



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0208411-2 B1

(22) Data do Depósito: 28/03/2002

(45) Data de Concessão: 28/06/2016



(54) Título: COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA TÓPICA PARA TRATAMENTO
PROFILÁTICO OU TERAPÊUTICO DE DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMITIDAS EM UM
PACIENTE HUMANO, E, USO DE UM COMPOSTO

(51) Int.Cl.: C08G 69/48; A61K 31/785; A61P 31/12; A61P 31/18

(30) Prioridade Unionista: 30/03/2001 AU PR 4128

(73) Titular(es): STARPHARMA PTY LTD.

(72) Inventor(es): BARRY ROSS MATTHEWS, GEORGE HOLAN, PETER KARELLAS, SCOTT
ANDREW HENDERSON, DAVID FRANCIS O'KEEFE

“COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA TÓPICA PARA TRATAMENTO PROFILÁTICO OU TERAPÊUTICO DE DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMITIDAS EM UM PACIENTE HUMANO, E, USO DE UM COMPOSTO”

5 CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção diz respeito à prevenção e tratamento de doenças sexualmente transmitidas e, em particular, diz respeito ao uso de um dendrímero tendo grupos terminais de dissulfonato de naftila como um agente topicamente aplicado na profilaxia ou tratamento terapêutico destas doenças.

10 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A incidência global, a morbidez e a mortalidade de doenças sexualmente transmitidas (STDs) causadas por HIV, HSV e outros patógenos virais e microbianos, são estimadas em várias centenas de milhões de indivíduos em todo o mundo. Uma abordagem para o controle da transmissão das STDs é o uso de microbicidas vaginais ou retais de controle feminino/masculino, topicamente aplicados, que inativam os patógenos relevantes. Conseqüentemente, o desenvolvimento de novos e seguros microbicidas tópicos para uso intravaginal ou intra-retal para a prevenção e tratamento das STDs é um alvo importante para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Os Pedidos de Patente Internacional n^{os} PCT/AU95/00350 (WO 95/34595) e PCT/AU99/00763 (WO 00/15240), cujos conteúdos ficam aqui incorporados por referência, apresentam uma nova classe de agentes polivalentes – os dendrímeros, macromoléculas altamente ramificadas, com um envoltório definido de grupos superficiais polianiónicos ou catiónicos, que se têm mostrado apresentar uma faixa de atividade antiviral e antimicrobiana com toxicidade mínima. Ao contrário das estruturas moleculares pequenas da maior parte dos antivirais, estes dendrímeros são uma classe de compostos macromoleculares polivalentes, altamente ramificados, formados por

seqüências de reações iterativas iniciando-se de uma molécula núcleo inicial com camadas ou estágios sucessivos sendo adicionados em “gerações” sucessivas para formar um composto polimérico tridimensional altamente ordenado. Os dendrímeros são caracterizados pelos seguintes aspectos: i. um
5 núcleo iniciador que pode ter um ou mais sítios reativos e ser como um ponto ou de tamanho significativo, de modo a efetuar a topologia final do dendrímero; ii. camadas de unidades de repetição ramificadas ligadas ao núcleo iniciador; iii. grupos terminais funcionais (tais como porções contendo aniônicos ou catiônicos) ligados à superfície do dendrímero, opcionalmente
10 através de grupos de ligação.

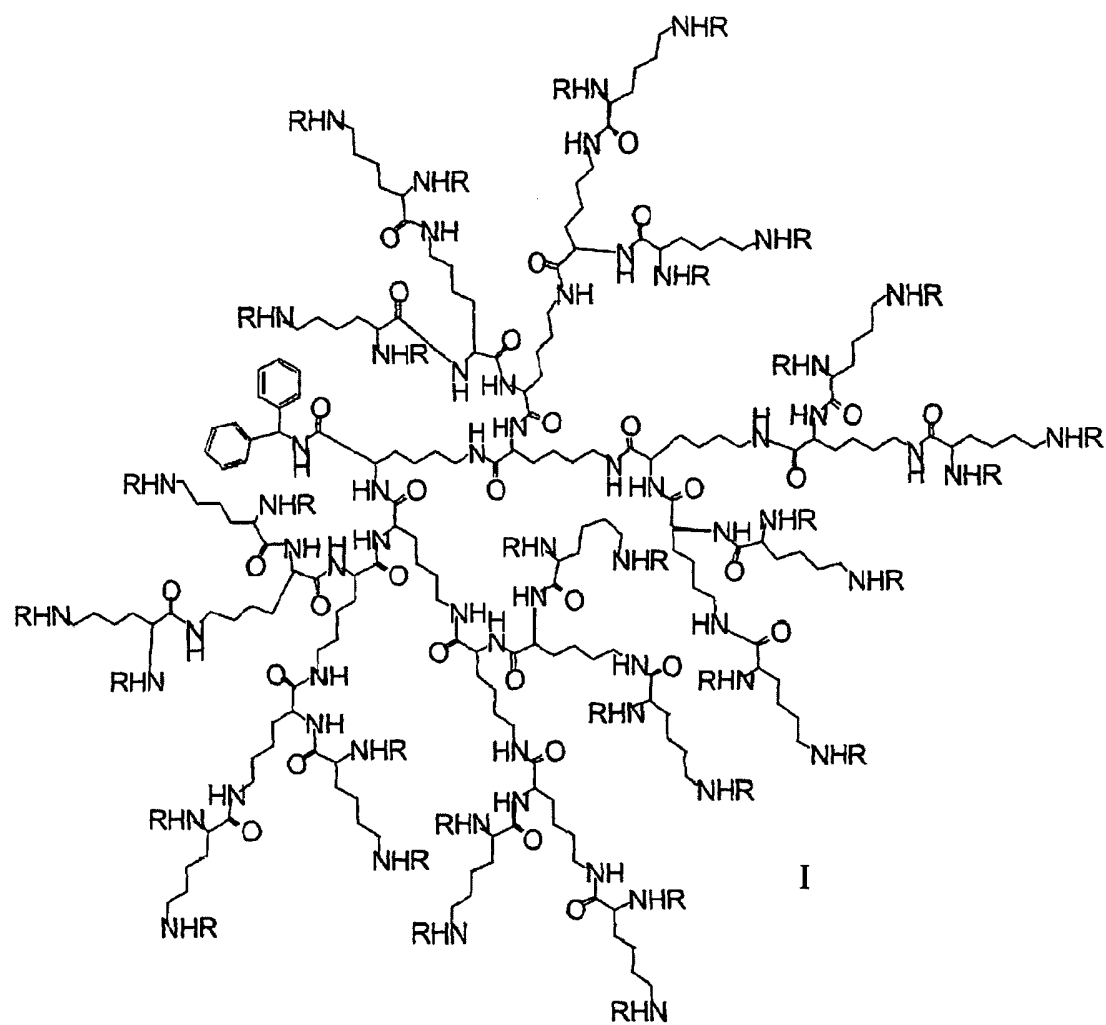
Estes compostos macromoleculares são sinterizados de blocos de formação monomérica com ramificações múltiplas ou estruturas semelhantes a árvore, e a superfície externa da molécula carrega diversos grupos funcionais que conduzem ao reconhecimento por um receptor biológico.

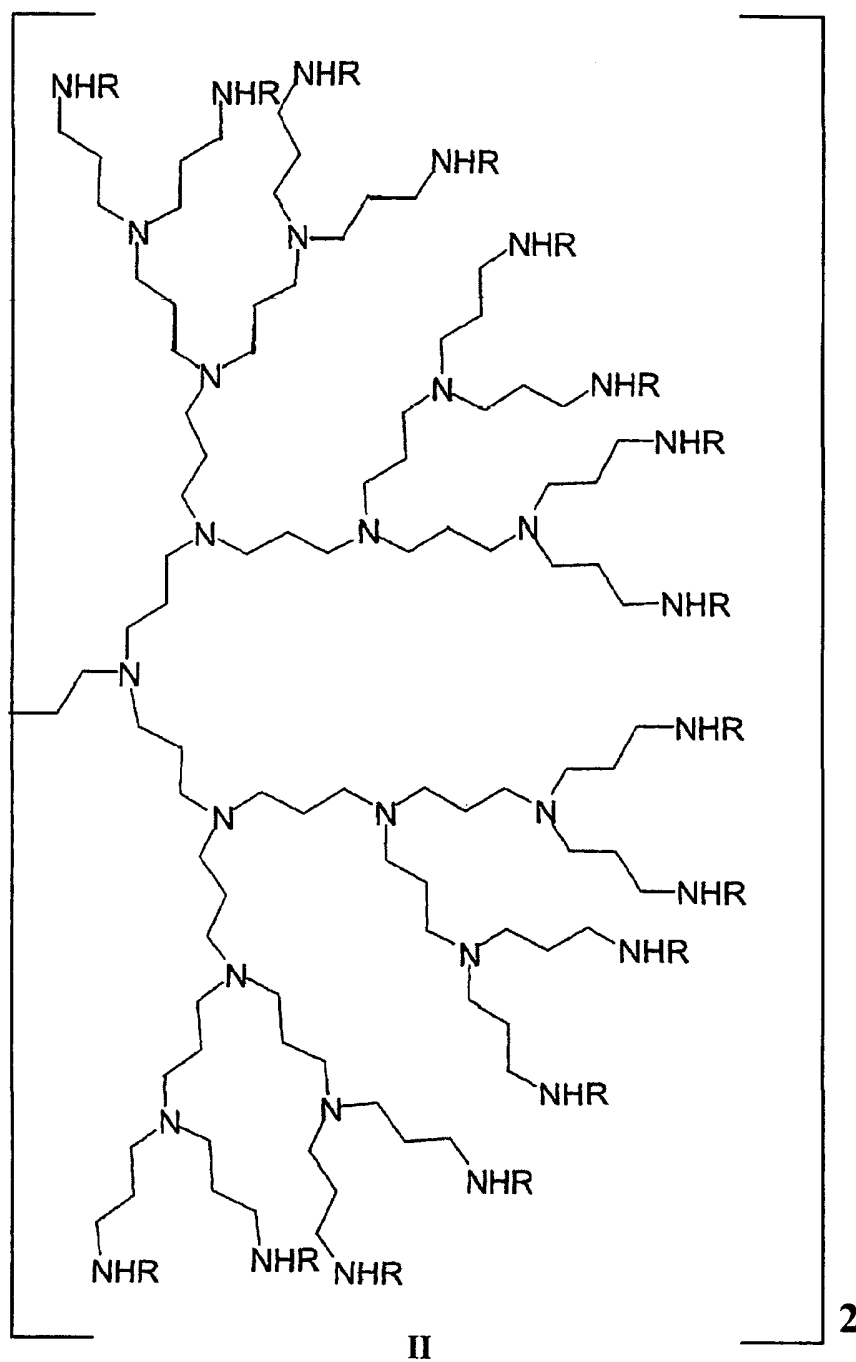
15 A preparação de dendrímeros é bem conhecida e é descrita, como exemplo, nas Patentes U.S. n^{os} 4.289.872 e 4.410.688 (descrevendo dendrímeros com base em camadas de unidades de lisina), bem como nas Patentes U.S. n^{os} 4.507.46 (ilegível), 4.558.120, 4.568.737 e 4.587.329 (descrevendo dendrímeros com base em outras unidades, incluindo os
20 dendrímeros de poliamidoamina ou de PAMAM).

