

(11) Número de Publicação: **PT 1387681 E**

(51) Classificação Internacional:  
**A61K 31/435** (2007.10) **A61P 31/14** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2002.05.02**

(30) Prioridade(s): **2001.05.03 GB 0110832**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.02.11**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.08.20**  
**235/2008**

(73) Titular(es):

**VIROGEN LTD.**

**1-3 BURTONHOLE ROAD, MILL HILL LONDON**  
**NW7 1AD** GB

(72) Inventor(es):

**ALBERT STANLEY TYMS**  
**DEBRA LYNN TAYLOR**

GB  
GB

(74) Mandatário:

**MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA**  
**RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA** PT

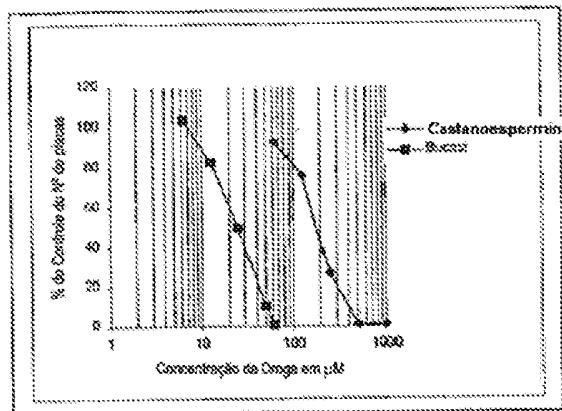
(54) Epígrafe: **COMPOSTOS ANTIVIRAIS**

(57) Resumo:

**RESUMO**  
**"COMPOSTOS ANTIVIRAIS"**

Comparação da actividade anti-BVDV de Bucaste e castanospermina por teste de redução de placas em células MBDK

Uso de certos ésteres de castanospermina no tratamento de doenças causadas por flavivírus, em particular no tratamento de doença causada pelo vírus da hepatite C (HCV) e composições que contém os referidos ésteres combinados com agentes terapêuticos adjuvantes.



**DESCRIÇÃO**  
**"COMPOSTOS ANTIVIRAIS"**

A presente invenção está relacionada com o uso de certos ésteres de castanoespermina no tratamento de doenças causadas pelo vírus da hepatite C (HCV).

**Flavivírus**

O grupo dos flavivírus (família *Flaviviridae*) compreende os géneros *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus* e inclui os agentes causadores de numerosas doenças humanas e uma variedade de doenças animais que causam perdas significativas à indústria da pecuária.

A família *Flaviviridae* (membros da qual são aqui referidos como flavivírus) inclui os géneros *Flavivirus* (por exemplo, vírus da febre amarela, vírus da dengue, vírus da encefalite japonesa, e vírus da encefalite por carapato), *Pestivirus* (por exemplo, vírus da diarreia viral bovina, vírus da febre suína clássica e vírus da "border disease" dos ovinos), *Hepacivirus* (vírus da hepatite C) e actualmente, membros não-classificados dos *Flaviviridae* (por exemplo, vírus GB tipo A, B e C).

A lista completa de membros da família *Flaviviridae* é definida em detalhes pelo Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (a definição taxonómica aceite está descrita em: Taxonomia de Vírus: A Classificação e Nomenclatura dos Vírus. O Sétimo Relatório do Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (livro). M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle,

R.B. Wickner (2000). Taxonomia de Vírus, VII relatório do CITV. Academic Press, San Diego), os conteúdos do qual são aqui incorporados por referência.

Porém, talvez o flavivírus mais significante seja o vírus da hepatite C (HCV). O HCV foi inicialmente identificado em 1989 e desde então tornou-se claro que este vírus é responsável pela maioria dos casos de hepatite não-A e não-B pós-transfusão. Sem dúvida, o HCV é agora reconhecido como uma das infecções mais comuns que causam doença crónica do fígado e a Organização Mundial de Saúde estima que 170 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas. A infecção por HCV resulta numa infecção crónica em 85 % dos pacientes infectados e aproximadamente 20-30 % destes progredirão para cirrose e doença hepática em estágio terminal, frequentemente complicada por carcinoma hepatocelular.

O estudo do HCV tem sido atrasado pela inabilidade de propagar o vírus eficientemente em culturas celulares. Porém, na ausência de um sistema adequado de cultura celular capaz de suportar a replicação do HCV humano, o BVDV é um modelo de cultura celular aceitável. O HCV e o BVDV dividem um grau significativo de homologia de proteínas locais, uma estratégia de replicação comum e provavelmente o mesmo local subcelular para o envelopamento viral.

O HCV é um vírus envelopado com cadeia de ARN pertencente à família Flaviviridae, mas classificado como o género distinto Hepacivirus. O genoma do HCV consiste numa moldura simples de leitura longa e aberta que codifica ~3000 poliproteínas de resíduo de aminoácidos. Esta poliproteína

é processada co e pós translacionalmente em pelo menos 10 produtos diferentes incluindo duas proteínas E1 e E2 glicosiladas N-ligadas.

O genoma carrega nas terminações 5' e 3' regiões não-traduzidas (RNTs) que formam estruturas secundárias e terciárias estáveis. A RNT 5' carrega um local de inserção de ribossoma interno (LIRI), permitindo a ligação directa de ribossomas em proximidade íntima com o códão inicial do ORF. Assim, a tradução do ARN do HCV é mediada pelo LIRI, ao invés do mecanismo CAP-dependente tipicamente usado por ARNm celular.

Dentro da poliproteína, os produtos da divisão são ordenados como se segue:

Núcleo (N), proteína envelope 1 (E1), E2, p7, proteína não-estrutural 2 (NS2), NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. A proteína do núcleo é uma proteína de ligação de ARN altamente básica que forma o maior constituinte do nucleocapsídeo. As proteínas envelope E1 e E2 são proteínas de membrana tipo 1 altamente glicosiladas ancoradas através da região carboxi-terminal. Elas estão inseridas no envelope lipídico da partícula viral e associam-se para formarem heterodímeros estáveis. O produto da divisão p7 é um pequeno peptídeo hidrofóbico de função desconhecida. As proteínas não-estruturais estão envolvidas na replicação viral e possuem atividades de protease (NS2/NS3), helicase (NS3) e ARN polimérase (NS5B).

A ligação à célula hospedeira provavelmente requer a interacção de E2 ou do complexo E1/E2 com um receptor que está presente na superfície celular.

Devido à falta de um sistema eficiente de replicação de cultura celular, a compreensão da montagem da partícula de HCV é muito limitada. Porém, a ausência de glicanas complexas, a localização de glicoproteínas de HCV expressadas no retículo endoplasmático (RE) e a ausência dessas proteínas na superfície celular sugerem que a morfogénese inicial do vírion ocorre por interacção com vesículas intracelulares do RE. Adicionalmente, heterodímeros maduros E1-E2 não deixam o RE, e sinais de retenção do RE foram identificados nas regiões C-terminais de E1 e E2. Neste caso, o vírus seria exportado através de uma via secretória constitutiva. Em acordo com esta ideia, complexos de glicanos N-ligados foram encontrados na superfície de partículas virais parcialmente purificadas sugerindo que o vírus transita pelo complexo de Golgi.

Até recentemente, o interferão- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) foi a única terapia com benefícios comprovados para o tratamento da infecção por HCV. O uso de IFN- $\alpha$  em até 50% de pacientes mostrou uma resposta ao tratamento, mas isto não é sustentável na maioria dos pacientes e há consideráveis efeitos colaterais associados. Mais recentemente, maior sucesso tem sido atingido usando IFN- $\alpha$  em combinação com o análogo nucleosídico ribavirina, mas pesquisas contínuas são necessárias para identificar novos candidatos terapêuticos que terão actividade antiviral mais potente e menos efeitos colaterais severos.

Há, portanto, uma necessidade de drogas anti-flavivirais melhores em geral, e drogas anti-HCV em particular.

#### **Glicoproteínas e desenvolvimento viral**

As glicoproteínas são classificadas em duas grandes classes de acordo com a ligação entre o açúcar e o aminoácido da proteína. A ligação N-glicosídica mais comum e extensivamente estudada entre uma asparagina da proteína e um resíduo N-acetyl-D-glucosamina de oligossacarídos. Oligossacarídeos N-ligados, seguindo uma ligação a uma estrutura de polipeptídeo, são processados por uma série de enzimas específicas no retículo endoplasmático (RE) e esta via de processamento tem sido bem caracterizada.

No RE, a  $\alpha$ -glucosidase I é responsável pela remoção de resíduos de  $\alpha$ -1,2 glicose do oligossacarídeo precursor e a  $\alpha$ -glucosidase II remove os dois resíduos remanescentes  $\alpha$ -1,3 ligados à glicose, antes da remoção de resíduos de manose por manosidases e outras reacções de processamento envolvendo várias transferases. Estas reacções de "corte" de oligossacarídeos permitem que as glicoproteínas se dobrem correctamente e interajam com proteínas acompanhantes como a calnexina e calreticulina para transporte através do complexo de Golgi.

