(11) Número de Publicação: **PT 2579871 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 31/375 (2015.01) ***A61K 31/675*** (2015.01)
A61P 31/22 (2015.01)

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

(22) Data de pedido: **2011.06.07**

(30) Prioridade(s): **2010.06.11 US 354050 P**
2010.06.23 US 357892 P
2010.12.22 US
201061426373 P

(43) Data de publicação do pedido: **2013.04.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.08.26**
225/2015

(73) Titular(es):
GILEAD SCIENCES, INC. **US**
333 LAKESIDE DRIVE FOSTER CITY, CA 94404
QUARRAISHA ABDOOL KARIM **ZA**
ABDOOL KARIM, SALIM S. **ZA**
AYESHA KHARSANY **ZA**

(72) Inventor(es):
QUARRAISHA ABDOOL KARIM **ZA**
AYESHA KHARSANY **ZA**
SALIM S. ABDOOL KARIM **ZA**
TOMAS CIHLAR **US**
JAMES FRANCIS ROONEY **US**

(74) Mandatário:
JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA
RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **FORMULAÇÕES ANTIVIRAIS TÓPICAS PARA A PREVENÇÃO DA TRANSMISSÃO DO HSV-2**

(57) Resumo:
A PRESENTE INVENÇÃO RELACIONA-SE COM FORMULAÇÕES DE COMPOSTOS ANTIVIRAIS, EM PARTICULAR O ÁCIDO [2-(6-AMINOPURIN- 9-IL)-1-METIL-ETOXIMETIL]-FOSFÓNICO (TENOFOVIR, PMPA), ADEQUADAS PARA A APLICAÇÃO TÓPICA, E À SUA UTILIZAÇÃO NA REDUÇÃO OU NA PREVENÇÃO DA AQUISIÇÃO E TRANSMISSÃO DO VÍRUS HERPES SIMPLEX.

RESUMO

FORMULAÇÕES ANTIVIRAIS TÓPICAS PARA A PREVENÇÃO DA TRANSMISSÃO DO HSV-2

A presente invenção relaciona-se com formulações de compostos antivirais, em particular o ácido [2-(6-amino-purin-9-il)-1-metil-etoximetil]-fosfónico (tenofovir, PMPA), adequadas para a aplicação tópica, e à sua utilização na redução ou na prevenção da aquisição e transmissão do vírus herpes simplex.

DESCRIÇÃO

FORMULAÇÕES ANTIVIRAIS TÓPICAS PARA A PREVENÇÃO DA TRANSMISSÃO DO HSV-2

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se genericamente a formulações de compostos com atividade antiviral, para a utilização na prevenção da aquisição e da transmissão do vírus herpes simplex (HSV-1 e HSV-2), em particular de HSV-2.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) e as doenças relacionadas são um importante problema de saúde pública a nível mundial. Apesar de terem sido feitos grandes avanços no prolongamento da vida de pacientes com SIDA por tratamento com agentes antivirais, não há nenhuma cura absoluta.

O vírus herpes simplex 2 (HSV-2) é uma outra doença que é um importante problema de saúde pública a nível mundial. Estima-se que o HSV-2 está presente em 20 % dos adultos sexualmente ativos em todo o mundo, e em homens e mulheres sobrecarregados com VIH a prevalência da infeção por HSV-2 pode subir para 80 %. É a causa mais comum da doença ulcerosa genital, mas é quase inteiramente assintomática.

Foi demonstrado que existe uma relação significativa entre as epidemias de transmissão sexual do VIH e do HSV-2, em que a presença do HSV-2 facilita a aquisição do VIH. Veja-se, por exemplo, "The effects of herpes simplex virus-2 on HIV acquisition and transmission", J. Acquir. Immune Defic. Syndr., 2004; 35 (5), por Lawrence Corey et al., onde é divulgado que mais de 30 estudos epidemiológicos demonstraram que o HSV-2 prevalente está associado com um risco de 2 a 4 vezes maior de transmissão e aquisição do VIH.