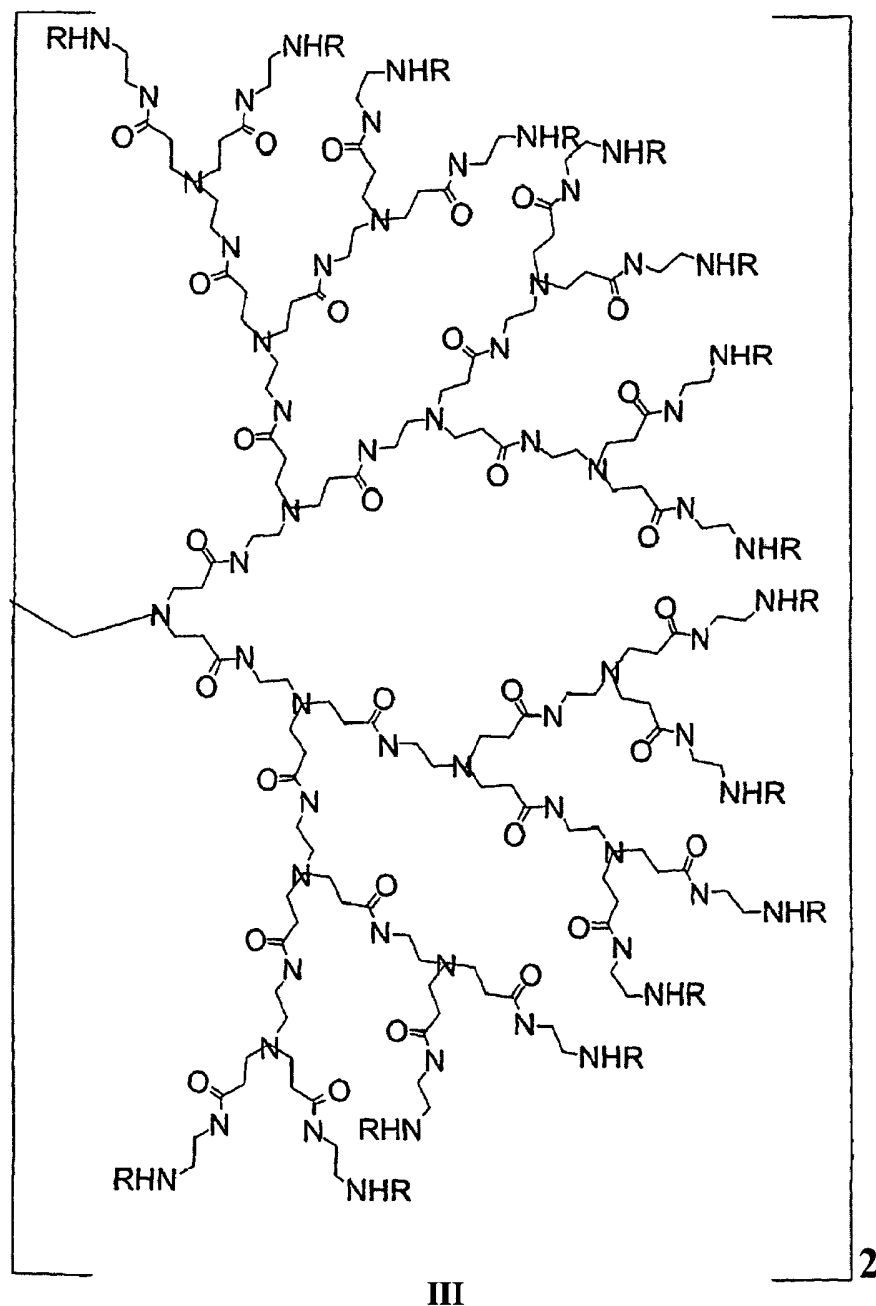
Em testes antivirais e antimicrobianos, um subconjunto destas estruturas de dendrímeros inesperadamente apresentaram atividade excepcional contra um amplo espectro de microorganismos associados com doenças sexualmente transmitidas, o que os torna os agentes de escolha para o
25 desenvolvimento de um microbicida vaginal ou retal para a profilaxia e tratamento de doenças sexualmente transmitidas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

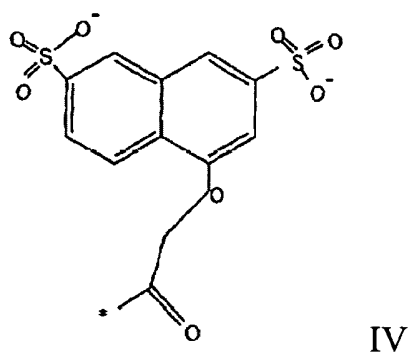
De acordo com a presente invenção, é provido um composto das fórmulas I, II ou III:







em que R representa um grupo da fórmula IV:



ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

Sais de adição de base farmacêuticamente aceitáveis adequados incluem, sem que a estes se limitem, os sais metálicos, tais como os sais de alumínio, cálcio, lítio, magnésio, potássio, sódio e zinco, bem como os sais orgânicos produzidos de aminas orgânicas tais como N,N'-
5 dibenziletilenodiamina, cloroprocaína, dietanolamina, etilenodiamina, dicicloexilamina, meglumina (N-metilglucamina) e procaína, aminas quaternárias tais como a colina, e sais de sulfônio e de fosfônio.

Compostos particularmente preferidos da presente invenção são os compostos referidos aqui como SPL-7013, SPL-7304 e SPL-7320,
10 cujas estruturas consistem de dendrímero de polilisina, dendrímero de poliamidoamina (PAMAM) e dendrímero de polipropilenimina que se estruturam respectivamente com os grupos de superfície ativa consistindo de 32 grupos de ácido naftil dissulfônico como sais de sódio. Cada um dos grupos de superfície funcional de naftil dissulfonato é articulado ao suporte
15 do dendrímero ramificado com uma articulação de amido metilenóxi aos 32 grupos terminais.

A presente invenção também provê uma composição farmacêutica tópica para tratamento profilático ou terapêutico de doenças sexualmente transmitidas em um paciente humano, a qual compreende um
20 composto das fórmulas I, II ou III acima ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em associação com pelo menos um portador ou diluente tópicos farmacêuticamente aceitáveis.

Em outro aspecto, a presente invenção também provê um método para o tratamento profilático ou terapêutico de doenças sexualmente transmitidas em um paciente humano, que compreende a administração tópica
25 ao paciente de uma quantidade eficaz de um composto das fórmulas I, II ou III acima, ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

Em ainda outro aspecto, a invenção provê o uso de um composto das fórmulas I, II ou III acima, ou um seu sal farmacêuticamente

aceitável, na fabricação de um medicamento para a administração tópica no tratamento profilático ou terapêutico de doenças sexualmente transmitidas em um paciente humano.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 Os compostos das fórmulas I, II e III, e seus sais farmaceuticamente aceitáveis são compostos novos que inesperadamente apresentaram atividade excepcional contra um amplo espectro de patógenos associados com as doenças sexualmente transmitidas.

10 Como descrito acima, os compostos SPL-7013, SPL-7304 e SPL-7320 são compostos preferidos da presente invenção, e mostraram que apresentam atividade antiviral significativa, particularmente contra os vetores virais e microbianos das doenças sexualmente transmitidas mais comuns.

O SPL-7013 apresenta uma atividade antiviral de amplo espectro com ampla eficácia e toxicidade mínima à célula ou ao animal, 15 contra os vetores de várias das mais importantes doenças sexualmente transmitidas por via vaginal ou retal. Alta atividade foi determinada contra o vírus do herpes 2 genital (HSV-2), tanto em testes de células *in vitro* quanto em um teste de modelo animal (camundongo) e em testes celulares *in vitro* contra o vírus do Herpes 1 (HSV-1) e o vírus de imunodeficiência humana 20 (HIV-1 e HIV-2). Foi também demonstrado ser ativo contra o agente causador das verrugas genitais, Papilomavírus Humano (HPV), e contra o vetor bacteriano da uretrite inespecífica, *Chlamydia trachomatis*. Em testes celulares, o SPL-7013 também tem apresentado atividade contra as cepas virais do vírus do Herpes 2 resistente aos agentes antivirais à base de 25 nucleosídeos modificados presentemente usados. Além disso os SPL-7304 e SPL-7320 apresentam alta atividade contra os HSV-1, HSV-2, HIV-1 e HIV-2. Além disso, os SPL-7013, SPL-7004 e SPL-7320 são ativos em ensaios de transmissão do HIV dependente de CD4 e independente de CD4, e são eficazes na prevenção da ligação e fusão do HIV-1. Todos os compostos

mostraram-se não apresentar o desenvolvimento de várias espécies de Lactobacilos benéficos. Além disso os SPL-7013, SPL-7304 e SPL-7320 mostraram serem eficazes na prevenção da infecção das células monoculares do sangue periférico humano (PBMCs) ou com o HIV-1 RoJo ou com SIV 80.6pd.

Conseqüentemente, estes compostos são úteis no tratamento profilático e terapêutico de doenças sexualmente transmitidas como agentes microbicidas tópicos destinados à aplicação à mucosa vaginal ou retal para proteger contra as infecções sexualmente transmitidas.

A presente invenção também provê uma composição farmacêutica tópica para o tratamento profilático ou terapêutico de doenças sexualmente transmitidas em um paciente humano, que compreende um composto de fórmulas I, II ou III ou um seu sal, como descrito acima, em associação com pelo menos um portador ou diluente tópico farmaceuticamente aceitável.

A formulação de tais composições é bem conhecida das pessoas habilitadas neste campo. Portadores e/ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem qualquer e todos os solventes convencionais, meios de dispersão, cargas, portadores sólidos, soluções aquosas, coberturas, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes intensificadores ou retardadores isotônicos e de absorção, agentes intensificadores ou retardadores da atividade, e outros. O uso de tais meios e agentes quanto às substâncias farmaceuticamente ativas é bem conhecido na técnica, e é descrito, como exemplo, em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a Edição, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USA. Salvo quando qualquer portador e/ou diluente convencionais sejam incompatíveis com o ingrediente ativo, seu uso nas composições farmacêuticas da presente invenção é considerado. Os ingredientes ativos suplementares, incluindo agentes com atividade antiviral ou antimicrobiana, podem também ser

incorporados às composições desta invenção.