Inibidores de enzimas-chave nesta via biossintética, particularmente as  $\alpha$ -glucosidases e  $\alpha$ -manosidase bloqueadoras, mostraram prevenir a replicação de vários vírus envelopados. Tais inibidores podem agir interferindo com o dobramento da glicoproteína do envelope viral, prevenindo então a interacção inicial celular vírus-hospedeiro ou fusão subsequente. Eles também podem prevenir a duplicação viral prevenindo a construção de glicoproteínas apropriadas exigidas para completar a membrana viral.

Por exemplo, relatou-se que os inibidores da glicosilação não-específica 2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -hidroxi-norvalina inibem a expressão de glicoproteínas VIH e bloqueiam a formação de sincícios (Blough *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 141(1), 33-38 (1986)). A multiplicação viral de células infectadas por VIH tratadas com estes agentes é parada, presumivelmente devido à indisponibilidade de glicoproteínas necessárias para a formação da membrana viral.

Noutro relatório, o inibidor da glicosilação 2-desoxi-2-fluoro-D-manoose mostrou exibir actividade antiviral contra células infectadas por influenza prevenindo a glicosilação de proteína de membrana viral (McDowell *et al.*, *Biochemistry*, 24(27), 8145-52 (1985)). Este relatório também estudou a actividade antiviral da 2-desoxiglicose e 2-desoxi-2-fluoroglicose e descobriu que cada uma inibe a glicosilação da proteína viral por um mecanismo diferente.

Lu *et al.* (1995) apresentaram evidência de que a glicosilação N-ligada é necessária para a secreção do vírus da hepatite b (*Virology* 213: 660-665) enquanto Block *et al.* (1994) mostraram que a secreção do vírus da hepatite B humana é inibida pelo imino açúcar N-butildesoxinojirimicina (PNAS 91: 2235-2239). Ver também WO9929321.

Taylor *et al.* (1988) demonstraram a perda da infectividade por citomegalovírus após o tratamento com castanospermina ou outros alcalóides de plantas e relacionam isto à síntese anormal de glicoproteínas (*Antiviral Res.* 10: 11-26). Ver também a patente dos EUA 5,0004,746.

Taylor *et al.* (1994) mostraram que a inibição de  $\alpha$ -glucosidase I das enzimas de processamento de glicoproteína por 6-O-butanoil-castanospermina possui consequências nas células T infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (Antimicrob. Ag. Chemother. 38: 1780-1787) enquanto Sunkara *et al.* (1989) descrevem a actividade anti-VIH de análogos de castanospermina (Lancet II 1206). Ver também a patente dos EUA 5,0004,746.

A patente dos EUA 5 385 911 revela a actividade anti-herpes em certos ésteres de castanospermina.

A combinação de inibidores específicos de aspartil-protease com derivados de castanospermina no tratamento de infecções retrovirais está revelada na patente dos EUA 5 539 430.

A terapia antiviral contra hepatite B está revelada em Locarni, S., *Today's Life Science*, 1990, páginas 32-80

Em *Antiviral Research*, 10 (1988), páginas 11-26, revela-se que a perda da infectividade por citomegalovírus após o tratamento com castanospermina correlaciona-se com a síntese anormal de glicoproteínas.

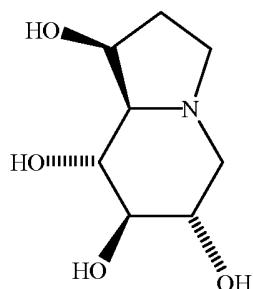
O consumo e metabolismo do 6-O-butanoil castanospermina e seu uso potencial como droga anti-VIH estão descritos em *Glycobiology*, vol.6, nº. 2, páginas 209-216, 1996.

Porém, muitos outros inibidores conhecidos da glicosilação mostraram não possuir actividade antiviral. Assim, a actividade antiviral contra vírus envelopados, em geral, e a actividade anti-flaviviral, especificamente, de inibidores da glicosilação é bem imprevisível.

### **Inibidores da Glucosidase**

A castanospermina e certos imino açúcares, como a desoxinojirimicina (DNJ) são inibidores da  $\alpha$ -glucosidase do RE e ambos inibem potencialmente os estágios iniciais do processamento de glicoproteínas. Porém, os seus efeitos diferem substancialmente dependendo do sistema ao qual são aplicados e podem exibir especificidades bem diferentes, sendo a castanospermina relativamente específica para a  $\alpha$ -glucosidase I.

A castanospermina é um alcalóide, originalmente isolado das sementes de *Castanospermum australe*, possuindo a seguinte fórmula:



Sistematicamente, este composto pode ser nomeado de várias maneiras, como a seguir: [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )]-octahidro-1, 6, 7, 8-indoli-zinetetrol ou [1S, (1S, 6S, 7R, 8R, 8aR)-1, 6, 7, 8-tetrahidroxi-indolizidina ou 1, 2, 4, 8-tetradesoxi-1, 4, 8-nitrilo-L-glicero-D-galacto-octitol. O termo "castanospermina" ou o primeiro nome sistemático será usado na discussão abaixo.

Branza-Nichita et al. (2001) J. Virol 75(8): 3527-3536 mostraram que o imino açúcar *N*-butildesoxinojirimicina possui um efeito antiviral contra o pestivírus BVDV. Porém, os autores deixam claro que enquanto o tratamento com inibidores da  $\alpha$ -glucosidase pode inibir os ciclos vitais

deste e de outros vírus envelopados, não é possível generalizar para outros vírus uma vez que os efeitos podem depender crucialmente da via de dobramento em particular usada pelas proteínas virais.

Courageot *et al.* (2000) *J. Virol.* 74(1): 564-572 relatam que os inibidores da  $\alpha$ -glucosidase castanospermina e DNJ reduzem a produção do vírus da dengue num modelo de camundongo *in vitro*. Porém, nenhuma diferença substancial na actividade entre o inibidor de imino açúcar DNJ e a castanospermina foi relatada.

WO 99/29321 revela o uso de inibidores gerais da  $\alpha$ -glucosidase (e imino açúcares em particular) no tratamento de infecções por HCV *inter alia*. Porém, nenhuma referência é feita à castanospermina (ou ésteres ou seus derivados), especificamente com este respeito. Ao invés, o documento enfoca as actividades de vários imino açúcares.

Choukhi *et al.* (1998) *J. Virol.* 72(5): 3851-3858 relatam o efeito da castanospermina nas interacções entre glicoproteínas de HCV e seus acompanhantes. A castanospermina não aboliu a interacção entre as glicoproteínas de HCV e os acompanhantes calnexina e calreticulina. Ao invés, a castanospermina na verdade aumentou a ligação de glicoproteínas à calreticulina. Os autores sugerem que o processamento de glicoproteína de HCV pode não ser sensível a inibidores de corte de glicoproteína (como a castanospermina), concluindo que:

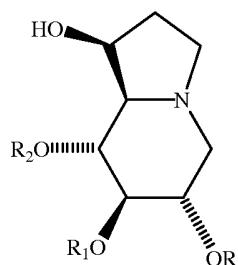
... a ligação de glicoproteínas de HCV e a libertação da calnexina ou calreticulina pode ser independente do corte... das glicanas N-ligadas.

[Choukhi et al., página 3856, coluna 1]

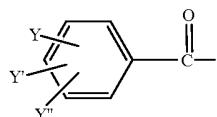
Apesar de tais contra-ensinamentos, os presentes inventores agora surpreendentemente descobriram que certos ésteres de castanospermina inibem na verdade, a actividade antiviral contra membros da família *Flaviviridae* (incluindo HCV). Além disso, eles descobriram que o índice terapêutico é inesperadamente bastante superior ao exibido por outros inibidores da  $\alpha$ -glucosidase da classe dos imino açúcares (os ésteres exibem actividade antiviral relativamente alta e toxicidade relativamente baixa). Sem desejar ligar-se a nenhuma teoria, postula-se que estas propriedades inesperadas dos ésteres de castanospermina podem reflectir sua especificidade relativa para uma classe particular de enzimas de processamento de glicoproteínas (como a  $\alpha$ -glucosidase I).

