5'-hidroxil livres podem ser ligados a um α ou β aminoácido protegido em N. A reação de ligação pode ser alcançada usando-se reagentes de ligação apropriados que promovem a ligação. Alguns exemplos não limitativos de reagentes de ligação são os reagentes tipo Mitsunobu (por exemplo, azodicarboxilatos de dialquila tal como azodicarboxilato de diisopropila e azodicarboxilato de dietila) com trifenil fosfino ou vários tipos de carbodiimidas.

A reação de ligação pode ser executada a qualquer temperatura que alcance os resultados desejados, isto é,

que seja adequada para que a reação aconteça a uma velocidade aceitável sem promover a decomposição ou produtos secundários excessivos.

Qualquer solvente de reação pode ser selecionado o qual pode alcançar a temperatura necessária e que pode solubilizar os componentes de reação. Exemplos não limitativos são qualquer solvente aprótico incluindo, mas não limitado a solventes de alquil ou haloalquil tais como hexano, ciclohexano, diclorometano ou dicloroetano, tolueno, acetona, acetato de etila, ditianos, THF, dioxano, acetonitrila, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida ou qualquer combinação destes.

O Esquema 3 é um exemplo não limitativo da preparação de um β -L-3',5'-di-aminoacil-nucleosídeo derivado de L-desoxiribonucleosídeo.



Esquema 3

Método opcional para a extensão da metade aminoacil
Os compostos do título podem ser feitos reagindo-se o 3'- e 5'-hidroxil com um derivado adequado, tal como um acil, e particularmente um grupo aminoacil. Se o nucleosídeo é derivado com uma metade aminoacil, pode ser desejável também ligar a amina livre a um α ou β aminoácido protegido em N. A reação de ligação pode ser alcançada usando-se reagentes de ligação apropriados que promovem a ligação. Alguns exemplos não limitativos de reagentes de ligação são

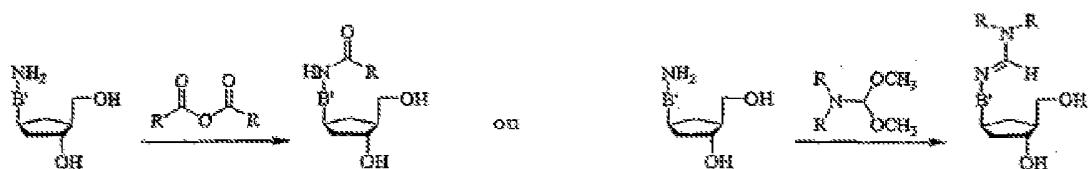
reagentes do tipo Mitsunobu (por exemplo, azodicarboxilatos de dialquila tais como azodicarboxilato trifenil fosfino ou vários tipos de carbodiimidas.

A reação de ligação pode ser executada a qualquer temperatura que alcance os resultados desejados, isto é, que seja adequada para que a reação aconteça a uma velocidade aceitável sem promover a decomposição ou produtos secundários excessivos.

Qualquer solvente de reação pode ser selecionado o qual pode alcançar a temperatura necessária e que pode solubilizar os componentes de reação. Exemplos não limitativos são qualquer solvente aprótico incluindo, mas não limitado a solventes de alquil ou haloalquil tais como hexano, ciclohexano, diclorometano ou dicloroetano, tolueno, acetona, acetato de etila, ditianos, THF, dioxano, acetonitrila, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida ou qualquer combinação destes.

Método opcional para a derivatização da base heteroaromática ou heterocíclica

Os compostos do título podem ser feitos protegendo-se opcionalmente qualquer grupo amino livre na base heterocíclica ou heteroaromática, por exemplo, N⁴-citosina, N⁶-adenina ou N²-guanina. Por exemplo, a amina pode ser protegida por uma metade acil ou uma metade dialquilaminometileno através do seguinte protocolo geral:



A proteção pode ser executada a qualquer temperatura que alcance os resultados desejados, isto é, que seja adequada para que a reação aconteça a uma velocidade aceitável sem promover a decomposição ou produtos secundários excessivos.

Qualquer solvente de reação pode ser selecionado o qual pode alcançar a temperatura necessária e que pode solubilizar os componentes de reação. Exemplos não limitativos são qualquer solvente aprótico incluindo, mas não limitado a solventes de alquil ou haloalquil tais como hexano, ciclohexano, diclorometano ou dicloroetano, tolueno, acetona, acetato de etila, ditianos, THF, dioxano, acetonitrila, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida ou qualquer combinação destes.

De forma subsequente, o grupo 3'-hidroxil livre pode ser ligado a um α ou β aminoácido protegido em N. A reação de ligação pode ser alcançada usando-se reagentes de ligação apropriados que promovem a ligação. Alguns exemplos não limitativos de reagentes de ligação são reagentes do tipo Mitsunobu (por exemplo, azodicarboxilatos de dialquila tais como azodicarboxilato de diisopropila e azodicarboxilato de dietila) com trifenil fosfino ou vários tipos de carbodiimidas.

A reação de ligação pode ser executada a qualquer temperatura que alcance os resultados desejados, isto é, que seja adequada para que a reação aconteça a uma velocidade aceitável sem promover a decomposição ou produtos secundários excessivos.

Qualquer solvente de reação pode ser selecionado o qual pode alcançar a temperatura necessária e que pode

solubilizar os componentes de reação. Exemplos não limitativos são qualquer solvente aprótico incluindo, mas não limitado a solventes de alquil ou haloalquil tais como hexano, ciclohexano, diclorometano ou dicloroetano, tolueno, acetona, acetato de etila, ditianos, THF, dioxano, acetonitrila, éter dietílico, piridina, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida ou qualquer combinação destes.

Numa forma de realização alternativa, o derivado N⁴- ou N⁶-acil é derivado de uma metade aminoacil, e pode ser preparado de acordo com a seguinte sequência de reação, protegendo-se opcionalmente os grupos hidroxil livres, seguida pela reação de condensação com o aminoéster apropriadamente protegido, e a remoção dos grupos protetores hidroxil, se necessário.

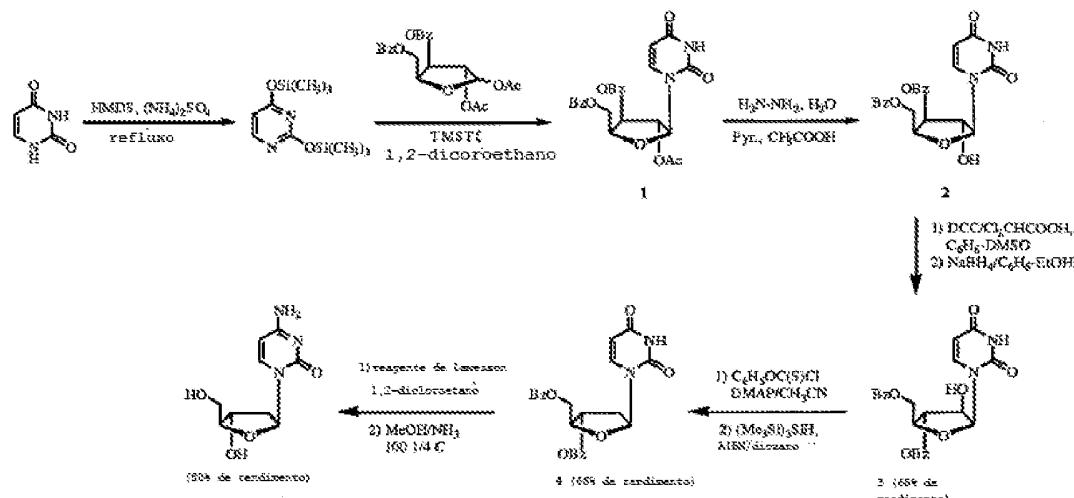
EXEMPLOS

Os pontos de fusão foram determinados em tubos capilares abertos em um aparelho Gallenkamp MFB-595-010 M e não estão corrigidos. Os espectros de absorção de UV foram registrados em um espectrofotómetro Uvikon 931 (KONTRON) em etanol. Os espectros de ¹H-NMR foram feitos à temperatura ambiente em DMSO-*d*₆ com um espectrómetro AC 250 ou 400. Os desvios químicos são fornecidos em ppm, DMSO-*d*₅ sendo ajustado a 2,49 ppm como referência. Troca de deutério, experimentos de decomposição ou 2D-COSY foram executados a fim de confirmar as tarefas do próton. As multiplicidades de sinal estão representadas por: s (único), d (duplo), dd (dobro de dobro), t (triplo), q (quádruplo), br (amplo), m (múltiplo). Todos os valores de J estão em Hz. Os espectros de massa FAB foram registrados no modo de íon positivo-(FAB > 0) ou negativo-(FAB < 0) em um espectrómetro de massa JEOL DX 300. A matriz era de álcool 3-nitrobenzílico (NBA)

ou uma mistura (50:50, v/v) de glicerol e tioglicerol (GT). Rotações específicas foram medidas em um espectropolarímetro Perkin-Elmer 241 (comprimento de rota de 1cm) e são fornecidas em unidades de 10^{-1} deg $\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$. As análises dos elementos foram executadas por "Service de Microanalyses du CNRS, Division de Venaison" (França). As análises indicadas pelos símbolos dos elementos ou funções estão dentro de $\pm 0,4\%$ dos valores teóricos. Cromatografia em camada fina foi executada em folhas de alumínio pré-cobertas de Sílica Gel 60F₂₅₄ (Merck, Art. 5554), a visualização dos produtos foi executada por absorvência em UV seguida por queima com ácido sulfúrico etanólico a 10% e aquecimento. A cromatografia em coluna foi executada em Sílica Gel 60 (Merck, Art. 9385) à pressão atmosférica.

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 1

Síntese Estereoespecífica de 2'-desoxi- β -L-citidina



(3,5-Di-O-benzoil- β -L-xilofuranosil)uracil (2)

O hidrato de hidrazina (1,4 mL, 28.7 mmol) foi adicionado a uma solução de 1-(2-O-acetyl-3,5-di-O-benzoil- β -L-xilofuranosil)uracil **1** [Ref.: Gosselin, G.; Bergogne, M.-C.; Imbach, J.-L., "Synthesis and Antiviral Evaluation of β -L-Xylofuranosyl Nucleosides of the Five Naturally Occurring

Nucleic Acid Bases", Journal of Heterocyclic Chemistry, outubro-novembro de 1993, 30, 1229-1233] (4,79g, 9,68 mmol) em piridina (60 mL) e ácido acético (15 mL). A solução foi agitada durante a noite à temperatura ambiente. Foi usada Acetona (35 mL) e a mistura foi agitada por 30 minutos. A mistura reacional foi evaporada sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [eluente: gradiente de metanol em etapas (0-4%) em diclorometano para fornecer **2** (3,0 g, 68%) que foi cristalizado a partir deciclohexano/diclorometano: mp = 111-114°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 11,35 (brs, 1H, NH), 7,9-7,4 (m, 11H, 2C₆H₅CO, H-6), (d, 1H, OH-2', J_{OH-2'}=4,2Hz), 5,77 (d, 1H, H-1', J_{1'-2'}=1,9Hz), 5,55 (d, 1H, H-5, J₅₋₆=8Hz), 5,54 (dd, 1H, H-3', J_{3'-2'}=3,9Hz e J_{3'-4'}=1,8Hz), 4,8 (m, 1H, H-4'), (m, 2H, H-5' e H-5''), 4,3 (m, 1H, H-2'), MS: FAB > 0 (matriz GT) m/z 453 (M+H)⁺, 105 (C₆H₅CO)⁺; FAB<0 (matriz GT) m/z 451 (M-H)⁻, 121 (C₆H₅CO₂)⁻, 111 (B)⁻, Calcul. Anal. para C₂₃H₂₀N₂O₈·H₂O: C, 58,09; H, 4,76; N, 5,96. Encontrado: C, 57,71; H, 4,42; N, 5,70.

1-(3,5-Di-O-benzoil-β-L-arabinofuranosil)uracil (3)

A uma solução de 1-(3,5-di-O-benzoil-β-L-xilofuranosil)uracil **2** (8g, 17,7mL) numa mistura de benzeno-DMSO anidro (265 mL, 6:4, v/v) foram adicionados piridina anidra (1,4mL), diciclohexilcarbodiimida (10,9g, 53mmol) e ácido dicloroacético (0,75mL). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente por 4 horas, e então diluída com acetato de etila (400 mL) e uma solução de ácido oxálico (4,8 g, 53mmol) em metanol (14mL) foi adicionada. Após ser agitada por 1 hora, a solução foi filtrada. O filtrado foi lavado com solução de NaCl saturada (2 x 500mL), solução de NaHCO₃ 3% (2 x 500mL) e água (2 x 500mL). A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, e então evaporada sob pressão reduzida. O resíduo resultante

foi então solubilizado Numa mistura de EtOH absoluto-benzeno (140mL, 2:1, v/v). A esta solução a 0°C foi adicionado NaBH₄ (0,96g, 26,5mmol). Após ser agitada por 1 hora, a solução foi diluída com acetato de etila (400mL), e então filtrada. O filtrado foi lavado com solução de NaCl saturada (400mL) e água (400mL). A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, e então evaporada sob pressão reduzida. O material bruto resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [eluente: gradiente de metanol em etapas (0-3%) em diclorometano para fornecer **3** (5,3g, 66%) que foi cristalizado a partir de acetonitrila: mp=182-183°C; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 11,35 (br s, 1H, NH), 8,0-7,5 (m, 11H, 2 C₆H₅CO, H-6), 6,23 (br s, 1H, OH-2'), 6,15 (d, 1H, H-1', J_{1'-2'}=4Hz), 5,54 (d, 1H, H-5, J_{5'-6'}=8,1Hz), 5,37 (t, 1H, H-3', J_{3'-2'}<=J_{3'-4'}=2,6Hz), 4,7-4,6 (m, 2H, H-5' e H-5"), 4,5 (m, 1H, H-4'); 4,4 (m, 1H, H-2'); MS: FAB>0 (matriz GT) m/z 453 (M+H)⁺, 341 (S)⁺, 113 (BH₂)⁺, 105 (C₆H₅CO)⁺; FAB<0 (matriz GT)m/z 451(M-H)⁻, 121 (C₆H₅CO₂)⁻, 111 (B)⁻; Calcul. Anal. para C₂₃H₂₀ON₂O₈: C, 61,06; H, 4,46; N, 6,19. Encontrado: C, 60,83; 4,34; N, 6,25.

1-(3,5-Di-O-benzoil-2-desoxi-β-L-eritro-pentofuranosil)uracil (4**)**

A uma solução de 1-(3,5-di-O-benzoil-β-L-*arabinofuranosil*)uracil **3** (5,2g, 11,4mmol) em 1, 2-dicloroetano anidro (120 mL) foram adicionados cloreto de fenoxitiocarbonila (4,7mL, 34,3mL) e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 12,5g, 102,6mmol). A solução resultante foi agitada à temperatura ambiente sob atmosfera de argónio por 1hora e então evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em diclorometano (300mL) e a solução orgânica foi sucessivamente lavada com uma solução de ácido hidroclórico 0,2 N arrefecida com gelo (3 x 200mL) e água (2 x 200mL) seca sobre Na₂SO₄ e então

evaporada sob pressão reduzida. O material bruto foi co-evaporado várias vezes com dioxano anidro e dissolvido neste solvente (110mL). À solução resultante foram adicionados argónio, hidreto de tris-(trimetilsilil) silano (4,2mL, 13,7mmol) e α,α' -azoisobutironitrila (AIBN, 0,6g, 3,76mmol). A mistura reacional foi aquecida e agitada a 100°C por 1 hora com argónio, então foi arrefecida à temperatura ambiente e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [eluente: gradiente de metanol em etapas (0-5%)] para fornecer **4** (2,78g, 56%) que foi cristalizado a partir de EtOH: mp=223-225°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 11,4 (br s, 1H, NH), 8,0-7,5 (m, 11H, 2C₆H₅CO, H-6), 6,28 (t, 1H, H-1', J=7Hz), (m, 2H, H-1' e H-5), 4,6-4,4 (m, 3H, H-4', H-5' e H-5"), 2,6 (m, 2H, H-2' e H-2"); MS: FAB>0 (matriz GT)m/z 437 (M+H)⁺, 3325 (S)⁺; FAB<0 (matriz GT)m/z 435 (M-H)⁻, (B)⁻; Calcul. Anal. para C₂₃H₂₀ON₂O₇: C, 63,30; H, 4,62; N, 6,42. Encontrado: C, 62,8; H, 4,79; N, 6,40.

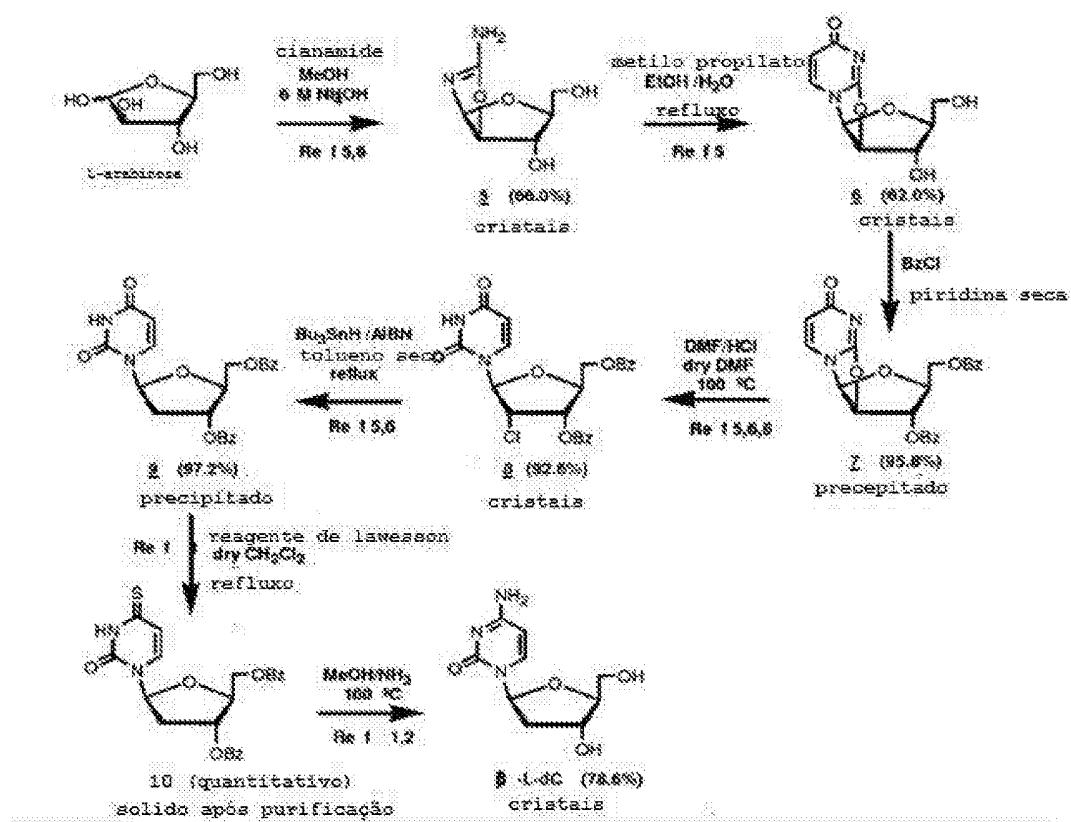
2'-Desoxi- β -L-citidina (β -L-dC)

Reagente de Lawesson (1,72g, 4,26mmol) foi adicionado sob argónio a uma solução de 1-(3,5-di-O-benzoil-2-desoxi- β -L-eritro-pentofuranosil)uracil **4** (2,66g, 6,1mmol) em 1,2-dicloroetano anidro (120mL) e a mistura reacional foi agitada sob refluxo por 2 horas. O solvente foi então evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [eluente: gradiente de acetato de etila em etapas (0-8%) em diclorometano] para fornecer o intermediário 4-tio como uma espuma amarela. Uma solução deste tio-intermediário (1,5g, 3,31mmol) em metanol amónia (previamente saturada a -10°C e vedada firmemente) (50mL) foi aquecida a 100°C numa bomba de aço inoxidável por 3 horas e então arrefecida a 0°C. A solução foi evaporada sob pressão reduzida. O material

bruto resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [eluente: gradiente de metanol em etapas (0-20%) em diclorometano]. Finalmente, as frações apropriadas foram unidas, filtradas através de uma unidade Millex HV-4 (0,45µm, Millipore) e evaporadas sob pressão reduzida para fornecer a 2'-desoxi-β-L-citidina (**β-L-dCO**) como uma espuma (0,6g, 80%) que foi cristalizada a partir de EtOH absoluto: mp = 198-199°C; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 7,77 (d, 1H, H-6, J₆₋₅ = 7,4Hz), 7,10 (br d, 2H, NH-₂), 6,13 (t, 1H, H-1', J = 6,7Hz), 5,69 (d, 1H, H-₅, J₅₋₆ = 7,4Hz), 5,19 (d, 1H, OH-₃', J_{OH-3'} = 4,1Hz), 4,96 (t, 1H, OH-5', J_{OH-5'} = J_{OH-5''} = 5,2Hz), 4,1 (m, 1H, H-3'), 3,75 (m, 1H, H-4'), 3,5 (m, 2H, H-5' e H-5''), 2,0 (m, 1H, H-2'), 1,9 (m, 1H, H-2''); MS:FAB > 0 (matriz GT) m/z 228 (M+H)⁺, 112 (BH₂)⁺; FAB < 0 (matriz GT) m/z 226 (M-H)⁻; [α]²⁰_D = -69 (c 0,52, DMSO) [[α]²⁰_D = +76 (c 0,55, DMSO) para um sal hidrocloreto comercialmente disponível do D-enantiómero]. Calcul. Anal. para C₉H₁₃N₃O₄ : C, 47,57; H, 5,77; N, 18,49. Encontrado: C, 47,35 ; H, 5,68 ; N, 18,29.

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 2

Síntese Estereoseletiva de 2'-Desoxi-β-L-Citidina (**β-L-dC**)



2-Amino- β -L-arabinofurano-[1',2':4,5]-oxazolina (5)

Uma mistura de L-arabinose (170g, 1,13mol: Fluka, >99,5%, ref. 10839), cianamida (100g, 2,38mol: Fluka, >98%, ref. 28330), metanol (300mL), e 6M-NH₄OH (50 mL) foi agitada à temperatura ambiente por 3 dias e então mantido a -10°C durante a noite. O produto foi recolhido por succção, lavado sucessivamente com metanol e éter, e seco a vácuo. Rendimento, em 130 g (66,0%) do composto analiticamente puro **5**, m.p. 170-172°C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 8 ppm 6,35 (br s, 2H, NH₂), 5,15 (d, 1H, H-1, J= 5,6Hz), 5,45 (br s, 1H, OH-3), 4,70 (br s, 1H, OH-5), 4,55 (d, 1H, H-2, J= 5,6 Hz), 4,00 (br s, 1H, H-3), 3,65 (m, 1H, H-4), 3,25 (m, 2H, H-5, H-5').

O^{2,2'}-anidro- β -L-uridina (6)

Uma solução do composto **5** (98,8g, 0,57 mol) e propiolato de metil (98mL: Fluka, >97%, ref. 81863) em etanol aquoso 50% (740 mL) foi refluxado por 5 horas, então arrefecido e

concentrado sob pressão reduzida à metade do volume original. Após precipitação com acetona (600 mL), o produto foi recolhido por sucção, lavado com etanol e éter, e seco. A solução-mãe foi parcialmente concentrada, o precipitado concentrado com acetona (1000mL), o sólido concentrado por sucção, e lavado com acetona e éter para fornecer um outro lote do produto. Rendimento total, 80g (62%) do composto **6**, m. p. 236-240°C; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ ppm 7,87 (d, 1H, H-6, J = 7,4Hz), 6,35 (d, 1H, H-1', J = 5,4Hz), 5,95 (d, 1H, H-5, J = 7,4Hz), 5,90 (d, 1H, OH-3'), 5,20 (d, 1H, H-2', J = 5,7Hz), 5,00 (m, 1H, OH-3'), 4,44 (br s, 1H, H-3'), 4,05 (m, 1H, H-4'), 3,25 (m, 2H, H-5, H-5').