É especialmente vantajoso formular composições na forma de unitária de dosagem para facilidade de administração e uniformidade da dosagem. A forma unitária de dosagem, como aqui usada, se refere a unidades
5 fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os pacientes humanos a serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de ingrediente ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o portador e/ou diluente farmacêuticos requeridos. As especificações para as novas formas unitárias de
10 dosagem da invenção são prescritas pelas, e diretamente dependentes das (a) características únicas do ingrediente ativo e do efeito terapêutico a ser alcançado, e (b) limitações inerentes na técnica de composição de um tal ingrediente ativo para o tratamento particular.

Como anteriormente descrito, a presente invenção também
15 provê um método para o tratamento profilático ou terapêutico de doenças sexualmente transmitidas em um paciente humano, mediante administração tópica ao paciente de uma quantidade eficaz de um dos compostos de fórmula I, II ou III ou sal destes, conforme supra descrito. Além disso, a presente invenção provê o uso de um composto de fórmulas I, II ou III ou um sal deste,
20 como descrito acima, na fabricação de um medicamento para administração tópica em tal tratamento profilático ou terapêutico de doenças sexualmente transmitidas.

Uma variedade de vias de administração tópica é disponível. O modo particular selecionado dependerá, naturalmente, da condição particular
25 em tratamento e da dosagem requerida para a eficácia profilática ou terapêutica. Os métodos desta invenção, em geral, podem ser praticados usando-se qualquer modo de administração que seja aceitável do ponto de vista médico, o que significa qualquer modo que produza níveis profiláticos ou terapêuticos do componente ativo da invenção, sem causar efeitos adversos

cl clinicamente inaceitáveis. Tais modos de administração incluem as vias vaginal, retal e transdérmica. Formulações adequadas para administração tópica, particularmente a vaginal ou a retal, incluem soluções, suspensões, géis, loções e cremes, assim como unidades discretas tais como supositórios e suspensões microencapsuladas. Outros sistemas de liberação podem incluir os sistemas de liberação prolongada, os quais possam proporcionar liberação lenta do componente ativo da invenção, incluindo os géis, cremes, supositórios ou cápsulas de liberação prolongada. Muitos tipos de sistemas de liberação prolongada acham-se disponíveis. Estes incluem, sem limitação: (a) os sistemas erosivos, em que o componente ativo está contido dentro de uma matriz, e (b) os sistemas difusíveis, em que o componente ativo permeia, em uma velocidade controlada, através de um polímero.

O componente ativo da presente invenção é administrado em quantidades profilática ou terapeuticamente eficazes. Uma quantidade profilática ou terapeuticamente eficaz significa aquela quantidade necessária, pelo menos parcialmente, para atingir o efeito desejado, ou para retardar o início, inibir a progressão, ou parar completamente, o início ou a progressão da condição particular em tratamento. Tais quantidades dependerão, naturalmente, da condição particular em tratamento, da gravidade da condição e dos parâmetros individuais do paciente, incluindo idade, condições físicas, altura, peso e tratamento simultâneo. Estes fatores são bem conhecidos daqueles de experiência normal na técnica e podem ser tratados com nada mais do que a experimentação de rotina. É preferível, em geral, que uma dose máxima seja usada, isto é, a dose segura mais elevada de acordo com o julgamento médico idôneo. Será entendido por aqueles de experiência normal na técnica, entretanto, que uma dose menor ou dose tolerável pode ser administrada por razões médicas, razões psicológicas ou virtualmente por quaisquer outras razões.

Em geral, em intervalos a serem determinados pela profilaxia

ou tratamento de estados patogênicos, as doses intravaginais ou intra-retais do componente ativo serão de cerca de 0,01 mg/kg por dia a 1000 mg/kg por dia. Doses pequenas (0,01 a 1 mg) podem ser administradas inicialmente, seguidas por doses crescentes até cerca de 1000 mg/kg por dia. Na eventualidade de
5 que a resposta em um paciente seja insuficiente em tais doses, doses ainda maiores (ou doses eficazes mais elevadas por uma via de liberação diferente mais localizada) podem ser empregadas, na medida em que a tolerância do paciente o permita. Doses múltiplas por dia podem ser consideradas para se obter níveis sistêmicos apropriados dos compostos.

10 Em um aspecto particularmente preferido, a presente invenção provê o uso de SPL7013, SPL7304 ou SPL7320 como um microbicida vaginal ou retal de amplo espectro, útil na prevenção e tratamento de doenças microbianas sexualmente transmitidas. Os SPL7013, SPL7304 e SPL7320 são solúveis em água e podem ser usados em solução, ou formulados em um
15 veículo adequado na forma de gel, loção, creme ou supositório, ou suspensão microencapsulada em solventes aquosos ou não aquosos, junto com reforçadores ou retardadores de sua atividade, agentes para sua absorção intensificada ou retardada na aplicação tópica, ou agentes para intensificar a aderência às camadas epiteliais ou mucosas vaginais/retais.

20 Na totalidade deste relatório descritivo e das reivindicações que seguem, a menos que o contexto requeira de outra maneira, a palavra “compreender” ou variações tais como “compreende” ou “compreendendo”, serão entendidas como contendo a inclusão de uma etapa ou etapas estabelecidas, ou número inteiro ou grupos de números inteiros, mas não a
25 exclusão de qualquer outra etapa ou etapas ou inteiro ou grupos de inteiros.

Outros aspectos da presente invenção serão evidentes dos seguintes exemplos, que são incluídos como ilustração, não limitação, da invenção.

EXEMPLO 1

A. PREPARAÇÃO DE BHAlis₂lis₄lis₈lis₁₆ TFA₃₂

1. N,N'-Di-t-Boc-L-Lisina (DBL)

L-lisina.HCl (1,83 kg; 10 moles) foi dissolvida em uma solução de hidróxido de sódio (880 g; 22 moles) em água (20 litros) e a solução
 5 resultante foi diluída com t-butanol (15 litros). Bicarbonato de di-t-butila (4,48 kg; 20,5 moles) foi então adicionado por gotejamento durante 1 hora, durante cujo tempo a mistura de reação tornou-se leitosa e quente (30 a 35°C). A mistura foi deixada em agitação durante a noite para dar uma solução transparente. A solução foi extraída com petróleo (40 a 60°C) 2 X 10
 10 litros), e a fase orgânica foi extraída com solução saturada de NaHCO₃ (3 X 4 litros). As camadas orgânicas combinadas foram esfriadas em um banho gelado e acidificadas cuidadosamente até pH 2 com solução de KHSO₄ 1M. A mistura turbida foi então extraída com éter (4 X 16 litros) e as camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água (2 X 8 litros), secadas
 15 (MgSO₄) e concentradas com uma temperatura de banho de < 30°C para dar uma produção quantitativa de N,N'-di-t-Boc-L-Lisina como um óleo muito viscoso.

2. ÉSTER 4-NITROFENÍLICO DE N,N'-Di-t-Boc-L-Lisina (DBLONp)

Uma solução de dicioexilcarbodiimida (DCC) (2,06 kg; 10
 20 moles) em acetato de etila (5 litros) foi adicionada às gotas a uma solução agitada gelada de Di-t-Boc-L-lisina (DBL) (3,46 kg; 10 moles) e 4-nitrofenol (NpOH) (1,39 kg; 10 moles) em acetato de etila (15 litros) sob nitrogênio. Após a adição ter sido completada, a mistura foi deixada aquecer-se até temperatura ambiente e agitada durante a noite. A suspensão branca resultante
 25 foi então filtrada e o filtrado foi concentrado para dar um resíduo sólido amarelado. O resíduo foi recristalizado do éter para dar o éster 4-nitrofenílico de N,N'-Di-t-Boc-L-lisina como um sólido branco (rendimento de cerca de 60%). Mais do produto pode mais tarde ser isolado dos licores mãe.

3. BHAlis.2HCl

Uma solução de DCC (41,2 g; 0,2 mol) em diclorometano seco (200 ml) foi adicionada a uma solução gelada de DBL (69,2 g; 0,2 mol) e benzidrilamina (BHA) (36,65 g; 0,2 mol) em diclorometano (600 ml). A mistura foi agitada em 0°C por 30 minutos e depois em temperatura ambiente por 3 horas. A suspensão resultante foi filtrada e uma tlc (éter de petróleo/EtOAc, 9:1) do filtrado não apresentou nenhum material de partida. O filtrado foi lavado com HCl 5%, água, NaHCO₃ saturado e água; depois, secado (MgSO₄) e concentrado para dar uma espuma.

Ácido trifluoroacético (TFA) (400 ml) foi adicionado a uma solução agitada da espuma em diclorometano seco (200 ml) em temperatura ambiente. Houve inicialmente vigorosa evolução de gás, que parou após cerca de 15 minutos; a tlc (EtOAc) não apresentou nenhum material de partida. A solução foi agitada por um adicional de 2 horas e depois foi concentrada para dar um óleo acastanhado. Este óleo foi dissolvido em acetonitrila seca (600 ml) e solução saturada de HCl gasoso dissolvido em etanol absoluto (cerca de 360 ml) adicionado com turbilhonamento. Um sólido branco logo começou a cristalizar-se e a mistura foi deixada repousar por 1 hora em temperatura ambiente para completar a cristalização. A mistura foi filtrada e o sólido lavado com acetonitrila seca, depois secado para dar BHALis.2HCl como um pó branco (rendimento de cerca de 80%).

4. BHALis₂Boc₄

Trietilamina (39,5 ml; 0,283 mol) foi adicionada a uma solução agitada de BHALis.2HCl (54,4 g; 0,14 mol) em DMF seco (300 ml). Formou-se uma suspensão branca, que foi agitada por 15 minutos quando DBLONp (262 g; 0,56 mol) foi adicionado. A mistura imediatamente se tornou amarela e foi agitada por 3 horas, mantendo-se o pH da mistura em 8 a 9 mediante a adição de trietilamina. A mistura de reação foi então acrescentada lentamente a um grande volume de água vigorosamente agitada, e a mistura foi agitada durante a noite. O precipitado foi coletado por filtração

e lavado com água (3X) e secado para dar um sólido amarelado. Este sólido foi pulverizado e, depois, lavado sucessivamente com éter, até que o éter não mostrasse nenhuma cor amarela no tratamento com NaOH aquoso. O sólido remanescente foi secado para dar $\text{BHALis}_2\text{Boc}_4$ como um pó branco (rendimento de cerca de 70%).

5. $\text{BHALis}_2\text{lis}_4\text{Boc}_8$

Ácido Trifluoroacético (600 ml) foi adicionado a uma solução de $\text{BHALis}_2\text{Boc}_4$ (116 g; 0,12 mol) em diclorometano seco (600 ml) e houve uma imediata evolução vigorosa de gás. A solução foi agitada por 2 horas e concentrada para dar um óleo viscoso. Este óleo foi dissolvido em DMF seco (500 ml) e o pH da solução foi ajustado em 8 a 9 com trietilamina. DBLONp (460 g; 0,99 mol) foi então adicionado e a solução amarela foi agitada por 2 dias em temperatura ambiente com ajuste periódico do pH com trietilamina para manter o pH acima de 8. A reação foi então precipitada em água e processada como descrito acima para dar $\text{BHALis}_2\text{lis}_4\text{Boc}_8$ como um pó branco (rendimento de cerca de 100%).