#### **Resumo da invenção**

De acordo com a presente invenção é fornecido o uso de um éster de castanospermina para a fabricação de medicamentos para o tratamento de uma infecção por vírus da hepatite C, compreendendo um éster da castanospermina possuindo a fórmula:



onde R, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são independentemente hidrogénio, C<sub>1-14</sub> alanol, C<sub>1-14</sub> aquenol, ciclohexanecarbonil, C<sub>1-8</sub> alcoxiacetil,



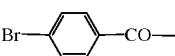
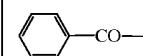
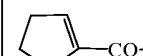
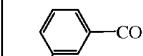
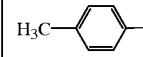
Naftalenocarbonil opcionalmente substituído por metil ou halogéneo; fenil( $C_{2-6}$  alcanoil) onde o fenil é opcionalmente substituído por metil ou halogéneo; cinamoil; piridinocarbonil opcionalmente substituído por metil ou halogéneo; dihidropiridina carbonil opcionalmente substituído por  $C_{1-10}$  alquil; tiofenecarbonil opcionalmente substituído por metil ou halogéneo; ou furancarbonil opcionalmente substituído por metil ou halogéneo; Y é hidrogénio,  $C_{1-4}$  alquil,  $C_{1-4}$  alcoxi, halogéneo, trifluorometil,  $C_{1-4}$  alquilsulfonil,  $C_{1-4}$  alquilmercapto, ciano ou dimetilamino; Y' é hidrogénio,  $C_{1-4}$  alquil,  $C_{1-4}$  alcoxi, halogéneo ou é combinado com Y para fornecer 3,4-metilenodioxi; Y'' é hidrogénio,  $C_{1-4}$  alquil,  $C_{1-4}$  alcoxi ou halogéneo; com R,  $R_1$  e  $R_2$  sendo seleccionados de forma que pelo menos um deles, mas não mais do que dois deles, seja hidrogénio; ou um sal farmaceuticamente aceitável ou seu derivado..

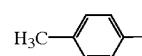
Preferencialmente, R,  $R_1$  e  $R_2$  são cada um hidrogénio independente,  $C_{1-10}$  alanol,  $C_{1-10}$  alquenol,  $C_{1-8}$  alcoxiacetil, ou onde Y é hidrogénio,  $C_{1-4}$  alquil,  $C_{1-4}$  alcoxi, halogéneo, trifluorometil,  $C_{1-4}$  alquilsulfonil,  $C_{1-4}$  alquilmercapto, ciano or dimetilamino; Y' é hidrogénio,  $C_{1-4}$  alquil,  $C_{1-4}$  alcoxi, halogéneo ou é combinado com Y para fornecer 3,4-metilenodioxi; Y'' é hidrogénio,  $C_{1-4}$  alcoxi ou halogéneo; com R,  $R_1$  e  $R_2$  sendo seleccionados de forma que pelo menos um deles, mas não mais do que dois deles, é hidrogénio.

R, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> podem cada um ser independentemente hidrogénio, C<sub>1-8</sub> alanol, C<sub>1-8</sub> alquenol, C<sub>1-8</sub> alcoxiacetil, ou um benzol opcionalmente substituído por um alquil ou halogéneo; com R, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> opcionalmente sendo seleccionados de forma que pelo menos um deles, mas não mais do que dois deles, seja o hidrogénio.

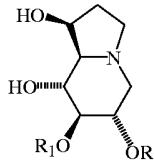
R, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> podem cada um ser independentemente hidrogénio, C<sub>1-8</sub> alanol, C<sub>1-8</sub> alquenol, C<sub>1-8</sub> alcoxiacetil, ou um benzol opcionalmente substituído por um grupo metil, bromo, cloro ou fluoro; com R, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> opcionalmente sendo seleccionados de forma que pelo menos um deles, mas não mais do que dois deles, seja o hidrogénio.

Em personificações preferidas os ésteres de castanospermina possuem as estruturas mostradas na Tabela 1.

Composto	Estrutura	Composto	Estrutura
	R		R
CAST	H	MDL 29270	H
MDL 28574	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-	MDL 44370	Br-  -CO-
MDL 43305	 -CO-	MDL 29797	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CO-
MDL 28653	 -CO-	MDL 29710	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CO-
MDL 29435	 -CO-	MDL 29513	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CO-
MDL 29204	 -CO-		

\* Em MDL 29270 R<sub>1</sub> é ; em todas as outras estruturas R<sub>1</sub> é H

Estrutura  
Básica



Particularmente preferidos são esteres de castanospermina onde  $R_1$  é um  $C_{1-8}$  alanol,  $C_{1-10}$  aquenol,  $C_{1-8}$  alcoxiacetil, ou um benzol opcionalmente substituído com um grupo alquil ou halogéneo..

$R_1$  pode ser um  $C_{1-8}$  alanol,  $C_{1-8}$  alquenol,  $C_{1-8}$  alcoxiacetil, ou um benzol opcionalmente substituído por um grupo metil, bromo, cloro ou fluoro.

O éster de castanospermina pode ser seleccionado de:

- (a)  $[1S-(1\alpha, 6\beta, 7\alpha, 8\beta, 8\alpha\beta)]$  -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-benzoato;
- (b)  $[1S-(1\alpha, 6\beta, 7\alpha, 8\beta, 8\alpha\beta)]$  -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 7-benzoato;
- (c)  $[1S-(1\alpha, 6\beta, 7\alpha, 8\beta, 8\alpha\beta)]$  -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-(4-metilbenzoato);
- (d)  $[1S-(1\alpha, 6\beta, 7\alpha, 8\beta, 8\alpha\beta)]$  -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 7-(4-bromobenzoato);
- (e)  $[1S-(1\alpha, 6\beta, 7\alpha, 8\beta, 8\alpha\beta)]$  -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6, 8-dibutanoato;
- (f)  $[1S-(1\alpha, 6\beta, 7\alpha, 8\beta, 8\alpha\beta)]$  -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-butanoato;
- (g)  $[1S-(1\alpha, 6\beta, 7\alpha, 8\beta, 8\alpha\beta)]$  -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-(2-furancarbonxilato);
- (h)  $[1S-(1\alpha, 6\beta, 7\alpha, 8\beta, 8\alpha\beta)]$  -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 7-(2, 4-diclorobenzoato);

- (i) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-(3-hexenoato);
- (j) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-octanoato;
- (k) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-pentanoato;
- (l) um éster de O-pivaloil;
- (m) um éster de 2-etil-butiril;
- (n) um éster de 3,3-dimetilbutiril;
- (o) um éster de ciclopropanol;
- (p) um éster de 4-metoxibenzoato;
- (q) um éster de 2-aminobenzoato; e
- (r) uma mistura de qualquer um de (a) - (q).

As drogas da invenção também podem compreender os ésteres de castanospermina da invenção em associação (por exemplo, em mistura ou co-embalagem) com interferão- $\alpha$ .

Assim, noutro aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo um éster de castanospermina como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores em combinação com:  $\alpha$  interferões.

Além da invenção fornecer uma composição compreendendo um éster de castanospermina como definido em qualquer uma das reivindicações prévias em combinação com compostos usados no tratamento de co-infecções frequentemente encontradas (como o vírus da hepatite B e os retrovírus humanos como os vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 e vírus linfotrópicos de células-T tipos 1 e 2). Exemplos de tais compostos incluem inibidores de RT nucleótidos (por exemplo, Lamivudina (3TC), zidovudina, estavudina, didanosina, adefovir dipivoxil e abacavir), inibidores de

RT não-nucleótidos (por exemplo, nevirapina) e inibidores da protease (por exemplo, saquinavir, indinavir e ritonavir).

As drogas adjuntas discutidas acima podem ser administradas juntamente com os ésteres de castanospermina da invenção. Alternativamente, os ésteres de castanospermina e drogas adjuntas podem ser administrados sequencialmente.

A composição descrita acima ainda compreende opcionalmente um excipiente farmaceuticamente aceitável. Assim, a invenção também contempla uma composição farmacêutica compreendendo a composição descrita acima.

A composição da invenção é preferencialmente para uso na terapia ou profilaxia, por exemplo, em quaisquer métodos terapêuticos e profiláticos aqui descritos.

Em outro aspecto, a invenção fornece um *kit* farmacêutico de partes compreendendo um éster de castanospermina como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores em combinação com: interferão- $\alpha$ .

O *kit* também pode compreender instruções para uso no tratamento de uma doença por vírus de hepatite C.

O éster de castanospermina e o interferão- $\alpha$  podem ser co-embalados em uma forma de unidade de dosagem.

Nas composições da invenção o éster de castanospermina e o interferão- $\alpha$  podem agir numa forma complementar ou sinérgica.

São particularmente preferidas as composições compreendendo os ésteres de castanospermina da invenção e o interferão- $\alpha$  que age em sinergia no tratamento de uma infecção por HCV.

Em quaisquer das composições farmacêuticas a seguir, a composição ou ésteres de castanospermina da invenção podem estar presentes numa forma de unidade de dosagem.