3',5'-Di-O-benzoil-O^{2'2'}-anidro- β -L-uridina (7)

A uma solução do composto **6** (71,1 g, 0,31 mol) em piridina anidra (1200 mL) foi adicionado cloreto de benzoíla (80,4mL: Fluka, p. a., ref. 12930) a 0°C e sob argónio. A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente por 5 horas sob exclusão de humidade atmosférica e foi cessada pela adição de etanol. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida e o resíduo resultante foi coevaporado com tolueno e etanol absoluto. A mistura bruta foi então diluída com etanol e o precipitado foi recolhido com sucção, lavada sucessivamente com etanol e éter, e seca. Rendimento, 129 g (95,8%) do composto **7**, m. p. 254°C; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ ppm 8, 1-7,4 (m, 11H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$, H-6), 6,50 (d, 1H, H-1', J = 5,7Hz), 5,90 (d, 1H, H-5, J = 7,5Hz), 5,80 (d, 1H, H-2', J = 5,8Hz), 5,70 (d, 1H, H-3'), 4,90 (m, 1H, H-4'), 4,35 (m, 2H, H-5, H-5').

3',5'-Di-O-benzoil-2'-cloro-2'-desoxi-P,L-uridina (8)

A uma solução do composto **7** (60,3g, 0,139mol) em dimetilformamida (460mL) foi adicionado a 0°C uma solução de N-HCl/DMF 3,2 N (208mL, preparada in situ adicionando-se

47,2mL de cloreto de acetila (Fluka, p. a., ref. 00990) a 0°C a uma solução de 27,3mL de metanol e 133,5mL de dimetilformamida). A mistura reacional foi agitada a 100°C por 1 hora sob exclusão de umidade atmosférica, arrefecida, e vertida em água (4000mL). o precipitado do composto **8** foi recolhido com sucção, lavado com água, e recristalizado a partir de etanol. Os cristais foram recolhidos, lavados com etanol e éter arrefecidos, e secos sob pressão reduzida. Rendimento, 60,6g (92.6%) do composto **8**, m. p. 164-165°C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm 8,7 (br s, 1H, NH), 8,1-7,3 (m, 11H, C₆H₅CO, H-6), 6,15 (d, 1H, H-1', J= 4,8Hz), 5,5 (m, 2H, H-5, H-2'), 4,65 (m, 4H, H-3', H-4', H-5', H-5").

3',5'-Di-O-benzoil-2'-desoxi-β-L-uridina (9)

Uma mistura do composto **8** (60,28g, 0,128mol), hidreto de tri-n-butiltin (95mL: Fluka, > 98%, ref. 90915) e azabisisobutironitrila (0,568 g: Fluka, > 98%, ref. 11630) em tolueno seco (720mL) foi refluxada sob agitação por 5 horas e foi arrefecida. o sólido foi recolhido com sucção e lavado com tolueno frio e éter de petróleo. o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e diluído com éter de petróleo para depositar uma produção adicional do composto **9**. Rendimento, 54,28 g (97,2%) do composto **9**; m. p. 220-221°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ ppm 8,91 (br s, 1H, NH), 8,1-7,5 (m, 11 H, C₆H₅CO e H-6), 6,43 (q, 1H, H-1', J_{1',2'}=5,7 Hz e J_{1'-2"} = 8,3Hz), 5,7-5,6 (m, 2H, H-3' e H-5), 4,8-(m, 3H, H-5', H-5" e H-4'), 2,8-2,7 (m, 1H, H-2'), 2,4-2,3 (m, 1H, H-2").

3',5'-Di-O-benzoil-2'-desoxi-β-L-4-tio-uridina (10)

Uma solução do composto **9** (69g, 0,158mol) e reagente de Lawesson (74 g: Fluka,> 98%, ref. 61750) em cloreto de metíleno anidro (3900mL) foi refluxada com argónio durante a noite. Após a evaporação do solvente, o resíduo bruto foi

purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [eluente: gradiente de metanol (0-2%) em cloreto de metíleno] para fornecer o composto **10** puro (73g) em rendimento quantitativo; ^1H NMR (CDCl_3) δ ppm 9,5 (br s, 1H, NH), 8,1-7,4 (m, 10H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$), 7,32 (d, 1H, H-6, $J = 7,7\text{Hz}$), 6,30 (dd, 1H, H-1', $J = 5,6\text{Hz}$ e $J = 8,2\text{Hz}$), 6,22 (d, 1H, H-5, $J = 7,7\text{Hz}$), 5,6 (m, 1H, H-3'), 4,7 (m, 2H, H-5', H-5''), 4,5 (m, 1H, H-4'), 2,8 (m, 1H, H-2'), 2,3 (m, 1H, H-2'').

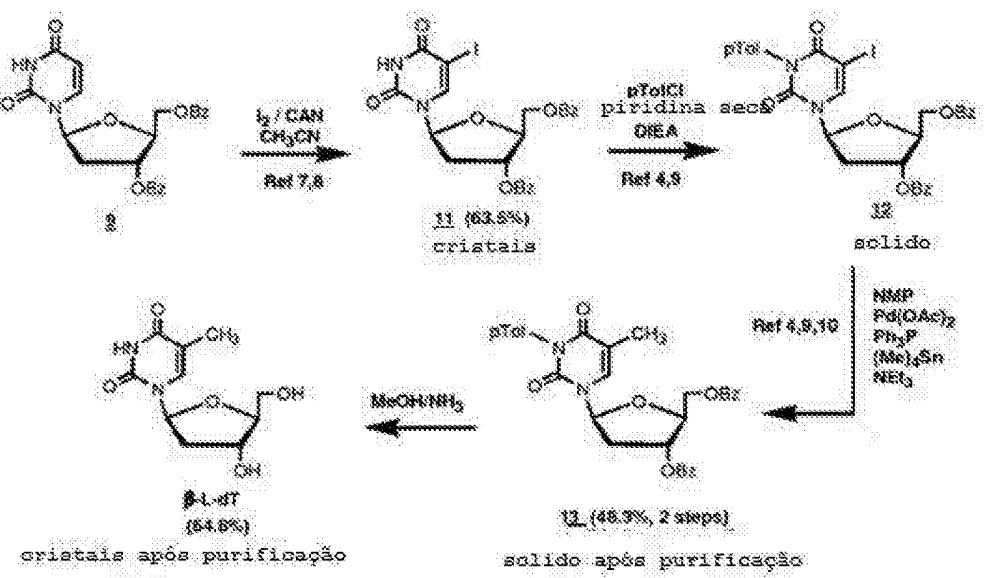
2'-Desoxi- β -L-citosina

Uma solução do composto **10** (7,3 g, 0,016 mol) em metanol saturado com amónia previamente saturada -5°C , vedada firmemente, e mantida no "frio" (73mL) foi aquecida a 100°C num cilindro de aço inoxidável por 3 horas. Após arrefecimento cuidadoso, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Uma solução aquosa do resíduo foi lavada com acetato de etila e evaporada à secura. Tal procedimento foi executado em outras 9 amostras (cada uma com 7,3 g) do composto **10** (quantidade total de **10**= 73g). Os 10 resíduos foram combinados, diluídos com etanol absoluto e arrefecidos para fornecer a 2'-desoxi- β -L-citosina como cristais. Traços de benzamida foram eliminados dos cristais de 2'-desoxi- β -L-citosina por um procedimento de extração sólido-líquido (sob refluxo em acetato de etila por 1 hora). Rendimento, 28.75 g (78.6%) do composto **6**; m. p. 141-145 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (DMSO) δ ppm 8,22 e 8,00 (2 br s, 2H, NH_2), 7,98 (d, 1H, H-6, $J = 7,59\text{Hz}$), 6,12 (t, 1H, H-1', $J = 6,5\text{Hz}$ e $J = 7,6\text{Hz}$), 5,89 (d, 1H, H-5, $J = 7,59\text{Hz}$), 5,3 (br s, 1H, OH-3'), 5,1 (br s, 1H, OH-5'), 4,2 (m, 1H, H-3'), 3,80 (q, 1H, H-4', $J = 3,6\text{ Hz}$ e $J = 6,9\text{Hz}$), 3,6-3,5 (m, 2H, H-5', H-5''), 2,2-2,0 (m, 2H, H-2', H-2''); FAB < 0 , (GT) m/e 226 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$, 110 (B) $^-$; FAB > 0 (GT) 228 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 112 (B+2H) $^+$;

$[\alpha]_{D^{20}} = -56,48$ ($c = 1,08$ em DMSO); UV (pH = 7) $\lambda_{\text{max}} = 270$ nm ($\varepsilon = 10000$).

EXEMPLO 1

Síntese Estereoseletiva de 2'-Desoxi- β -L-Timidina (β -L-dT)



3',5'-Di-O-benzoil-2'-desoxi-5-iodo- β -L-uridina (**11**)

Uma mistura do composto **9** (105,8g, 0,242 mol), iodo (76,8g: Fluka, 99,8%, ref. 57650), nitrato de cério e amónio (CAN) (66,4g: Aldrich,> 98,5%, ref. 21, 547-3) e acetonitrila (2550mL) foi agitada a 80°C por 3 horas, a mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente, levando à cristalização do composto **11** (86,6g, 63,5%); m. p. 192-194°C; 1H NMR (DMSO) δ ppm 8,34 (s, 1H, NH), 8,2-(m, 11H, 2 C_6H_5CO , H-6), 6,31 (q, 1H, H-1', $J = 5,5$ Hz e $J = 8,7$ Hz), 5,5 (m, 1H, H-3'), 4,7 (m, 2H, H-5', H-5''), 4,5 (m, 1H, H-4'), 2,7 (m, 1H, H-2'), 2,3 (m, 1H, H-2''); FAB < 0, (GT) m/e 561 ($M-H$) $^-$, 237 (B) $^-$; FAB > 0 (GT) 563 ($M+H$) $^+$; $[\alpha]_{D^{20}} + 39,05$ ($c = 1,05$ em DMSO); UV (EtOH 95) $\lambda_{\text{max}} = 281$ nm ($\varepsilon = 9000$), $\lambda_{\text{min}} = 254$ nm ($\varepsilon = 4000$), $\lambda_{\text{max}} = 229$ nm ($\varepsilon = 31000$); Calculado Anal. para $C_{23}H_{19}IN_2O_7$: C, 49,13H, 3,41 N, 4,98 I, 22,57. Encontrado: C, 49,31, H, 3,53, N, 5,05, I, 22,36.

3',5'-Di-O-benzoil-2'-desoxi-3-N-toluoil-β-L-timidina (13)

A uma solução do composto **11** (86,6g, 0,154 mol) em piridina anidra (1530mL) contendo diisopropiletilamina (53,6mL: Aldrich, > 99,5%, ref. 38,764-9) foi adicionado, em porções a 0°C, cloreto de *p*-toluoil (40,6mL: Aldrich, 98%, ref. 10,663-1). A mistura reacional foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente, então foi adicionada água para interromper a reação e a mistura reacional foi extraída com cloreto de metileno. A fase orgânica foi lavada com água, seca sobre sulfato de sódio e evaporada à secura para fornecer a 3',5'-di-O-benzoil-2'-desoxi-3-N-toluoil-5-iodo-β-L-uridina bruta (**12**) que pode ser usada para a próxima etapa sem purificação adicional.

Uma solução da mistura bruta **12**, acetato de paládio (3,44g: Aldrich, > 99,98%, ref. 37, 987-5), trifenilfosfino (8,0g: Fluka, >97%, ref. 93092) em N-metilpirolidinona (1375mL: Aldrich, >99%, ref. 44,377-8) com trietilamina (4,3mL) foi agitada à temperatura ambiente por 45 minutos. Então, tetrametiltin (42,4mL: Aldrich, >99%, ref. 14,647-1) foi adicionado em gotas a 0°C sob argônio. Após agitação a 100-110°C durante a noite, a mistura reacional foi vertida em água e extraída com éter dietílico. A solução orgânica foi seca sobre sulfato de sódio e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [eluente: gradiente de acetato de etila em etapas (0-10%) em tolueno] para fornecer o composto **13** como uma espuma (42,3 g, 48,3% para as duas etapas). ^1H NMR (DMSO) δ ppm 8,3-7,2 (m, 15H, 2 $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$, 1 $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}$, H-6), 6,29 (t, 1H, H-1', J = 7,0Hz), 5,7 (m, 1H, H-3'), 4,7-4,5 (m, 3H, H-5', H-5", H-4'), 2,7-2,6 (m, 2H, H-2', H-2"); FAB <0, (GT) m/e 567 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$, 449 ($\text{M}-\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}$) $^-$, 243 (B) $^-$, 121 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}$) $^-$; FAB >0 (GT) 1137 (2 $\text{M}+\text{H}$) $^+$, 569 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 325 ($\text{M}-\text{B}$) $^-$, 245 (B+2H) $^+$, 119 ($\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$) $^+$.

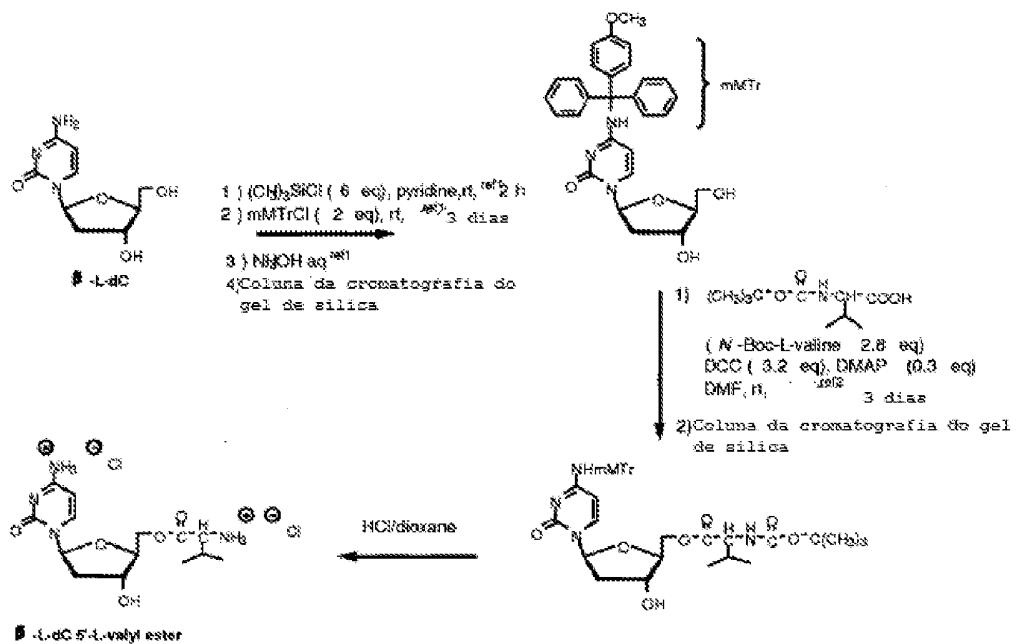
2'-desoxi-(β -L-timidina

Uma solução do composto **13** (42,3 g, 0,074 mol) em metanol previamente saturada com amónia a -5°C, vedada firmemente, e mantida no frio (1850mL) foi agitada à temperatura ambiente por dois dias. Após evaporação do solvente, o resíduo foi diluído com água e lavado várias vezes com acetato de etila. A camada aquosa foi separada, evaporada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [eluente: gradiente de metanol em etapas (0-10%) em cloreto de metileno] para fornecer a 2'-desoxi- β -L-timidina pura (11,62g, 64,8%) que foi cristalizada a partir de etanol; m. p. 185-188°C; 1 H NMR (DMSO) δ ppm 11,3 (s, 1H, NH), 7,70 (s, 1H, H-6), 6,2 (pt, 1H, H-1'), 5,24 (d, 1H, OH-3', J = 4,2Hz), 5,08 (t, 1H, OH-5', J = 5,1Hz), 4,2 (m, 1H, H-3'), 3,7 (m, 1H, H-4'), 3,5-3,6 (m, 2H, H-5', H-5''), 2,1-2,0 (m, 2H, H-2', H-2''); FAB < 0, (GT) m/e 483 (2M-H)⁻, 349 (M+T-H)⁻, 241 (M-H)⁻, 125 (B)⁻; FAB > 0 (GT) 243 (M+H)⁺, 127 (B+2H)⁺⁺; $[\alpha]_D^{20}$ -13,0 (c = 1,0 em DMSO); UV (pH = 1) λ_{max} = 267nm (ϵ = 9700), λ_{min} = 234 nm (ϵ = 2 000).

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 3

Síntese Química de Éster β L-dC 5'-L-Valil

Como um exemplo ilustrativo da síntese de β -L-dC aminoésteres, o éster β -L-dC-5'-L-valil é sintetizado protegendo-se primeiro o grupo amino de β -L-dC usando-se $(CH_3)_3SiCl$. O β -L-dC protegido passa por esterificação pela adição de N-Boc L-valina. O éster é então desprotegido para fornecer o éster β -L-dC 5'-L-Valil. Outros métodos para sintetizar ésteres de aminoácido são divulgados nas Patentes americanas nº 5,700,936 e 4,957,924. O 5'-O-éster L-valinil de L-dA, L-dC, L-dT, e L-dU são formas de realização preferenciais desta invenção.



Ref. 1: pela modificação de um procedimento previamente descrito na série D: Nyilas, A. e outros, *Tetrahedron* **1990**, 46(6), 2149-2164.

Ref. 2: pela modificação de um procedimento previamente descrito para o éster aciclovir L-valil: Beauchamp, L. M. e outros, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **1992**, 3(3), 157-164.

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 4

⁴N-mMTr-2'-desoxi- β -L-citidina (1, Figura 1)

O β -L-dC (1g; 4,40mmol) foi tomado em piridina seca (44 mL). Após proteção transitória com grupo trimetilsilil (TMSCl, 3,34 mL, 26,4 mmol) seguida por adição de mMTrCl (3,38 mg, 11 mmol) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 540 mg, 4,40 mmol), a mistura reacional foi agitada por 3 dias à temperatura ambiente {A. Nyilas; C. Glemarec; J. Chattopadhyaya; *Tetrahedron Lett.*, 1990, **46**, 2149-2164}. Após a extração com bicarbonato de sódio, a camada orgânica foi lavada com água, evaporada e tomada em dioxano (40 mL). Amônia aquosa (8,5 mL) foi adicionada em gotas e a mistura

reacional foi agitada durante a noite. Após evaporação de todos os materiais voláteis, a resíduo sólido foi purificado em coluna de sílica gel {eluente: gradiente de MeOH em etapas (0-10%) em CH_2Cl_2 }, fornecendo o composto desejado **1** (1,02 g, 46,5%) como uma espuma. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ ppm 8,39 (br s, 1H, NH, D_2O passível de troca), 7,70 (d, 1H, H-6, J = 7,3 Hz), 7,4-6,8 (m, 14H, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{C} (\text{C}_6\text{H}_4)\text{OCH}_3$), 6,23 (d, 1H, H-5, J = 7,3 Hz), 6,02 (t, 1H, H-1', J = 6,5 Hz), 5,16 (d, 1H, OH-3', J = 3,8 Hz, D_2O passível de troca), 4,9 (br s, 1H, OH-5', D_2O passível de troca), 4,1 (m, 1H, H-3'), 3,7 (m, 4H, H-4', OCH_3), 3,5 (m, 2H, H-5', H-5''), 2,1-1,8 (2m, 2H, H-2', H-2''); FAB < 0, (GT) m/e 498 (M-H)⁻, 382 (B)⁻; 226 (M-mMTr)⁻; FAB > 0 (GT) 500 (M+H)⁺, 273 (mMTr)⁺; UV (EtOH 95) $\lambda_{\text{max}} = 279$ nm; $\lambda_{\text{min}} = 250$ nm.

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 5

Éster 5'-L-N-(terc-butoxicarbonil)valina de $^4\text{N-mMTr-2}'$ -desoxi- β -L-citidina (**2**, Figura 1)

A uma solução do composto **1** (1 g, 2,00 mmol) em DMF seco (34 mL) foram adicionados sucessivamente 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 37 mg, 0,3 mmol), N-(terc-butoxi-carbonil)-L-valina (Boc-Val-OH, 587 mg, 2,7 mmol), e N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 660 mg, 3,2 mmol) {L. M. Beauchamp; G. F. Orr; P. De Miranda; T. Bumette; T. A. Krenitsky; Antiviral Chem. Chemother. 1992, **3**, 157-164}. A solução foi agitada à temperatura ambiente. Após 40 horas, a mistura reacional foi recarregada com DMAP adicional (37 mg, 0,3 mmol), Boc-Val-OH (587 mg, 2,7 mmol) e DCC (660 mg, 3,2 mmol) e agitada à temperatura ambiente por 40 horas. A mistura foi filtrada, o DMF foi removido do filtrado sob pressão reduzida, e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna se sílica gel {eluente: gradiente de MeOH em etapas (0-10%) em CH_2Cl_2 } para fornecer o

composto 2 desejado (515 mg, 37%) como uma espuma. ^1H NMR (DMSO- d_6) 8 ppm 8,44 (br s, ^1H , NH, D_2O passível de troca), 7, 7-6, 8 (m, 15H, H-6 e $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{OCH}_3$), 6,26 (d, 1H, H-5, $J = 7,3$ Hz), 6,06 (t, 1H, H-1', $J = 6,6$ Hz), 5,7 (bs, 1H, OH-3', D_2O passível de troca), 4,2-4,0 (m, 3H, H-3', H-4' e CH), 3,8- 3,9 (m, 2H, H-5', H-5"), 3,7 (s, 3H, OCH_3), 2,0-1,9 (m, 3H, H-2', H-2", CH), 1,36 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 0,86 (m, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); FAB < 0, (GT) m/e 1395 (2M-H) $^-$ 697 (M-H) $^-$, 425 (M-mMTr) $^-$, 382 (B) $^-$; 216 (BocVal-H) $^-$; FAB > 0 (GT) 384 (B+2H) $^+$, 273 (mMTr) $^+$; 57 $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ $^+$; UV (EtOH 95) $\lambda_{\text{max}} = 279$ nm; $\lambda_{\text{min}} = 249$ nm.

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 6

Éster 5'-L-valina de hidrocloreto de 2'-desoxi- β -L-citidina (3, Figura 1)

O composto 2 (500mg, 0,715mmol) foi dissolvido em uma solução 20% de ácido trifluoracético em CH_2Cl_2 (25mL) e triisopropilsilano (1,47mL, 71,5mmol) foi adicionado. Uma mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente por 1hora e o éster de valina foi precipitado em Et_2O como o sal trifluoracetato. Após várias evaporações com água, o precipitado foi tomado em água (2mL), tratado com uma solução saturada de HCl em dioxano (20mL) e evaporado sob pressão reduzida. Este tratamento foi repetido 3 vezes e o composto desejado 3 foi finalmente precipitado em éter (207 mg, 73%) como o sal hidrocloreto. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ ppm 9,7 (br s, 1H, 1/2 NH_2 , D_2O passível de troca), 8,6 (br s, 4H, 1/2 NH_2 , NH_3 , D_2O passível de troca), 7,98 (d, 1H, , H-6, $J = 7,8$ Hz), 6,17 (d, 1H, H-5, $J = 7,8$ Hz), 6,11 (pt,1H, H-1'), 5,5 (bs, < 1H, OH-3', D_2O passível de troca), (m, 2H, H-5', H-5"), 4,3 (m, 1H, H-3'), 4,2-4,0 (m, 2H, H-4', CH), 3,8-3,9, 3,7 (s, 3H, OCH_3), 2,3-2,1 (m, 3H, H-2', H-2", CH), 0,94 (dd, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $J = 3,7$ e 6,6 Hz); FAB <0,

(GT) m/e 361 (M+Cl)⁻, 325 (M-H)⁻, 116 (Val-H)⁻, 110 (B)⁻; 216 (BocVal-H)⁻; FAB > 0 (GT) 653 (2M+H)⁺, 327 (M+H)⁺; 112 (B+2H)⁺;)+; { α } D²⁰ = 28, 57 (c = 0,49 em DMSO); UV (EtOH95) $\lambda_{\text{max}} = 272$ nm ($\epsilon = 8700$); $\lambda_{\text{min}} = 255$ nm ($\epsilon = 7600$); HPLC rt= 8,37min (gradiente de 0 a 50% CH₃N em tampão acetato de trietilamônio 20 mM programado por um período de 30 min com uma velocidade de fluxo de 1 mL/min).