6. $\text{BHALis}_2\text{lis}_4\text{lis}_8\text{Boc}_{16}$

Ácido trifluoroacético (1 litro) foi adicionado a uma solução de $\text{BHALis}_2\text{lis}_4\text{Boc}_8$ (200 g; 0,106 mol) em diclorometano seco (1 litro) e houve uma imediata evolução vigorosa de gás. A solução foi agitada por 2 horas e concentrada para dar um óleo viscoso. Este óleo foi dissolvido em DMF seco e o pH da solução foi ajustado em 8 a 9 com trietilamina. DBLONp (782 g; 1,67 mol) foi então acrescentado e a solução amarela foi agitada por 2 dias em temperatura ambiente com ajuste periódico de pH com trietilamina, para manter o pH acima de 8. A reação foi então precipitada em água e processada como descrito acima, para dar $\text{BHALis}_2\text{lis}_4\text{lis}_8\text{Boc}_{16}$ como um pó branco (rendimento de cerca de 100%).

7. $\text{BHALis}_2\text{lis}_4\text{lis}_8\text{lis}_{16}\text{Boc}_{32}$

Ácido trifluoroacético (1,61 litro) foi adicionado a uma

solução de BHAlis₂lis₄lis₈Boc₁₆ (300 g; 0,081 mol) em diclorometano seco (800 ml) e houve uma imediata evolução vigorosa de gás. A solução foi agitada por 2 horas e concentrada para dar um óleo viscoso. Este óleo foi dissolvido em DMF seco (1,2 litro) e o pH da solução foi ajustado em 8 a 9 com trietilamina. DBLONp (1030 g; 2,21 mol) foi então acrescentado e a solução amarela foi agitada por 2 dias em temperatura ambiente com ajuste periódico de pH com trietilamina, para manter o pH acima de 8. A reação foi então precipitada em água e processada como descrito acima, para dar BHAlis₂lis₄lis₈lis₁₆Boc₃₂ como um pó branco (rendimento de cerca de 100%).

8. BHAlis₂lis₄lis₈lis₁₆ TFA₃₂

Ácido trifluoroacético (168 ml) foi adicionado em uma porção a uma suspensão do núcleo de polilisina protegida de t-butiloxicarbonato (Boc) BHAlis₂lis₄lis₈lis₁₆Boc₁₃₂ (20 g) em diclorometano (350 ml) e a reação foi agitada por 14 horas em temperatura ambiente. A mistura de reação foi concentrada *in vacuo*, dissolvida em H₂O (200 ml) e secada por congelamento para dar BHAlis₂lis₄lis₈lis₁₆TFA₃₂ (17,5 g, 83%) como um sólido branco amarelado.

B. PREPARAÇÃO DE SPL 7013

20 (i) 1-(OXIMETILENO-CARBOXIETIL)-3,6-NAFTALENO-DISSULFONATO DISSÓDICO

1-hidróxi-3,6-naftaleno dissulfonato dissódico (100 g) foi dissolvido em dimetil sulfóxido (250 ml), e diisopropiletilamina (60 ml) foi adicionado em uma porção. Bromoacetato de etila (38 ml) foi adicionado durante um período de 30 minutos e a reação foi agitada por 14 horas em temperatura ambiente com a exclusão da umidade. A reação foi lentamente escoada em acetato de etila (2 litros) para dar um resíduo/goma oleoso. O sobrenadante foi decantado e acetato de etila (1,5 litro) foi adicionado. Várias triturações, seguidas por lavagem com acetona do resíduo, deram o 1-

(oximetileno-carboxietil)-3,6-naftaleno dissulfonato dissódico (97 g, 78%) como um sólido marrom.

(ii) ÁCIDO 1-(OXIMETILENO-CARBÓXI)-3,6-NAFTALENO DISSULFÔNICO

5 NaOH aquoso (134 ml) foi adicionado em uma porção a uma solução de 1-(oximetileno-carboxietil)-3,6-naftaleno dissulfonato dissódico (97 g) em 500 ml de H₂O. A reação foi agitada por 14 horas em temperatura ambiente e, então, passada através de uma coluna IR120 (forma de ácido). Secando-se por congelamento, as frações coletadas deram o ácido 1-
10 (oximetileno-carbóxi)-3,6-naftaleno dissulfônico (67 g, 83%) como um sólido marrom.

(iii) BHAlis₂lis₄lis₈lis₁₆[NH-CO-CH₂O-3,6-NAFTIL-(SO₃Na)₂]₃₂ – SPL 7013

Ácido 1-(oximetileno-carbóxi)-3,6-naftaleno dissulfônico
15 (47,85 g) foi dissolvido em DMF (500 ml), e diisopropiletilamina (115 ml) foi adicionado em uma porção. Esta solução foi então adicionada a uma solução preparada pela adição de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-óxi-tris-pirrolidino fosfônio (PyBOP; 72 g), em uma porção, a uma solução de BHAlis₂lis₄lis₈lis₁₆TFA₃₂ (15,95 g) em DMF (650 ml). DMF (100 ml) foi
20 usado para lavar o funil de gotejamento. A mistura de reação foi agitada por 14 horas em temperatura ambiente e, depois, diluída com água (10 litros). A solução foi bombeada através de um filtro de 1 micron de profundidade e através de um aparelho Pall Filtron (Pall Gelman) contendo uma membrana de 10 kD. A solução resultante foi passada através de uma coluna IR120
25 (forma de sódio), bombeada através de um filtro de 0,22 micron de profundidade e secada por congelamento para dar SPL-7013 como um sólido branco amarelado com um rendimento de 75%. Tempo de retenção = 15 minutos em uma coluna de HPLC ODS-EC 15 cm x 4,6 mm em 30°C com o comprimento de onda de detecção ajustado em 240 nm. A amostra foi eluída

em uma taxa de fluxo de 1 ml por minuto usando-se a eluição em gradiente detalhada abaixo:

Tempo (min.)	% A	% B
0	90	10
2	90	10
20	10	90
30	10	90
31	90	10

Em que o solvente A = TBAH 0,015 M em NH₄OAc 0,01 M (pH 7,0) e o solvente B = TBAH 0,015 M em MeOH.

- 5 A análise espectral de massa de SPL7013 indica um peso molecular de 16.580 ± 2 Dalton. O peso molecular médio esperado para SPL7013, fórmula molecular C₅₈₃H₅₇₇N₆₃Na₆₄O₂₈₇C₆₄ é de 16581,53.

C. PREPARAÇÃO DE SPL 7304

- 10 De uma maneira semelhante, o SPL7304 foi preparado pelo acoplamento PyBOP de ácido 1-(oximetileno-carbóxi)-3,6-naftaleno dissulfônico com o dendrímero poliamidoamina (PAMAM), geração 3 (Starburst[®], Sigma-Aldrich Pty. Ltd., Austrália).

D. PREPARAÇÃO DE SPL 7320

- 15 De uma maneira semelhante, o SPL7320 foi preparado pelo acoplamento PyBOP de ácido 1-(oximetileno-carbóxi)-3,6-naftaleno dissulfônico com o dendrímero polipropilenimina dotriacontaamina, geração 4,0 (DAB-Am-32, Sigma-Aldrich Pty. Ltd., Austrália).

EXEMPLO 2

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE SPL 7013, SPL 7304 E SPL 7320

- 20 **A. ATIVIDADE CONTRA O VÍRUS DE IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA**

- 25 As cepas do vírus de imunodeficiência humana usadas foram HIV-1 (IIIB)¹ e HIV-2 (ROD)². As medições da atividade anti-retroviral e da citotoxicidade foram realizadas em paralelo. Elas se basearam na viabilidade das células MT-4 que haviam sido infectadas com o HIV e, depois, expostas a várias concentrações dos compostos de teste. Após as células MT-4 terem

sido deixadas proliferar por 5 dias, o número de células viáveis foi quantificado por um procedimento colorimétrico com base em tetrazólio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em microbandejas de 96 reservatórios.³

5 Em todos estes ensaios, a absorção viral (multiplicidade viral de infecção, MOI) foi de 0,01, ou 100 vezes os 50% da dose infecciosa da cultura celular (CCID₅₀). A concentração antiviralmente inibidora de 50% (EC₅₀) foi definida como a concentração do composto necessária para proteger 50% das células infectadas pelo vírus em relação à citopaticidade
10 viral. A concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foi definida como a concentração do composto necessária para reduzir a viabilidade das células com infecção simulada por 50%. O símbolo > é usado para indicar a mais elevada concentração em que os compostos foram testados e ainda observados não citotóxicos. Os valores médios de EC₅₀ e CC₅₀ para as várias experiências
15 separadas são apresentados conforme definido acima. Por via de regra, os valores individuais não se desviaram em mais do que 2 vezes para acima e para baixo dos valores de EC₅₀ e CC₅₀. SI é o índice de seletividade antiviral CC₅₀/EC₅₀.

TABELA. ATIVIDADE DO HIV

Composto	Cepa	EC ₅₀ µg/ml	EC ₉₀ µg/ml	CC ₅₀ µg/ml	SI
SPL-7013	IIIB	0,45	0,954	>125	>280
	ROD	3,26	4,86	>50	>17
SPL-7304	IIIB	0,15		>88	>652
	ROD	0,8		>50	>63
SPL-7320	IIIB	0,164		>88	>537
	ROD	1,153		>50	>47

20 IIIB = HIV-1 ROD = HIV-2

EC₉₀ = concentração eficaz para reduzir 90% da placa viral.

(i) **MÉTODOS PARA OS ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA TRANSMISSÃO DO HIV DEPENDENTE DE CD4 E INDEPENDENTE DE CD4, LIGAÇÃO E FUSÃO DO HIV, E INIBIÇÃO DO**
25 **DESENVOLVIMENTO DE LACTOBACILLUS SP.**

Células e vírus:

O HIV-1_{IIIB}, e as linhagens celulares HeLa CD4 LTR β -gal, GHOST X4/X5 e HL2/3 foram obtidos do NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Bethesda, MD), e mantidos como
5 recomendado. Células ME180 foram obtidas da American Type Culture Collection (Manassas, VA).

Manipulação e Armazenagem do Material de Teste

Os compostos são tipicamente solubilizados em DMSO a 100% e armazenados a -80°C até o teste, a menos que solventes alternativos e
10 condições de armazenagem sejam especificadas pelo responsável. Os estoques congelados são descongelados na temperatura ambiente, pré-aquecidos por 15 minutos em 37°C e turbilhonados antes da preparação das soluções de trabalho no meio de cultura tecidual. Durante todos os estágios de diluição e manipulação do composto, os compostos são protegidos da luz
15 incidente por coberturas opacas e por armazenagem e diluição em plásticos de cultura tecidual opacos ou cor de âmbar. Adicionalmente, a exposição à luz ambiental incidente e das capelas de cultura tecidual de fluxo laminar são controladas pela redução da iluminação fluorescente no laboratório em 50%. A concentração final do DMSO é de 0,25% na concentração de teste mais
20 elevada.