Assim, a invenção ainda contempla um *kit* como definido acima no qual o éster de castanospermina e o interferão- $\alpha$  estão numa forma de unidade de dosagem.

A expressão "um sal farmaceuticamente aceitável" é pretendida a cobrir sais de adição de ácidos orgânicos ou inorgânicos não-tóxicos dos compostos de base.

Ácidos inorgânicos ilustrativos que formam sais adequados incluem ácidos hidroclórico, hidrobrómico, sulfúrico, e fosfórico e sais de metais ácidos como o ortofosfato de monohidrogénio sódico e sulfato de hidrogénio potássico. Ácidos orgânicos ilustrativos que formam sais adequados incluem ácidos mono, di, e tricarboxílicos. Exemplos de tais ácidos são, acético, glicólico, láctico, pirúvico, malônico, succínico, glutárico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, hidroximaleico, benzólico, hidroxibenzólico, fenilacético, cinâmico, salicílico, e 2-fenoxibenzólico. Outros ácidos orgânicos que formam sais adequados são os ácidos sulfónicos como o ácido sulfónico metano e ácido sulfónico 2-hidroxietano.

Estes sais e os compostos podem existir numa forma hidratada ou substancialmente anidra. Os sais ácidos são preparados por técnicas padrão como dissolver a base livre

em solução aquosa ou aquosa-álcool ou outro solvente adequado contendo o ácido apropriado e isolando por evaporação a solução, ou reagindo a base livre num solvente orgânico, neste caso o sal separa-se directamente ou pode ser obtido por concentração da solução.

Em geral os sais de adição de ácidos dos compostos desta invenção são materiais cristalinos que são solúveis em água e vários solventes orgânicos hidrofílicos e que em comparação com as suas formas de base livre, demonstram maiores pontos de derretimento e uma solubilidade aumentada.

A expressão "um derivado farmaceuticamente aceitável" pretende cobrir drogas pró-éster que possuem resistência maior à hidrólise e lipofilicidade aumentada. Tais pró-drogas exibem remoção rápida do tracto GI quando libertadas oralmente enquanto fornecem um "efeito armazém" que sustenta a concentração da droga activa no local alvo (por exemplo, o fígado).

Os grupos C<sub>1-14</sub> alanol referidos acima podem ser de cadeia simples ou ramificada ou cíclica e podem ser exemplificados por formil, acetil, propionil, butiril, isobutiril, ciclopropanocarbonil, hexanoil, octanoil e decanoil.

Os grupos C<sub>1-14</sub> alquenol referidos acima podem ser de cadeia simples ou ramificada ou cíclica, mas possuem pelo menos uma dupla ligação carbono-carbono. Exemplos incluem propenol, butenol, isobutenol, hexenol, octenol e decenol.

O C<sub>1-6</sub> alcoxiacetil referidos acima podem ser metoxi-acetil, etoxiacetil e butoxiacetil.

Os halogéneos referidos acima podem ser exemplificados por flúor, cloro, bromo, ou iodo.

Os grupos  $C_{2-6}$  alanol referidos acima podem ser acetil, propionil, butiril, isobutiril e hexanoil.

Os grupos  $C_{1-4}$  alquil referidos acima, sozinhos ou como parte de um alcoxi, um alquilsulfonil, ou um grupo alquilmercapto, podem ser grupos alquil de cadeia simples ou ramificada contendo até 4 átomos de carbono. Exemplos de vários grupos são metil, etil, propil, butil, metoxi, etoxi, butoxi, metilsulfonil, etilsulfonil, metilmercapto e etilmercapto.

Os grupos fenil ( $C_{2-6}$  alanol) referidos acima podem ser benzenoacetyl e benzenopropionil.

Os vários grupos naftalenocarbonil, piridinocarbonil, tiofenocarbonil e furancarbonil referidos acima incluem os vários isómeros de posição e estes podem ser naftaleno-1-carbonil, naftaleno-2-carbonil, nicotinoil, isonicotinoil, N-metil-dihidro-piridino- 3-carbonil, tiofeno-2-carbonil, tiofeno-3-carbonil, furan-2-carbonil e furan-3-carbonil. Os grupos naftaleno, piridino, tiofeno e furano podem ser opcionalmente substituídos como indicado acima.

Compostos preferidos da presente invenção são aqueles onde  $R$ ,  $R_1$  e  $R_2$  são grupos 1 ou 2 alanol, alquenol, ou benzol com o benzol substituído por  $Y$ ,  $Y'$  e  $Y''$  como descritos acima, especialmente um  $C_{1-4}$  alanol ou um benzol opcionalmente substituído com um alquil ou halogéneo.

Mais preferidos são os compostos de fórmula 1 onde um de R, R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> é alanol ou benzol, especialmente um C<sub>1-8</sub> alanol, C<sub>1-8</sub> alquenol, ou um benzol opcionalmente substituído por um alquil ou halogéneo, e os outros são hidrogénios.

Ainda mais preferidos são os compostos de fórmula 1 onde um de R, R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> é um C<sub>1-8</sub> alanol, C<sub>1-8</sub> alquenol, ou um benzol opcionalmente substituído por um alquil ou halogéneo, especialmente um grupo metil, bromo, cloro, ou fluoro, e os outros são hidrogénios.

Mais preferidos são os compostos de fórmula 1 onde um de R, R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> é um C<sub>1-8</sub> alanol, C<sub>1-8</sub> alquenol, ou um benzol opcionalmente substituído por um alquil ou halogéneo, especialmente um grupo metil, bromo, cloro, ou fluoro, mais especialmente, um grupo metil, bromo, cloro, ou fluoro na posição para, e onde R e R<sub>2</sub> são cada um, um hidrogénio.

Os esteres da presente invenção são preparados pela reacção de castanospermina com um cloreto ou anidrido ácido apropriado num solvente inerte. A halida pode ser um cloreto ou brometo e o anidrido inclui anidridos mistos. A quantidade relativa da halida ácida ou anidrido usados, a quantidade relativa de solvente, a temperatura e o tempo de reacção são todos controlados para minimizar o número de grupos hidroxi que serão acilados. Assim, apenas um excesso limitado do derivado ácido é usado, o que significa até cerca de um excesso de três dobras do agente acilante.

O uso de um solvente em quantidades relativamente grandes, serve para diluir os reagentes e suprimir a quantidade de produtos mais acilados que se formam. O solvente usado é

preferencialmente um que dissolverá os reagentes usados sem reagir com eles.

É ainda preferível conduzir a reacção na presença de uma amina terciária que reagirá com e removerá qualquer ácido formado durante o decorrer da reacção. A amina terciária pode ser adicionada à mistura ou pode ser usada por si mesma em excesso e servir como solvente. A piridina é um solvente preferido nesta relação. Como indicado acima, o tempo e temperatura são da mesma forma controlados ao limite da quantidade de acilação que ocorre.

Preferencialmente, a reacção é conduzida arrefecendo um banho-maria por um período de cerca de 16 horas para fornecer aos monoésteres com o tempo de reacção estendido para um período maior, como 7 dias, se diésteres forem desejados. A reacção pode, na verdade, ser conduzida em temperaturas maiores e aquecimento pode ser usado contanto que vários factores envolvidos sejam controlados apropriadamente.

Quando a reacção é conduzida como descrita, a mistura final da reacção ainda conterá uma quantidade considerável de castanospermina não reagida. Este material não reagido pode ser recuperado da mistura de reacção e reciclado em reacções subsequentes e assim aumentar a quantidade total de castanospermina convertida para éster. Esta reciclagem é particularmente importante quando a reacção é conduzida sob condições que favorecem o isolamento de monoésteres.

Os procedimentos como descritos acima geralmente fornecem 6- ou 7-monoésteres ou 6,7- ou 6,8- diésteres. Outros isómeros podem ser obtidos pelo uso apropriado de grupos

bloqueadores. Assim, por exemplo, a castanospermina pode ser reagida com o cloreto de 2-(dibromometil) benzol para fornecer o 6,7-diéster. Este diéster é então reagido com uma halida ácida apropriada ou anidrido para fornecer o 8-éster correspondente. Os dois grupos protectores são então prontamente removidos por conversão dos dois grupos dibromometil para formil (usando perclorato de prata e 2,4,6-colidina em acetona aquosa) seguido por hidrólise do éster ácido formilbenzóico obtido usando morfolina e ião hidróxido.

O procedimento indicado pode ser usado de maneira semelhante para fornecer isômeros de diéster.