Por conseguinte, uma abordagem para o problema de aquisição de VIH/SIDA e de doenças relacionadas seria reduzir o risco de transmissão do VIH e do HSV-2, a fim de reduzir o número de indivíduos que são infetados. Para além disso, dado que em muitos países as mulheres são desproporcionalmente afetadas pela infeção pelo VIH em comparação com os homens (a transmissão do VIH de homens para mulheres é estimada ter 7 vezes maior eficiência em relação à de mulheres para homens), uma abordagem preferida seria proporcionar composições que sejam eficazes contra o VIH e o HSV-2 e possam ser usadas por mulheres com ou sem o consentimento ou conhecimento dos seus parceiros.

O ácido [2-(6-amino-purin-9-il)-1-metil-etoximetil]-fosfónico (tenofovir, PMPA) é um composto bem conhecido com atividade antirretroviral potente, útil no tratamento de pacientes com SIDA. Veja-se, por exemplo, W02006/017044, em que é divulgada uma formulação de gel de tenofovir. Os resultados de um ensaio clínico recente realizado na África do Sul com esta formulação de gel de tenofovir confirmam a proposta de que a formulação é eficaz na prevenção da transmissão do VIH (Abdool Karim et al., Science 2010; 329: 1168-1174), e também demonstraram que a mesma formulação de gel de tenofovir é eficaz em retardar e/ou prevenir a transmissão do HSV-2. Isto é surpreendente, dado que, embora as publicações anteriores tenham indicado que o tenofovir é conhecido por ser um agente antirretroviral potente, não era anteriormente conhecido como sendo eficaz como um agente anti-herpético (veja-se, por exemplo, "Differential antiherpesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Feb. 1993, p 312-338, por J. Balzarini et al., Noesans et al., Antiviral Chemistry and Chemotherapy 8(1), p 1-23 (1977) e De Clerq et al., Clinical Microbial

Reviews, Vol. 16, No 4, p 569-596 (2003).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se com formulações de compostos com atividade antiviral, em particular o ácido [2-(6-amino-purin-9-il)-1-metil-etoximetil]-fosfónico (tenofovir, PMPA), adequadas para a aplicação tópica (por exemplo, vaginal, retal, etc.) e a sua utilização em retardar e/ou prevenir a aquisição e transmissão de infeções de HSV-2.

Na presente invenção, a formulação é um gel que é aplicado vaginalmente a uma fêmea humana. O gel é aplicado antes da atividade sexual, ou após a atividade sexual, ou antes e depois da atividade sexual, uma vez ou duas vezes por dia. Uma forma de realização da formulação de gel compreende uma mistura de tenofovir, hidroxietilcelulose, propilparabeno, metilparabeno, edetato dissódico, glicerina, ácido cítrico e água purificada até 100 %, com a adição de uma pequena quantidade de 10 % p/p de hidróxido de sódio e de 10 % p/p de ácido clorídrico diluído para ajustar o pH para cerca de 4,4. Num exemplo, a formulação de gel compreende:

Ingrediente	(% p/p)
Tenofovir	0,2 - 2,00
Hidroxietilcelulose, NF (Natrasol®250H)	1 - 5,0
Propilparabeno, NF	0,01 - 0,10
Metilparabeno, NF	0,1 - 0,25
Edetato dissódico, USP	0,02 - 0,10
Glicerina, USP	3,00 - 30,00
Ácido cítrico, USP	0,5 - 2,00
Água purificada, USP	para 100 %

com a adição de uma pequena quantidade de 10 % p/p de hidróxido de sódio e de 10 % p/p de ácido clorídrico diluído para ajustar o pH para cerca de 4,4.

Uma forma de realização da formulação de gel

compreende:

	% p/p
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulose, NF (Natrasol®250H)	2,50
Propilparabeno, NF	0,02
Metilparabeno, NF	0,18
Edetato dissódico, USP	0,05
Glicerina, USP	20,00
Ácido cítrico, USP	1,00
Água purificada, USP	75,25
Total	100,00

com a adição de uma pequena quantidade de 10 % p/p de hidróxido de sódio e de 10 % p/p de ácido clorídrico diluído para ajustar o pH para um alvo de 4,4.

Uma segunda forma de realização da formulação de gel compreende:

	% p/p
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulose, NF (Natrasol®250H)	3,0
Propilparabeno, NF	0,005
Metilparabeno, NF	0,22
Edetato dissódico, USP	0,05
Glicerina, USP	5,0
Ácido cítrico, USP	1,00
Água purificada, USP	89,66
Total	100,00

com a adição de uma pequena quantidade de 10 % p/p de hidróxido de sódio e de 10 % p/p de ácido clorídrico diluído para ajustar o pH para um alvo de 4,4.