Ensaio de Inibição da Transmissão do HIV independente de CD4

Células ME180, uma linhagem celular epitelial cervical negativa CD4, positiva X4, são mantidas em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, glutamina e antibióticos. Vinte e quatro horas antes
25 do ensaio, as células ME180 são tripsinizadas, lavadas e semeadas em placas microtituladoras de fundo plano de 96 reservatórios em uma densidade de 2×10^3 células por reservatório. No dia do ensaio, células H9 cronicamente infectadas com o isolado clínico SK1 do HIV-1 (H9-SK1) são tratadas com mitomicina C recém-produzidas ($200 \mu\text{g/ml}$) por 60 minutos em 37°C . Esta

concentração de mitomicina C é suficiente para resultar na morte celular, mas permite que a transmissão do vírus ocorra. Após o tratamento de mitomicina C, as células H9-SK1 são lavadas por três vezes com meio de cultura tecidual. Os compostos de teste são adicionados à monocamada de ME180 seguidos por 2×10^4 de células H9-SK1. As células ME180 são co-cultivadas com as células H9-SK1 e o material de teste durante 4 horas, e as células H9-SK1 são removidas por lavagem da monocamada de ME180 por três vezes com PBS. Em 24 e 48 horas após o início do ensaio, os reservatórios são novamente lavados por três vezes com PBS para garantir a remoção das células H9-SK1, e a cultura é continuada no meio livre de material de teste. Em seis dias após o co-cultivo, os sobrenadantes são coletados e avaliados quanto à expressão do antígeno p24 por ELISA. A viabilidade celular é avaliada por redução do corante XTT. Os compostos que são julgados como ativos no primeiro teste são re-ensaiados com ou sem a adição de mucina. Os testes na presença de mucina são realizados pela adição de 200 µg/ml de mucina porcina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) para as reações de transmissão. Os intervalos de transmissão e a lavagem sem substituição da mucina ou composto são conduzidos como descrito acima. Todas as determinações são realizadas em triplicata com diluição serial $\frac{1}{2} \text{Log}_{10}$ dos materiais de teste.

Ensaio de Inibição da Transmissão do HIV Dependente de CD4:

O ensaio de inibição da transmissão do HIV independente de CD4 é realizado essencialmente como descrito para o ensaio de transmissão independente de CD4, exceto quanto ao uso da linhagem celular GHOST(3) X4/R5 CD4 positiva. Esta linhagem celular é derivada da linhagem celular de HOS (osteossarcoma humano), que é negativa quanto ao co-receptor de HIV e a expressão de CD4. A linhagem celular é engendrada para expressar T4 (CD4), R5 e X4 através de vetores retrovirais não selecionáveis e uma construção de HIV-2 LTR hGFP com um marcador selecionável de higromicina. As linhagens celulares são manipuladas e cultivadas como

descrito acima para o ensaio de inibição do HIV independente de CD4, com exceção de que células H9/SK-1 tratadas com $2,5 \times 10^4$ GHOST(3) X4/R5 e 5×10^2 mitomicina C são usadas no ensaio. A adição de compostos, o tratamento de mitomicina C e a lavagem de pós-transmissão para remover as células H9/SK-1 são realizados como descrito acima para permitir a comparabilidade dos dois ensaios antivirais. A replicação viral é avaliada em 24 horas após a infecção, seguindo-se 3 lavagens, mediante medição de p24 associado à célula por ELISA para garantir uma rodada única de infecção na presença de CD4. A toxicidade do composto e a viabilidade celular são avaliadas por redução de corante XTT. Os compostos que são julgados como ativos no primeiro teste, são reensaiados com ou sem a adição de mucina. Os testes na presença de mucina são realizados pela adição de 200 µg/ml de mucina porcina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) em meio de cultura tecidual para as reações de transmissão. Os intervalos de transmissão e a lavagem sem substituição da mucina ou composto são conduzidos como descrito acima. Todas as determinações são realizadas em triplicata com diluição serial $\frac{1}{2} \text{Log}_{10}$ dos materiais de teste.

Ensaio de Lactobacillus:

Lactobacillus crispatus e *Lactobacillus jensenii* foram obtidos da American Type Tissue Culture Collection e cultivados em caldo *Lactobacilli* MRS (Difco, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Este meio permite o crescimento eficiente dos *Lactobacilli* sob condições anaeróbicas. Os estoques de *Bacillus* são produzidos e congelados em glicerol a 15% em -80°C para uso no ensaio de sensibilidade. Para avaliar o efeito dos compostos sobre o crescimento de *L. crispatus* e *L. jensenii*, 10 ml de meio MRS é inoculado com uma aplicação do estoque bacteriano de glicerol. A cultura é colocada em um saco de CO_2 Gas Pak e incubada por 24 horas em 37°C . No dia seguinte, as culturas de *Lactobacillus* são diluídas a uma OD de 0,06 em um comprimento de onda de 670 nm. Os compostos são diluídos e

colocados em uma placa de fundo plano de 96 reservatórios e os *Lactobacillus sp.* são adicionados. A solução comercialmente disponível de Penicilina/Estreptomicina em uma alta concentração de teste de 1,25 U/ml e 1,25 µg/ml, respectivamente, é usada como o controle positivo. As placas são

5 novamente incubadas por 24 horas em 37°C em um saco de CO₂ Gas Pak e o crescimento bacteriano é determinado pela medição da densidade ótica em 490 nm em uma leitora de placas Molecular Devices. Todas as determinações são realizadas com diluições de 6 ½ log de uma alta concentração de teste, em triplicada.

10 *Ensaio de Ligação do Vírus:*

Este ensaio é designado para detectar compostos que interagem com a ligação celular e viral em bloco, e/ou os compostos que interagem com o complexo de formação de ligação/fusão. O ensaio de ligação é realizado com células HeLa CD4 LTR β-gal. As células HeLa CD4 LTR β-gal

15 são rotineiramente cultivadas com os antibióticos de seleção requeridos. Vinte e Quatro horas antes do início do ensaio, as células são tripsinizadas, contadas e 1×10^4 células colocadas em um reservatório de 0,2 cm em meio sem antibióticos de seleção. Em 24 horas, o meio é removido e o composto no meio é colocado sobre as células e incubado por 15 minutos a 37°C. Um título

20 conhecido da cepa IIIB do HIV é então adicionado aos reservatórios e a incubação é continuada por 1 hora. No final da incubação, os reservatórios são lavados por 3 vezes com meio e a cultura é continuada por 40 a 48 horas. No término do ensaio, o meio é removido e a expressão da enzima β-galactosidase determinada por quimioluminescência conforme instruções dos

25 fabricantes (Tropix Gal-screen®, Bedford Mass.) por um método quimioluminescente de etapa única com o uso de uma solução única para lisar as células e detectar a atividade da enzima β-galactosidase. A toxicidade do composto é monitorada em uma placa irmã mediante redução de corante XTT. Todas as determinações são realizadas em triplicata com diluição serial

$\frac{1}{2}$ Log₁₀ dos materiais de teste. O intervalo de adsorção vital de 1 hora é suficientemente curto para que o AZT, que requer fosforilação para sua forma de trifosfato ativa (AZT-TTP), não fique ativo neste ensaio.

Ensaio de Fusão:

5 O ensaio de fusão avalia a capacidade dos compostos de bloquearem a fusão de célula-a-célula mediada pelo HIV-1 Env e expressa em CD4 em células separadas. Este ensaio é sensível aos inibidores tanto da interação de gp/120/CD4 quanto aos inibidores do co-receptor de X4. Primeiramente, 5×10^3 células HeLa CD4 LTR β -gal são colocadas em
10 reservatórios microtituladores e incubadas durante a noite. No dia seguinte, o meio é removido e as células HeLa CD4 LTR β -gal são incubadas por 1 hora a 37°C em meio recente com o composto de teste. Em seguida à incubação, 5×10^3 de células HL2/3 são adicionadas e a incubação é continuada por 40 a 48 horas. Em 40 a 48 horas, a expressão da enzima β -galactosidase é
15 detectada por quimioluminescência (Tropix Gal-screen®, Tropix, Bedford, MA). A toxicidade do composto é monitorada em uma placa irmã mediante redução de corante XTT. Todas as determinações são realizadas em triplicata com diluição serial $\frac{1}{2}$ Log₁₀ dos materiais de teste.

ELISA do Antígeno P24:

20 Os kits do ELISA são comprados da Coulter Electronics, e a detecção do sobrenadante antígeno p24 associado à célula é realizada de acordo com instruções do fabricante. Quanto ao p24 associado à célula, os lisados celulares são produzidos por lise dos conteúdos do reservatório em 25 a 50 μ l de tampão de lise viral fornecido pela Coulter, e ensaiados em seguida
25 a uma rodada de congelamento/descongelamento. Todas as determinações de p24 são realizadas em seguida à diluição serial das amostras, para garantir absorvâncias na faixa linear da curva padrão do antígeno p24. A curva padrão é produzida usando-se os padrões e as instruções fornecidas pelo fabricante. Os dados são obtidos por análise espectrofotométrica em 450 nm usando-se a

leitora de placas Molecular Devices Vmax. As concentrações finais são calculadas dos valores das densidades ópticas usando-se o pacote de softwares Molecular Devices Soft Max e expressas em pg/ml de antígeno p24.

Manchamento de XTT para a Viabilidade Celular e Citotoxicidade do

5 *Composto:*

Os valores de TC_{50} para os materiais de teste são derivados por medição da redução do corante de tetrazólio XTT [hidróxido de (2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazólio] em placas microtituladoras em duplicata contendo célula e composto sem vírus.

10 XTT é metabolizado pela enzima mitocondrial NADPH oxidase em células metabolicamente ativas a um produto formazan solúvel, permitindo a rápida análise quantitativa da viabilidade celular e da citotoxicidade do composto. A solução XTT é preparada diariamente como um estoque de 1 mg/ml em PBS. Solução de metossulfato de fenazina (PMS) é preparada em 15 mg/ml em

15 PBS e armazenada no escuro em $-20^{\circ}C$. O estoque de XTT/PMS é preparado imediatamente antes do uso pela diluição do PMS a 1:100 em PBS e adicionando-se 40 μ l por ml de solução de XTT. Cinquenta microlitros de XTT/PMS são acrescentados a cada reservatório da placa e a placa é incubada por 4 horas em $37^{\circ}C$. A incubação de 4 horas foi empiricamente determinada

20 de modo a situar-se dentro da faixa de resposta linear para a redução do corante MTS com os números indicados de células para cada ensaio. Seladores adesivos de placas são usados no lugar das tampas, a placa selada é invertida por várias vezes para misturar o produto formazan solúvel, e a placa é lida em 450 nm com um espectrofotômetro formato de placa de 96

25 reservatórios Molecular Devices Vmax.