Com 1,8-O-isopropilidenocastanospermina ou 1,8-ciclohexilidenocastanospermina, a reacção com um cloreto ácido em um procedimento padrão de esterificação favorece a formação do 6-éster quase que exclusivamente. O grupo isopropilideno ou ciclohexilideno é então removido por tratamento com um ácido como o ácido 4-toluenosulfónico. Os compostos cetal iniciais são por si mesmos obtidos do 6,7-dibenzoato de castanospermina. Este dibenzoato é reagido com 2-metoxipropeno ou 1-metoxiciclohexeno e ácido para apresentar o grupo 1,8-O-isopropilideno ou 1,8-O-ciclohexilideno e os dois grupos ésteres benzoato são removidos por hidrólise com base como hidróxido de sódio ou transesterificação com alcóxido de sódio ou potássio como catalisador.

#### **Aplicações médicas**

A invenção encontra aplicação na medicina, por exemplo, em métodos de terapia e/ou profilaxia. Os métodos incluem aplicações veterinárias.

Como aqui utilizado, o termo "um método de tratar a infecção por flavivírus" refere-se ao tratamento de um paciente (humano ou animal) que foi infectado por um flavivírus. Os métodos de tratamento envolvem administrar ao dito paciente uma quantidade eficiente de antiviral das composições ou medicamentos da invenção.

Como aqui utilizado, o termo "infecção flaviviral" refere-se a qualquer estado ou condição que envolve (por exemplo, é causada, exacerbada ou caracterizada por) um flavivírus residindo nas células ou corpo do dito paciente.

O termo "paciente" aqui utilizado significa mamíferos como primatas, incluindo humanos, ovinos, equinos, bovinos, suíños, cães, gatos, ratos e camundongos.

### **Posologia**

Os medicamentos empregues na presente invenção podem ser administrados por via oral ou parenteral, incluindo administração intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea, transdérmica, aérea (aerossol), rectal, vaginal e tópica (incluindo bucal e sublingual).

A quantidade de éster de castanospermina administrado pode variar amplamente de acordo com a unidade de dosagem em particular empregada, o período de tratamento, a idade e sexo do paciente tratado, a natureza e extensão da doença tratada, e o éster particular de castanospermina seleccionado.

Além disso, o éster de castanospermina pode ser usado em conjunto com outros agentes conhecidos por serem úteis no

tratamento de infecções flavivirais (como descrito acima) e em tais personificações a dose pode ser ajustada de acordo.

Doses menores podem ser usadas em personificações que incorporam derivados de pró-droga de éster de castanospermina da invenção que exibem maior resistência à hidrólise e aumentam a lipofilicidade. Como explicado acima, tais pró-drogas exibem remoção rápida do tracto GI quando libertadas oralmente enquanto fornecem um "efeito armazém" que sustenta a concentração da droga activa no local alvo (por exemplo, o fígado).

Assim, a quantidade eficiente de éster de castanospermina a ser administrada geralmente variará de cerca de 15 mg/kg a 500 mg/kg. Uma unidade de dosagem pode conter de 25 a 500 mg de éster de castanospermina, e pode ser tomada uma ou mais vezes por dia. O éster de castanospermina pode ser administrado com um carregador farmacêutico usando formas de unidade de dosagem convencionais oralmente, parenteralmente, ou topicalmente, como descrito abaixo.

A via preferida de administração é a administração oral. Em geral, uma dose adequada estará na variação de 0,1 a 300 mg por quilograma de peso corporal do recipiente por dia, preferencialmente na variação de 6 a 150 mg por quilograma de peso corporal por dia e mais preferencialmente na variação de 15 a 100 mg por quilograma de peso corporal por dia.

A dose desejada é preferencialmente apresentada como duas, três, quatro, cinco ou seis ou mais sub-doses administradas em intervalos apropriados durante o dia. Estas sub-doses podem ser administradas em formas de unidades de dosagem,

por exemplo, contendo 10 a 1500 mg, preferencialmente 20 a 1000 mg, e mais preferencialmente 50 a 700 mg do ingrediente activo por forma de unidade de dosagem.

### **Formulação**

As composições da invenção podem ser fornecidas em combinação com um excipiente farmaceuticamente aceitável. Qualquer excipiente adequado pode ser usado, incluindo, por exemplo, diluentes inertes, agentes desintegrantes, agentes ligantes, agentes lubrificantes, agentes adoçantes, agentes flavorizantes, agentes colorantes e conservantes. Diluentes inertes adequados incluem sódio e carbonato de cálcio, sódio e fosfato de cálcio, e lactose, enquanto amido de milho e ácido algínico são agentes desintegrantes adequados. Agentes ligantes podem incluir amido e gelatina, enquanto agentes lubrificantes, se presentes, serão geralmente estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco.

As composições farmacêuticas podem tomar qualquer forma adequada, e incluir, por exemplo, comprimidos, elixires, cápsulas, soluções, suspensões, pós, grânulos e aerossóis.

A composição farmacêutica pode tomar a forma de um *kit* de partes, que pode compreender a composição da invenção juntamente com instruções para uso e/ou uma pluralidade de diferentes componentes em forma de unidade de dosagem.

Comprimidos para uso oral podem incluir o ingrediente activo misturado com excipientes farmaceuticamente aceitáveis, como diluentes inertes, agentes desintegrantes, agentes ligantes, agentes lubrificantes, agentes adoçantes, agentes flavorizantes, agentes corantes e conservantes. Diluentes inertes adequados incluem sódio e carbonato de

cálcio, sódio e fosfato de cálcio, e lactose, enquanto amido de milho e ácido algínico são agentes desintegrantes adequados. Agentes ligantes podem incluir amido e gelatina, enquanto agentes lubrificantes, se presentes, serão geralmente estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco. Se desejado, os comprimidos podem ser revestidos com um material como o monostearato de gliceril ou distearato de gliceril, para retardar a absorção no tracto gastrointestinal.

Cápsulas para uso oral incluem cápsulas rígidas de gelatina nas quais o ingrediente activo é misturado com um diluente sólido, e cápsulas de gelatina macias onde o ingrediente activo é misturado com água ou um óleo, como óleo de amendoim, parafina líquida ou óleo de oliva.

Formulações para administração rectal podem ser apresentadas como um supositório com uma base adequada, compreendendo, por exemplo, manteiga de cacau ou um salicilato.

Formulações adequadas para administração vaginal podem ser apresentadas como pessários, tampões, cremes, geles, pastas, espumas ou formulações em spray contendo além do ingrediente activo, carregadores conhecidos no escopo como sendo apropriados.

Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutâneo e intravenoso, os compostos da invenção geralmente serão fornecidos em soluções estéreis aquosas ou suspensões, tamponadas para um pH apropriado e isotonicidade.

Veículos aquosos adequados incluem solução de Ringer e cloreto de sódio isotônico. Suspensões aquosas de acordo com a invenção podem incluir agentes de suspensão como derivados da celulose, alginato de sódio, polivinilpirrolidona e goma tragacanto, e um agente humidificador como a lecitina. Conservantes adequados para suspensões aquosas incluem etil e n-propil p-hidroxibenzoato.

Os compostos da invenção também podem estar presentes como formulações de lipossomas.

Para administração oral o éster de castanospermina pode ser formulado em preparações sólidas ou líquidas como cápsulas, pílulas, comprimidos, tabletes, pastilhas, derretidos, pós, grânulos, soluções, suspensões, dispersões ou emulsões (cujas soluções, dispersões de suspensões ou emulsões podem ser aquosas ou não-aquosas). As formas de unidade de dosagem sólida podem ser uma cápsula que pode ser de gelatina do tipo comum ou macia, contendo, por exemplo, surfactantes, lubrificantes, e preenchedores inertes como lactose, sucrose, fosfato de cálcio e amido de milho.

Noutra personificação os compostos desta invenção podem ser preparados com bases para comprimidos convencionais como lactose, sucrose e amido de milho, em combinação com ligantes como acácia, amido de milho, ou gelatina, agentes desintegrantes com intenção de ajudar na quebra e dissolução do comprimido após a administração, como amido de batata, ácido algínico, amido de milho, e goma guar, lubrificantes com intenção de melhorar o fluxo de granulações do comprimido e prevenir a adesão de material comprimido às superfícies dos cantos e orifícios do

comprimido, por exemplo, talco, ácido esteárico, ou estearato de magnésio, cálcio ou zinco, tintas, agentes corantes, e agentes flavorizantes com intenção de melhorar as qualidades estéticas dos comprimidos e torná-los mais aceitáveis ao paciente.

Excipientes adequados para uso em formas de dosagem líquida oral incluem diluentes como água e álcoois, por exemplo, etanol, álcool benzil, e álcoois de polietileno, com ou sem adição de um surfactante farmaceuticamente aceitável, agente suspensor ou agente emulsificante.

Os derivados do éster de castanospermina desta invenção também podem ser administrados parenteralmente, ou seja, subcutaneamente, intravenosa, intramuscularmente, ou intraperitonealmente.