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 7

N⁴-acetil-2'-desoxi- β -L-citidina (4, Figura 2)

A uma suspensão do nucleosídeo, β -L-dC (415mg, 1,83mmol) em N,N-dimetilformamida (9,2mL) foi adicionado anidrido acético (207 μ L, 2,20mmol) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente por 24horas [V. Bhat; B. G. Ugarkar; V. A. Sayeed, K.Grimm; N. Kosora; P. A. Domenico; E. Stocker, Nucleosides & Nucleotides, 1989, 8(2), 179-183]. Após remoção do DMF sob pressão reduzida, o resíduo resultante foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica gel [eluente: MeOH 15% em CH₂CL₂] para fornecer o composto desejado (310mg, 63%) que foi recristalizado do etanol; mp. 128-170°C; ¹H NMR (DMSO-d₆) δ ppm 10,86 (s, 1H, NH, D₂O passível de troca), 8,31 (d, 1H, H-6, $J = 7,5$ Hz), 7,18 (d, 1H, H-5, $J = 7,5$ Hz), 6,09 (t, 1H, H-1', $J = 6,3$ Hz), 5,25 (d, 1H, OH-3', D₂O passível de troca, $J = 4,2$ Hz), 5,03 (t, 1H, OH-5', D₂O passível de troca, $J = 5,0$ Hz), 4,1-4,2 (m, 1H, H-3'), 3,8 (m, 1H, H-4'), 3,4-3,6 (m, 2H, 2H, H-5', H-5''), 2,2-2,3 (m, 1H, H-2'), 2,08 (s, 3H, CH₃), 2,0-1,9 (m, 1H, H-2''); FAB < 0, (GT) m/e 806 (3M-H)⁻, 537 (2M-H)⁻, 360 (M+G-H)⁻, 268 (M-H)⁻, 152 (B)⁻; FAB > 0 (GT) 808 (3M+H)⁺, 539 (2M+H)⁺; 362 (M+G+H)⁺, 270 (M+H)⁺, 154 (B+2H)⁺, 117 (S)⁺; UV (H₂O) $\lambda_{\text{max}} = 297$ nm ($\epsilon = 8300$); $\lambda_{\text{min}} = 270$ nm ($\epsilon = 3500$); $\lambda_{\text{max}} = 245$ nm

($\varepsilon=14400$); $\lambda_{\text{min}} = 226\text{nm}$ ($\varepsilon= 5800$); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 81,31$ ($c = 1,07$ em DMSO).

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 8

N^4 -[(Dimetilamino)metileno]-2'-desoxi- β -L-citidina (5, Figura 3)

O composto do título foi preparado de acordo com o procedimento público desenvolvido para a preparação do D-enanciómero correspondente [S. G. Kerr, e T. I. Kalman, *J. Pharm. Sei.* 1994, 83, 582-586]. Uma solução de L-dC (500mg, 2,20mmol) em DMF (4,8mL) foi tratada com dimetilformamida dimetilacetal (2,8mL, 21,08mmol), e agitada à temperatura ambiente durante a noite. A solução foi evaporada sob pressão reduzida, e coevaporada com etanol. A cristalização a partir de etanol-éter forneceu o composto do título (501,2mg, 81%) como cristais amarelos claros. M.p. 174-176°C (lit.: 188-190°C para o D-enanciómero); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ ppm 8,60 (s, 1H, N=CH), (d, 1H, H-6), 6,15 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H, H-1'), 5,96 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, H-5), 5,22 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H, OH-3'), 5,01 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, OH-5'), 4,20 (m, 1H, H-4'), 3,80 (m, 1H, H-3'), 3,56 (m, 2H, H-5' e H-5''), 3,15 e 3,02 (2s, 3H e 3H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2,22-1, 90 (2m, 1H e 1H, H-2' e H-2''); FAB > 0 (GT) 847 ($3\text{M}+\text{H}$) $^+$ 565 ($2\text{M}+\text{H}$) $^+$ 283 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$; FAB < 0, (GT) m/z 599 ($2\text{M}+\text{Cl}$) $^-$, 317 ($\text{M}+\text{Cl}$) $^-$, 165 (B) $^-$.

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 9

3',5'-Di-O-acetyl-2'-desoxi- β -citidina (6, Figura 4)

O composto do título foi sintetizado numa etapa inicial a partir da L-dC e seguindo um procedimento desenvolvido por Breiner e outros [R. G. Breiner; W. Rose; J. A. Dunn; J. E. Mae Diarmid e J. Bardos; *J. Med. Chem.* 1990, 32, 2596-2603]

para a preparação do D-enanciómero. Uma solução de L-dC (765mg, 3,37mmol) e cloreto de acetila (960 μ l, 13,48mmol) em ácido acético glacial (4,8ml) foi agitada à temperatura ambiente por 10 min, então clorofórmio anidro (3,5mL) foi adicionado e a agitação foi continuada por 24horas. A solução foi evaporada sob pressão reduzida e coevaporada com etanol. A cristalização a partir do etanol produziu 78% do composto desejado, mp 192.193°C (lit: 187-189°C para o D-enanciómero [Breiner e outros, J. Med. Chem. 1990, 33, 2596-2603]); 1 H NMR(DMSO-d₆) δ ppm 9,8 e 8,7 (2 br s, < 3H, NH₃⁺, D₂O passível de troca), 8,0 (d, 1H, H-6, J = 7,8 Hz), 6,18 (d, 1H, H-5, J = 7,8Hz), 6,08 (t, 1H, H-1', J = 6,7 Hz), 5,2 (m, 1H, H-3'), 4,3-4,1 (m, 3H, H-4', H-5', H-5"), 2,4-2,5 (m, 2H, H-2', H- 2"), 2,06 e 2,03 (2 s, 6H, 2 CH₃) ; FAB < 0, (GT) m/e 968 (3M+C1)⁻, 657 (2M+C1)⁻, 438 (M+G+C1)⁻, 346 (M+C1)⁻, 310 (M-H)⁻, 110 (B)⁻; 59 (CH₃COO)⁻; FAB > 0 (GT) 623 (2M+H)⁺, 312-(M+H)⁺, 201 (S)⁺, 112 (B+2H)⁺, 43(CH³CO)⁺; $[\alpha]_D^{20}$ 36,27 (c = 1.02 DMSO) ; UV (MeOH) λ_{max} = 277 nm (ε =9900) ; λ_{min} = 246 nm (ε =5000)

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 10

Diéster de 3',5'-L-N-(t-Butoxicarbonil)valina de 2'-desoxi- β -L-citidina (9), Figura 5)

Uma solução de N⁴-[(dimetilamino)metileno]-2'-desoxi- β -L-citidina [7, 500mg, 1,77mmol] em DMF (35mL) foi tratada com Boc-Val-OH (1,31g, 6,03mmol), DMAP (86,5mg, 0,71mmol), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etylcarbodiimida (EDC) (1,36g, 7,09mmol), e agitada à temperatura ambiente por 40horas. Quantidades adicionais de Boc-Val-OH (655mg, 3,01mmol), DMAP (43,2mg, 0,35mmol), EDC (680mg, 3,55mmol) foram adicionadas, e a solução foi agitada por um período adicional de 20horas. Após evaporação sob pressão reduzida, o resíduo foi tomado em CH₂Cl₂, e extraído várias vezes com água. A camada orgânica

foi lavada com salmoura (100 mL), seca (Na_2SO_4), e evaporada sob pressão reduzida para fornecer o composto **8** como um material bruto, que foi usado na próxima etapa sem purificação adicional. O resíduo foi tomado em dioxano (18 mL), tratado com NH_4OH aq. 26%, e agitado à temperatura ambiente por 1 hora. A solução foi evaporada sob pressão reduzida, e o resíduo foi purificado por cromatografia em sílica gel usando-se um gradiente em etapas de MeOH (0-5%) e CH_2Cl_2 , para fornecer o composto do título (698,7 mg, 58% a partir de **9**). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ ppm 7,58 (d, 1H, H-6), 7,29-7,18 (m, 4H, NH-Boc e NH_2), 6,20 (t, J = 6,6 Hz, 1H, H-1'), 5,75 (d, J = 7, 3 Hz, 1H, H-5), 5,20 (br, s, 1H, H-3'), 4,29 (m, 2H, H-5' e H-5"), 4,14 (br s, 1H, H-4'), 3,86 (m, 2H, CH-NH-Boc), 2,31-2,21 (m, 2H, H-2' e H-2"), 2,13-1,98 (m, 2H, CH(iPr)), 1,38 e 1,36 (2s, 18H, tBu), 0,88 e 0,85 (2 d, J = 6,8Hz, 12H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ ppm 172,67 e 172,46, 166,41, 156,64 e 155,70, 141,39, 95,43, 85,78, 82,03, 79,14, 75,57, 64,90, 60,37 e 60,11, 37,40, 30,33, 29,00, 19,83-19,12; FAB > 0 (GT) 626 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 112 ($\text{B}+2\text{H}$)⁺, 255 ($\text{M}-\text{Boc}$)⁺; FAB <0, (GT) m/z 1249 (2 $\text{M}-\text{H}$)⁻, 624 ($\text{M}-\text{H}$)⁻.

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 11

Éster de 3,5'-L-Valina de hidrocloreto de 2'-desoxi- β -L-citidina (**10**, Figura 5)

Uma solução de **9** (675 mg, 1,08 mmol) em dioxano (30ml) foi tratada com uma solução de HCl 26% em dioxano (30ml), e agitada à temperatura ambiente por 1hora e 55minutos. A suspensão branca resultante foi evaporada sob pressão reduzida. O resíduo sólido branco foi tomado em uma quantidade mínima de MeOH e precipitado em éter para fornecer o composto do título 10 como um sólido branco. Mp. 187°C (decomp.); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ ppm 9,79 (br s, 1H, 1/2

NH₂), 8,72 (br s, 7H, 1/2 NH₂ e NH₃⁺), 8,04 (d, 1H, H-6), 6,21 (d, J = 7,8Hz, 1H, H-5), 6,16 (t, J = 6,9Hz, 1H, H-1'), 5,39 (m, 1H, H-3'), 4,50-4,40 (m, 3H, H-4', H-5' e H-5''), 3,90 (2 br d, 2H, CH-NH₃⁺), 2,63-2,50 (2m, 2H, H-2' e H-2''), 2,21 (m, 2H, CH(iPr)), 1,02-0,94 (m, 12H, CH(CH₃)₂); ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ ppm 169,50 e 168,94, 161,02, 148,50, 145,26, 95,18, 87,19, 82,15, 76,14, 65,77 e 65,59, 58,12 e 58,07, 37,00, 30,16, 19,26-18,51; FAB > 0 (GT) 426 (M+H)⁺, 112 (B+2H)⁺; FAB < 0, (GT) m/z 885 (2M+Cl)⁻, 460 (M+Cl); UV (H₂O) λ_{max} = 270 nm (ε 7600).

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 12

Éster N⁴-Boc-Valinil de 2'-desoxi-β-L-citidina (13, Figura 6)

Uma mistura de L-dC (1,80g, 7,92mmol) e trietilamina (8,8mL, 63,14mmol) em THF anidro (80mL) foi tratada com clorotrimetilsilano (6mL, 47,28mmol) e agitada à temperatura ambiente durante a noite. A reação foi arrefecida pela adição de uma solução aquosa saturada de NH₄Cl (26mL) e água (10mL). A camada aquosa foi extraída três vezes com EtOAc. As camadas orgânicas foram combinadas, lavadas com salmoura, secas (Na₂SO₄) e evaporadas sob pressão reduzida para fornecer um óleo espumoso amarelo claro bruto contendo 11, que foi usado na próxima etapa sem purificação adicional. O resíduo foi tomado em CH₂Cl₂ (104mL), tratado com N-(terc-butoxicarbonil)-L-valina (Boc-Val-OH, 1,72g, 7,90mmol), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfônio (BOP, 4,20g, 9,50mmol), trietilamina (2,2mL, 15,78mmol), e agitado à temperatura ambiente por 2 dias. A solução foi diluída com EtOAc e foi extraída duas vezes com NaHCO₃ saturado. A camada orgânica foi seca (Na₂SO₄) e evaporada sob pressão reduzida para

fornecer 12 como um material bruto, que foi usado para a próxima etapa sem purificação adicional. Este resíduo foi tomado em dioxano (80 mL), tratado com solução de NH₄OH 26% aquosa, e agitado à temperatura ambiente por 6 horas e 45 minutos. A solução foi evaporada sob pressão reduzida, coevaporada com EtOH absoluto, e o resíduo foi purificado por cromatografia em sílica gel, usando-se um gradiente de MeOH em etapas (5-10%) em CH₂Cl₂, para fornecer o composto **13** como uma espuma (1,64g, 48,5% de rendimento total). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ ppm 10,88 (s, 1H, NH-4) , 8,40 (d, 1H, H-6) , 7,26 (d, J = 7,4Hz, 1H, H-5) , 7,06 (d, J=8,2Hz, 1H, CH-NH-Boc) , 6,15 (t, J= 6,3Hz, 1H, H- 1') , 5,32 (d, J = 4,2Hz, 1H, OH-3') , 5,09 (t, J= 5,2Hz, 1H, OH-5') , 4,27 (m, 1H, H-3') , 4,06 (pt, J = 7,5Hz, 1H, CH-NH-Boc) , 3,91 (m, 1H, H-4') , 3,63 (m, 2H, H-5' e H-5") , 235 (m, 1H, H-2") , 2,06 (m, 2H, H-2' e CH(CH₃)₂) , 1,43 (s, 9H, tBu) , 0,92 (pt, J = 6,6Hz, 6H, CH(CH₃)₂) ; ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ ppm 174,41, 162,94, 156,47, 155,24, 146,10, 96,06, 88,79, 87,10, 79,09, 70,75, 61,78, 61,55, 41,74, 30,63, 29,02, 19,61 e 19,10; FAB > 0 (GT) 853 (2M+H)⁺, 427 (M+H)⁺, 311 (B+2H)⁺, 255 (M-Boc)⁺; FAB < 0, (GT) m/z 851 (2M-H)⁻, 425 (M-H)⁻, 309 (B)⁻.

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 13

3',5'-N⁴-Trivalil-2'-desoxicitidina (**14**, Figura 7)

O material inicial 3',5'-N⁴-tri(Boc-valil)-2'-desoxicitidina foi dissolvido em CH₂Cl₂, mas havia algum material insolúvel de forma que a amostra foi filtrada através de Perlita. Isto resultou em um aumento do volume de CH₂Cl₂ usado. O reagente HCl/dioxano foi então adicionado com agitação. Em alguns minutos observava-se algum borbulhamento na solução e então a mistura tornava-se turva. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por cerca de 1hora. Durante este tempo o precipitado tornou-se

mais cristalino. A mistura foi rapidamente filtrada, o resíduo da filtragem foi lavado com CH_2Cl_2 , e então foi seco na bomba para fornecer 0,16g (69%) de cristais branco gelo. Os reagentes e as condições estão descritos de forma mais explícita abaixo na Tabela 1.

Tabela 1

Reagente	Mol. Unitário	Peso/vol. calculado	Mol/partes	peso/vol usado	Mol/partes	Eq.
3',5',N ⁴ -triBoc-Val-2'-dC(CyVal2a-2a)	825,0FW	0,30g	0,00036	0,3g	0,00036	1,00
CH_2Cl_2	5,0 partes	1,5 mL	5	3,0mL	10	10,0
HCl, 3,9M em dioxane	256ml/mol	0,47 g	0,00182	0,5	0,00195	5,37
3',5',N ⁴ -triVal-2'-dC, bruto	634,0FW	0,23g	Calc-obt.	0,16g	69,4%	

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 14

Método de Ensaio de HPLC para DiBocValil-2'-dC e DiBocValil-2'-dU

Uma amostra de 1,0mg/mL foi feita, dissolvendo-se o composto desejado em etanol absoluto. A solução foi então diluída com uma solução que continha MeOH 50% e KH_2PO_4 50% (0,015M, pH = 3,30-3,50) até uma concentração de 0,16mg/mL ser obtida. (Nota: todos os solventes usados foram degaseificados antes do uso) 20 μL da solução foram então imediatamente injetados numa coluna de HPLC a partir de

WATERS (NOVAPAK C18- 4pm - 3,9 X 150mm). A taxa de fluxo foi ajustada a 1mL/min com uma temperatura de coluna de 35°C. Para detectar os compostos, a detecção do comprimento de onde foi ajustada a 275 nm para Di-Boc2'dC, 260 nm para Di-Boc2'dU e 204 nm para impurezas após 15 minutes. A coluna foi corrida com KH₂PO₄ (0,015M, pH =3,30-3,50, ajustado com H₃PO₄ 10% v/v) na Bomba A e acetonitrila grau HPLC na Bomba B. O padrão do gradiente está indicado na Tabela 2.

Tabela 2

#	Tempo	Modulo	Evento	Volume
1	0,01	Bomba	FFluxo T.	1
2	0,01	Bomba	B.Con	45
3	12,009	Bomba	B.Con	45
4	10	Bomba	B.Con	70
5	28,00	Bomba	B.Con	70
6	28,00	Bomba	B.Con	45
7	32,00	Bomba	B.Con	45
8	32,01	SCL-10Avp	paragem	0

IX. Farmacocinética dos Compostos Ativos

As polimerases de ADN humanas e a função mitocondrial não foram afetadas pela L-dC *in vitro*. A L-dC não era citotóxico às células mononucleares do sangue periférico humanas (PBMCs), células progenitoras de medula óssea e numerosas linhas de célula de origem mamífera humanas e não humanas.

Nucleosídeos antivirais e análogos de nucleosídeo exercem seu efeito antiviral como os derivados de trifosfato intracelular no nível da polimerase viral durante a replicação do vírus. Assim como os nucleosídeos naturais (D-desoxicitidina e D-timidina) e análogos de nucleosídeo antiviral (por exemplo, lamivudina e zidovudina), a L-dC foi ativado de forma intracelular por fosforilação. Em

hepatócitos humanos, a desoxicitina quinase (dCK) era responsável pela conversão inicial dependente da dose da L-dC a um derivado 5'-monofosfato (MP). A L-dC-MP foi então convertida a uma forma 5'-difosfato (DP), que foi subseqüentemente convertido ao metabólito de 5'-trifosfato (TP) intracelular predominante. O nível de L-dC-TP alcançou 72,4 μ M em células HepG2 expostas a 10 μ M L-dC (90,1 μ M em hepatócitos humanos primários) em 24horas e possuía uma meia-vida intracelular de 15,5horas. A exposição de células HepG2 ou hepatócitos humanos em cultura primária a L-dC também produziu um segundo derivado TP, β -L-2-desoxiuridina 5'-trifosfato(L-dU-TP). O nível de L-dU-TP alcançou 18,2 μ M em células HepG2 expostas a 10 μ M L-dC (43,5 μ M em hepatócitos humanos primários) em 24horas.

Em culturas de hepatócito humano primário e na linha de célula de hepatoma humano (HepG2), o principal metabólito de L-dC era L-dC-TP. E exposição destas células à L-dC também levou à formação de L-dU-TP. A L-dC-TP e L-dU-TP não exibiam polimerases de ADN humanas, α , β e γ até concentrações de 100 μ M, a maior concentração testada.

FORMA DE REALIZAÇÃO DE REFERENCIA 15

Estudo de Solubilidade

A solubilidade da desoxiribocitosina natural (D-dC), éster 3'-valinil de L-dC e éster 3,5'-divalinil de L-dC em água foram comparadas. A solubilidade de L-dC foi avaliada primeiro analisando-se os dados de HPLC (isto é, área sob a curva) por injeções sucessivas de várias concentrações bem conhecidas de β -L-dC, conforme mostrado na Tabela 3. O HPLC foi corrido em uma coluna C18 Nova-Pack (3,9 x 150 mm) em um gradiente de 0 a 2 5% de CH₃CN em tampão de acetato de trietilamónio 20 mM (TEAAc) programado para um período de

15 minutos com uma taxa de fluxo de 1 ml por minuto. A concentração da solução versus a área sob a curva produziu uma relação (Figura 8a) linear com $y = 4150049477x - 4334,46845$.

Tabela 3

Concentração (mol/L)	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	10^{-5}
Área	4175916	2031950	440122	55264

A partir desta, uma solução saturada foi preparada com desoxiribocitosina natural (D-dC); 3 amostras foram tomadas e injetadas no HPLC. A concentração desta solução saturada foi determinada para ser 1,07, 1,08 e 0,96mol/L; portanto, a solução saturada tinha uma concentração saturada média de 1.03mol/L ou 272g/L. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4

Resultados	Área	Concentração (mol/L)
1a amostra	4420674000	1, 07
2a amostra	4475191000	1, 08
3a amostra	3983845000	0, 96

Similarmente foi avaliada a solubilidade do hidrocloreto do éster 3'-valinil de β -L-dC em água. A curva de calibragem foi determinada através de injeções sucessivas de várias concentrações do hidrocloreto do éster 3'-valinil de β -L-dC no HPLC e medindo-se a área sob a curva, conforme mostrado na Tabela 5. Novamente, o HPLC foi corrido em uma coluna C18 Nova-Pack (3,9 x 150 mm) em um gradiente de 0 a 25% de CH₃CN em tampão de acetato de trietilamônio 20mM (TEAAc) programada para um período de 15 minutos com uma taxa de fluxo de 1ml por minuto. A concentração da solução versus a

área sob a curva produziu uma relação linear com $y = 3176423963x - 33051,63$.

Tabela 5

Concentração (mol/L)	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
Área	3.166.842	1.514.47	254.29	119.66	19.26

A partir deste, uma solução saturada foi tentada para hidrocloreto de éster 3'-valinil de β -L-dC, entretanto nenhuma foi obtida. Portanto, a quantidade máxima de hidrocloreto de éster 3'-valinil de β -L-dC facilmente disponível no laboratório, foi dissolvida em água. Três amostras foram colhidas e foram determinadas a partir da área sob a curva do HPLC, para se possuir uma concentração média de 1,013, 0,996 e 1,059 mol/L. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6

Resultados	Área	Concentração (mol/L)
1a amostra	3218013000	1,013
2a amostra	3162471000	0, 996
3a amostra	3362725000	1, 059

Todos os três resultados estão dentro da faixa prevista calculada a partir da curva de calibragem, indicando solubilidade completa do composto naquelas altas concentrações, indicando que uma solução saturada desta amostra é maior que a média das três amostras, isto é, maior que 1,023 mol/L ou 408 g/L.

A solubilidade do hidrocloreto do éster 3',5'-divalinil de β -L-dC em água foi avaliada. A curva de calibragem foi determinada através de injeções sucessivas de várias

concentrações do hidrocloreto do éster 3',5'-divalinil de β -L-dC no HPLC e medindo-se a área sob a curva, conforme mostrado na Tabela 7. O HPLC foi corrido em uma coluna C18 Nova-Pack (3,9 x 150 mm) em um gradiente de a 25% de CH₃CN em tampão de acetato de trietilamônio 20mM (TEAAc) programada para um período de 15 minutos com uma taxa de fluxo de 1mL por minuto. A concentração da solução versus a área sob a curva produziu uma relação linear com $y = 3176423963x - 33051,63$ (Figura 8b).

Tabela 7

Concentração (mol/L)	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
Área	2.863.372	1.466.574	211.046	115.678	14.435

A partir deste, uma solução saturada foi tentada para hidrocloreto de éster 3',5'-divalinil de β -L-dC, entretanto nenhuma foi obtida. Portanto, a quantidade máxima de hidrocloreto de éster 3',5'-divalinil de β -L-dC facilmente disponível no laboratório, foi dissolvida em água. Três amostras foram colhidas e foram determinadas a partir da área sob a curva do HPLC, para se possuir uma concentração média de 2,8, 2,4 e 2,4mol/L. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8

Resultados	Área	Concentração (mol/L)
1a amostra	8336188000	2,8
2a amostra	7054012000	2,4
3a amostra	6970838000	2,4

Todos os três resultados estão dentro da faixa prevista calculada a partir da curva de calibragem, indicando solubilidade completa do composto naquelas altas

concentrações, indicando que uma solução saturada desta amostra é maior que a média das três amostras, isto é, mais de 2,5mol/L ou 1.337g/L.