Uma terceira forma de realização da formulação de gel compreende:

	% p/p
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulose, NF (Natrasol®250H)	3,25
Propilparabeno, NF	0,005
Metilparabeno, NF	0,22
Edetato dissódico, USP	0,05
Glicerina, USP	5,0
Ácido cítrico, USP	1,00
Água purificada, USP	89,41
Total	100,00

com a adição de uma pequena quantidade de 10 % p/p de hidróxido de sódio e de 10 % p/p de ácido clorídrico diluído para ajustar o pH para um alvo de 4,4.

Uma quarta forma de realização da formulação de gel compreende:

	% p/p
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulose, NF (Natrasol®250H)	3,5
Propilparabeno, NF	0,005
Metilparabeno, NF	0,22
Edetato dissódico, USP	0,05
Glicerina, USP	5,0
Ácido cítrico, USP	1,00
Água purificada, USP	89,16
Total	100,00

com a adição de uma pequena quantidade de 10 % p/p de hidróxido de sódio e de 10 % p/p de ácido clorídrico diluído para ajustar o pH para um alvo de 4,4.

Outra forma de realização da invenção refere-se ao ácido (R)-(1-(6-amino-9H-purin-9-il) propan-2-iloxi) metilfosfónico para a utilização na redução ou na prevenção da transmissão de HSV-2 a um mamífero e para a

utilização na redução ou na prevenção da aquisição de HSV-2 por um mamífero, particularmente quando o ácido (R)-(1-(6-amino-9H-purin-9-il) propan-2-iloxi) metilfosfónico é formulado como um gel, em que a formulação compreende:

	% p/p
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulose, NF (Natrasol®250H)	2,50
Propilparabeno, NF	0,02
Metilparabeno, NF	0,18
Edetato dissódico, USP	0,05
Glicerina, USP	20,00
Ácido cítrico, USP	1,00
Água purificada, USP	75,25
Total	100,00

Esta invenção refere-se genericamente a composições e a métodos que previnem e/ou reduzem o risco de transmissão do HSV-2 por meio da atividade sexual. Embora sejam principalmente dirigidas a conduta heterossexual (isto é, relação sexual vaginal sexo masculino / feminino), as composições da presente invenção também são úteis para as partes envolvidas em outros tipos de comportamento sexual. Por exemplo, as composições da presente invenção podem ser usadas por partes envolvidas em relações sexuais anais (sexo masculino / feminino ou masculino / masculino); as composições da presente invenção destinadas a serem utilizadas em relações sexuais anais são de preferência modificadas para ajustar a capacidade de tamponamento para valores de pH encontrados normalmente no reto e por alteração da capacidade de lubrificação da formulação.

Para a relação sexual vaginal heterossexual, a composição pode ser inserida na vagina antes da relação sexual. Para a relação sexual anal (heterossexual ou homossexual), a composição pode ser inserida no reto antes da relação sexual. Para qualquer uma das relações sexuais

vaginal ou anal, a composição pode também atuar como um lubrificante. Para proteção adicional é geralmente preferido que a composição seja aplicada antes da relação sexual ou de outra atividade sexual e que, se for caso disso, seja utilizado um preservativo. Para ainda mais proteção, a composição pode ser aplicada novamente tão rapidamente quanto possível após a conclusão da atividade sexual.

Se desejado, podem ser incorporados na composição aromatizantes, aromas, fragrâncias, e corantes, desde que não interfiram com a segurança e a eficácia da composição. Com efeito, a incorporação de tais aromatizantes, aromas, fragrâncias, e corantes nas composições da presente invenção podem aumentar a probabilidade de a composição vir a ser utilizada durante a atividade sexual.