Em tais personificações, o medicamento é fornecido como doses injectáveis do composto num diluente fisiologicamente aceitável com um carregador farmacêutico que pode ser um líquido estéril ou uma mistura de líquidos. Líquidos adequados incluem água, salina, dextrose aquosa e soluções de açúcares relacionados, um álcool (como etanol, isopropanol, ou álcool hexadecil), glicóis (como propileno glicol ou polietileno glicol), cetais de glicerol (como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol), éteres (como o poli(etileno-glicol) 400), um óleo, um ácido gordo, um éster de ácido gordo ou glicerídeo, ou um glicerídeo de ácido gordo acetilado com ou sem adição de um surfactante farmaceuticamente aceitável (como sabão ou detergente), agente suspensor (como pectina, carómeros, metilcelulose, hidroxipropilmetylcelulose, ou carboximetylcelulose), ou agente emulsificante e outros adjuvantes farmacêuticos.

Ilustrativo de óleos que podem ser usados nas formulações parenterais desta invenção é o petróleo, animal, vegetal ou de origem sintética, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja, óleo de gergelim, óleo de algodão, óleo de milho, óleo de oliva, petrolato, e óleo mineral.

Ácidos gordos adequados incluem ácido oleico, ácido esteárico, e ácido isosteárico. Ésteres adequados de ácidos gordos são, por exemplo, etil oleato e isopropil miristato.

Sabões adequados incluem metais ácalis gordos, amónia, e sais de trietanolamina e detergentes adequados incluem detergentes catiónicos, por exemplo, halidas de dimetil dialquil amónia, halidas de alquil piridínio, e acetatos de alquilaminas; detergentes aniónicos, por exemplo, sulfonatos de alquil, aril e olefina, sulfatos de alquil, olefina, éter e monoglycerídeos, e sulfosuccinatos; detergentes não-iónicos, por exemplo, óxidos de aminas gordos, alcanolamidas de ácidos gordos, e copolímeros de polioxietilenopolipropileno; e detergentes anfotéricos, por exemplo, alquil-beta-aminopropionatos, e sais de amónia quaternária de 2-alquilimidazolina, assim como misturas.

As composições parenterais desta invenção tipicamente conterão cerca de 0,5 a 25% por peso do derivado do éster de castanospermina da fórmula 1 na solução. Conservantes e tampões também podem ser usados com vantagens. Para minimizar ou eliminar a irritação no local da injeção, tais composições podem conter um surfactante não-iónico possuindo um balanço hidrófilo-lipófilo (BHL) de cerca de 12 a 17. A quantidade de surfactante em tais formulações varia de cerca de 5 a 15% por peso. O surfactante pode ser um simples componente possuindo o BHL acima ou ser uma

mistura de dois ou mais componentes possuindo o BHL desejado. Exemplos de surfactantes usados em formulações parenterais são a classe de ésteres de ácidos gordos de polietileno sorbitano, por exemplo, monooleato de sorbitano e concentrados de alto peso molecular de óxido de etileno com uma base hidrofóbica, formados pela condensação de óxido de propileno com propileno glicol.

Os derivados do éster de castanospermina desta invenção também podem ser administrados topicamente, e quando assim realizado, o carregador pode adequadamente compreender uma solução, unguento, ou base em gel. A base, por exemplo, pode compreender um ou mais dos seguintes: petrolato, lanolina, polietileno glicóis, cera de abelha, óleo mineral, diluentes como água e álcool, e emulsificantes e estabilizadores. Formulações tópicas podem conter uma concentração de éster de castanospermina ou seu sal farmacêutico de cerca de 0,1 a 10% w/v (peso por unidade de volume).

A invenção será agora descrita com referência às seguintes personificações exemplares, que são puramente ilustrativas e não pretendem ser limitadas em nenhuma forma. Seria preferível que as modificações para detalhes sejam feitas enquanto ainda estiver dentro do escopo da invenção.

### **Exemplificação**

#### **Células, Vírus e Inibidores**

Células MDBK (NBL-1) (ATCC CCL22) derivadas de rim bovino e BVDV citopático (cp) (cepa NADL) (ATCC VR-534) estavam disponíveis da Coleção Americana de Tipos de Culturas (ATCC).

As células MDBK foram mantidas em Meio Dulbecco Eagle Modificado (DMEM) (Sigma, Poole, Dorset) suplementadas com 10% de FCS, 2mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina e 50 $\mu$ g/ml de estreptomicina.

6-0-butanoilcastanospermina (Bucast; Celgosivir; VIR-222; MDL 28,574A) foi sintetizada como descrito anteriormente (Liu, P.S., Hoekstra, W.J. and King, C.H.R. (1990). Síntese de potentes agentes anti-VHI: esteres de castanospermina. *Tetrahedron Lett.* 31: 1535-1549) e fornecidas por Aventis (antigamente conhecida como Marion Merrell Dow). Castanospermina (1S, 6S, 7R, 8R, 8aR-1 6, 7, 8 tetrahidroxiindolizidina) isolada de sementes do Castanheiro Australiano, *Castanospermum australe*, como descrito anteriormente (Liu, P.S. and Rhinehart, B.L. (1986). Isolamento de castanospermina e seu uso como agente anti-diabético. Patente Europeia EP 0202661) e também foi obtida da Aventis. N-butil-desoxinojirimicina (N-butil-DNJ) e N-nonil-desoxinojirimicina (NN-DNJ) foram comprados de Toronto Research Chemicals, Canadá. Bucast, Castanospermina e N-butil-DNJ foram feitos como soluções de stock de 100mM em água. NN-DNJ foi feito como uma solução de stock de 100 mM em DMSO. Soluções de stock foram armazenadas a -20°C.

#### **Ensaio de Redução de Placas**

Células MDBK foram semeadas em placas de culturas com 6 poços (Nunclon<sup>TM</sup>, Nunc, Dinamarca) e permitidas a crescerem em confluência. As células são lavadas duas vezes em salina morna tamponada com fosfato (PBS) e então infectadas com BVDV NADL (150pfu/poço) em 0,25ml PBS contendo 1% de soro de cavalo e 1 mM MgCl<sub>2</sub>. As placas de cultura celular foram então incubadas a 37°C por uma hora com 5% de CO<sub>2</sub> e as placas agitadas a cada 15-20 minutos. O inóculo viral foi

então removido e substituído com 3,0 ml de cobertura de agarose de baixa temperatura de gelificação diluída em DMEM suplementada com 5% de soro de cavalo, 2 mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina e 50 $\mu$ g/ml de estreptomicina e contendo diferentes concentrações de composto teste ou nenhum composto. Pelo menos poços duplicados ou triplicados foram usados para cada concentração do composto teste. A agarose foi permitida solidificar a temperatura ambiente por 15 minutos e então incubada a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Após 3 dias de incubação, as células foram fixadas adicionando-se 1,5 ml de uma solução de formaldeído 10% sobre a cobertura de ágar e deixando por uma noite. O ágar foi gentilmente removido dos poços e as células coradas com 0,3% de azul-de-metileno em PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. O excesso de coloração foi removido e as células lavadas com PBS antes de secar as placas e contar as placas virais microscopicamente. Linhas de resposta de dose foram esquematizadas a partir do número médio de placas presentes versus o log da concentração do composto. A concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) foi computada após análise de regressão linear.

#### **Ensaio de Citopaticidade XTT**

Células MDBK foram semeadas em placas de culturas com 96 poços (Costar® 3596, Corning Incorp., EUA) e permitidas a crescerem em confluência. As células foram lavadas duas vezes em salina morna tamponada com fosfato (PBS) e então infectadas com BVDV NADL (100 pfu/poço) em 100 $\mu$ l de DMEM suplementado com 5% de soro de cavalo, 2mM L-glutamina, 50 U/ml de penicilina e 50  $\mu$ g/ml de estreptomicina. Alguns poços foram falsamente infectados para agirem como controlos. Um pouco mais dos 100 $\mu$ l de DMEM suplementados

como acima, mas contendo diferentes concentrações de composto em teste ou nenhum composto foi então adicionado a cada poço. Poços triplicados foram usados para cada concentração de composto. Em paralelo, células não-infectadas foram tratadas com compostos para avaliar a citotoxicidade. As placas foram então incubadas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Após 6 dias, 25 µl de uma solução de 1mg/ml 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolium-5-carboxanilida (XTT)/25µM metosulfato de fenazina (PMS) (XTT e PMS comprados de Sigma, Poole, Dorset, RU) foram então adicionados a cada poço e as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. A absorvância foi então determinada a 450 nm. Dados foram esquematizados como O.D versus o log da concentração do composto e a concentração inibitória a 50% (IC<sub>50</sub>) calculada.