Estudos de solubilidade similares foram feitos no hidrocloreto de éster 5'-valinil de β -L-dC (mais de 5,1mol/L ou 1.664g/L) e no hidrocloreto de éster 3',5'-diacetil de β -L-dC (3,3mol/L ou 1.148g/L). Os resultados cumulativos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9

Composto	Solubilidade (mol/L)	Solubilidade (g/L)
D-dC	1, 03	272
5'-val-L-dC	> 5,1	>1664
3'-val-L-dC	> 1,023	> 408
3',5'-diacetil-L-dC	3,3	1148
3',5'-dival-L-dC	> 2,5	> 1337

Estudo de log P - Tampão Fosfato

Aproximadamente 1,5mg de D-dC foi dissolvido em 2,2mL de solução de tampão fosfato 0,02M (A, 100mL, pH = 7,2), feita a partir de uma mistura de solução de fosfato de potássio monobásico (28,5mL) e solução de fosfato de potássio dibásico (71,5mL), saturada com octanol-1 (B). A 1mL desta solução foi adicionado 1mL de octanol-1 (B) saturado com solução tampão de fosfato 0,02M (A). A mistura resultante foi agitada e centrifugada; três amostras de cada fase foram colhidas e analisadas por HPLC, conforme mostrado na Tabela 10. O HPLC foi corrido numa coluna C18 Nova-Pack (3,9 x 150mm) em um gradiente de 0 a 25% de CH₃CN em tampão de acetato de trietilamônio 20mM (TEAAC) programada para um período de 15minutos com uma taxa de fluxo de 1mL por minuto. Descobriu-se que o log P de D-dC é -1,41; portanto, D-dC prefere água a octanol.

Tabela 10

	ESTUDO 1						ESTUDO 2											
	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³						
AREA	1948481	2138720	2197377	79838	82173	80359	2388141	2326654	2339059	93123	90275	89651						
AVE.	2092193			80723			2348618			91016								
P (B/A)	0,039						0,039											
LOGP	-1,41						-1,41											

Similarmente, aproximadamente 1,5mg de hidrocloreto do éster L-dC-3'-valina foi dissolvido em 2,5mL de solução de tampão fosfato 0,02M (A, 100mL, pH = 7,2), feita a partir de uma mistura de solução de fosfato de potássio monobásico (28,5mL) e solução de fosfato de potássio dibásico (71,5mL). A solução foi então saturada com octanol-1 (B). A 1mL desta solução, foi adicionado 1mL de octanol-1 (B) saturado com solução tampão de fosfato 0,02M (A). A mistura resultante foi agitada e centrifugada; três amostras de cada fase foram colhidas e analisadas por HPLC, conforme mostrado na Tabela 11. O HPLC foi corrido numa coluna C18 Nova-Pack (3,9 x 150mm) em um gradiente de 0 a 25% de CH₃CN em tampão de acetato de trietilamônio 20mM (TEAAc) programada para um período de 15minutos com uma taxa de fluxo de 1mL por minuto.

Tabela 11

ESTUDO 1						ESTUDO 2						
	A'	A''	A'	B'	B''	B'	A'	A''	A'	B'	B''	B'
A ₁₁₁	3382733	/	3437733	1003344	96848	103466	3358180	3448062	3413971	100119	/	101731
A _{ave}	3383227			100284			3439738			100955		

149

P (B/A)	0.0296	0.0293
log P	-1,53	-1,53

Descobriu-se que o log P de hidrocloreto do éster L-dC-3'-valina é -1,53; portanto, o éster L-dC-3'-valina prefere água a octanol a um grau maior que D-dC.

Os valores de log P foram calculados para o hidrocloreto do éster L-dC-5'-valina e hidrocloreto do éster L-dC-3',5'-divalina. Os resultados estão apresentados na Tabela 12. Entretanto, deve-se notar que o valor do log P para o hidrocloreto do éster L-dC-3',5'-divalina é provavelmente menor que aquele medido (-0,86). Conversão significante do éster divalina no éster 3'- ou 5'- monovalinil ou mesmo a L-dC foi observada durante o experimento. 50% de conversão do hidrocloreto do éster L-dC-3',5'-divalina foi detectada na fase aquosa e 14% na fase orgânica. Esta conversão é devido à instabilidade dos ésteres no tampão fosfato a um pH de 7 (ver Exemplos 14 e 15).

Tabela 12

Composto	Log P (octanol/água)
D-dC	-1,41
hidrocloreto do éster L-dC-3'-valina	-1,53
hidrocloreto do éster L-dC-5'-valina	-1,42
hidrocloreto do éster L-dC-	-0,86

3',5'- divalina	
hidrocloreto do éster L-dC-	-0,74
3',5'- diacetil	

Estudo de log P'-Água MilliQ

A fim de evitar a conversão do éster divalina nos monoésteres e L-dC, um estudo de log P altamenteativo foi executado usando-se água Milli-Q (A') em vez do tampão fosfato (pH a 6,5 em vez de 7,2). É importante notar que apenas a forma de hidrocloreto do éster de divalinal pode ser considerada em água. Aproximadamente 1,5mg de hidrocloreto do éster L-dC-3',5'-divalinal foi dissolvido em 2,2mL de água Milli-Q (A', pH = 6,5) saturado com octanol-1 (B). Foi adicionado a 1mL desta solução, 1mL de octanol-1 (B) saturado com água MilliQ (A'). A mistura resultante foi agitada e centrifugada; três amostras de cada fase foram colhidas e analisadas por HPLC, conforme mostrado na Tabela 13. O HPLC foi corrido numa coluna C18 Nova-Pack (3,9 x 150 mm) em um gradiente de 0 a 25% de CH₃CN em tampão de acetato de trietilamônio 20mM (TEAAc) programada para um período de 15 minutos com uma taxa de fluxo de 1mL por minuto. Descobriu-se que o log P' da 35'-divalina sob estas condições era de -2,72, indicando o forte efeito dos contra-ions no tampão fosfato. Nenhuma conversão da divalina aos monoésteres ou L-dC foi observada na fase aquosa ou na fase orgânica.

Tabela 13

ESTUDO 1						ESTUDO 2							
	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³		A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³
AREA	3284243	3282159	32832281	5854	5776	6496	3282927	3327123	3207985	5819	5615	6139	
AVE	3284241			5919			3302678			5861			
P ⁰ (B/A)		1.80 X 10 ⁻³						1.77 X 10 ⁻³					
LOG P		-2,7						-2,75					

Similarmente, aproximadamente 1,5mg de hidrocloreto do éster L-dC-5'-valinil foi dissolvido em 2,2mL de água Milli Q (A', ph = 6,5) saturado com octanol-1 (B). A 1mL desta solução, foi adicionado 1mL de octanol-1 (B) saturado com água Milli Q (A'). A mistura resultante foi agitada e centrifugada; três amostras de cada fase foram colhidas e analisadas por HPLC, conforme mostrado na Tabela 14. O HPLC foi corrido em uma coluna C18 Nova-Pack (3,9 x 150 mm) em um gradiente de 0 a 25% de CH₃CN em tampão de acetato de trietilamônio 20mM (TEAAC) programada para um período de 15minutos com uma taxa de fluxo de 1mL por minuto. Descobriu-se que o log P da 5'-valina sob estas condições era de -2,75, novamente um valor mais baixo que aquele encontrado no estudo de log P usando tampão fosfato.

Tabela 14

Série	ESTUDO 1						ESTUDO 2					
	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³
ÁREA	3772494	3771863	3788317	38862	38831	/	3819808	3975153	3965234	38461	38454	38777
AVE	3760924		5813				3885845			7938		
R ² (S/A)	1,54 X 10 ⁻³						2,04 X 10 ⁻³					
LOG P'	-2,81						-2,69					

Sob estas condições, os valores de log P' para o hidrocloreto do éster L-dC-5'-valinil e hidrocloreto do éster L-dC-37,5'-divalinal eram muito similares (Tabela 15).

Tabela 15

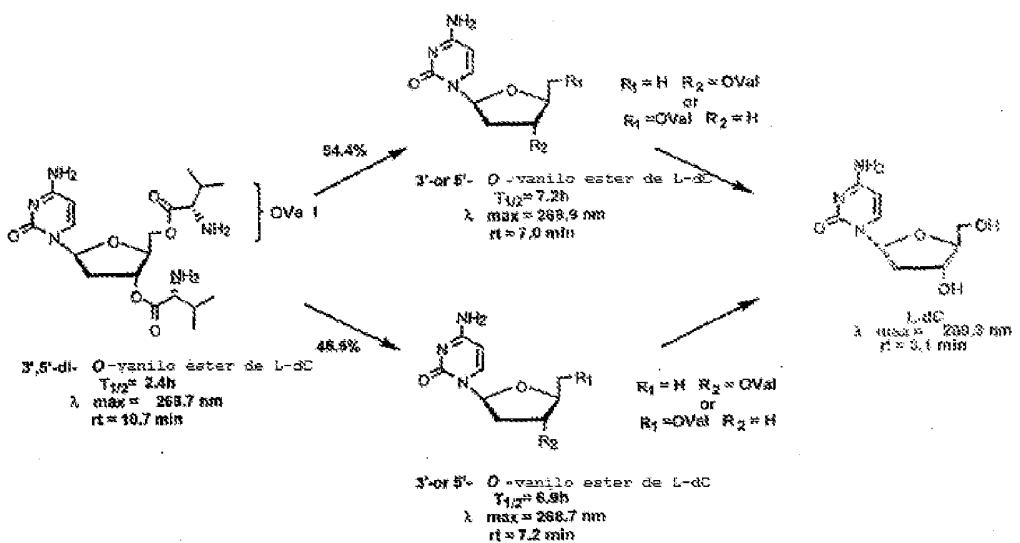
Composto	Log P (octanol/água)	Log P' (octanol/água)
hidrocloreto do éster L-dC-5'-valina	-1,42	-2,75
hidrocloreto do éster L-dC-3',5'-divalina	-0,86	-2,72

Estudo de Estabilidade ao pH de 7,4

A taxa de decomposição de cada metabólito do hidrocloreto do éster L-dC-3'-valina foi calculada. A meia- vida do hidrocloreto do éster L-dC-3'-valina no pH = 7,40 foi determinada como sendo de 7 horas numa solução de Tris-HCl 0,2M a 37°C. Nestas condições, o hidrocloreto do éster L-dC-3'-valina é simplesmente transformado em L-dC. Nenhuma citosina foi detectada, assim, não havia nenhum rompimento de ligação de glicosídeo detectável.

Similarmente, a taxa de decomposição de cada metabólito do hidrocloreto do éster L-dC-3',5'-divalina foi calculada. A meia-vida do hidrocloreto do éster L-dC-3',5'-divalina no pH = 7,42 foi determinada como sendo de 2,4 horas em uma solução de Tris-HCl 0,2M a 37°C. Nestas condições, o hidrocloreto do éster L-dC-3',5'-divalina é parcialmente hidrolisado a 3'- e 5'-valinil-L-dC, que são posteriormente transformados em L-dC. Nenhuma citosina foi detectada, assim, não havia nenhum rompimento de ligação de glicosídeo detectável (Esquema 4, Figuras 9a e 9b).

Esquema 4

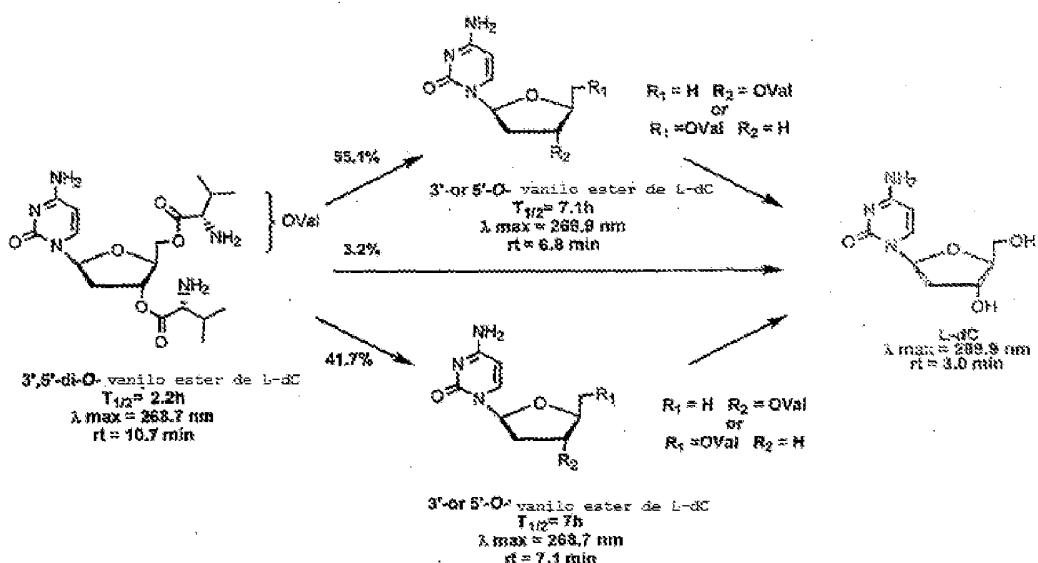


Estudo de Estabilidade ao pH de 7,20

A meia-vida do hidrocloreto do éster L-dC-3',5'-divalina no pH de 7,20 foi determinada como sendo de 2,2 horas em um tampão fosfato 20 mM. Nestas condições o hidrocloreto do éster L-dC-3',5'-divalina é parcialmente hidrolisado em 3'- e 5'-valinil-L-dC, que são posteriormente transformados em L-dC. Nenhuma citosina foi detectada, assim, não havia

nenhum rompimento de ligação de glicosídeo detectável (Esquema 5, Figuras 10a e 10b).

Esquema 5



Estudo de Estabilidade ao pH de 4,50

A meia-vida do hidrocloreto do éster L-dC-3'-valina no pH de 4,5 foi determinada como sendo de 8,6 dias num tampão de acetato 20mM. Novamente, o hidrocloreto do éster L-dC-3'-valina é simplesmente transformado em L-dC. Nenhuma citosina foi detectada, assim, não havia nenhum rompimento de ligação de glicosídeo detectável.

Similarmente, a meia-vida do hidrocloreto do éster L-dC-3',5'-divalina no pH de 4,51 foi determinada como sendo de 44 horas em um tampão de acetato 20mM. Nestas condições o hidrocloreto do éster L-dC-3',5'-divalina é parcialmente hidrolisado em 3'- e 5'-valinil-L-dC, que são posteriormente transformados em L-dC. Nenhuma citosina foi detectada, assim, não havia nenhum rompimento de ligação de glicosídeo detectável (Figuras 11a e 11b).

Estudo de Estabilidade ao pH de 1,2

A meia-vida do hidrocloreto do éster L-dC-3'-valina no pH de 1,2 foi determinada como sendo maior que 48horas numa solução tampão de KC1-HC1 135 mM. Nenhuma citosina foi detectada, assim, não havia nenhum rompimento de ligação de glicosídeo detectável.

Similarmente, estudos de estabilidade foram feitos no hidrocloreto do éster L-dC-5'-valina. Este composto era completamente estável a um pH de 1,2, com nenhum outro metabólito ou produtos de decomposição detectados por até 23horas. Nenhum rompimento de ligação glicosídica foi detectado até 2 dias na solução.

Descobriu-se que o éster 3',5'-diacetil de L-dC possuía uma meia-vida a um pH de 1,2 de 11,2horas. Sob estas condições o composto foi parcialmente hidrolisado nos derivados 3'- ou 5'-, que foram posteriormente transformados em L-dC. Nenhum rompimento de ligação glicosídica foi detectado até 2 dias na solução.

Descobriu-se que o éster 3',5'-divalinil de L-dC era completamente estável a um pH de 1,23 desde que nenhum outro composto fosse detectado até 48 horas nestas condições. Nenhum rompimento de ligação glicosídica foi detectado até 2 dias na solução (Figura 12).

Alternativamente, quando a posição N⁴ da L-dC é mascarada com dimetilamino-metileno ou acetil, a meia-vida do composto a um pH de 1,2 é apenas de 26minutos ou 50minutos, respectivamente.

Biodisponibilidade de Dose Única de L-dC no Macaco Cynomologus

A farmacocinética da L-dC depois de administração IV ou oral de L-dC a macacos cynomologus foi determinada. Neste estudo, 10 mg/kg de L-dC radiomarcado com tritio ($[3H]$) foram administrados a três macacos cynomologus como uma dose IV única. Seguindo um período de desgaste de seis semanas, os mesmos três macacos receberam uma dose oral idêntica de L-dC. Foram colhidas amostras de sangue para análise farmacocinética antes da dosagem e em 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 6, 8 e 24horas após a dosagem. Foram colhidas amostras de urina para análise farmacocinética através de pan catch antes da dosagem e nos seguintes intervalos pós-dosagem: 0-2, 2-4, 4-8, e 8-12horas, e então em intervalos de 12horas desde então até 336horas pós-dosagem. O fármaco foi detectado e a concentração determinada usando-se uma área de cromatografia líquida de alta performance de fase reversa. Os dados do nível de fármaco no sangue e na urina foram analisados por um método matemático não modelar e AUC's derivado pela regra trapezoidal linear.

Administração intravenosa de L-dC. O C_{max} médio de L-dC após administração IV era de 95,7 μM e ocorreu no tempo de amostragem mais anterior (15 minutos pós-dose) para todos os animais. As concentrações do plasma de L-dC diminuíam com o tempo depois do bolo IV com $t_{1/2}$ média de 1,59 hora. A limpeza total (CL) e limpeza renal (CLR) de L-dC depois da administração IV eram em média de 0,53L/h/kg e 0,46L/h/kg, respectivamente. O volume aparente de distribuição médio (Vd) de 1,22L/kg indicava que a L-dC possuía uma distribuição de tecido extravascular significante.

A excreção urinária era rápida, com 71% da dose administrada recuperada dentro de 2 horas. A L-dC era responsável pela maior parte (94%) da dose recuperada na urina. A limpeza renal (0,46L/h/kg) era responsável por 87% da limpeza total de L-dC e sugeria que a excreção renal era a principal rota de eliminação.

A L-dU foi detectada no plasma e na urina, indicando que a eliminação metabólica da L-dC também ocorria depois da administração IV. Níveis baixos de L-dU foram detectados no plasma no limite de detecção (limite mínimo de detecção (LLOD) = 0,1 μ M). A excreção renal de L-dU era de 4,0% da dose total recuperada na urina. Com exceção de L-dU, nenhum outro metabólito foi detectado no plasma ou urina.

Administração oral de L-dC. O C_{max} era de 3,38 μ M e ocorria a um T_{max} de 2,33 horas. A concentração de plasma da L-dC declinou de uma maneira bifásica com um $t_{1/2}$ terminal médio de 2,95 horas e estava abaixo dos limites de detecção em 24 horas em todos os macacos. A L-dC foi absorvida a partir do trato gastrointestinal com uma biodisponibilidade oral média (F) de 16,4%.

A L-dU foi detectada no plasma e na urina, o que sugeria que a eliminação metabólica da L-dC ocorria depois da administração oral. Baixos níveis de L-dU foram detectados no plasma no LLOD. Com exceção de L-dU, nenhum outro metabólito foi detectado no plasma ou urina.

Aproximadamente 8,5% da dose de administração oral foram recuperados na urina em 12 horas. Após 72 horas, 15,5% \pm 8% foram recuperados. A L-dC era responsável pela maior parte (-69%) da dose excretada na urina. A excreção renal de L-dU

era de 29% da dose total recuperada. Fezes não foram colhidas.

A Tabela 16 apresenta um resumo dos resultados farmacocinéticos para administração IV e oral de L-dC em macacos cynomologus.

Tabela 16 - Análise Farmacocinética Após Administração Intravenosa e Oral de L-dC (10 mg/kg) no Macaco Cynomologus

ROTA	AUC _{0-t_{last}}	t _{1/2}	C _{max}	T _{max}	CL	CL _R	V _d	F
(h)	(mM·h)	(h)	(mM)	(h)	(L/h/kg)	(L/h/kg)	(L/kg)	(%)
IV	81.1	1.59	95.7	0	0.53	0.46	1.22	-
(3)	(±5.7)	(±0.09)	(±13)		(±0.04)		(±0.11)	
Oral	13.7	2.95	3.38	2.33	-	-	-	16.4
(3)	(±4.3)	(±1.3)	(±1.3)	(±1.5)				(±5.0)

Valor médio (±SD).

Biodisponibilidade de Dose Única de L-dC no Macaco Rhesus

A farmacocinética do L-dC depois da administração oral no macaco Rhesus foi determinada. Neste estudo, 10mg/kg de L-dC radiomarcado com [3H] foram administrados a três macacos Rhesus como uma dose oral única. Amostras de sangue para análises farmacocinéticas foram colhidas antes da dose e a 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 6, 8 e 24horas após a dose. Amostras de urina para análises farmacocinéticas foram colhidas através de recolhimento em recipiente antes da dose e ao longo dos seguintes intervalos após a dose: 0 a 2, 2a4, 4a8 e 8a12 horas, e depois em intervalos de 12 horas e subsequentemente através de 336 horas após a dose. O fármaco foi detectado e sua concentração determinada

utilizando-se uma área de HPLC de fase reversa. Os dados de níveis de fármaco no sangue e na urina foram analisados por um método matemático não modelar e as AUCs derivadas pela regra trapezoidal linear.

Os valores de $AUC_{0,25-8}$ e C_{max} médios eram 12,2 mgM.h e 3,23 mgM, respectivamente. O C_{max} ocorreu a um T_{max} de 0,83 hora. O $t_{1/2}$ médio foi de 3,34 horas e a concentração de plasma L-dC esteve abaixo dos níveis de detecção por 24 horas em todos os macacos. A excreção renal média de L-dC foi de 0,273 L/h/kg. Não foi observado qualquer metabólito no plasma de macacos recebendo L-dC.

Aproximadamente 8,5% da dose oral administrada (biodisponibilidade oral de L-dC de aproximadamente 16%) foram recuperados na urina em 8 horas. Após 48 horas, 15% foram recuperados. L-dC correspondia à maioria (aproximadamente 77%) do fármaco excretado na urina. A excreção renal de L-dU era 23% da dose recuperada total. Com a exceção de L-dU, nenhum outro metabólito foi detectado.

A AUC e C_{max} para L-dC após a administração oral em macacos Rhesus, era similar àquela observada em macacos cynomolgus.

Biodisponibilidade de Dose Única de L-dC no Rato

Foram determinadas a biodisponibilidade e a farmacocinética de L-dC em ratos. Neste estudo, 10mg/kg [³H] de L-dC radiomarcado foram administrados em três ratos Sprague-Dawley fêmeas como uma dose IV única. Um segundo grupo de três animais recebeu uma dose oral idêntica de L-dC. Amostras de sangue foram colhidas para análises farmacocinéticas 0,17, 0,33, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 24

horas após a dose. Urina foi igualmente coletada 8 e 24 horas após a dose. O fármaco foi detectado e a concentração determinada no plasma e na urina, utilizando-se uma área de HPLC de fase reversa. Os dados foram analisados por um método matemático não modelar e as AUCs derivadas pela regra trapezoidal linear.

Administração intravenosa de L-dC. O valor médio $AUC_{0,25 \rightarrow 8}$ era de 3,01 mM.h. O $C_{\text{máx}}$ de L-dC era de 91,1mgM e ocorreu nos períodos iniciais de amostragem (10 minutos após a dose) para todos os animais. As concentrações de L-dC em plasma declinaram de maneira bifásica após o bolo IV com uma $t_{1/2}$ média de 1,21 horas. O CL e L-dC atingiram a média de 1,44 L/h/kg. O V_d médio de 2,53 L/kg indicava que o L-dC possuía uma distribuição em tecido extravascular significativa. Não foi observado qualquer metabólito no plasma de ratos recebendo L-dC.

L-dC correspondia à maioria da radioatividade recuperada na urina. Detectou-se L-dU na urina, o que sugeriu que a eliminação metabólica de L-dC ocorreu após a administração IV.

Administração oral de L-dC. O valor médio de $AUC_{0,25 \rightarrow 8}$ era de 4,77mM.h. O $C_{\text{máx}}$ médio era de 1,50 mgM e ocorreu a um $T_{\text{máx}}$ de 1,0 hora. A concentração em plasma de L-dC declinou com um $t_{1/2}$ de 2,52 horas. A L-dC limitou a absorção do trato gastrintestinal com uma biodisponibilidade oral média (F) de 15,4%. Não foram observados quaisquer metabólitos no plasma de ratos após a administração oral de L-dC.

A L-dC correspondia à maioria da radioatividade recuperada na urina. Detectou-se L-dU no plasma e na urina, o que

sugeriu que a eliminação metabólica de L-dC ocorre após a administração oral.

A Tabela 17 apresenta um resumo dos resultados farmacocinéticos para L-dC IV e oral.

ROTA	AUC _{0-25.8}	t _{1/2}	C _{max}	T _{max}	CL	V _d	F
(h)	(μ M·h)	(h)	(μ M)	(h)	(L/h/kg)	(L/kg)	(%)
IV	30.1	1.21	91.1	0	1.44	2.53	-
(3)	(\pm 4.7)	(\pm 0.06)	(\pm 6.6)		(\pm 0.29)	(\pm 0.60)	
Oral	4.77	2.52	1.50	1.0	-	-	15.4
(3)	(\pm 2.1)	(\pm 1.3)	(\pm 0.68)				(\pm 4.6)

Valor Médio (\pm SD).