Uma vantagem do presente método é que pode ser utilizado para proteção durante uma ampla variedade de atividades sexuais (vaginal ou anal) por heterossexuais, bissexuais e homossexuais. Outra vantagem do presente método de reduzir a transmissão do HSV-2 é que este método pode ser implementado e/ou utilizado com mais facilidade pela parte a ser penetrada. Assim, uma mulher pode usar o presente método para se proteger (assim como o seu parceiro), com ou sem o conhecimento do parceiro do método a ser utilizado. Para além disso, o parceiro não seria obrigado a confiar na afirmação do seu parceiro ou parceira de ser livre de SIDA ou acordo para usar o preservativo para proteção. Cada uma ou ambas as partes sexuais (especialmente a participante do sexo feminino) poderia iniciar e implementar a utilização do presente método. De preferência, o método é usado antes da atividade sexual e mais preferivelmente tanto antes como depois da atividade sexual.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Recentemente, em vez de testar novos compostos como

potenciais microbicidas, o tenofovir, um nucleótido inibidor da transcriptase reversa (RT) do VIH altamente seletivo e eficiente amplamente usado na terapia do VIH, foi formulado como um gel de 1 % e testado num estudo controlado por placebo, duplo cego com cerca de 900 mulheres africanas. Os resultados deste estudo mostraram uma diminuição global de 39 % na frequência da transmissão sexual do VIH-1. Este efeito profilático aumentou ainda mais para uma redução de 54 % da transmissão entre as mulheres com elevada adesão ao tratamento com tenofovir. Assim, este ensaio foi o primeiro exemplo de um microbicida que diminui de forma convincente a transmissão do VIH-1.

Surpreendentemente, também foi observada no ensaio uma redução significativa de 51 % do risco de aquisição do vírus herpes simplex tipo 2 (HSV-2). Esta observação é importante, uma vez que o HSV-2 é um copatógenio comum com o VIH-1, o que facilita a transmissão do VIH, presumivelmente através da indução de ulceração genital e inflamação. Este efeito do gel de tenofovir no HSV foi inesperado, uma vez que este fármaco antirretroviral e anti-hepadnaviral altamente potente foi previamente mostrado exibir atividade mínima, se alguma, *in vitro* contra o HSV e a maioria dos outros vírus de ADN.

O presente estudo fornece provas de que as concentrações obtidas intravaginalmente pela administração tópica de um gel de 1 % de tenofovir são equivalentes às que inibem a replicação do HSV-1 e HSV-2 em várias linhas celulares e tipos de células primárias. Assim, a atividade anti-herpética do tenofovir observada no ensaio clínico é um resultado do seu efeito anti-herpético direto.

Será feita agora referência em detalhe a certas formas de realização da invenção. Enquanto a invenção será descrita em conjunto com as formas de realização enumeradas, será entendido que estas não se destinam a

limitar a invenção a essas formas de realização. Pelo contrário, a invenção destina-se a cobrir todas as alternativas, modificações e equivalentes, que possam ser incluídas dentro do âmbito da presente invenção tal como definida pelas reivindicações.

DEFINIÇÕES

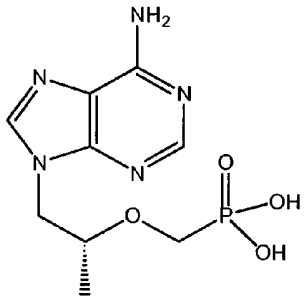
Salvo indicação em contrário, os seguintes termos e frases tal como são aqui utilizados, destinam-se a ter os significados que se seguem:

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um composto que, quando administrada a um sujeito para o tratamento de uma doença, é suficiente para o efeito de tratamento para a doença. A "quantidade terapeuticamente eficaz" pode variar dependendo do composto, da doença e da sua gravidade, da idade, do peso, etc., do sujeito a ser tratado.

"Biodisponibilidade" é o grau em que o agente farmaceuticamente ativo se torna disponível ao tecido alvo após a introdução do agente no corpo. A melhoria da biodisponibilidade de um agente farmaceuticamente ativo pode fornecer um tratamento mais eficiente e eficaz para os pacientes porque, para uma dada dose, mais do agente farmaceuticamente ativo estará disponível nos locais do tecido alvo.

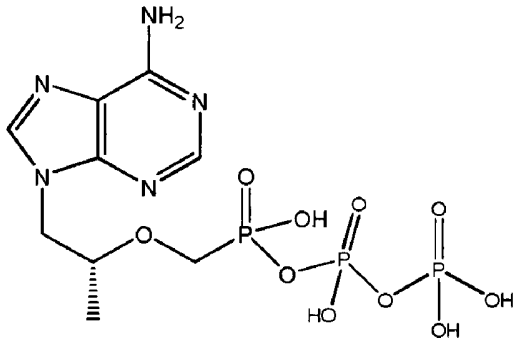
Os compostos das combinações da invenção podem ser referidos como "ingredientes ativos" ou "agentes farmaceuticamente ativos".