#### **Actividade antiviral**

Usando um ensaio de redução de placas em células MDBK, a castanospermina e Bucast inibiram a formação de placas de BVDV numa forma dose-dependente (ver Figura 1). Bucast foi aproximadamente 13 vezes mais potente do que a castanospermina, como registado anteriormente com relação à actividade contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A IC<sub>50</sub> média para o Bucast foi 16,25µM ±7,5 µM, comparada com uma IC<sub>50</sub> média de 216,6µM ±55,0 µM para a castanospermina (Tabela 2).

#### **Tabela 2**

#### **Actividade anti-BVDV de inibidores de $\beta$ -glucosidase I determinada por ensaio de redução de placas**

Composto	IC <sub>50</sub> (μM)	Média IC <sub>50</sub> (μM) ±DP	CC <sub>50</sub> (μM)
Bucast	10, 10, 20, 25	16,25 ±7,5	>1000
Castanospermina	180, 190, 280	216,6 ±55,0	>1000
N-Butil-DNJ	>300, 250		>300
N-Nonil-DNJ	90, 120	105	Tóxico @ 300

Não houve sinais de citotoxicidade em concentrações acima de 1000μM como julgado por exame microscópico de monocamadas celulares. Em paralelo aos experimentos de redução de placas, os inibidores da  $\alpha$ -glucosidase I N-butil-DNJ e N-Nonil-DNJ apenas mostraram inibição parcial a concentrações >100μM e >300μM, respectivamente. N-nonil-DNJ foi claramente citotóxico para células a uma concentração de 300μM.

Resultados semelhantes foram obtidos quando um ensaio de citopaticidade XTT foi usado para determinar efeitos anti-BVDV e a citotoxicidade dos inibidores de  $\alpha$ -glucosidase I em paralelo. Como mostrado na Figura 2 o Bucast e a castanospermina protegeram as células MDBK contra morte celular induzida por vírus enquanto não mostraram citotoxicidade em células tratadas não-infectadas. Nos mesmos experimentos nem o N-butil-DNJ ou N-nonil-DNJ demonstraram qualquer proteção contra o efeito citopático do BVDV. Enquanto o N-butil-DNJ não mostrou citotoxicidade, como observado anteriormente em experimentos de redução de placas, o N-nonil-DNJ foi claramente citotóxico para células MDBK. A concentração citotóxica 50% calculada de N-

nonil-DNJ foi  $120\mu\text{M}$ . Usando uma multiplicidade de infecção (MOI) de aproximadamente 0,01, os valores  $\text{IC}_{50}$  médios para o Bucast e a castanospermina neste ensaio de citopaticidade foram  $36\mu\text{M} \pm 22\mu\text{M}$  e  $400\mu\text{M}$ , respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3**

**Actividade anti-BVDV de inibidores de  $\beta$ -glucosidase I determinada por ensaio de citopaticidade XTT**

Composto	* $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Bucast	60, 30, 70, 40, 60 média = $52 \pm 16,43$	$>300$
Castanospermina	300, 500 média = 400	$>1000$
N-Butil-DNJ	$>300$ , $>1000$	$>1000$
N-Nonil-DNJ	60, $>100$	120

\*MOI = 0,01

Numa experiência, o N-nonil-DNJ mostrou alguma actividade antiviral, mas o índice de selectividade foi apenas de 2 dobras.

A investigação do efeito do vírus MOI na actividade anti-BVDV do Bucast indicou que este foi mais potente quando taxas menores de vírus infeccioso:número de células foram usadas (ver Figura 3 e Tabela 4).

**Tabela 4**

**Actividade anti-BVDV do Bucast e N-Butil-DNJ em diferentes multiplicidades de infecção como determinado por ensaio de citopaticidade XTT**

MOI	IC <sub>50</sub> (μM)	
	Bucast	N-Butil-DNJ
0,1	200, 170	>300
0,01	60, 30	>300
0,001	40	>300
0,0001	5.0	55

Algum efeito antiviral pôde ser obtido com o N-butil-DNJ quando um MOI muito baixo foi usado, mas este inibidor foi 10 dobras menos potente do que o Bucast.

O ensaio de citopaticidade XTT foi usado para avaliar a habilidade do interferão de leucócito humano (interferão- $\alpha$ ) de inibir o efeito citopático do BVDV em células MDBK e um valor IC<sub>50</sub> de 1,3 unidades de resistência ao interferão (IRU) por poço foi demonstrado. Outros experimentos demonstraram que o valor IC<sub>50</sub> para o interferão  $\alpha$  foi reduzido na presença de Bucast e interferão- $\alpha$  em combinação. Também, o valor IC<sub>50</sub> para o Bucast foi reduzido usando-se esta combinação. Os índices de combinação (IC) foram calculados usando a fórmula de Suhnel (Antiviral Research, 13, 23-40). Um valor IC de menos de 1 indica uma interacção sinérgica e valores de menos de 0,8 são considerados a indicarem um resultado estatisticamente significativo. A combinação do interferão- $\alpha$  e Bucast produziu valores IC variando de 0,28 a 0,46. Estes

resultados, portanto, indicam um efeito sinérgico quando o Bucast é usado na presença do interferão- $\alpha$ .

Estes dados estão resumidos na Tabela 5.

**Tabela 5**

**Actividade Anti BVDV do Bucast em combinação com interferão alfa como determinado por ensaio de citopaticidade XTT**

Concentração Fixa da Droga	IC <sub>50</sub>	Índice de Combinação (IC)
Interferão $\alpha$ (IRU/poço)	Bucast ( $\mu$ M)	
0,5	3	0,46
0,25	4	0,28
0,125	13	0,37
0	52±16,43	
Bucast ( $\mu$ M)	Interferão $\alpha$ (IRU/poço)	
10	0,12	0,3
5	0,22	0,28
0	1,3	

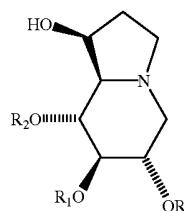
**Equivalentes**

As seguintes descrições detalham personificações actualmente preferidas da presente invenção. Numerosas modificações e variações nas suas práticas são esperadas a ocorrerem àqueles habilitados na arte por consideração destas descrições. Estas modificações e variações pretendem estar englobadas dentro das reivindicações aqui anexas.

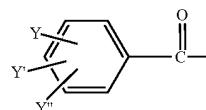
Lisboa, 19 de Novembro de 2008

## REIVINDICAÇÕES

1. O uso de um éster de castanospermina para a fabricação de um medicamento para o tratamento de infecção por vírus da hepatite C, compreendendo um éster de castanospermina possuindo a fórmula:



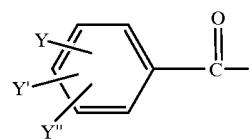
onde R, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são independentemente hidrogénio, C<sub>1-14</sub> alcanol, C<sub>1-14</sub> aquenol, ciclohexanecarbonil, C<sub>1-8</sub> alcoxiacetil,



naftalenocarbonil opcionalmente substituído por metil ou halogéneo; fenil (C<sub>2-6</sub> alcanol) onde o fenil é opcionalmente substituído por metil ou halogéneo; cinamoil; piridinocarbonil opcionalmente substituído por metil ou halogéneo; dihidropiridina carbonil opcionalmente substituído por C<sub>1-10</sub> alquil; tiofenecarbonil opcionalmente substituído por metil ou halogéneo; ou furancarbonil opcionalmente substituído por metil ou halogéneo; Y é hidrogénio, C<sub>1-4</sub> alquil, C<sub>1-4</sub> alcoxi, halogéneo, trifluorometil, C<sub>1-4</sub> alquilsulfonil, C<sub>1-4</sub> alquilmercápto, ciano ou dimetilamino; Y' é hidrogénio, C<sub>1-4</sub> alquil, C<sub>1-4</sub> alcoxi, halogéneo ou é combinado com Y para fornecer 3,4-metilenodioxi; Y'' é hidrogénio, C<sub>1-4</sub> alquil, C<sub>1-4</sub> alcoxi ou halogéneo; onde pelo menos um, mas não mais do que dois, de

$R$ ,  $R_1$  e  $R_2$ , seja hidrogénio; ou um sal farmaceuticamente aceitável ou seu derivado.

2. O uso de acordo com a reivindicação 1, onde  $R$ ,  $R_1$  e  $R_2$  são cada um independentemente hidrogénio,  $C_{1-10}$  alanol,  $C_{1-10}$  alquenol,  $C_{1-8}$  alcoxiacetil, ou



onde  $Y$  é hidrogénio,  $C_{1-4}$  alquil,  $C_{1-4}$  alcoxi, halogéneo, trifluorometil,  $C_{1-4}$  alquilsulfonil,  $C_{1-4}$  alquilmercapto, ciano ou dimetilamino;  $Y'$  é hidrogénio,  $C_{1-4}$  alquil,  $C_{1-4}$  alcoxi, halogéneo ou é combinado com  $Y$  para fornecer 3,4-metilenodioxi; e  $Y''$  é hidrogénio,  $C_{1-4}$  alcoxi ou halogéneo;

onde pelo menos um, mas não mais do que dois, de  $R$ ,  $R_1$  e  $R_2$  é hidrogénio.