Tabela 17 – Análise Farmacocinética após Administração Intravenosa e Oral de L-dC(10 mg/kg) no rato

Biodisponibilidade de Dose Única de L-dC na Marmota

Foram determinadas a farmacocinética e a biodisponibilidade de L-dC em marmotas. Neste estudo, 10 mg/kg [³H] de L-dC radiomarcado foram administrados em três marmotas em uma dose IV única. Amostras de sangue foram colhidas para análise farmacocinética 2, 5, 15 e 30 minutos e 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0 e 24 horas após a dose. Após um período de desgaste de sete dias, os mesmos animais receberam 10 mg/kg L-dC como uma dose oral única. Foram colhidas amostras de sangue para análise farmacocinética 15 e 30 minutos e 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 8,0 e 24 horas após a dose. Coletou-se urina ao longo do período de 24 horas após a dose. Foram determinados níveis de fármaco, CL, t_{1/2} e F. Os níveis de fármaco foram determinados utilizando-se um método de HPLC

com detecção de radioatividade em linha e contagem de cintilação.

Administração intravenosa de L-dC. O $C_{\text{máx}}$ médio de L-dC foi de $112\mu\text{M}$ e ocorreu no período de amostragem inicial (2 minutos após a dose) para todos os animais. As concentrações em plasma de L-dC declinaram de maneira bifásica após o IV com um $t_{1/2}$ médio de 2,85 horas. O CL de L-dC atingiu o valor médio de $0,39\text{ L/h/kg}$. O V_d médio foi de $1,17\text{ L/kg}$. A L-dC correspondeu à maioria da radioatividade recuperada na urina. A L-dU foi recuperada no plasma e urina, indicando que a eliminação metabólica de L-dC ocorreu após a administração IV. Os níveis de L-dU detectados间断地 no plasma estavam no limite da quantificação do ensaio ou abaixo deste, com um $C_{\text{máx}}$ de $0,75\mu\text{M}$.

Administração oral de L-dC. O $C_{\text{máx}}$ era $1,37\mu\text{M}$ e ocorreu em um $T_{\text{máx}}$ de 3 horas. As concentrações em plasma de L-dC diminuíram com uma média de $t_{1/2}$ de 5,22 horas. O L-dC foi absorvido do trato gastrintestinal com uma biodisponibilidade oral variando de 5,6% a 16,9%, com uma média de 9,57%. A L-dC correspondeu à maioria da radioatividade recuperada na urina. Detectou-se L-dU no plasma e na urina, indicando que a eliminação metabólica de L-dC ocorreu após a administração oral. O L-dU no plasma estava próximo do limite de quantificação com um $C_{\text{máx}}$ médio de $0,19\mu\text{M}$.

A Tabela 18 apresenta um resumo dos resultados farmacocinéticos para L-dC IV e oral.

Tabela 18 - Análise Farmacocinética de L-dC (10 mg/kg) após Administração Intravenosa e Oral na Marmota

ROTA (n)	AUC _{t=24^a}	t _{1/2} (h)	C _{max} (μ M)	T _{max} (h)	CL (L/h/kg)	V _d (L/kg)	F (%)
IV (3)	174 (\pm 120) ^b	2.85 (\pm 1.30)	112 (\pm 33)	0	0.39 (\pm 0.3)	1.17 (\pm 0.36)	-
PO (3)	11.3 (\pm 4.7)	5.22 (\pm 2.7)	1.37 (\pm 0.22)	3.0 (\pm 1)	-	-	9.57 (\pm 6.4)

a. t = 0,033 horas para administração IV e 0,25 horas para administração PO

b. Valor Médio (\pm SD)

Biodisponibilidade dos Pró-fármacos de L-dC

A biodisponibilidade de L-dC, 5'-monoéster de L-dC, éster divalina de L-dC e diacetil éster de L-dC foi avaliada em macacos cynomolgus, com e sem L-dT. Quando o éster divalina de L-dC foi administrado oralmente em macacos, aproximadamente 73% da dose foram absorvidos. Do éster divalina de L-dC absorvido, mais de 99% foi rapidamente convertido em L-dC para fornecer uma alta concentração de L-dC no plasma e nenhum éster divalina de L-dC detectável. Uma concentração baixa do éster monoalina de L-dC foi detectada inicialmente após a administração oral de éster divalina de L-dC. Uma concentração baixa de β -L-2'-desoxiuridina (L-dU) foi detectada imediatamente. Nenhum outro metabólito foi detectado. Os resultados são fornecidos na Tabela 19. Conforme indicado, a combinação do éster 3'-5'-divalinal de L-dC com L-dT forneceu a maior biodisponibilidade de L-dC.

Tabela 19

	L-dC parente (mw=227.22)	L-dC ³ 5'-valina (mw=399.27)	L-dC 3'-valina (mw=399.27)	L-dC di-valina (mw=534.87)	L-dC di-acetilo (mw=347.75)
% BA ¹	16.4 ± 5.0	39.0 ± 11.4	85.1 ± 24.5	72.7 ± 22.0	23.0 ± 6.5
% BA w/ L-dT ²	11.9 ± 1.7	ND	ND	74.6 ± 9.9	24.9 ± 4.0

¹ estimado relativo to AUC da L-dC (dose oral)

² Coadministrado com 10mg/kg L-dT

³ Estudo da atividade específica 5' -mono-valina baseado numa dose totalmente radioativa

ND, não determinado

Pureza=87% L-dC-mono-valine, 12% L-dC

Biodisponibilidade de Dose Única de Dival-L-dC em Macaco Cynomolgus

Três macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) não simples receberam 10mg/kg de dival-L-dC por via intravenosa com uma quantidade de rastreamento de fármaco marcada com tritio ($[3H]^-$) (250 μ Ci) dissolvida em solução salina a 9,0% estéril. Após um período de desgaste de 6 semanas, os mesmos três animais receberam uma dose oral idêntica de dival-L-dC. Foram colhidas amostras de sangue em tubos heparinizados antes da dose (aproximadamente 18 horas) e 0,25, 0,50, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 24 horas após a dose. Urina também foi coletada em intervalos de 0 a 2, 2 a 4, 4 a 8, 8 a 12 horas e depois em intervalos de 12 horas até 336 horas após a dose. O fármaco foi quantificado no plasma e na urina com uma área de cromatografia líquida e espectrometria de massa (LC-MS). Após a administração de dival-L-dC, o curso de tempo da concentração no plasma de L-dC foi analisado por um método matemático não modelar e a área sob as curvas de tempo-concentração (AUC) derivadas pela regra trapezoidal linear. A biodisponibilidade (F) de L-dC após a administração IV e PO de dival-L-dC foi

calculada a partir das AUCs de L-dC, onde $F = \frac{AUC_{po}}{AUC_{iv}} \times \frac{dose\ IV}{dose\ PO}$.

A dival-L-dC administrada por via intravenosa foi convertida rapidamente em L-dC após a administração intravenosa. A dival-L-dC foi detectada no plasma aos 15 minutos ($1,39\mu M$) e aos 30 minutos ($0,36\mu M$, em 1 dos 3 animais) [limite inferior de quantificação (LLOQ) = $0,23\mu M$ ou 100 ng/mL]. A dival-L-dC não foi detectada no plasma após 30 minutos depois da dose. A forma parcialmente não esterificada de dival-L-dC, β -L-2'-desoxicitidina-5'-éster valina foi detectada no plasma aos 15 minutos ($3,23\mu M$) e reduziu em concentração para $0,08\mu M$ por duas horas (LLOQ = $0,031\mu M$ ou 10 ng/mL). A L-dC representou a maioria do fármaco presente no plasma após a administração intravenosa. O valor de AUC_{0-24h} médio para L-dC foi de $19,8\mu M/h$. O pico de concentração de plasma médio ($C_{máx}$) de L-dC foi de $24.6\mu M$ (LLOQ = $0,088\mu M$ ou 20 ng/mL) e ocorreu no primeiro momento de amostragem (15 minutos após a dose) em todos os animais. A concentração em plasma de L-dC declinou de maneira bifásica com uma $t_{1/2}$ média de 1,73 horas. A excreção corporal (CL) total e volume de distribuição aparente (V_d) de L-dC foram, em média, $1,01\text{ L/h/kg}$ e $2,46\text{ L/kg}$, respectivamente, indicando que a L-dC possuía distribuição em tecido extravascular significativa. A ligação de dival-L-dC e L-dC às proteínas do plasma humano ex vivo foi de $13,3\% \pm 2,6\%$ e $19,7\% \pm 5,9\%$, respectivamente. O impacto da ligação a proteína de plasma humano em níveis de fármaco livre de dival-L-dC e L-dC foi mínimo, sugerindo que as interações de fármaco envolvendo o deslocamento do local de ligação não são antecipadas.

A excreção urinária foi rápida com $58\% \pm 3\%$ da dose administrada de dival-L-dC excretada em 2 horas após a

administração intravenosa. A L-dC correspondia à maioria (aproximadamente 93%) do fármaco excretado na urina. A L-dU foi igualmente detectada no plasma e na urina. Isto sugere que a eliminação metabólica de L-dC também ocorre após a administração de dival-L-dC. Níveis reduzidos de L-dU foram detectados no plasma em momentos intermitentes em dois dos três animais em concentrações variando de 0,22 μ M a 0,88 μ M (LLOQ = 0,22 μ M ou 50 ng/mL). Não houve níveis detectáveis de L-dU em qualquer momento no terceiro macaco. A excreção renal de L-dU e da forma parcialmente não esterificada de dival-L-dC, β -L-2'-desoxicitidina-5'-éster valina foi menor, correspondendo a aproximadamente 2,5% e 3,7% da dose total recuperada, respectivamente. Detectou-se dival-L-dC na urina de um dos três animais 2 horas após a administração IV, que correspondeu a aproximadamente 0,15% da dose recuperada.

Devido às concentrações baixas intermitentes dos ésteres monovalina e L-dU no plasma e na urina, não foi viável executar análise farmacocinética destes metabólitos. O aparecimento do éster monovalina de dival-L-dC não era inesperada, uma vez que este representa e intermedia a conversão de dival-L-dC em L-dC. Adicionalmente, estudos de metabolismo celular *in vitro* com hepatócitos primário de macacos, ratos e humanos e em extrações de células HepG2 demonstraram que a L-dC não foi diretamente desaminada a L-dU mas que monofosfato de L-dC (-MP) é convertido e, L-dU-MP, que é ativado para difosfato de L-dU (-DP) e trifosfato de (-TP) ou metabolizado em L-dU, que é então detectado no compartimento extracelular (plasma). A L-dU era não citotóxica ($CC_{50} > 200 \mu$ M) e o L-dU-TP possuía um IC_{50} *in vitro* contra o ácido desoxirribonucléico (ADN) polimerase do vírus da hepatite B de 5,26 μ M (ver *Microbiology and Virology*, Seção 10).

Dival-L-dC administrada por via oral foi também convertida rapidamente em L-dC após a administração oral e não foi detectável nas amostras de plasma em qualquer período de tempo (LLOQ de dival-L-dC em solução = 0,23 μ M ou 100 ng/mL). O metabólito de dival-L-dC parcialmente não esterificado, β -L-2-desoxicitidina-5'-éster valina, foi detectado aos 30 minutos e 1 hora em concentrações variando de 0,034 β a 0,107 β (LLOQ de monoéster em solução = 0,031 μ M ou 10 ng/mL). A dival-L-dC não foi detectada no plasma.

A L-dC representou a maioria (> 99% em C_{max}) dos níveis de fármaco no plasma após a administração oral de dival-L-dC. O valor de $AUC_{0,25-8}$ médio para L-dC foi de 14,0 μ Mh. O C_{max} de L-dC foi de 8,26 μ M (LLOQ de L-dC em solução = 0,88 μ M ou 20 ng/mL) e ocorreu em 0,67 hora após a administração de dival-L-dC. A concentração em plasma de L-dC de uma forma bifásica com um $t_{1/2}$ médio de 2,28 horas. A biodisponibilidade oral média de L-dC após a administração de dival-L-dC foi de 72,7% \pm 22%.

A L-dU foi também detectada no plasma indicando que a eliminação metabólica de L-dC ocorre após a administração oral de dival-L-dC. Níveis baixos de L-dU foram detectáveis no plasma a partir de 30 minutos até 4 horas em dois dos três animais, com concentrações variando de 0,24 μ M a 0,66 μ M (LLOQ de L-dU em solução = 0,22 μ M ou 50 ng/mL) e em um animal apenas em 8 horas a uma concentração de 0,39 μ M.

Após a administração oral, a dival-L-dC foi rapidamente absorvida do trato gastrintestinal e convertida em L-dC pelo metabolismo da primeira etapa intestinal e/ou hepático. Nem o metabolismo de dival-L-dC ou L-dC foi associado a enzimas microssomais do fígado. Após a administração de altos níveis de dosagem de dival-L-dC, o

éster monovalina de L-dc foi detectado momentaneamente antes da conversão em L-dC. Não foi detectada qualquer dival-L-dC após a administração oral. Os níveis em plasma de L-dC reduzidos intermitentes foram detectados no limite inferior do ensaio de quantificação ou abaixo do mesmo. A L-dU foi formada pela desaminação de L-dC após a absorção celular de L-dC.

Aproximadamente 31% \pm 8% da dose oral administrada foi recuperada na urina em 4 horas. Após 72 horas, 39% \pm 8% foi recuperado. A L-dC correspondia à maioria (aproximadamente 95%) do fármaco excretada na urina. A excreção renal de L-dU e da forma parcialmente não esterificada de dival-L-dC, (β -L-2'-desoxicitidina-5'-éster valina foi menor, correspondendo a aproximadamente 2,5% e 0,2% da dose total recuperada, respectivamente. Não encontrada qualquer dival-L-dC na urina.

A Tabela 20 representa um resumo de resultados farmacocinéticos para L-dC após dosagem IV e oral de dival-L-dC.

Parâmetro Farmoquinético							
ROTA	AUC _{0.25-8}	t _{1/2}	C _{max}	T _{max}	CL	V _d	F
(n)	(μ M h)	(h)	(μ M)	(h)	(L/h/kg)	(L/kg)	(%)
IV	19.8	1.73	24.6	0	1.01	2.46	
(3)	(\pm 5.2)	(\pm 0.33)	(\pm 2.6)		(\pm 0.32)	(\pm 0.47)	
Oral	14.0	2.28	8.26	0.67			72.7
(3)	(\pm 2.4)	(\pm 1.4)	(\pm 0.71)	(\pm 0.3)			(\pm 22)
(3)	Valor Médio [\pm desvio padrão (SD)]						

Tabela 20 -Análise Farmacocinética após Administração Intravenosa e Oral de Dival-L-dC (10 mg/kg) em Macacos Cynomologus

A Tabela 21 apresenta um esquema de uma formação de metabólito de dival-L-dC, o derivado de monovalina de L-dC, L-dC e L-dU, após administração IV e oral de dival-L-dC. O C_{max} de cada metabólito é também observado.

Tabela 21 - Formação de Metabólito para Administração IV e Oral de Dival-L-dC

Intravenoso (10 mg/kg Dival-L-dC)			
	dival-L-dC →	mono-val-L-dC →	L-dC →
C _{max}	1.39 μM	3.23 μM	24.6 μM
Oral (10 mg/kg dival-L-dC)			
	val-L-dC →	mono-val-L-dC →	L-dC →
C _{max}	Not detected	0.11 μM	8.26 μM
			L-dU
			0.66 μM

Biodisponibilidade Oral de L-dC através de Dival-L-dC em Macaco Cynomolgus

Três macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) machos não simples receberam 10 mg/kg de dival-L-dC por via oral com uma quantidade de rastreamento de fármaco marcada com [3H] (250 μCi) dissolvida em solução salina a 0,9%. Amostras de sangue foram colhidas em tubos heparinizados antes da dos (aproximadamente 18 horas) e 0,25, 0,50, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 24 horas após a dosagem. Coletou-se urina em intervalo de 0a2, 2a4, 4a8, 8a 12 horas e depois em intervalos de 12 horas até 33 6 horas após a dose. O fármaco foi quantificado em plasma e em urina utilizando-se análise por HPLC. Após a administração de dival-L-dC, a período de temperatura de concentração de L-dC no plasma foi analisado por um método matemático não modelar e a área sob as curvas

de tempo-concentração (AUC) derivadas pela regra trapezoidal linear. A dival-L-dC foi rapidamente absorvida e convertida em L-dC após a administração oral. A análise por cromatografia líquida de alta pressão radiochromatográfica (HPLC) de amostras de plasma confirmou que a maioria da radioatividade recuperada era de L-dC. A dival-L-dC foi detectada em apenas um animal em 15 minutos após a dose em uma concentração de 0,35 μ M. A forma parcialmente não esterificada de dival-L-dC, β -L-2'-desoxicitidina-5'-éster valina, não foi detectada no plasma ou urina. Aproximadamente 26% da dose oral administrada foram recuperados na urina em 8 horas. Após 72 horas, 31% foram recuperados. A L-dC correspondeu à maioria (aproximadamente 89%) de fármaco excretada na urina. A excreção renal de L-dU foi menor, correspondendo a aproximadamente 10% da dose recuperada. Não foram detectados na urina dival-L-dC, sua forma parcialmente não esterificada ou qualquer outro metabólito.

O perfil farmacocinético geral foi comparável àquele determinado no estudo farmacocinético conforme demonstrado por relações entre $C_{\text{máx}}$ e AUC similares. Níveis reduzidos de L-dU foram detectados no plasma em dois dos três animais com um $C_{\text{máx}}$ médio de 0,33 μ M. Não foi detectada qualquer L-dU no plasma do terceiro animal. O nível de L-dU estava no limite de quantificação ou abaixo deste, impedindo a análise farmacocinética.

Metabolismo de Dival-L-dC *in vitro*

Foram conduzidos estudos para determinar a estabilidade e ligação à proteína de dival-L-dC e seus metabólitos não esterificados no plasma humano. A dival-L-dC foi incubada em plasma humano e 37°C e amostras foram analisadas em

diversos períodos de tempo até 24 horas (Figura 13). Nenhuma dival-L-dC foi detectável em 24 horas, com conversão completa em L-dC. Dois metabólitos adicionais (β -L-2'-desoxicitidina-5'-éster valina e β -L-2'-desoxicitidina-éster valina) foram igualmente observados. A natureza transitória destes metabólitos indica que os mesmos são intermediários na conversão de dival-L-dC em L-dC. A meia-vida *in vitro* de dival-L-dC em plasma humano a 37°C foi determinada como sendo de aproximadamente 39 minutos.

O impacto da ligação a proteína de plasma humano nos níveis livres de dival-L-dC e L-dC foi também investigado utilizando-se um método de ultrafiltragem. A ligação de dival-L-dC a proteína de plasma foi de 13,3% \pm 2,6%. A ligação de L-dC às proteínas de plasma foi de 19,7% \pm 5,9%. Este estudo mostra que o impacto da ligação a proteínas do plasma em dival-L-dC e L-dC é mínimo e sugere que interações o fármaco envolvendo deslocamento do local de ligação não são antecipadas.

Ativação Metabólica e Perfil Intracelular de L-dC

O metabolismo celular de L-dC foi examinado utilizando-se células HepG2 e hepatócitos primários humanos. Uma análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) demonstrou que a L-dC foi extensivamente fosforilada nos hepatócitos. O metabólito predominante em células HepG2 expostas a 10 μ M de L-dC por 24 horas foi o L-dC-TP, que alcançou 72,4 μ M \pm 1,8 μ M (ver Tabela 23). Em hepatócitos primários humanos, a concentração de L-dC-TP em 24 horas era de 90,1 μ M \pm 37 μ M, similar ao nível de fosforilação em células HepG2. A exposição de hepatócitos a L-dC levou à ativação de um segundo derivado de 5'-trifosfato, L-dU-TP. Em células

HepG2 expostas a 10 μM de L-dC, o nível de L-dU-TP atingiu 18,2 μM (43,5 pM em hepatócitos humanos primários) em 24 horas. Em hepatócitos primários de ratos e macacos a extensão da fosforilação de L-dC foi ligeiramente mais baixa.

Tabela 23 - Ativação de L-dC (10 μM) em Hepatócitos

Células	n	Metabolito (10 μM)						
		L-dC-MP	L-dU-MP	L-dC-DP	L-dC-DP-colina	L-dU-DP	L-dC-TP	L-dU-TP
HepG2	3	23,3 \pm 0,86	6,73 \pm 0,41	10,2 \pm 1,9	25,6 \pm 0,08	2,69 \pm 0,45	72,4 \pm 1,8	18,2 \pm 1,0
Humana								
Primária	3	27,6 \pm 1,5	5,74 \pm 2,4	7,19 \pm 2,3	15,8 \pm 1,8	3,93 \pm 1,6	90,1 \pm 37	43,5 \pm 27
Hepatócitos								
Células	n	Metabolito (10 μM)						
		L-dC-MP	L-dU-MP	L-dC-DP	L-dC-DP-choline	L-dU-DP	L-dC-TP	L-dU-TP
Macaco								
Primário	1	11,2	2,54	7,66	10,4	3,31	39,3	21,9
Hepatócitos								
Ratos primário								
	3	5,09 \pm 2,1	3,53 \pm 0,97	1,52 \pm 0,38	8,82 \pm 3,1	7,90 \pm 1,4	14,2 \pm 3,1	46,9 \pm 5,2
Hepatócitos								

(a) Células foram incubadas por 24 horas com $[^3\text{H}]\text{-L-dC}$, atividade específica: Ensaio de HepG2 = 0,5 Ci/mmol; ensaio de hepatócitos humanos, de macaco e rato = 1,0 Ci/mmol.

Em adição aos derivados fosforilados de L-dC e L-dU, a formação de um metabólito $[\beta\text{-L-2}'\text{-desoxipolinucleotídeo}$ foi também observada. Em culturas de células HepG2 e hepatócitos primários expostas a 10 μM de L-dC por 24 horas, $[\beta\text{-L-2}'\text{-desoxicitidina-5}'\text{-difosfocolina}$ (L-dC-DP-colina) foi detectada em uma concentração de 25,6 μM (faixa de 25,6 μM a 25,7 μM) e 12,3 μM (faixa de 8,82 a 15,8 μM), respectivamente.

O perfil metabólico obtido após exposição por 24 horas de células HepG2 a 10 μM de $[^3\text{H}]\text{-L-dC}$ é mostrado na Figura 14.

A aparente meia-vida intracelular do L-dC-TP foi de 15.5 horas \pm 0,34 horas, o que se correlacionou à atividade antiviral prolongada após a retirada do fármaco nos experimentos de rebote viral. O padrão de fosforilação detectado em hepatócitos primários humanos foi qualitativamente e quantitativamente similar ao obtido utilizando-se células HepG2 (Figura 15).

Quinase Celular Associada à Ativação Metabólica

A D-desoxicitidina (dCyd) é um substrato natural de dCyd quinase citosólica (dCK) e timidina quinase mitocondrial (TK2) para conversão em dCyd-5'-monofosfato (dCMP). A timidina quinase citosólica (TK1) e a TK2 utilizam D-timidina (Thd) como um substrato natural para conversão em Thd-5'-monofosfato (TMP). A quinase celular envolvida na fosforilação inicial de L-dC foi identificada em estudos de competição utilizando-se L-dC e os Thd e dCyd endógenos naturais. A fosforilação intracelular de L-dC foi reduzida, de uma forma dependente de dosagem, por dCyd mas não por Thd. Assim, a dCyd atuou com um inibidor da fosforilação de L-dC. A mudança na fosforilação intracelular de L-dC foi similar quando as células HepG2 foram expostas a Thd e dCyd ou apenas dCyd. A inibição da fosforilação de L-dC apenas pela desoxipirimidina natural, dCyd, sugeriu que a dCK estava envolvida na fosforilação de L-dC.

O papel destas atividades de pirimidina nucleosídeo quinase na fosforilação de L-dC foi adicionalmente investigado nas linhas celulares deficientes em quinase. Ocorreu uma queda significativa na quantidade de metabólitos fosforilados de L-dC em células deficientes em dCK. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada na fosforilação de L-dC em células deficientes em TK1. Estes dados eram

consistentes com os estudos de competição descritos acima e indicaram que a dCK desempenha um papel crítico na fosforilação de L-dC em L- dC-MP.