ANÁLISE DOS DADOS

Sulfato de dextrano (positivo) e dextrano (negativo) são usados como controles para os ensaios de inibição da transmissão de HIV dependente de CD4 e independente de CD4. O corante de ácido sulfônico

Chicago Sky Blue é usado como um controle positivo para os ensaios⁴ de ligação e de fusão. Solução de Penicilina (10.000 U/ml) Estreptomicina (10,0 mg/ml) comercialmente disponível é usada como um controle positivo para o ensaio de sensibilidade do *Lactobacillus*. Para cada composto, quando apropriado, um IC₅₀ (replicação ou transmissão do vírus de inibição da concentração em 50%), ID₅₀ (50% de crescimento dos *Lactobacilli* inibidor da concentração), TC₅₀ (concentração resultante em uma redução de 50% na viabilidade celular) e um índice terapêutico (TI: TC₅₀/IC₅₀ ou ID₅₀) são calculados por regressão linear.

10 RESULTADOS DOS ENSAIOS DE TRANSMISSÃO DEPENDENTE DE CD4 E INDEPENDENTE DE CD4

composto	Exp.#	mucina	ensaio de transmissão independente de CD			ensaio de transmissão dependente de CD4		
			IC ₅₀	TC ₅₀	TI	IC ₅₀	TC ₅₀	TI
sulfato de dextrano	1	-				0,316	>100	>316
	2	-	1,1	>50	>46	0,158	>50	>316
	2	+	0,16	>50	>309	0,158	>50	>316
dextrano	1	-				>100	>100	--
	2	-	>100	>100	--	>100	>100	--
	2	+	>100	>100	--	>100	>100	--
SPL7013	1	-				0,76	>100	>132
	2	-	28,5	>100	3,5	0,39	>100	>256
	2	+	1,1	>100	>90,9	0,49	>100	>205
SPL7304	1	-				<0,3	>100	>316
	2	-	5,0	>100	>20	0,89	>10	>112
	2	+	2,8	>100	>36	0,65	>100	>153
SPL7320	1	-				<0,3	>100	>316
	2	-	0,8	>100	>125	0,68	>100	>147
	2	+	0,8	>100	>125	1,15	>10	>87

RESULTADOS DOS TESTES DO *LACTOBACILLUS SP.*

composto	unidades	<i>L. crispatus</i> (ID ₅₀)	<i>L. jensenii</i> (ID ₅₀)	comentários
penicilina/es treptomicina	Diluição ¹	1:150,00	1:180,00	composto de controle
SPL7013	µg/ml	>100	>100	
SPL7304	µg/ml	>100	>100	
SPL7320	µg/ml	>100	>100	

¹ As concentrações de partida da Penicilina e da Estreptomicina são de 1,25 U/ml e 1,25 µg/ml, respectivamente.

15 RESULTADOS DOS ENSAIOS DA INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO E DA FUSÃO

composto	ensaio de ligação ($\mu\text{g/ml s}$)			ensaio de fusão($\mu\text{g/ml}$)		
	IC ₅₀	TC ₅₀	TI	IC ₅₀	IC ₅₀	TI
Chicago Sky Blue	0,66	>10	>15	0,79	>10	>12
	0,09	>10	>111	0,62	>10	>16
SPL7013	0,57	>100	>175	0,71	>100	>141
SPL7304	<0,32	>100	>312	<0,32	>100	>312
	0,036	>1	>2778	0,56	>1	>178
SPL	<0,32	>100	>312	0,49	>100	>204
	0,049	>1	>2041			

(ii) ATIVIDADE DE SPL7013, SPL7304 E SPL7320 CONTRA HIV-1 RoJo E SIV 89.6pd

MÉTODOS

Vírus

5 A cepa RoJo do vírus de imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) é um isolado pediátrico de baixa passagem derivado dos laboratórios do Southern Research Institute (SRI). O SHIV89.6pd foi obtido da Mark Kewis em SRI e estoques cultivados em PBMCs humanos para testes antivirais.

10 Isolamento e Jateamento das PBMCs

Células monoclonais de sangue periférico (PBMCs) foram obtidas de hepatite normal e doadores negativos de HIV-1 por separação de gradiente *ficoll hypaque*. Resumidamente, o sangue anticoagulado foi diluído a 1:1 com solução salina tamponada de fosfato da Dulbecco sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ (PBS) e disposto em camadas sobre 14 ml de meio de separação de Linfócito em um tubo centrífugo de 50 ml. Os tubos foram então centrifugados por 30 minutos a 600 X g. PBLs em bandas foram suavemente aspirados da interface resultante e subsequente lavados 2X com PBS por centrifugação de baixa velocidade. As células mononucleares foram contadas, a viabilidade foi determinada por exclusão do corante Trypan Blue e recolocadas em suspensão em meio RPMI 1640 suplementado com FBS a 15% (inativado a calor), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 10 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina com 2 $\mu\text{g/ml}$ de fitoemaglutinina (PHA) em 1×10^6 células/ml. As células foram cultivadas por 48 a 72 horas

em 37°C, 5% de CO₂. Em seguida à incubação, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas e recolocadas em suspensão em RPMI 1640 suplementado com FBS a 15% (inativado a calor), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10 µg/ml de gentamicina com 20 U/ml de IL-2 recombinante (R & D Systems, Minneapolis, MN). IL-2 foi incluído no meio de cultura para manter a divisão celular iniciada pelo estímulo mitogênico de PHA. As células foram cultivadas em IL-2 por 72 horas e depois usadas para a prova viral.

Ensaio de PBMC:

Células mononucleares de sangue periférico humano de um mínimo de 2 doadores, que brotaram com PHA e IL-2, foram contadas, a viabilidade determinada por exclusão de corante Trypan Blue, e misturadas em proporções iguais. Doadores associados foram usados para minimizar a variabilidade observada entre doadores individuais que resulta de diferenças quantitativas e qualitativas na infecção de HIV e na resposta global ao PHA e IL-2 de populações de linfócitos primários. As células foram recolocadas em suspensão em 1×10^6 células/ml em RPMI 1640 sem vermelho fenol suplementado com Soro Bovino Fetal a 15% (inativado a calor), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10 µg/ml de gentamicina com IL-2 (20 U/ml, R & D Systems, Minneapolis, MN). Cinquenta microlitros de células foram então distribuídas aos 60 reservatórios internos de uma placa de cultura microtituladora de fundo redondo de 96 reservatórios em um formato padrão desenvolvido pelo Infectious Disease Research Department of Southern Research Institute. Cada placa contém reservatórios de controle de células (células apenas), reservatório de controle de vírus (células mais vírus), e reservatórios experimentais (medicamento mais células mais vírus). Os compostos diluídos em série são adicionados à placa microtituladora, seguidos pela cepa de HIV-1 ou SHIV-1 pré-titulada apropriada. Todas as amostras foram ensaiadas em triplicata com uma placa

de replicada sem vírus para a determinação da toxicidade do composto. O volume final por reservatório foi de 200 µl. O ensaio foi incubado por 6 dias em uma atmosfera umedecida a 37°C, 5% de CO₂, após o que os sobrenadantes foram coletados, para análise de atividade em RT e placas irmãs foram analisadas quanto à viabilidade celular por redução de corante MTS. Os reservatórios foram também examinados microscopicamente e quaisquer anormalidades foram anotadas.

Manchamento de MTS quanto à viabilidade celular:

No término dos ensaios, as placas de ensaio foram manchadas com o corante MTS à base de tetrazólio solúvel (CellTiter[®] Reagent Promega, Madison, WI) para determinar a viabilidade celular e quantificar a toxicidade do composto. O MTS é metabolizado pelas enzimas mitocôndrias de células metabolicamente ativas a um produto formazan solúvel, possibilitando a rápida análise quantitativa da viabilidade celular e da citotoxicidade do composto. Este reagente é uma solução estável única que não requer a preparação antes do uso. No término do ensaio de PBMC, 20 µl do reagente MTS foi adicionado por reservatório, e os reservatórios são incubados por 4 horas em 37°C. Os seladores de placas T Adhesive foram usados no lugar das tampas, a placa selada foi invertida por várias vezes para misturar o produto formazan solúvel, e a placa é lida espectrofotometricamente em 490 nm com uma leitora de placas Molecular Devices Vmax.

Ensaio de Transcriptase Reversa:

A atividade de transcriptase reversa foi medida em sobrenadantes isentos de células. Tiofosfato de timidina triciado (NEN) (TTP) foi recolocado em suspensão em H₂O destilado em 5 Ci/ml. Poli rA e oligo dT foram preparados como uma solução de estoque que foi mantida em -20°C. O tampão de reação de RT foi preparado fresco em uma base diária e consiste de 125 µl de EGTA 1,0 M, 125 µl de dH₂O, 110 µl de SDS a 10%, 50 µl de Tris 1,0 M (pH 7,4), 50 µl de DTT 1,0 M e 40 µl de MgCl₂ 1,0 M.

Estas três soluções foram misturadas entre si em uma relação de 2 partes de TTP, 1 parte de poli rA:oligodT, e 1 parte de tampão de reação. Dez microlitros desta mistura de reação foi colocada em uma placa microtituladora de fundo redondo e 15 µl de sobrenadante contendo o vírus foram adicionados e misturados. A placa foi incubada a 37°C em um banho de água com um suporte sólido para impedir a submersão da placa, e foi incubada por 60 minutos. Em seguida à reação, o volume de reação foi espalhado sobre peças de papel DE81, lavado por 5 vezes durante 5 minutos cada em um tampão de fosfato de sódio a 5%, 2 vezes por 1 minuto cada em água destilada, 2 vezes por 1 minuto cada em etanol a 70%, e depois secado. Opti-Fluor O foi adicionado a cada amostra e a radioatividade incorporada foi quantificada utilizando-se um contador de cintilação líquida Wallac 1450 Microbetaplus.

Análise dos Dados:

IC₅₀ (50% de inibição da replicação viral), TC₅₀ (50% de redução na viabilidade celular) e um índice terapêutico (TI, IC₅₀/TC₅₀) são fornecidos. AZT foi usado como um composto de controle positivo relevante para os ensaios individuais.

Os resultados das avaliações antivirais realizadas são resumidos na seguinte tabela:

RESUMO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS EM PBMCs

composto	PBMCs infectados de HIV-1 RoJo (µg/ml)			PBMCs infectados de SHIV 89.6pd. (µg/ml)		
	IC ₅₀	TC ₅₀	TI	IC ₅₀	TC ₅₀	TI
SPL7013	6,1	>100	>16	0,25	>100	>400
SPL7304	13,2	>100	>7,6	0,92	>100	>109
SPL7320	2,6	>100	>39	0,29	>100	>345
AZT (µM)	0,0005	>1	>200	0,002	>1	>500

B. ATIVIDADE CONTRA HERPESVÍRUS – HSV-1 E HSV-2

(i) Ensaio de redução de placa viral

Método Geral

Cepas padrão de HSV G (HSV-2) e F (HSV-1) foram usadas

nos testes. A introdução de vírus para uma placa de 6 reservatórios foi de 100 pfu/reservatório. A linhagem celular suscetível de HSV, células Vero, foi usada no ensaio de redução da produção viral. Para o teste de citotoxicidade, uma linhagem de células epiteliais, células Hela-229, foi empregada.