O PMPA ou tenofovir (patentes US N.ºs 4 808 716, 5 733 788, 6 057 305) tem a estrutura:



Os nomes químicos do PMPA, tenofovir incluem: (R)-9-(2-fosfonilmetoxipropil) adenina; ácido (R)-(1-(6-amino-9H-purin-9-il) propan-2-iloxi) metilfosfónico; e ácido fosfónico, [[(1R)-2-(6-amino-9H-purin-9-il)-1-metil-etoxi] metil]. O número de registo CAS é 147127-20-6.

O difosfato de tenofovir tem a estrutura:



e é denominado por anidrido difosfórico (R)-(1-(6-amino-9H-purin-9-il) propan-2-iloxi) metilfosfónico.

Também é divulgada a administração tópica da formulação ao ânus. Também é divulgada a aplicação oral, que é adequadamente levada a cabo através da aplicação de uma composição que está na forma de um elixir ou gargarejo. A aplicação oral é especialmente preferida para prevenir a infeção durante os procedimentos dentários. Adequadamente, a composição é aplicada imediatamente antes do início do procedimento dentário e periodicamente durante todo o procedimento.

A presente invenção também inclui formulações que são aerossóis, espumas, geleias, cremes, supositórios,

comprimidos, tampões, etc., e a utilização de um preservativo que é revestido com a formulação. Numa forma de realização preferida, o preservativo é revestido com um lubrificante ou agente potenciador da penetração que compreende um composto antiviral, de um modo preferido o tenofovir. Os lubrificantes e os agentes potenciadores da penetração são descritos nas patentes US N.os 4 537 776; 4 552 872; 4 557 934; 4 130 667, 3 989 816; 4 017 641; 4 954 487; 5 208 031; e 4 499 154.

EXEMPLOS

Os exemplos que se seguem descrevem ainda e demonstram formas de realização particulares dentro do âmbito da presente invenção. Os exemplos são dados somente para ilustração e não são para ser interpretados como limitações uma vez que são possíveis muitas variações sem se afastarem do âmbito das reivindicações. Os exemplos que se seguem são destinados apenas para ilustração e não se destinam a limitar o âmbito da invenção de nenhuma forma. O "ingrediente ativo" designa um ou mais NRTI, tal como definido anteriormente, preferencialmente o tenofovir ou um derivado fisiologicamente funcional do mesmo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Células. Os fibroblastos de pulmão embrionário humano (HEL) (HEL-299; ATCC CCL-137) foram cultivados em meio MEM de Earle (Gibco, Invitrogen Corporation, RU) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FCS), 1 % de L-glutamina, 1 % de aminoácidos não essenciais e 1 % de piruvato de sódio. Os queratinócitos primários humanos (PHK) foram isolados a partir de prepúcio neonatal. Os fragmentos de tecido foram incubados com tripsina – EDTA durante 1 h a 37 °C. As células epiteliais foram separadas e cultivadas em meio livre de soro de queratinócitos (queratinócito – SFM), (Gibco, Invitrogen Corporation, RU), contendo os suplementos que se seguem: 0,5 µg de hidrocortisona por ml, 10 ng de fator de crescimento epidérmico por ml, 2 mM

de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio, $1x10^{-10}$ M de toxina da cólera, 5 µg de insulina por ml, 5 µg de transferrina humana por ml e $15x10^{-4}$ mg de 3,3',5-triiodo-2-tironina por ml. Os PHK foram usados em monocamadas para os ensaios antivirais e para a preparação de culturas organotípicas raft. As células TZM-bl foram gentilmente cedidas pelo Dr. G. Van Ham (ITG, Antuérpia, Bélgica).