Utilizando-se extrações citosílicas de células HepG2 como uma fonte de enzimas, a cinética de estado estacionário para a fosforilação de L-dC, Thd e dCyd foram similares conforme indicado pela constante Michaelis-Menten (K_m) aparente e os valores de velocidade máxima (V_{max}) (L-dC: K_m de 5,75 mM e V_{max} de 1,12 nmol/minuto/mg de proteína; Thd: K_m de 4,06 mM e V_{max} de 1,26 nmol/minuto/mg de proteína. dCyd: K_m de 4,85 mM e V_{max} de 2,15 nmol/minuto/mg de proteína). Adicionalmente, a eficiência da fosforilação de L-dC, Thd e dCyd foi similares conforme definido pelos seus valores de V_{max}/K_m correspondentes (0,19, 0,31 e 0,44, respectivamente).

Adicionalmente, a extensão de fosforilação intracelular de L-dC foi comparada àquela dos substratos endógenos naturais, Thd e dCyd em extrações de fígado de marmota. Isto foi feito para apoiar testes antivirais no modelo de marmota de infecção viral por hepatite B. A fosforilação de L-dC foi similar àquela dos substratos endógenos. Além disso, o nível de fosforilação de L-dC foi comparável àquele da L-dC e àquele do substrato endógeno em extrações de fígado humano.

X. AÇÃO DOS COMPOSTOS ATIVOS CONTRA VHB RESISTENTE A FÁRMACO

Os β -L-2'-desoxinucleosídeos, e em particular a β -L-2'-desoxicitidina e a β -L-2'-desoxitimidina, são inibidores potentes e seletivos de VHB resistente a fármacos (M552V). Os recombinantes de VHB contendo a mutação YMDD (definida

como substituições de aminoácidos nos lócus de ligação de tirosina, metionina, aspartato, aspartato nucleosídeo de VHB polimerase), podem ser utilizados para gerar linhas celulares expressando VHB resistente a lamivudina, embora estes genomas sejam frequentemente menos competentes na sua multiplicação que o VHB do tipo feroz *in vitro* (Fu e Cheng, 1998). Estes sistemas recombinantes fornecem a melhor abordagem para se dirigir à questão de resistência. Foi tentada a determinação da atividade de LdT (Indivíduo 60,459) contra as estirpes de VHB resistentes à lamivudina (mutações YMDD) através da utilização de ensaios de transfecção transitórios utilizando células hepáticas Huh-7, o sistema celular preferencial para tais avaliações, de acordo com a abordagem descrita por Ono e outros, 2001. Contudo, nas células Huh-7, a L-dT exibiu uma fraca atividade mesmo contra o VHB do tipo feroz. Enquanto as células Huh-7 fosforilaram a lamivudina bastante bem, houve fosforilação mínima de LdT para o trifosfato ativo. Estes resultados foram resumidos nos materiais enviados à Agência para a Extremidade LdT do Encontro da Fase 2 (Indivíduo 60,459; Número de Série 024). Portanto, o sistema de Ono e outros não é apropriado para a análise destes fármacos.

Como uma abordagem alternativa, genomas de VHB mutados foram introduzidos em células HepG2 através de transfecção transitória. Estas experiências, foram mal-sucedidas de forma similar, primeiramente devido à transfectabilidade pobre e variável destas células, que impedem a obtenção de valores consistentes de eficácia antiviral.

Um modo mais apropriado de abordar a questão da resistência para LdT e LdC é através utilização de linhas celulares de HepG2 estáveis expressando vírus VHB recombinantes com os genomas do tipo feroz, assim como mutações resistentes à

lamivudina nas posições 552 e 515 ou 528, respectivamente. Comparadas aos métodos anteriores, estas linhas celulares estáveis oferecem níveis de expressão de polimerase consistentes combinados a uma boa relação sinal-ruído.

A atividade *in vitro* dos fármacos LdT (telbivudina) e LdC foi determinada contra mutantes do vírus da hepatite B (VHB) resistentes à lamivudina. As mutações de VHB biologicamente relevantes (subtipo ayw) que foram determinados para conferir resistência à terapia com lamivudina na configuração clínica, surgem no gene polimerase e compreendem duas mutações simples, M552V e M552I, encontradas no motivo de local ativo-chave de YMDD assim como duas mutações duplas, L515M/M552V e L515M/M552I. (A mutação L515M aqui citada é equivalente às mutações L526M ou L528M no domínio B, frequentemente citado em estudos de resistência de VHB: a diferença na numeração reflete as inserções/deleções de sequência entre genótipos de VHB diferentes).

Materiais e Métodos

As construções de ADN recombinante correspondentes a estas mutações resistentes à lamivudina foram criadas por mutagênese direcionada a local. O sistema de teste compreende linhas celulares estáveis, ligando-se a cada um dos genomas mutantes transfetados, assim como um genoma de VHB de controlo do tipo feroz. A atividade antiviral de LdT (telbivudina) e LdC, conjuntamente com os fármacos de controlo lamivudina e PMEA, foi determinada contra os genomas de VHB mutante e do tipo feroz nas linhas celulares respectivas.

A LdT (telbivudina) e a LdC demonstraram atividade mínima contra a mutação simples M552I ou as mutações duplas

L515M/M552V e L515M/M552I, embora a LdC tenha atingido um EC₅₀ contra o mutante L515M/M552V. Entretanto, em contraste a lamivudina, ambos os fármacos retêm quase toda a atividade antiviral contra o genoma de VHB com mutação simples M552V. A mutação M552V é significativamente resistente à lamivudina e acredita-se que seja um intermediário chave no caminho melhor para o desenvolvimento da ruptura da resistência à lamivudina. Nos pacientes tratados com lamivudina, o mutante M552V aparece normalmente entre 4 a 8 semanas antes do aparecimento da mutação dupla L515M/M552V, altamente resistente (Gauthier e outros, 1999), que corresponde de 60% a 70% de toda a resistência a lamivudina em pacientes com hepatite B (Ahmed e outros, 2000).

Estes resultados sugerem que a atividade de LdT (telbivudina) e de LdC contra o mutante M552V, pode ajudar a suprimir uma maior proporção de aparecimento de resistência antiviral, mediada por YMDD em pacientes. Combinada à melhor supressão quantitativa da multiplicação de VHB observada em pacientes tratados com LdT (comparados aos receptores de lamivudina) na atual Fase de testes clínicos IIB, estes resultados sugerem que é provável que resistência de VHB a LdT mediada por YMDD seja substancialmente menos frequente do que é observado com o tratamento com lamivudina.

Em estudos clínicos controlados de lamivudina (100 mg qd), administrada em pacientes infetados por VHB, a prevalência de VHB mutante YMDD foi de 14% a 32% após um ano de tratamento e até 58% após dois ou três anos de tratamento. O vírus mutante foi associado à evidência de resposta ao tratamento reduzida em relação aos pacientes com lamivudina sem mutações YMDD.

Uma análise genotípica de vírus isolados, obtidos de pacientes com multiplicação de VHB renovada enquanto recebiam lamivudina, sugere que a redução da sensibilidade do VHB a lamivudina está associada às mutações resultantes numa substituição de metionina em valina ou isoleucina no motivo YMDD do domínio catalítico de VHB polimerase (posição 552) e uma substituição de leucina por metionina na posição 515 ou 528 (dependendo do genótipo/subtipo de VHB).

No presente momento, não há sistema de infecção por VHB baseado em célula que possa ser utilizado para avaliar a atividade de agentes antivirais contra células infectadas com isolado de VHB resistentes a lamivudina de pacientes. O modelo DVHB *in vitro* não se mostrou útil em selecionar mutações resistentes ao fármaco devido aos hepatócitos primários de pato utilizados neste modelo não poderem ser mantidos por mais do que poucas semanas em cultura celular. A relevância de seleção de mutantes resistentes a fármaco no modelo de marmota *in vivo* é dúbia, devido ao espectro de mutações resistentes à lamivudina na marmota não se encaixar no identificado em pacientes infetados por VHB.

Os recombinantes de VHB contendo a mutação YMDD podem ser utilizados para gerar linhas celulares que expresse VHB resistentes a lamivudina, embora estes genomas sejam frequentemente menos competentes em multiplicação que o VHB do tipo feroz *in vitro* (Fu e Cheng, 1998). Estes sistemas recombinantes fornecem a melhor abordagem para se dirigir à questão da resistência. A atividade de LdT (IND 60,459) contra as estirpes de VHB resistentes a lamivudina (mutações YMDD) através da utilização de ensaios de transfecção transitória utilizando células hepáticas Huh-7, o sistema celular preferencial para tais avaliações, de

acordo com a abordagem descrita por Ono e outros, 2001, foi tentada. Entretanto, em células Huh-7, a LdT apresentou um fraca atividade mesmo contra o VHB do tipo feroz. Uma investigação posterior revelou que enquanto as células Huh-7 fosforilavam a lamivudina bastante bem, houve fosforilação mínima de LdT no trifosfato ativo. Estes resultados foram resumidos nos materiais enviados à Agência para a Extremidade LdT do Encontro de Fase 2 (IND 60,459; Número de Série 024), embora o sistema de Ono e outros não seja apropriado para a análise deste tipo de fármaco.

Como uma abordagem alternativa, genomas de VHB mutados foram introduzidos células HepG2 através de transfecção transitória. Estes experimentos foram mal sucedidos de forma similar, primeiramente devido à pobre e variável transfectabilidade destas células, que impediu a obtenção de valores consistentes quanto à eficácia antiviral.

Um modo mais apropriado para abordar a questão da resistência para LdT e LdC é através da utilização de linhas celulares de HepG2 estáveis que expressem vírus VHB recombinantes com genomas do tipo feroz assim como mutações resistentes a lamivudina nas posições 552 e 515 ou 528, respectivamente. Comparado aos métodos anteriores, estas linhas celulares estáveis oferecem níveis de expressão de polimerase consistentes com uma boa relação sinal-ruído.

EXEMPLO 2

Transfecção de Células de HepG2 para Criar Linhas Celulares Estáveis Resistentes a Lamivudina

Células transformadas de forma estável, portadoras das características do genoma de VHB resistente a lamivudina e do tipo feroz, foram obtidas para testar a atividade de LdT

e LdC contra os mutantes juntamente com lamivudina e adefovir como controlos.

Meio de Crescimento de HepG2

EMEM (Mediatech, Cat#MT 10-010-CV)

FBS a 10% (Mediatech, Cat#MT 35-011-CV)

1x L-glutamina (2mM final)

1x Penicilina-Estreptomicina (100 I.U./100 μ g por mL final)

1x Na-Piruvato (1 mM final)

1x Aminoácidos não essenciais (NEAA, 0,1 mM final)

Média de Transfecção de HepG2

EMEM (Mediatech, Cat#MT 10-010-CV)

FBS a 10% (Mediatech, Cat#MT 35-011-CV)

1x L-glutamina (2 mM final)

1x Na-Piruvato (1 mM final)

1x NEAA (0,1 mM final)

Meio de Crescimento/Seleção de Linha Celular Estável de HepG2

EMEM (Mediatech, Cat#MT 10-010-CV)

FBS a 10% (Mediatech, Cat#MT 35-011-CV)

1x L-glutamina (2 mM final)

1x Penicilina-Estreptomicina (100 I.U./ μ g por mL final)

1x Na-Piruvato (1 mM final)

1x NEAA (0,1 mM final)

500 μ g/mL de Geneticina (G-418, Life Technologies Cat# 10131)

Construções

pCMV-WT (ayw)

PCMV-M552V

PCMV-M552I

pCMV-L515M/M552V

pCMV-L515M/M552I

pCMV-neo

Todas as construções contêm o genoma de VHB clonado atrás do promotor CMV. Os plasmídeos de VHB contendo genes de polimerase mutados em ponto foram derivados por mutagênese direcionada a local, utilizando-se pCMV-VHB como pai e um kit comercial (kit QuikChange da Stratagene, Cat# 200518-5) conforme descrito anteriormente (Allen e outros, 1998). O pCMVVHB (gentilmente fornecido pelo Dr. C. Seeger, Fox Chase Cancer Institute) contém uma extensão excedente de genoma VHB do subtipo ayw. A construção contendo uma mutação simples L515M não foi gerada, porque se acredita que esta mutação confere apenas resistência mínima a lamivudina, ao invés disso ela serve como mutação compensatória (Gauthier e outros, 1999).

O plasmídeo pCMV-neo foi utilizado para conferir resistência ao antibiótico G-418 (neomicina). Este plasmídeo contém a cadeia principal de pEGFP-N1 (Clonatech, Cat#6085-1) com SV40-deriado Kan^r/Neor^r, mas sem a expressão EGFP.

Preparação de células para transfecção: As células foram colocadas em placas de 6 cavidades revestidas com colágeno (Biocoat, Becton Dickinson, Cat# 35-4400) a 2x10⁵ células por cavidade em 3 mL de meio de crescimento de HepG2. As células foram incubadas durante a noite a 37°C.

Preparação do complexo Fugene ADN: cada construção foi utilizada para transfectar 2 cavidades de uma placa de 6 cavidades revestidas com colágeno. Os controlos incluíram 1 cavidade contendo a construção de pCMVVHB do tipo feroz sem o ADN de pCMV-neo e 1 cavidade contendo o plasmídeo neoR apenas. As células foram transfectadas com Fugene (Roche,

Cat# 1815091) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante com uma relação entre Fugene e ADN de 3:1 (3 μ L de Fugene + 1 μ g de ADN de plasmídeo superespiralado/cavidade). De forma breve, 6 μ L de Fugene foram diluídos em 200 μ L de meio EMEM livre de soro em um tubo de microcentrífuga. Foram então adicionados 2 μ g do ADN de plasmídeo de VHB respectivo com 0,2 μ g de ADN de pCMV-neo. A solução foi gentilmente misturada e depois encubada por 15 minutos à temperatura ambiente.

Transfecção de células: As placas de 6 cavidades foram aspiradas e alimentadas com 2 mL de meio de transfecção de HepG2. A solução do complexo Fugene:ADN foi então adicionada lentamente às células enquanto a placa era agitada para dispersar a solução uniformemente. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. O Meio de Crescimento/Seleção de Linha Celular de HepG2 foi adicionado no dia seguinte.

Seleção das colónias estáveis de linhas de células e sub clones: as células transfectadas foram alimentadas duas vezes por semana por 2 semanas e meia até que se formaram colónias distintas resistentes a G418. As colónias que pareceram ser "clones" (não estando em contato com quaisquer outras colónias) foram retiradas da placa de 6 cavidades com uma ponta de pipeta e colocadas em placas com colágeno de 96 cavidades BD em 150 μ L de Meio de Crescimento/Seleção de Linha Celular de HepG2. Foram selecionadas por construção 16 colónias.

EXEMPLO 3

As células transfectadas foram alimentadas duas vezes por semana durante 2 semanas e meia até que se formaram

colónias distintas resistentes a G418. As colónias que pareceram ser "clones" (não estando em contato com quaisquer outras colónias) foram retiradas da placa de 6 cavidades com uma ponta de pipeta e colocadas em placas com colágeno de 96 cavidades BD em 150 μ L de Meio de Crescimento/Seleção de Linha Celular de HepG2. foram selecionadas por construção, 16 colónias.

O meio foi trocado a cada 3-4 dias. As colónias de expressão de VHB foram identificadas através do teste de 100 μ L de sobrenadante de cultura quanto à presença de HbeAg através de ELISA (ver abaixo). As colónias positivas foram subclonadas por diluição limitativo em placas de 96 cavidades de colágeno e o sobrenadante de cultura foi selecionado por ELISA 2 semanas mais tarde (o meio foi trocado a cada 3-4 dias). Cavidades positivas foram expandidas, soluções-mãe congeladas foram produzidas e linhas celulares foram, então novamente clonadas por diluição limitativo e o sobrenadante de cultura foi selecionado por ELISA 2 semanas depois.

EXEMPLO 4

Teste de Linhas Celulares Transflectadas Estáveis

Clones de linha celular estável foram selecionados para expressão de genoma viral por dois testes. O primeiro ensaio foi um ensaio ELISA semiquantitativo que mede a produção de vírus e antigénio (HbeAg) de hepatite B, um marcador de proteína viral que se correlaciona bem com a multiplicação viral. As linhas celulares que produziram altos níveis de HbeAg foram então testadas quanto à produção de genomas virais multiplicáveis utilizando-se o ensaio de polimerase endógena.

HBeAg-ELISA de Sobrenadante de Cultura de Linha Celular Estável: O anticorpo de captura era um mAb anti- HBeAg de camundongo utilizado a 10 ug/mL. 100 uL de sobrenadante de cultura foram utilizados diretamente da placa de cultura celular de 96 cavidades. O anticorpo de detecção era um anticorpo anti-HBc/eAg policlonal (de coelho) (DAKO, Cat# B0586) a uma diluição de 1:3.000 em FCS/TNE a 10%). Um conjugado de peroxidase de cabra anti-coelho-IgG (1:10.000, Zymed Cat# 81-6120) foi utilizado para desenvolvimento e um substrato era a o-fenilenodiamina (Zymed Cat# 00-2003) em tampão de citrato/fosfato. O desenvolvimento foi parado com 2N Na₂SO₄ antes da leitura da densidade ótica (O.D.) a 490 nm num leitor de placa Fusion (Packard Instruments).

Ensaio de Polimerase Endógena (EPA) de lisado celular: As células foram desenvolvidas em placas de colágeno de 12 cavidades até uma confluência de 100% por 3 a 4 dias e os lisados citosólicos foram preparados em 1 mL de Tris-HCl 50 mM de pH 7,4, 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂, NP-40 a 0,2%. Os EPAs foram essencialmente executados conforme descrito (Seifer e outros, 1998). De forma breve, os nucleocapsídeos de VHB intracelulares foram imunoprecipitados dos lisados citoplásmicos durante a noite a 4°C com anticorpo anti-HBc/eAg de coelho (Dako Cat# B0586) e imobilizado em contas Cl-4B de sefarose proteína A (Amerschan Pharmacia, Cat# 17-0780-01). Os capsídeos imobilizados foram então lavados, as reações de polimerase endógena foram iniciadas a um volume de reação de 50 mM contendo Tris-HCl de pH 7,4, NH₄Cl 75mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 20 mM, β-ME 0,1 mM, NP-40 a 0,5%, dGTP arrefecido 100 μM, TTP, dCTP, e ³³P-dATP 50 nM (Perkin Elmer Life Sciences, Cat# NEG 612H) e incubados durante a noite a 37°C. Após a digestão com 1 mg/mL de Proteinase K (Roche, Cat# 1373196) pro 1 hora a 37°C., o ADN de VHB marcado com ³³P foi liberado através de extração de fenol/clorofórmio. Os ácidos nucléicos foram finalmente

precipitados com volumes iguais de acetato de NH₄ 5M e volumes de 2,5 ETOH a 100% e separados em um gel de agarose nativo a 1% em tampão de Tris-borato. Os géis foram fixados com TCA a 7%, depois secos ou tingidos em membrana de nylon carregada positivamente (Pall Biodyne Plus, Cat# 60406) durante a noite à temperatura ambiente através de transferência capilar em NaOH 0,4 N. Os géis/membranas secos foram expostos a uma tela Phosphoimager (Molecular Dynamics) durante a noite à temperatura ambiente, depois escaneados (Storm 860, Molecular Dynamics) e quantificados com o software ImageQuant (Molecular Dynamics).

As linhas celulares clonais foram selecionadas por possuir alta expressão de HBeAg, assim como a produção de alto nível de genomas multiplicadores e designadas como segue:

Linha Celular	Vírus
WT3/C1	Tipo Feroz (ayw)
V1/C9	M552V
12	M552I
MV5/B3	L515M/M552V
MI4	L515M/M552I

EXEMPLO 5

Teste Antiviral

LdT (telbivudina, Idenix), LdC-HCl (Idenix), Lamuvudina (Moravec) e PMEA (Moravec)

PMEA é o componente ativo do pró-fármaco adefovir.

Placas de colágeno I Biocoat de 12 cavidades (Becton Dickinson, Cat# 35-4500) são semeadas com células a uma densidade de 0,5 a 1x10⁶ células por cavidade em 2 mL de DMEM contendo FBS a 5%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 I.U./100 µg/mL de estreptomicina e 0,5 mg/mL de G-418.

São preparadas novas diluições de fármaco em DMSO a 100% como soluções-mãe de 200x. Para cada experimento, 4 alíquotas de cada série de diluição de fármaco são armazenadas a -20°C até serem utilizadas. Uma vez que as células atinjam a confluência, o tratamento do fármaco é iniciado adicionando-se 10 µL de diluição de fármaco em 2 mL de DMEM nova + FBS a 5%. Assim, a concentração final de DMSO são excede 0,5%. O controlo, que não é fármaco, recebe apenas 10 µL de DMSO. As células são tratadas em dias alternados com 2 mL de fármaco nova/meio num total de 8 dias. Os lisados celulares são então recolhidos no 10º dia conforme descrito abaixo:

Aspirar o meio e rinsar a monocamada celular cuidadosamente uma vez com 1 mL de PBS.

Adicionar 1 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50mM de pH 7,5/NaCl 150 mM/MgCl₂ 5 mM/NP-40 a 0,2%). Armazenar em gelo entre 30 minutos a 4 horas.

Recolher as células lisadas. Transferir 1.5ML para tubos de microcentrifugador.

Transferir o lisado clarificado para tubos novos. Congelar em gelo seco e armazenar a -80°C até estar pronto para continuar com os ensaios de polimerase endógena essencialmente como descrito acima.

Foram gerados EC₅₀ a partir dos dados do Phosphoimager por ajuste de curva utilizando-se o software Xlfit.

A Tabela 24 resume os resultados obtidos quando LdT e LdC, assim como os controlos de lamivudina e PMEA, foram testados quanto a atividade contra os genomas de VHB mutante diferente e do tipo feroz expressados em células HepG2 transfectadas de forma estável. As atividades

antivirais estão presentes na Tabela 24a. Os valores de EC₅₀ obtidos para as diferentes fármacos contra o vírus do tipo feroz geralmente estão de acordo com os valores relatados na literatura, exceto que o valor de EC₅₀ médio para LdT é superior ao valor típico de cerca de 200 nM observado na maioria de nossos estudos anteriores. A atividade antiviral de LdT em cultura celular é bastante variável e a potência de LdT em ensaios de cultura celular não parece ser uma antecipação da eficácia vista em pacientes nas configurações clínicas.

Em relação à atividade observada contra mutações resistentes à lamivudina, PMEA conservou atividade significativa contra todos os mutantes de acordo com relatórios anteriores (ver documento informativo Gilead FDA, 2002). Contra os dois mutantes duplos ou contra o mutante simples M552I, LdT, LdC e lamivudina foram amplamente inativos (EC₅₀ > 1 mM), embora a LdC tenha mostrado atividade limítrofe contra o mutante L515M/M552V com um EC₅₀ de aproximadamente 780 µM. A maior descoberta a partir do presente estudo foi que a LdT e LdC retêm atividade quase que completa contra o mutante simples M552V, considerando-se que a atividade de lamivudina contra este mutante foi significativamente reduzida.

O efeito das mutações resistentes a lamivudina na eficácia observada dos fármacos, pode ser mais bem visto a partir as análises de resistência a multiplicação apresentadas na Tabela 24b. Os resultados obtidos neste estudo estão em ampla concordância com os estudos anteriores (conforme resumido no Documento Informativo da Comissão Consultiva Dilead FDA, 2002). Está claro a partir da Tabela 24b que LdT, LdC e lamivudina mostram uma resistência à multiplicação substancial quando testadas contra ambos os

mutantes duplos ou o mutante simples M552I. Entretanto, o estado do mutante simples M552V. A LdT e LdC exibiram atividade antiviral essencialmente inalterada contra este mutante, com respectivas mudanças de resistência a multiplicação de 1,2 e 2,1 vezes, considerando-se que a lamivudina mostra uma resistência a multiplicação de 24,8 vezes em nossas mãos e uma resistência de 153 vezes de acordo com o grupo Glaxo (Allen e outros, 1998).