3. O uso de acordo com a reivindicação 1, onde  $R$ ,  $R_1$  e  $R_2$  são cada um independentemente hidrogénio,  $C_{1-8}$  alanol,  $C_{1-8}$  alquenol,  $C_{1-8}$  alcoxiacetil, ou um benzol opcionalmente substituído com um alquil ou halogéneo;

onde pelo menos um, mas não mais do que dois, de  $R$ ,  $R_1$  e  $R_2$  é hidrogénio.

4. O uso de acordo com a reivindicação 1, onde  $R$ ,  $R_1$  e  $R_2$  são cada um independentemente hidrogénio,  $C_{1-8}$  alanol,  $C_{1-8}$  alquenol,  $C_{1-8}$  alcoxiacetil, ou um benzol opcionalmente substituído com um grupo metil, bromo, cloro ou fluoro;

onde pelo menos um, mas não mais do que dois, de  $R$ ,  $R_1$  e  $R_2$  é hidrogénio.

5. O uso de acordo com a reivindicação 1 onde R<sub>1</sub> é um C<sub>1-8</sub> alanol, C<sub>1-10</sub> aquenol, C<sub>1-8</sub> alcoxiacetil, ou um benzol opcionalmente substituído com um grupo alquil ou halogéneo.

6. O uso de acordo com a reivindicação 1 onde R<sub>1</sub> é um C<sub>1-8</sub> alanol, C<sub>1-8</sub> aquenol, C<sub>1-8</sub> alcoxiacetil, ou um benzol opcionalmente substituído com um grupo metil, bromo, cloro, ou fluoro.

7. O uso de acordo com a reivindicação 1, onde um éster de castanospermina é seleccionado de:

- (a) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-benzoato;
- (b) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 7-benzoato;
- (c) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-(4-metilbenzoato);
- (d) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 7-(4-bromobenzoato);
- (e) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6, 8-dibutanoato;
- (f) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-butanoato;
- (g) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-(2-furancarboxilato);
- (h) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 7-(2, 4-diclorobenzoato);
- (i) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-(3-hexenoato);
- (j) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-octanoato;
- (k) [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8 $\alpha\beta$ )] -octahidro-1, 6, 7, 8-indolizinetetrol 6-pentanoato;

- (l) um éster de O-pivaloilo;
- (m) um éster de 2-etil-butirilo;
- (n) um éster de 3,3-dimetilbutirilo;
- (o) um éster de ciclopropanoilo;
- (p) um éster de 4-metoxibenzoato;
- (q) um éster de 2-aminobenzoato; e
- (r) uma mistura de qualquer um de (a) - (q).

8. O uso de acordo com a reivindicação 1 onde o éster de castanospermina é [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8a $\beta$ )]-octahidro-1,6,7,8-indolizinetetrol 6-benzoato.

9. O uso de acordo com a reivindicação 1 onde o éster de castanospermina é [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8a $\beta$ )]-octahidro-1,6,7,8-indolizinetetrol 6-butanoato.

10. O uso de acordo com a reivindicação 1 onde o éster de castanospermina é [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8a $\beta$ )]-octahidro-1,6,7,8-indolizinetetrol 6-pentanoato.

11. O uso de acordo com a reivindicação 1 onde o éster de castanospermina é [1S-(1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 8a $\beta$ )]-octahidro-1,6,7,8-indolizinetetrol 6-(2-furancarboxilato).

12. O uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11 onde o medicamento ainda compreende um excipiente farmaceuticamente aceitável.

13. Uma composição compreendendo um éster de castanospermina como definido em qualquer uma das reivindicações 1-11 em combinação com o interferão- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ).

14. O uso de acordo com a reivindicação 13 onde o éster de castanospermina é [1S-(1 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,8 $\beta$ ,8a $\beta$ )]-octahidro-1,6,7,8-indolizinetetrol 6-butanoato.

15. O uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 13-14 onde o medicamento ainda compreende um excipiente farmaceuticamente aceitável.

16. Uso de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 13-15 para a fabricação de um medicamento para o tratamento de infecção por vírus de hepatite C.

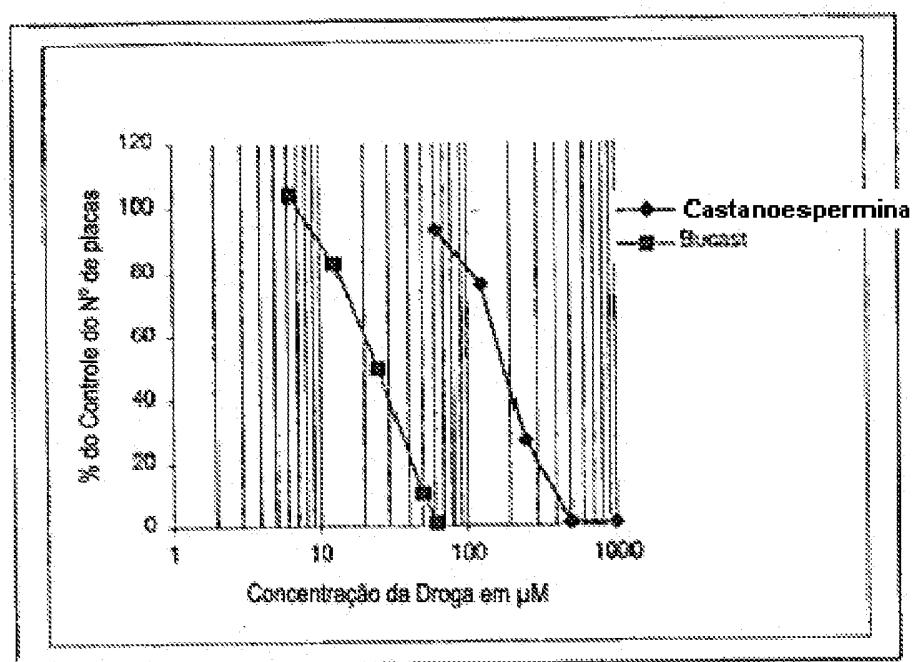
17. Um *kit* farmacêutico de partes compreendendo um éster de castanospermina como definido como qualquer uma das reivindicações anteriores em combinação com o interferão- $\alpha$ .

18. O *kit* de acordo com a reivindicação 17 ainda compreendendo instruções para uso no tratamento de uma doença por vírus de hepatite C.

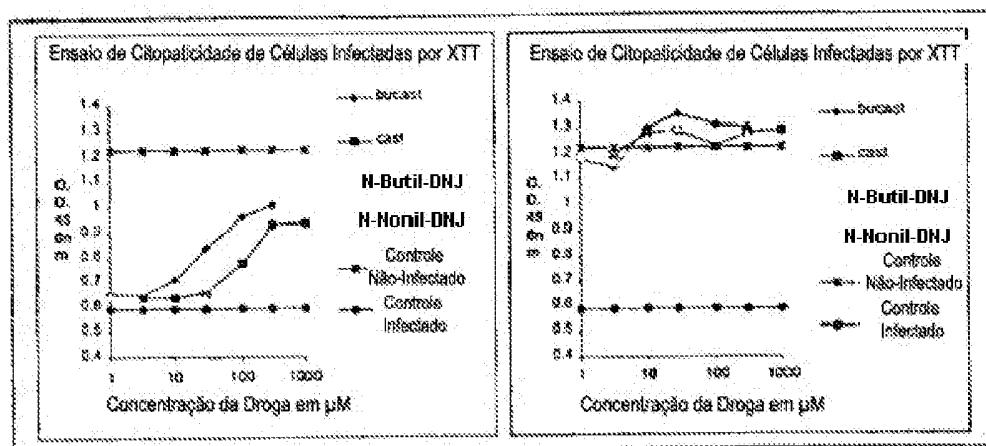
19. O *kit* de acordo com a reivindicação 17 onde o éster de castanospermina e/ou interferão- $\alpha$  está em forma de unidade de dosagem.

Lisboa, 19 de Novembro de 2008

**Figura 1**  
**Comparação da atividade anti-BVDV do Bucast e castanospermina**  
**por ensaio de redução de placas em células MBDK**



**Figura 2**  
Atividade anti-BVDV e citotoxicidade de inibidores da  $\alpha$ -glucosidase I determinadas por ensaio de citopatogenicidade XTT



**Figura 3**  
**Atividade anti-BVDV do Bucast e N-butil-DNJ em diferentes multiplicidades de infecção como determinado por ensaio de citopatogenicidade XTT**