Vírus. As estirpes de HSV-1 KOS e F e as estirpes de HSV-2 G e MS foram utilizadas como vírus herpes de referência. Foram usadas várias estirpes clínicas de HSV-1 do tipo selvagem (wt) [RV-6, RV-132, RV-134, C559143], HSV-1 deficiente em timidina quinase (TK^-) [RV-36, RV-117, 328058], HSV-2 wt [RV-24, RV-124,NA, PB, NS, HSV-47] e HSV-2 TK^- [RV-101, RV-129, 19026589, LU, HSV-44] isoladas a partir de indivíduos infetados com vírus na Bélgica. A estirpe VIH-1 III_B foi fornecida por R.C. Gallo (na época no National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Compostos. As fontes dos compostos foram as que se seguem: aciclovir [ACV, 9-(2-hidroxietoximetil) guanina], GlaxoSmithKline, Stevenage, RU; ganciclovir [GCV, 9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil) guanina, Roche, Basileia, Suíça; penciclovir [PCV, 9-(4-hidroxi-3-hidroximetilbut-1-il) guanina], Aventis, Frankfurt, Alemanha; brivudin [(E)-5-(2-bromovinil)-1-(-D-2'-desoxiribofuranos-1-il-uracilo, BVDU], Searle, RU; (S)-HPMPC [cidofovir, CDV, (S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) citosina], PMEA, [adefovir, ADV, 9-[2-(fofonilmetoxietil) adenina] e (R)-PMPA [tenofovir, TFV, (R)-9-[2-(fofonilmetoxipropil) adenina]] Gilead Sciences, Foster City, CA. O difosfato de tenofovir (TFV-DP) e o trifosfato de aciclovir (ACV-TP) foram obtidos de Moravek Biochemicals, Brea, CA.

Radioquímicos. [^{3}H] tenofovir (radioespecificidade: 15 Ci/mmol), [8-^{3}H] dGTP (radioespecificidade: 17,9 Ci/mmol) e [2,8-^{3}H] dATP ((radioespecificidade: 153 Ci/mmol) foram

obtidos de Moravek Biochemicals (Brea, CA).

Ensaio de redução do efeito citopático (CPE) de HSV. Foram usadas células HEL e PHK para realizar o ensaio de redução do CPE. Ambos os tipos de células foram cultivados em placas de microtitulação de 96 poços no seu meio de crescimento correspondente. As monocamadas confluentes foram infetadas com cada uma das estirpes virais a 100 $CCID_{50}$ (1 $CCID_{50}$ corresponde à diluição de stock de vírus que é infecioso para 50 % das culturas de células). O meio utilizado para permitir a infeção viral e o crescimento em células HEL foi o meio de MEM de Earle contendo 2 % de FCS. Após um período de adsorção de 2 h, o vírus residual foi removido e as células infetadas foram adicionalmente incubadas em meio contendo diluições em série dos compostos de ensaio (em duplicado). Após 2 a 3 dias de tempo de incubação, a citopaticidade (CPE) viral foi avaliada visualmente, e foi determinada a concentração eficaz de 50 % [EC_{50}, a concentração de composto necessária para reduzir a CPE viral em 50 %]. As EC_{50} dos compostos testados contra cada estirpe viral foram calculadas como os valores médios de pelo menos duas experiências independentes. Os ensaios foram realizados de uma forma semelhante em PHK, com a exceção de que foi usado o meio F12 de [uma mistura de 1/3 de HAM F12 e de 2/3 de meio de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FCS), 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio, 5 ml de 100x antibiótico-antimicótico por litro (Gibco, Invitrogen Corporation)] para a infeção viral e foi adicionada uma mistura 50/50 (v/v) de queratinócito - SFM e de meio Dulbecco-F12 após a adsorção viral.

Infeção pelo vírus do herpes de culturas primárias de células de monócitos / macrófagos. As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram obtidas a partir do sangue de dadores saudáveis