Tanto a LdT quanto a LdC foram relativamente inativas contra as estirpes de VHB de mutantes duplos comumente encontradas em pacientes com hepatite B com resistência a lamivudina estabelecida. Se estes resultados *in vitro* são antecipações de atividade clínica, então os resultados sugerem que a LdT e a pró-fármaco de LdC atualmente sendo investigadas na clínica podem possuir atividade anti-VHB mínima em pacientes com resistência a lamivudina estabelecida, ligadas a estirpes de VHB de mutante duplo. Entretanto, dois relatórios resumidos recentes na literatura destacaram o problema de que os resultados com transfectantes de laboratório algumas vezes possuem pouco valor de antecipação em relação à atividade na clínica. Um relatório de virologistas de Gilead (Delaney e outros, 2001) sugere atividade *in vitro* mínima de entecavir contra estirpes de VHB mutantes YMDD, enquanto outro resumo no mesmo encontro (AASLD, 2001) descreveu os resultados de um grande teste prospectivo conduzido pelo patrocinador do entevacir (Bristol Meyers Squibb), no qual o tratamento com entecavir produziu substanciais reduções de ADN de VHB em pacientes com hepatite B resistente a lamivudina (REF xxx). Assim, em vista do valor de antecipação clínica problemático para resultados de laboratório relacionados a VHB, pode ser desejável executar um teste clínico pequeno para LdT (e LdC) em pacientes com VHB resistente a

lamivudina, apesar da atividade *in vitro* mínima para estes dois compostos contra as estirpes de VHB de mutante duplo.

Os estudos mostraram atividade antiviral essencialmente inalterada para LdT e LdC contra o mutante de VHB M552V, em contraste à lamivudina. A mutação M552V é crítica para o desenvolvimento de resistência a lamivudina, à medida que se acredita que seja esta a primeira etapa no caminho que leva ao mutante duplo M515L/M552V, que corresponde a 60% a 70% da resistência a lamivudina em pacientes com hepatite B (Ahmed e outros, 2000). Esta descoberta *in vitro* é importante para a compreensão geral do perfil de resistência essencial da LdT (telbivudina), uma vez que a atividade contra a mutação chave M552V pode ajudar a suprimir o surgimento de resistência viral em pacientes com hepatite B sendo tratados com LdT (telbivudina).

Enquanto padrões de resistência viral clínica podem ser estabelecidos apenas a partir de testes clínicos, a atividade inalterada de LdT e LdC contra mutantes de VHB M552V, unida à melhor supressão quantitativa de multiplicação de VHB observada em pacientes tratados com LdT na atual Fase IIB de teste clínico, sugere ser provável que resistência de VHB mediada por YMDD a LdT seja substancialmente menos freqüente que a observada no tratamento com lamivudina.

Tabela 24. Perfil de Inibição (a) eficácia antiviral; e (b) resistência à multiplicação] de LdT, LdC, Lamivudina e PMEA contra vírus VHB do tipo feroz e mutante resistente a lamivudina derivados de linhas celulares estáveis determinadas por EPA de nucleocapsídeos intracelulares.

Tabela 24a Eficácia Antiviral

Linha Celular	Vírus	Droga			
		LdT	LdC-HCl	Lam	PMEA
		EC ₅₀ (uM)	EC ₅₀ (uM)	EC ₅₀ (uM)	EC ₅₀ (uM)
WT3/C1	WT (ayw)	0.65 ± 0.28	0.18 ± 0.09	0.05 ± 0.03	0.33 ± 0.17
V1/C9	M552V	0.85 ± 0.48	0.36 ± 0.13	0.96 ± 0.36	1.02 ± 0.22
I2	M552I	≥1000	≥1000	≥1000	1.6 ± 1.12
MV3/B3	L515M/M552V	≥1000	777 ± 99	≥1000	0.62 ± 0.3
MI4	L515M/M552I	≥823 ± 307	≥1000	≥1000	1.49 ± 0.3

Tabela 24B Resistência a Multiplicação

Linha Celular	Vírus	Droga			
		LdT	LdC-HCl	Lam	PMEA
		X Resist.	X Resist.	X Resist.	X Resist.
WT3/C1	WT (ayw)	1	1	1	1
V1/C9	M552V	1.2 ± 0.4	2.1 ± 0.5	24.8 ± 17.8	3.8 ± 2.3
I2	M552I	≥1360 ± 363	≥6733 ± 4245	≥22922 ± 9063	4.6 ± 3.0
MV3/B3	L515M/M552V	≥1360 ± 363	5051 ± 2717	≥22922 ± 9063	3.3 ± 2.9
MI4	L515M/M552I	≥1049 ± 226	≥6733 ± 4245	≥22922 ± 9063	3.6 ± 1.1

Todos os números em ambas as Tabelas representam valores médios + /- DP derivado a partir de três a quatro experimentos independentes.

EC₅₀ = Concentração efetiva que reduz a produção do vírus em 50% na cultura celular

Resistência a Multiplicação = EC₅₀ para o VHB mutante dividido pelo EC₅₀ para o VHB do tipo feroz

Ahmed SNS, Tavan D, Pichoud C e outros, "Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B" Hepatology 2000, 32, 1078-1088.

Allen MI, Deslauriers M, Webster A e outros, "Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine" Hepatology 1998, 27 (6), 1670-1677.

Delaney WE, Huiling Y, Westland CE e outros, "In vitro cross resistance testing of adefovir, entecavir, and β -L-thymidine (L-DT) against drug-resistant strains of VHB". Hepatology 2001, 34 (Nº 4, Parte 2), 628A, resumo número 1825.

Fu L e Cheng, YC. "Role of additional mutations outside the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase in L(-)SddC (3TC) resistance" Biochem Pharmacol. 1998, 55, 1567-1572.

Gauthier J, Bourne EJ, Lutz, MW e outros, "Quantitation of hepatitis B viremia and emergence of YMDD variants in patients with chronic hepatitis B treated with lamivudine" J. Infectious Dis 1999, 180, 1757-62.

Documento Informativo de Comissão Consultiva Gilead FDA, "Adefovir dipivoxil for the treatment of chronic hepatitis B" NDA 21-449. Tabela 1, pág 12. 5 de julho de 2002.

Ono SK, Kato N, Shiratori Y e outros, "The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance" J. Clin Invest. 2001, 107, 449-455.

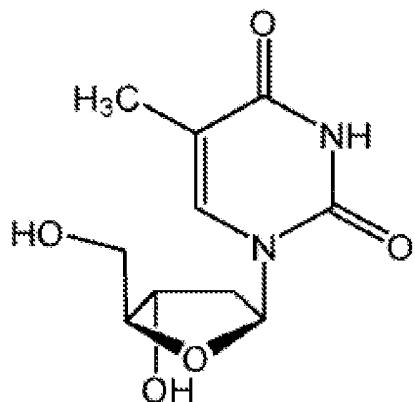
Seifer M, Hamatake R, Bifano M, Standring DN. "Generation of replication-competent hepatitis B virus nucleocapsids in insectcells" J. Virol. 1998, 72, 2765-2776.

Esta invenção foi descrita com referência a suas modalidades preferenciais. Variações e modificações da

invenção serão óbvias àqueles habilitados na área a partir da descrição detalhada da invenção precedente. Pretende-se que todas estas variações e modificações estejam incluídas no escopo desta invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição farmacêutica para utilização no tratamento de um hospedeiro infectado com uma forma resistente a droga do vírus HB que apresenta uma mutação no codon 552 a partir da metionina para valina na região de ADN-polimerase, compreendendo um composto β -L-2'-desoxinucleosídeo que consta da formula:



ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável, ou um 3' e/ou 5'-aminoácido, incluindo o éster L-valinil;

na presença de um portador ou diluente farmaceuticamente aceitável

2. Uma composição farmacêutica para utilização como reivindicado na reivindicação 1, em que a referida forma de vírus da hepatite B, que exibe uma mutação na 552 codon da metionina para valina na região de polimerase do ADN resistente ao fármaco, é uma forma da hepatite B que exibe um mutação no codão 552 de metionina para valina na região de polimerase do ADN, resistente à lamivudina.

3. A composição farmacêutica para utilização como reivindicado na reivindicação 1, ou na reivindicação 2 compreende ainda um ou mais agentes (anti-VHB) anti-

hepatite B, em que os outros agentes anti-VHB são seleccionados de um grupo consistindo de 3TC (2',3'-didesoxi-3'-triacitidina), FTC (β -2-hidroximetilo-5-5-fluorcitocina-1-il)-1,3-oxatiolano), L-FMAU (2'-fluoro-5-metil-p,L-arabinofuranoliloridina), DAPD (($-$)- β -D-2,6-diaminopurina dioxolano, DXG(($-$)-beta-D-Dioxolano guanina), famciclovir, penciclovir, BMS-200475 (2-amino-1,9-dihidro-9-[(1S,3R,4S)-4-hidroxi-3-(hidroximetilo-2-metilenociclopentilo]-6H-purina-6-um, monohidrato), bis pom PMEA (adefovir, dipivoxil ou {2-6-amino-9H-purina-9-ilo)etoxi}acido metilofosfónico), lobucavir, ganciclovir, tenofovir, Lfd4C (β -L-5-fluor-2',3'-desidro-2',3'-didesoxicitidina, foscarnet (trisodio fosfonoformato), isoprinosina, levamizole, N-acetilcisteína (NAC), interferon, interferon peguilado, ISS ("Sequencia Imunoestimuladora"), ribavirina, PC1323 (ácido dissulfónico de batocuproína) e um ácido poliadenocíclico poliuridílico.

4. A composição farmacêutica para utilização como reivindicado na reivindicação 3, onde pelo menos um dos agentes anti-VHB seja o interferon.

5. A composição farmacêutica para utilização como reivindicado na reivindicação 4, onde o interferon é seleccionado de entre um grupo que consiste de: interferon alfa, interferon alfa-peguilado, interferon alfa-2a, interferon alfa-2b, interferon alfa-2a peguilado, interferon alfa-2b peguilado, ROFERON® -A (interferon alfa-2a), PEGASYS® (interferon alfa-2a peguilado), INTRO®A (Interferon alfa-2b), PEG-INTRON® (Interferon alfa-2b peguilado), interferon beta, interferon gama, interferon tau, interferon ómega, interferon de união, INFERGEN (interferon alfacon-1), OMNIFERON (interferon natural), REBIF (interferon beta-la), ómega interferon, interferon

alfa oral, interferon gama-lb, SuperFeron (IFN-alfa multi-subtipo humano natural), e HUFERON (IFN-beta humano).

6. A composição farmacêutica para utilização como definido em qual quer reivindicação 1 ou 3-5, fabrico de um medicamento para o tratamento de um hospedeiro infetado com uma forma do VHB resistente ao fármaco com mutações no códon 552 da metionina a valina, na região da polimerase do ADN.

7. O uso de acordo com a reivindicação 6, quando é uma forma do VHB que exibe uma mutação no codão 552 de metionina para valina na região de polimerase do ADN, resistente à lamivudina.

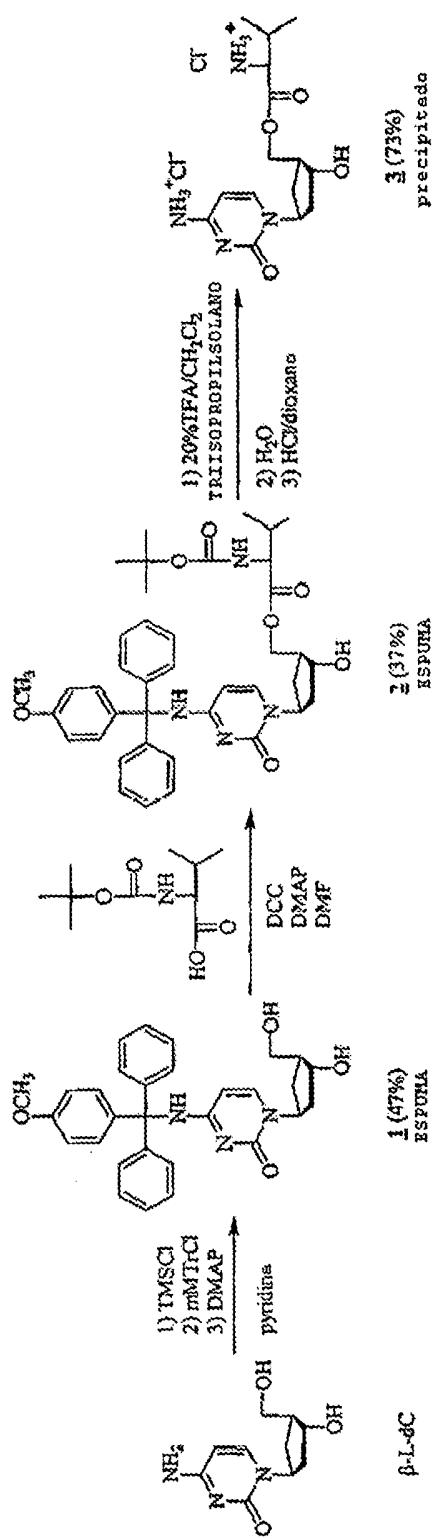
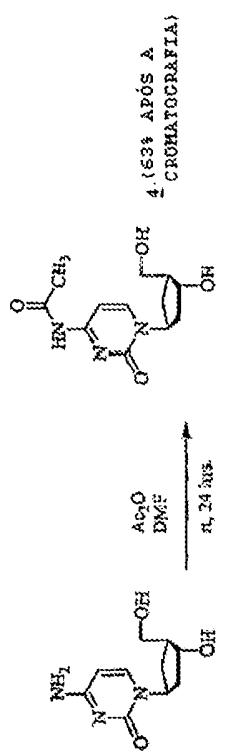
8. A utilização conforme reivindicação 6 e 7 e a composição farmacêutica conforme qualquer uma das reivindicações 1 a 5, sendo o hospedeiro um mamífero.

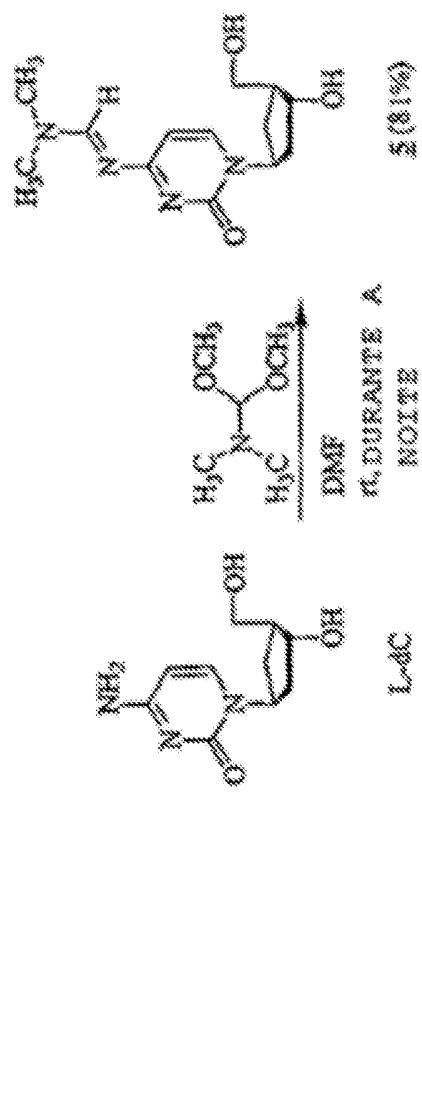
9. O uso ou composição farmacêutica a ser usada, conforme a reivindicação 8, sendo o hospedeiro um ser humano

RESUMO

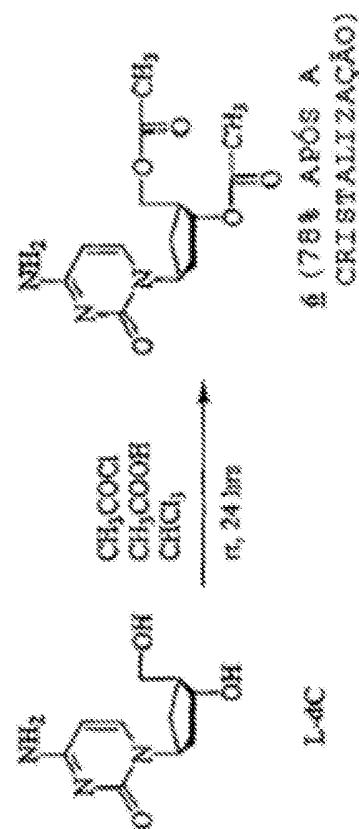
**β-L-2'-DESOXINUCLEÓSIDOS PARA TRATAMENTO DE ESTIRPES
RESISTENTES DE VHB**

Foi descoberto que os β -L-2'-desoxinucleosídeos são ativos contra o vírus da hepatite B, com mutações, resistente ao fármaco. Um método para tratar VHB resistente a lamivudina (M552V) em um hospedeiro é fornecido, o qual inclui administrar um β -L-2'-desoxinucleosídeo ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável. Além disso, um método para impedir que a mutação do VHB resistente à lamivudina (M552V) ocorra em um hospedeiro simples é fornecido, o qual inclui administrar um β -L-2'-desoxinucleosídeo ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável. Um método para impedir e/ou suprimir o surgimento de mutante duplo de VHB (L52 8M/M552V) em um hospedeiro é também fornecido, o qual inclui administrar um β -L-2'-desoxinucleosídeo ou seu sal, éster ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável.

Fig 1a SÍNTSE DE ÉSTERES 3'-VALINIL DE 2'-DESOXI- β -L-CITIDINAFig 1b SÍNTSE DE ÉSTERES 5'-VALINIL DE 2'-DESOXI- β -L-citidinaFig 2 SÍNTSE DE N4-ACETIL-2'-DESOXI- β -L-citidina



struttura del 3', 5'-DT-O-acetyl-2', -deoxoy-β-D-glucosano



struttura del 3', 5'-DT-O-acetyl-2', -deoxoy-β-D-glucosano

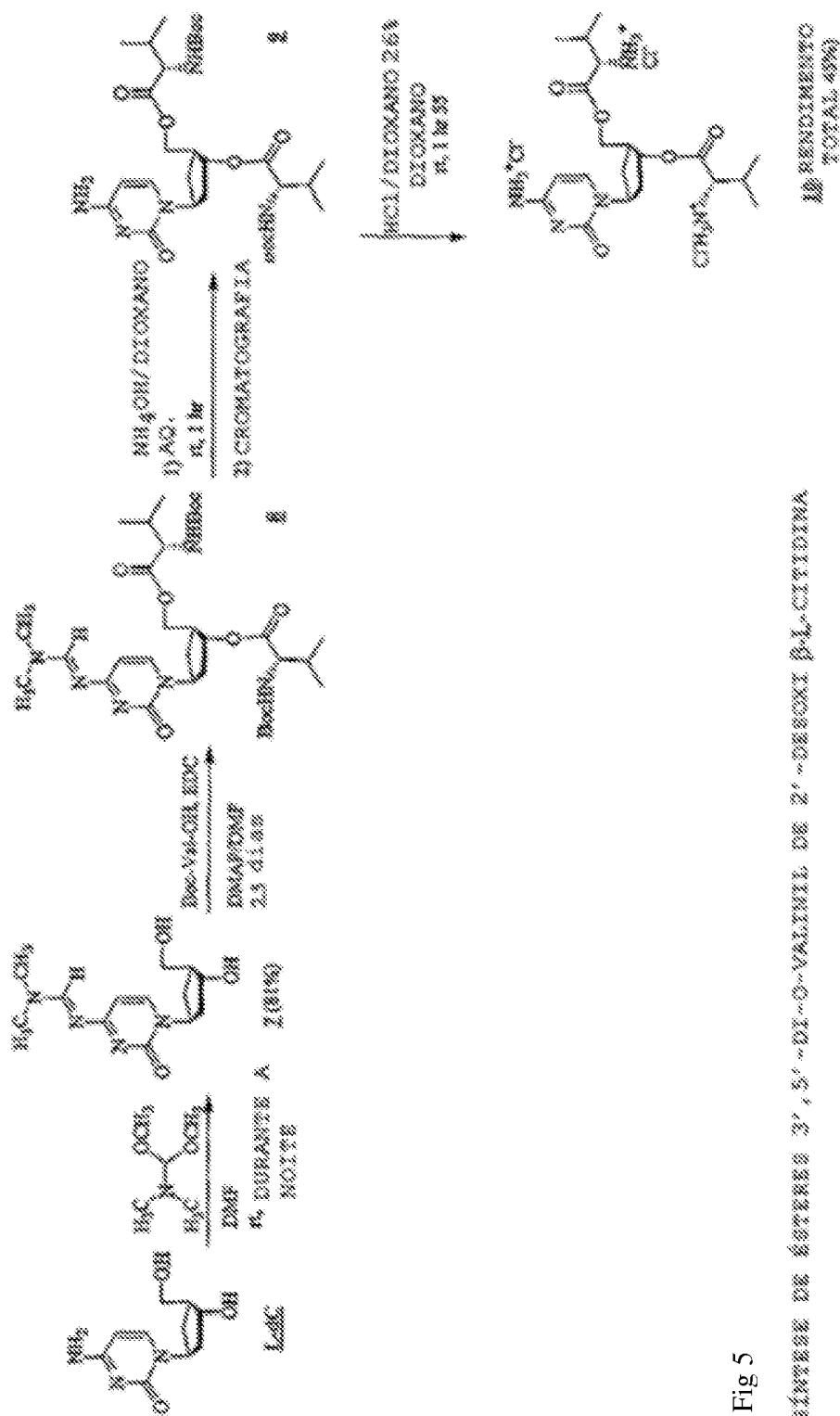


Fig 5

Figura 5. Síntesis de pentosa 3', 3'-D-ribofuranosil-2'-deoxi-D-ribofuranose.