5 Os efeitos antivirais dos compostos foram determinados pelo ensaio de redução de placa modificado. As células confluentes foram lavadas com PBS e subseqüentemente infectadas com HSV (100 pfu/reservatório) por 1 hora a 37°C e inclinando-se a cada 10 minutos. Após o inóculo viral ter sido removido, as células infectadas foram lavadas com PBS e cobertas com
10 metilcelulose a 0,5% em meio de cultura (volume igual de metilcelulose a 1% misturado com 2 x meio de cultura). As células foram incubadas em 37°C por 2 dias para infecção de HSV-2 e 3 dias para HSV-1. Quando o tamanho das placas estava adequado, as células foram fixadas com formalina a 10% por 10 minutos. As placas subseqüentemente foram manchadas com violeta genciana
15 a 0,5% por 10 minutos. O corante foi removido por lavagem com água da torneira e deixado secar em uma coifa. As placas foram então contadas.

Todos os dados foram gerados de experiências em duplicata. As contagens médias das placas nos reservatórios de teste foram comparadas com as contagens médias das placas nos reservatórios de controle.

20 As EC_{50} 's (concentrações dando uma redução de 50% na contagem de placas do inóculo) foram calculadas. As medições das atividades antivirais e da citotoxicidade foram realizadas em paralelo na mesma cepa de células. A concentração citotóxica de 50% (CC_{50}) foi definida como a concentração do composto necessária para reduzir a viabilidade das células de
25 infecção simulada em 50%.

MÉTODO DE TRATAMENTO DA PRÉ-INFECÇÃO

O meio de cultura foi removido das células Vero congruentes na placa de 6 reservatórios, e lavado com 1 ml de PBS. 1 ml de meio de cultura contendo o composto nas concentrações de 0, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3,

10 e 30 µg/ml, foi adicionado a cada reservatório e incubado em 37°C por 1 hora. Em seguida à pré-incubação das células com dendrímero, estas foram então infectadas com 100 pfu/reservatório ou de HSV-1 ou de HSV-2. As infecções foram incubadas em 37°C por 1 hora com inclinação a cada 10 minutos. Após o inóculo ter sido removido, as células infectadas foram cobertas com 1,5 ml de metilcelulose a 0,5% diluída com 2 x meio de cultura por ensaio de placa.

TRATAMENTO DE CÉLULAS INFECTADAS

Células Vero confluentes foram lavadas com PBS. As células foram então infectadas com 100 pfu/reservatório ou de HSV-1 ou de HSV-2 em 37°C por 1 hora. Em seguida à remoção do inóculo viral, as células infectadas foram lavadas uma vez com PBS e cobertas com metilcelulose a 0,5% contendo dendrímero nas concentrações de 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1,3, 10, 30 e 100 µg/ml. As células foram incubadas a 37°C por 2 dias (HSV-2) ou 3 dias (HSV-1) por ensaio de placa.

CITOTOXICIDADE DO DENDRÍMERO

O meio de cultura foi removido das células Hela-229 confluentes em placas de 24 reservatórios por bomba. As células foram então lavadas uma vez com 1 ml de PBS. 1 ml de meio de cultura contendo dendrímeros nas concentrações de 0, 100, 500 e 1000 µg/ml foi adicionado a cada reservatório. As células foram incubadas em incubadora de 37°C por 2 dias. No final da incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS. 500 µl de vermelho neutro a 0,01% (em PBS) foram subsequentemente adicionados a cada reservatório, e incubados a 37°C por 30 minutos. O corante foi então removido e as células foram lavadas por duas vezes com 1 ml de PBS por reservatório. O corante foi extraído pela adição de 500 µl de etanol a 50% e ácido acético glacial a 1% em PBS a cada reservatório, e incubado em temperatura ambiente por 15 minutos com agitação suave em 120 a 150 rpm. 100 µl de corante extraídos de cada

reservatório foram colocados em placas de 96 reservatórios e a absorbância a 550 nm foi lida em uma leitora ELISA.

TABELA DE ATIVIDADE CONTRA HSV-1 E HSV-2

composto	tratamento	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
SPL-7013	PT/HSV-2	0,61	>1000
SPL-7013	PT/HSV-1	0,93	>1000
SPL-7013	INF/HSV-2	3,59	>1000
SPL-7013	INF/HSV-1	4,59	>1000
SPL-7304	PT/HSV-2	0,4	>1000
SPL-7304	PT/HSV-1	3	>1000
SPL-7304	INF/HSV-2	54,4	>1000
SPL-7304	INF/HSV-1	50,4	>1000
SPL-7320	PT/HSV-2	0,6	>1000
SPL-7320	PT/HSV-1	2,2	>1000
SPL-7320	INF/HSV-2	33,3	>1000
SPL-7320	INF/HSV-1	16,4	>1000

PT = tratamento de pré-infecção

INF = tratamento de células infectadas.

(ii) HERPESVÍRUS – 2. EFICÁCIA EM UM MODELO ANIMAL

A eficácia do SPL-7013 foi testada em um teste de prevenção do HSV genital no modelo de camundongo (cepa MS). Uma dose de 15 µl de 100 mg/ml, ou 10 mg/ml do composto, foi instilada dentro da vagina de 16 animais 20 segundos antes da infecção com HSV-2. O SPL preveniu a infecção e a doença em todos os animais testados, em comparação aos controles. A mortalidade total em três dias do mesmo número de camundongos infectados de controle foi usada como um ponto final dos testes.

TABELA DE INFECÇÃO DE HSV-2 DO TRATO GENITAL E DE TRATAMENTO DA DOENÇA NO CAMUNDONGO

concentração	número de animais	animais protegidos contra	
		Doença (%)	Infecção (%)
100	11	11/11 (100%)	11/11 (100%)
100	12	12/12 (100%)	12/12 (100%)
10	12	11/12 (97%)	10/12 (83%)
controle de PBS	12	0/12 (0%)	0/12 (0%)

Todos os animais tratados 20 segundos antes da infecção.

C. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV). INIBIÇÃO DA ABSORÇÃO DAS CÉLULAS EPITELIAIS HUMANAS

O composto foi avaliado quanto à sua capacidade de inibir a ligação e a absorção de partículas semelhantes ao vírus papilomavírus humano, a uma linhagem de células epiteliais humanas.

5 O composto foi testado em uma série de seis diluições como inibidor da ligação e da absorção de Partículas Semelhantes a Vírus (VLPs) marcadas com fluorocromo de Papilomavírus, do papilomavírus humano do tipo 6b. Deixou-se que as VLPs se ligassem e fossem absorvidas pelas células epiteliais na presença de SPL-7013. O ensaio de ligação e absorção foi determinado usando-se a citometria de fluxo e a inibição da ligação foi
10 relatada como um percentual em relação à ligação observada na ausência de inibidor. Os testes foram realizados em dois ensaios independentes.

MÉTODOS

Células. A linhagem celular A431 do carcinoma epidermóide humano foi comprada da American Type Culture Collection na passagem 30
15 (CRL-1555, Batelada F-13530) e mantida em DMEM em FCS a 10%.

As VLPs do papilomavírus humano do tipo 6b foram cultivadas e purificadas de acordo com procedimentos de operação padrão. As partículas foram rotuladas com um fluorocromo.

O composto foi dissolvido novamente em água estéril até as
20 concentrações de 5 mM e foram usados frescos para o primeiro ensaio antes de serem congelados em -20°C. Ele foi então descongelado para o segundo ensaio.

ENSAIO DE ABSORÇÃO.

Um frasco T75 de células A431 foi lavado com 10 ml de
25 PBS/EDTA (0,05%) por 5 minutos em 37°C antes de ser tratado com 2 ml de tripsina por outros 5 minutos em 37°C. DMEM/FCS 10% (10 ml) foi adicionado às células, as células foram centrifugadas em 1000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente, e recolocadas em suspensão em meio completo a 3×10^5 células/ml em um tubo de 15 ml. As células foram

incubadas em 37°C por 2 horas com inversão a cada 20 minutos, de modo a possibilitar a re-expressão das proteínas superficiais das células. As células foram centrifugadas em 1000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente, e recolocadas em suspensão em DMEM livre de soro a 3×10^5 células/100 µl, e 100 µl da suspensão foram colocados em um tubo de 1,5 ml. O composto foi adicionado às células nas seguintes seis diluições em 10 µl de PBS: 100 µM, 10 µM, 1,0 µM, 100 nM, 10 nM, 1,0 nM.

As células foram incubadas com o composto por 30 minutos em 37°C antes que as VLPs rotuladas (200 ng) fossem adicionadas. Como um controle positivo, VLPs apenas foram adicionadas às células e o controle negativo foi de células com VLPs adicionadas, mas incubadas em gelo. As células foram misturadas e incubadas em 37°C por 2 horas. As células foram lavadas uma vez com 1 ml de PBS e fixadas em tampão FACS (P13S/formaldeído a 4%). A análise foi realizada em uma máquina FACS da Coulter.

ANÁLISE

Os resultados foram analisados usando-se WinList. Inicialmente, a dispersão dianteira/lateral foi usada para analisar o tamanho celular e as células vivas foram bloqueadas. As intensidades fluorescentes médias (MFI) deste bloqueio foram geradas e usadas para outras análises. A absorção foi relatada como o percentual em relação à ligação observada para as VLPs sozinhas (100%) em relação às células com VLPs incubadas sobre gelo (0%).

RESULTADOS

SPL-7013. A inibição máxima da absorção (26% de absorção) foi observada em 1 µM sem inibição adicional em maiores concentrações. Este composto ainda apresentou inibição da absorção em 1 µM e 10 nM. A absorção viral aumentou após este ponto com concentração decrescente de SPL-7013.

D. INFECÇÃO DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*. EFICÁCIA DO SPL-7013 EM UM MODELO ANIMAL.

Camundongos fêmeas (cepa MS) foram tratados ou no trato genital superior ou no inferior, com uma instilação de 15 µl de 100 mg/ml de solução de SPL-7013, 20 segundos antes da infecção com *C. trachomatis*. A infecção do trato genital inferior é definida pelo isolamento do organismo mediante cultura de amostras de mechas vaginais nos dias 3 ou 6 após a prova. Quanto à infecção do trato genital superior, a definição é isolamento do organismo mediante cultura do tecido do trato genital superior colhida no dia 10 após a prova. camundongos tratados com tampão PBS de fosfato foram usados como controles.