seronegativos por centrifugação de gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque. As PBMC foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 20 % de soro fetal bovino (FCS) inativado por calor (56 °C, 30 min), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/l) e L-glutamina (2 mM), em seguida foram plaqueadas em placas de 48 poços ($1,8x10^6$ células / poço). As células de monócito / macrófago (M/M), foram separadas por aderência sobre o plástico. Após 5 dias, as células não aderentes foram removidas cuidadosamente por lavagens suaves repetidas com meio morno, e as M/M aderentes (95 % puras) foram cultivadas durante mais 3 dias para amadurecer e para formar uma monocamada. As células fibroblastóides de rim de macaco verde africano (Vero) altamente sensíveis ao efeito citopático do HSV-2 foram crescidas em meio RPMI suplementado com 10 % de FCS inativado por calor e foram usadas em ensaios de titulação de vírus infeciosos. Para avaliar a atividade anti-HSV2 do tenofovir em macrófagos humanos, o composto foi adicionado aos macrófagos 1 hora antes da infeção com concentrações crescentes (0,04, 0,2, 1, 5, 20, 100 ou 500 µg/ml). Do mesmo modo, as culturas de macrófagos foram tratadas com diferentes concentrações de adefovir (0,04, 0,2, 1, 5, 20 ou 100 µg/ml) ou aciclovir (0,008, 0,04, 0,2, 1, 5, 20 ou 100 µg/ml) utilizado como um fármaco controlo.

As culturas de macrófagos foram então infetadas com HSV-2 (100 $CCID_{50}$) na presença dos compostos de teste. Depois de 2 horas de adsorção do vírus, as culturas foram lavadas extensivamente para remover quaisquer partículas de vírus residuais. Foram então adicionados às culturas meio de cultura fresco e compostos, nas concentrações indicadas. O tenofovir, o adefovir e o aciclovir foram mantidos durante toda a experiência. Foram também executados para cada experiência controlos positivos apropriados (M/M infetadas mas não tratadas) e negativos

infetados de forma simulada (M/M não infetadas e não tratadas). Todos os ensaios foram realizados em triplicado. O efeito citopático nos macrófagos foi monitorizado diariamente por observação microscópica e foi concluído no dia 5 - 6 após a infeção. Por conseguinte, o efeito inibitório potencial dos compostos sobre a replicação de HSV-2 foi avaliada 6 dias após a infeção. A quantidade de vírus infecioso nos sobrenadantes foi determinada por um ensaio de diluição limitada clássico em culturas de células Vero. Os títulos de vírus produzido foram calculados de acordo com o método de Reed e Muench e expressos como dose infeciosa para 50 % da cultura de tecidos por ml ($TCID_{50}$/ml).
A capacidade de inibição foi expressa em % e calculada considerando como valor 100 sendo a produção de vírus em culturas não tratadas infetadas com vírus.

Coinfecção de células TZM-bl com VIH-1 e HSV-2. A linha celular TZM-bl é derivada a partir de células HeLa e expressa níveis elevados de CD4, CCR5 e CXCR4. Para além disso, esta linha celular é transduzida de forma estável com uma luciferase firefly conduzida por LTR e o gene da galactosidase de *E. coli* (15). Numa placa de 96 poços foram plaqueadas 10.000 células TZM-bl no dia 1. No dia 2, o sobrenadante foi aspirado e foram adicionados às culturas de células 100 µl de diluições em série de tenofovir. Em seguida, foram administrados 100 µl de uma suspensão de vírus que contém quer o VIH-1 (NL4.3) quer o HSV-2 (G) ou ambos os vírus em conjunto. Dois a três dias após a infeção, a infeção pelo VIH-1 foi monitorizada com base na determinação da atividade da luciferase. Para este fim, foram removidos 100 µl de sobrenadante da cultura e foram adicionados 100 µl de Bright-Glo Luciferase Assay Substrate (Promega, Madison, EUA). O sinal de luminescência foi medido utilizando o leitor de placas de microtitulação Safire 2 (Tecan, Mannedorf, Suíça). Também

foi incluída uma condição de controlo contendo apenas células infetadas de forma simulada para medir os níveis de fundo da luminescência. Três dias após a infeção, a citopaticidade induzida pelo HSV-2 foi registada microscopicamente com base na formação de células gigantes.