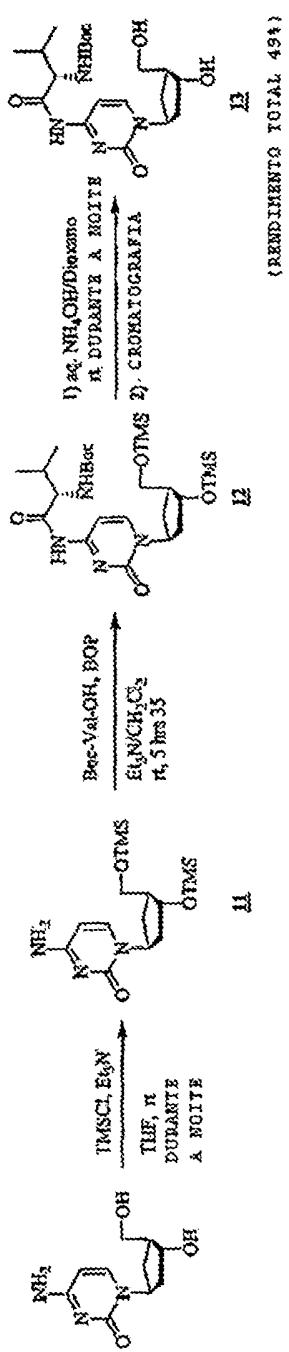


Fig 6

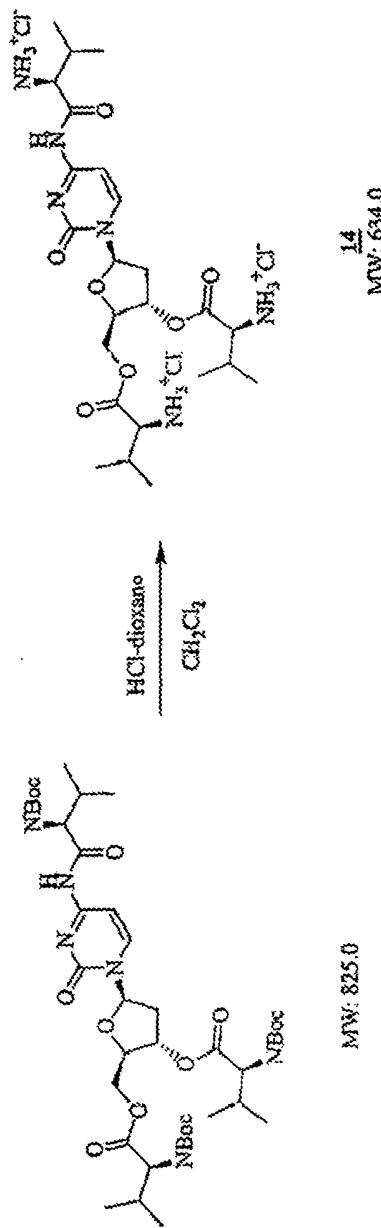


Fig 7

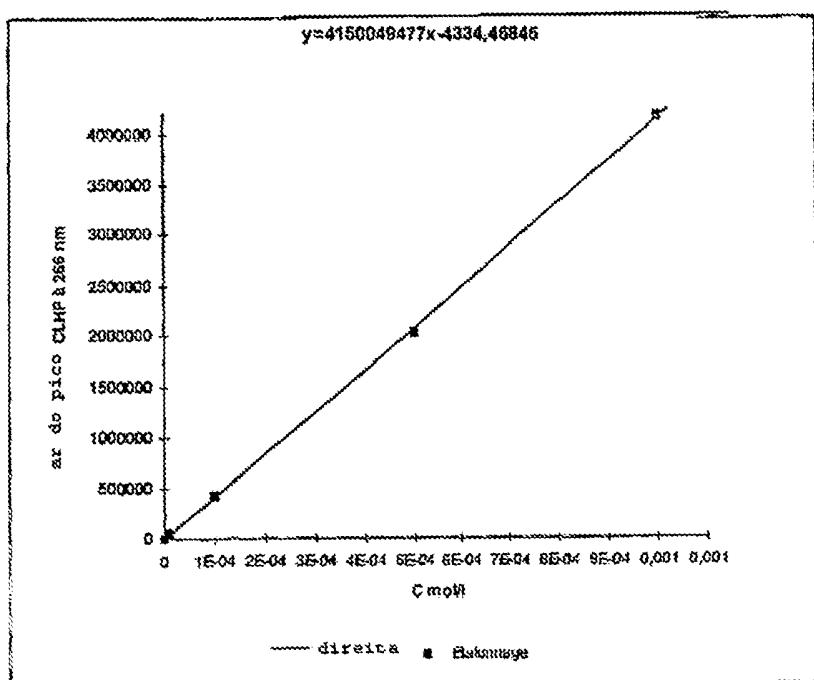


Fig 8a CURVA DE CALIBRAÇÃO DE SOLUBILIDADE PARA D-SC

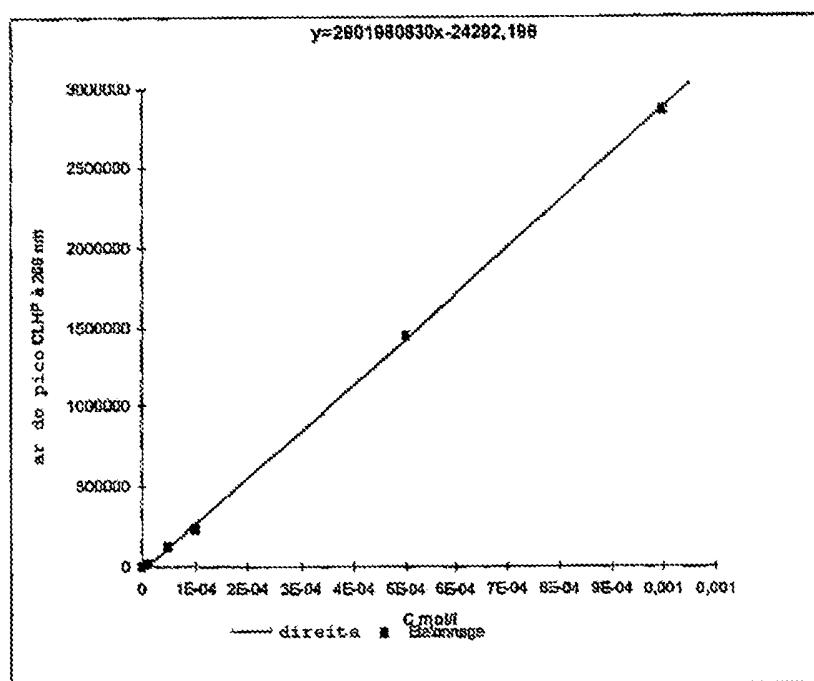
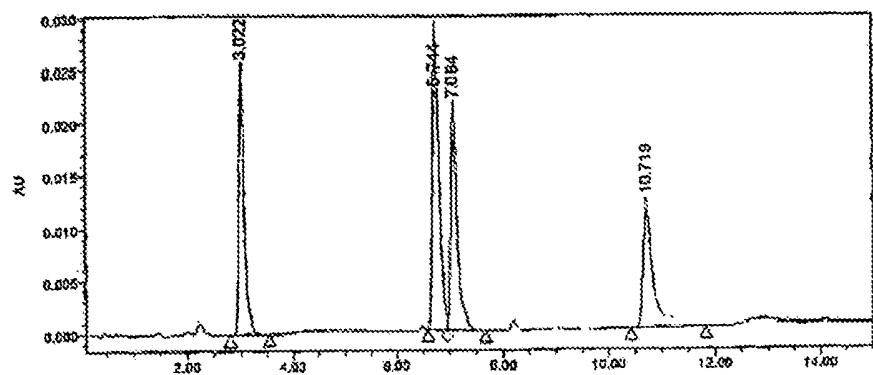


Fig 8b CURVA DE CALIBRAÇÃO DE SOLUBILIDADE PARA ÉSTER 3',5'-DIVALINIL DE L-DC



PERFIL DE HPLC - 7,5 HORAS AO pH de 7,42
Fig 9a

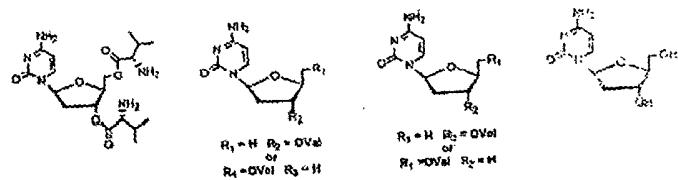
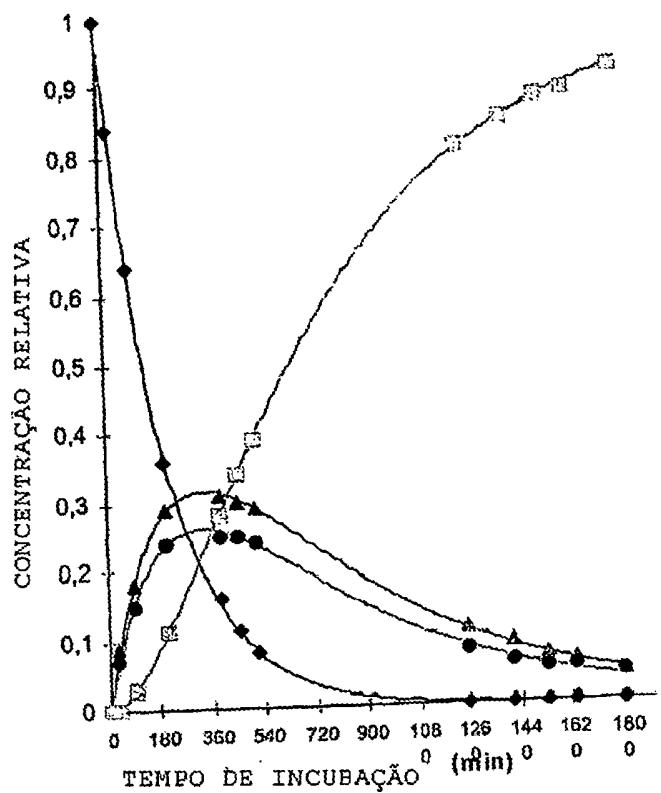


Fig9b CURVAS CINÉTICAS AO pH de 7,42

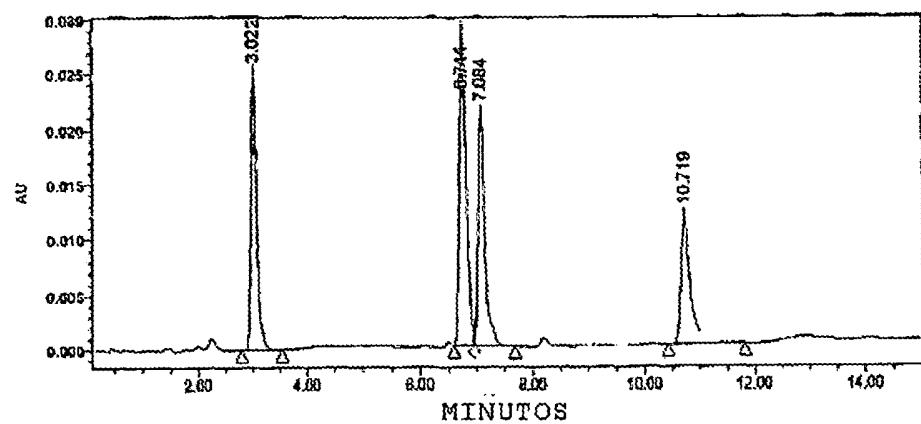


Fig10a PERFIL DE HPLC – 5,33 HORAS AO pH de 7,20

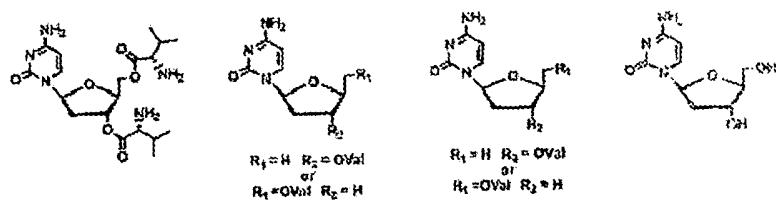
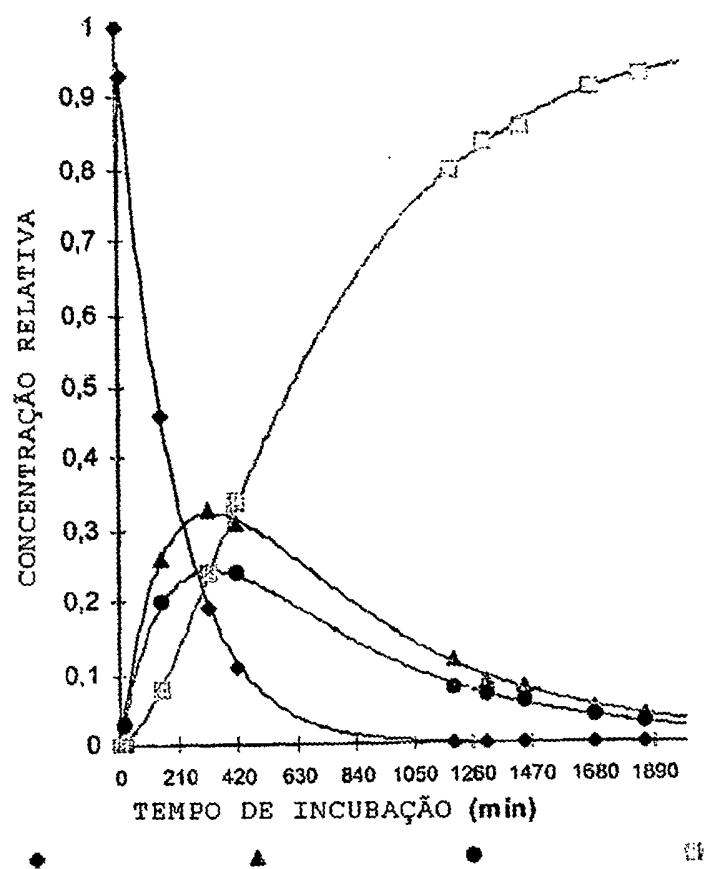


Fig10b

CURVAS CINÉTICAS AO pH de 7,20

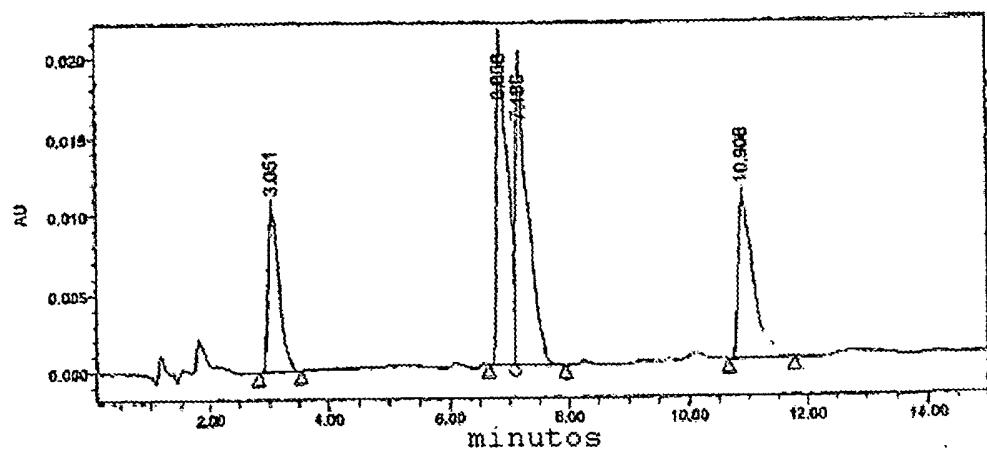


Figure 11a PERFIL DE HPLC - 95,7 HORAS AO pH de 4,51

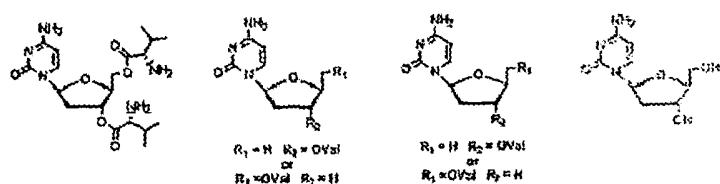
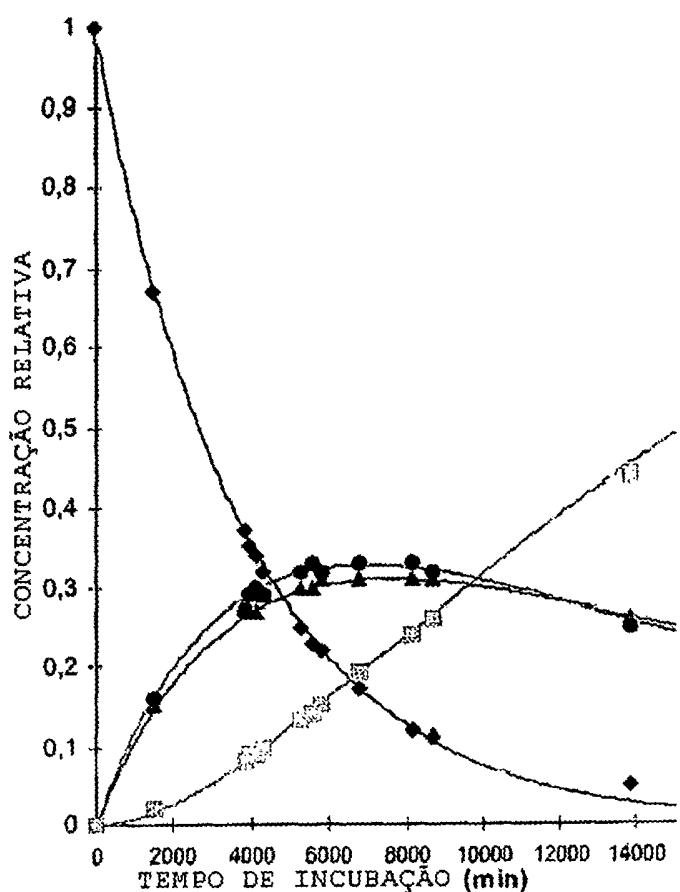


Fig11b CURVAS CINÉTICAS AO pH de 4,51

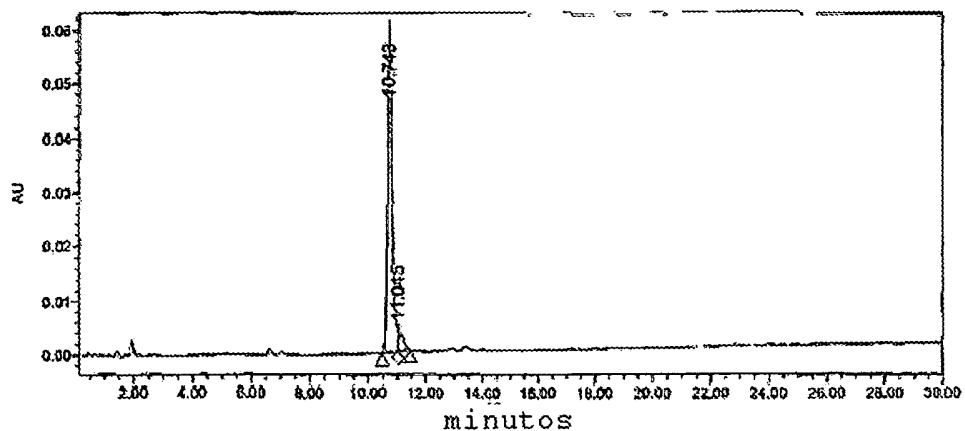


Fig12 PERFIL DE HPLC – 48 HORAS AO pH de 1,23

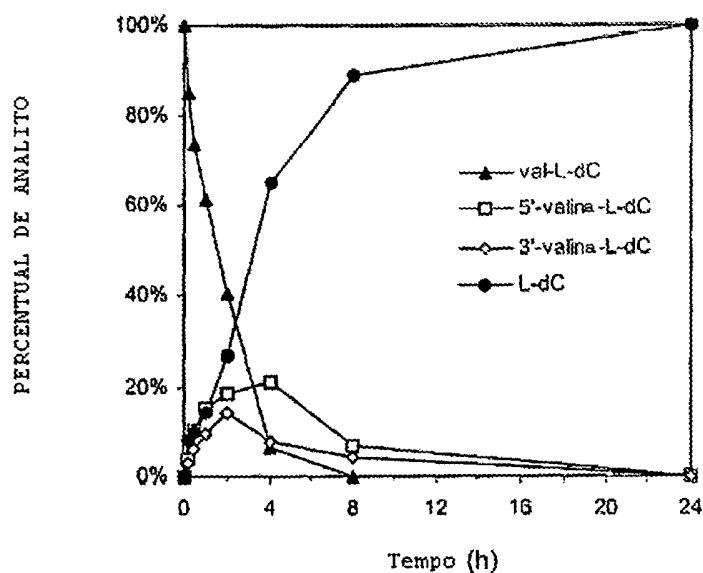


Fig13 METABOLISMO IN VITRO DE 3',5'-DIVAL-L-dC EM PLASMA HUMANO

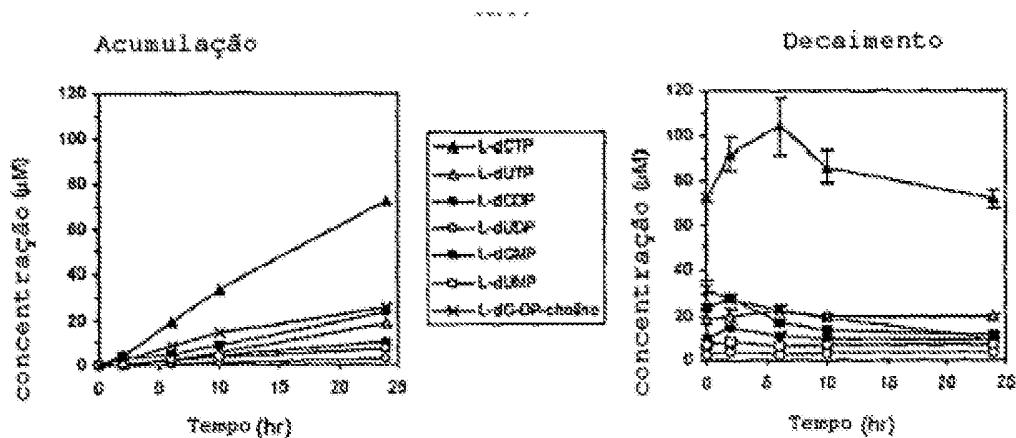


Figura 14: Metabolismo intracelular L-dC em células HepG2.

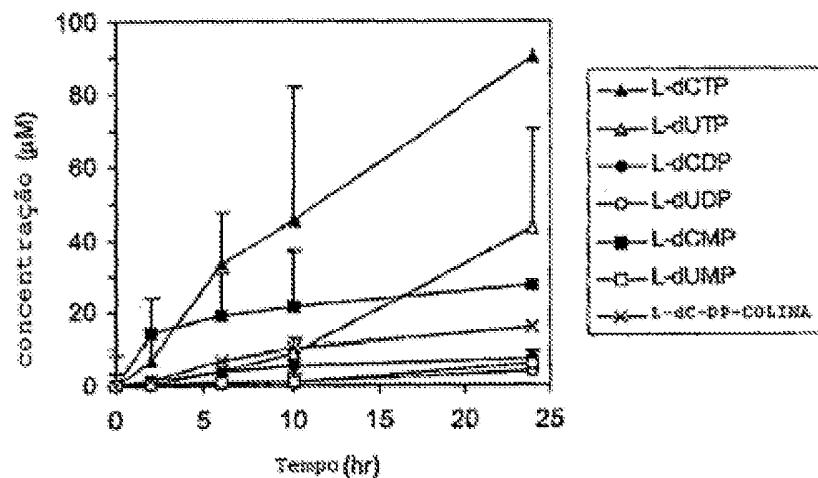
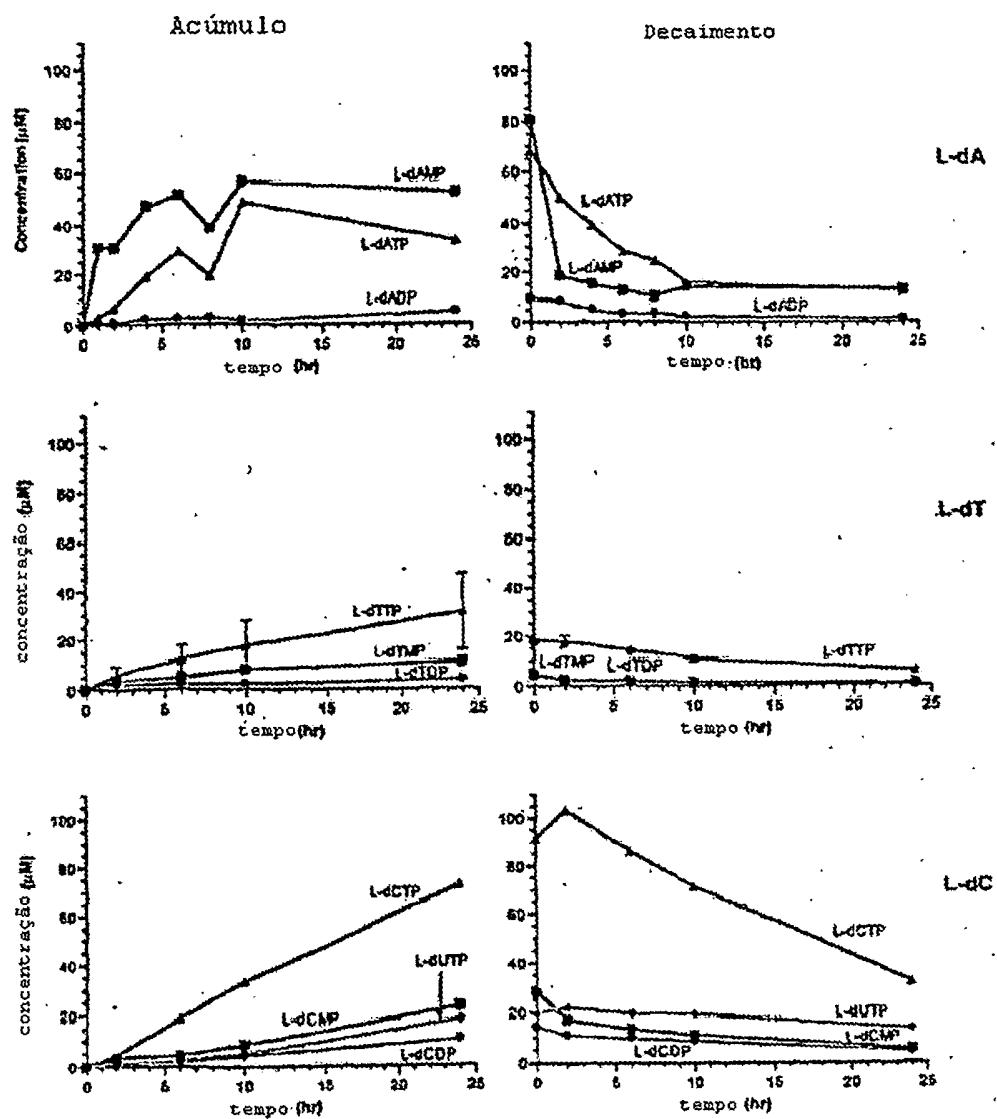


Figura 15: Metabolismo intracelular L-dC em hepatócitos primários humanos.



ACÚMULO E DIMINUIÇÃO DE L-dA, L-dT E L-dC EM CÉLULAS HepG2
Fig16