EFEITOS SOBRE A INFECÇÃO DE *C. TRACHOMATIS* DO TRATO GENITAL EM CAMUNDONGOS

Animais Protegidos Contra a Infecção

Grupo	Nº de animais	Tempo	Trato Inferior(%)	Trato Superior(%)
Grupo 1.				
SPL-7013	16	-20 s	8(50%) ^a	8(50%)
PBS	15	-20 s	1(7%)	2(13%)
Grupo 2.				
SPL-7013	16	-20 s	6(38%)	8(50%) ^a
PBS	16	-20 s	1(7%)	1(6%)

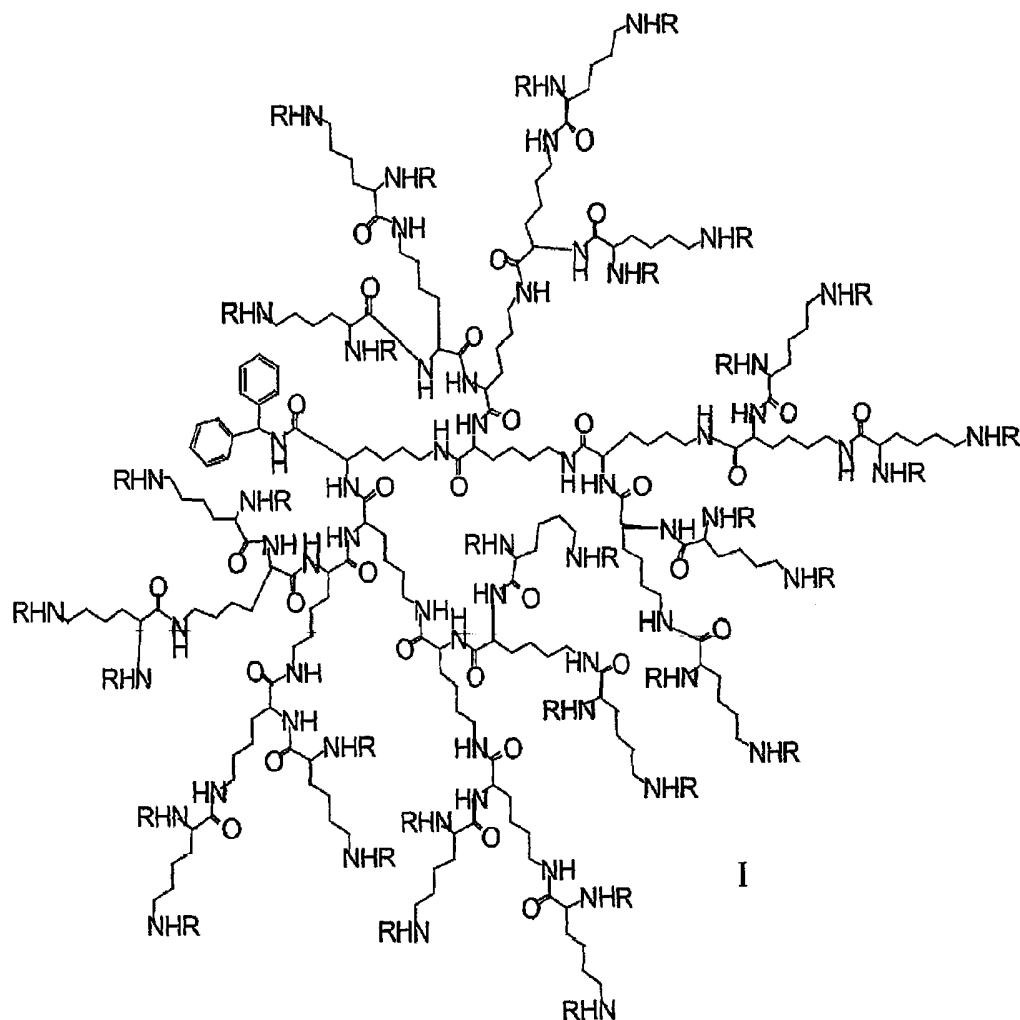
As pessoas versadas nesta ciência observarão que variações e modificações podem ser feitas na invenção conforme amplamente aqui descrita, outras que não aquelas especificamente descritas, sem que se afaste do espírito e escopo da invenção. Deve ficar entendido que esta invenção intenta incluir todas essas variações e modificações.

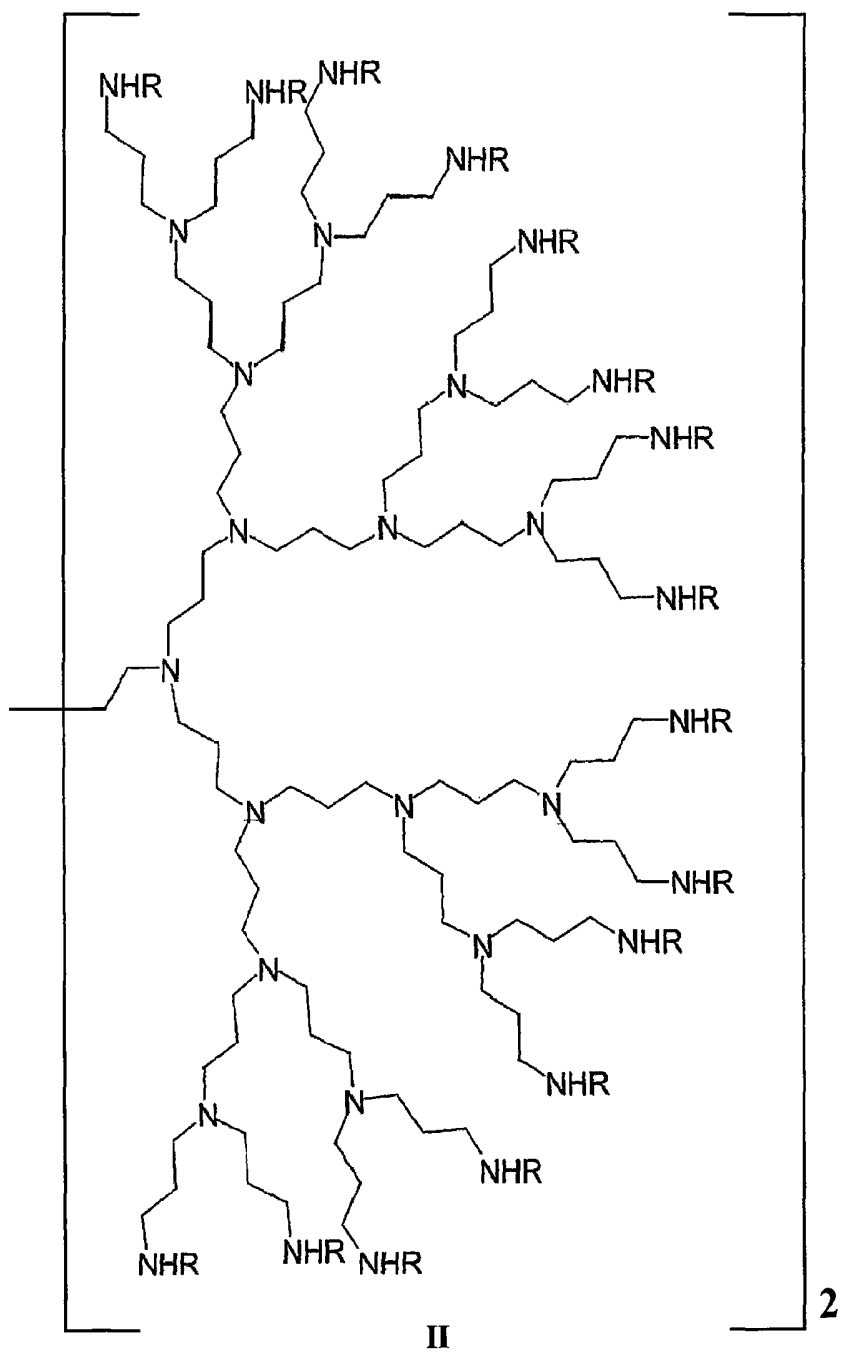
REFERÊNCIAS:

1. Popovic, M.; Sarngadharan, M. G.; Read, E.; Gallo, R. C. Detecção, isolamento e produção contínua do retrovírus citopático (HTLV-III) de pacientes com AIDS e pré-AIDS. *Science* (1984), 224: 497-500.
- 5 2. Clavel, E.; Guyader, M.; Guetard, D.; Salle, M.; Montagnier, L.; Alizon, H. Clonagem molecular e polimorfismo do vírus de imunodeficiência humana do tipo 2. *Nature* (1986), 324: 691-695.
3. Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, M. R.; Schols, D.; Herdewijn, R.; Desmyter, J.; De Clercq, E. Ensaio colorimétrico
10 rápido e automatizado à base de tetrazólio, para a detecção de compostos anti-HIV. *J. Virol. Methods* (1988), 20: 309-321.
4. Clanton *et al.*, *J. AIDS*. (1992), 5: 771.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de ser das fórmulas I, II ou III:





[O-]S(=O)(=O)c1ccc2c(c1)c(c3cc(S(=O)(=O)[O-])cc3)cc(OC(=O)C*)c2

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que referido sal farmacêuticamente aceitável é selecionado de

sais metálicos tais como os sais de alumínio, cálcio, lítio, magnésio, potássio, sódio e zinco, e os sais orgânicos com aminas orgânicas tais como N,N'-dibenziletlenodiamina, cloroprocaína, dietanolamina, etilenodiamina, dicitloexilamina, meglumina (N-metilglucamina) e procaína, ou aminas quaternárias tais como a colina, e sais de sulfônio e de fosfônio.

3. Composto, caracterizado pelo fato de ser de fórmula (I) como definido na reivindicação 1 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

4. Composto, caracterizado pelo fato de ser de fórmula (II) como definido na reivindicação 1, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

10 5. Composto, caracterizado pelo fato de ser de fórmula (III) como definido na reivindicação 1, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

6. Composição farmacêutica tópica para tratamento profilático ou terapêutico de doenças sexualmente transmitidas em um paciente humano, caracterizada pelo fato de que compreende um composto como definido em
15 qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, em associação com pelo menos um portador ou diluente tópicos farmaceuticamente aceitáveis.

7. Uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para administração tópica no tratamento profilático ou
20 terapêutico de doenças sexualmente transmitidas em um paciente humano.

8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que referida doença é uma doença sexualmente transmitida por via vaginal ou retal, selecionada da infecção de HSV-1, HSV-2, HIV-1, HIV-2 e HPV, e da infecção de *Chlamydia trachomatis*.

RESUMO

“COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA TÓPICA PARA
TRATAMENTO PROFILÁTICO OU TERAPÊUTICO DE DOENÇAS
SEXUALMENTE TRANSMITIDAS EM UM PACIENTE HUMANO, E,
5 USO DE UM COMPOSTO”

Uso de um dendrímero de polilisina, poliamidoamina ou polipropilenimina tendo grupos terminais de dissulfonato de naftila como um agente topicamente aplicado na profilaxia ou tratamento de doenças sexualmente transmitidas.