Culturas organotípicas raft epiteliais. Para a preparação de equivalentes epidérmicos foi feita uma solução de matriz de colagénio com colagénio misturado em gelo com meio F12 de HAM 10 vezes concentrado, 10 vezes de tampão de reconstituição e fibroblastos Swiss 3T3 J2. Foi vertido um mililitro da solução de matriz de colagénio nos poços de placas de microtitulação de 24 poços. Após o equilíbrio de gel com 1 ml de meio de crescimento durante a noite a 37 °C, foram plaqueadas $2,5x10^5$ células PHK sobre o topo dos géis e mantidas submersas durante 24 - 48 horas. Os rafts de colagénio foram levantados e colocados em grelhas de inox na interface entre o ar e o meio de cultura líquido. O meio de crescimento foi uma mistura de 1/3 de HAM F 12 e 2/3 de meio de Eagle modificado por Dulbecco, com os mesmos suplementos tal como utilizados para o queratinócito - SFM. As células epiteliais foram deixadas a estratificar, sendo o meio substituído a cada 2 - 3 dias. Para a avaliação dos efeitos antivirais dos compostos no sistema de raft, foram corridas em paralelo duas séries de rafts, uma para exame histológico e a outra para a quantificação da produção viral por um ensaio de redução de placa. Os rafts foram infetados com 5.000 PFU de estirpes de HSV-1 (KOS) ou de VIH-2 (G) após 10 dias pós-elevação e, em seguida, o meio foi substituído por meio contendo diferentes diluições dos compostos. O meio de crescimento que contém as diferentes concentrações dos compostos foi mudado dois dias mais tarde e 3 dias mais tarde (após 15 dias de diferenciação), uma série de rafts foi fixada em 10 % de formalina tamponada, foi embebida em

parafina e foi corada com hematoxilina e eosina para avaliação histológica. Outra série de rafts foi utilizada para quantificar a produção de vírus. Para esse efeito, cada raft foi congelado em 3 ml de solução salina de tampão fosfato (PBS) e foi descongelado para libertar o vírus do epitélio infetado. Os sobrenadantes foram clarificados por centrifugação a 1.800 rpm e foram titulados por um ensaio de placas em culturas de células HEL. Foi então calculada a produção de vírus em cada raft. Foram usados dois rafts para cada concentração de fármaco para determinar os efeitos dos compostos sobre a produção de vírus.

Tecidos humanos *ex vivo*. Os tecidos das amígdalas humanas foram obtidos de pacientes submetidos a amigdalectomia de rotina no Children's National Medical Center (Washington, DC) sob o protocolo aprovado pelo IRB. Os tecidos cervicais foram obtidos através do National Disease Research Interchange (NDRI, Filadélfia, PA). Os tecidos foram dissecados para blocos de cerca de 8 mm^3 e foram colocados em géis de esponja de colagénio em meio de cultura na interface ar - líquido, tal como descrito anteriormente (16). Resumidamente, os blocos de tecido foram cultivados em meio RPMI 1640 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) que contém 15 % de soro fetal bovino inativado por calor (FCS; Gemini Bio-Products, Woodland, CA).

Tecido das amígdalas: Para cada condição experimental, foram inoculados 27 blocos de tecido (9 blocos / poço / 3 ml de meio completo) com 5 µl de stock viral do HSV-1 (estirpe F) ou do HSV-2 (estirpes G e MS) (ATCC) colocados em cima de cada bloco de tecido. As experiências de coinfecção foram realizadas através da inoculação de blocos de tecido sequencialmente com 5 µl do HSV-2 (estirpe G) e 5 µl (0,5 ng de p24) de $X4_{LAI.04}$ (obtido a partir do Rush University Virology Quality Assurance Laboratory (Chicago, IL)). Em todas as experiências em que

foram utilizados tecidos das amígdalas, o tenofovir foi adicionado ao meio de cultura 12 h antes da infeção viral e reposto em cada mudança do meio de cultura.

Tecido cervico-vaginal: Para cada condição experimental foram imersos 16 blocos de tecido em 500 µl de uma suspensão do HSV-2 (estirpe G), durante 2 horas a 37 °C, foram lavados três vezes com PBS e, em seguida, foram colocados sobre os rafts de gelfoam. O tenofovir foi adicionado durante a infeção e reposto em cada mudança do meio de cultura. A replicação viral do herpes simplex foi avaliada pela libertação do ADN viral no meio de cultura tal como medida por PCR quantitativa em tempo real (17). A replicação do VIH-1 foi avaliada por meio da libertação do antigénio p24 da cápside utilizando um ensaio à base de grânulos (18).

Atividade antiviral *in vivo* do HSV-1 e do HSV-2 em ratinhos infetados. Ratinhos atímicos nu NMRI adultos (pesando ~ 20 g) foram escarificados na área lombo-sacra sobre uma superfície de cerca de 1 cm^2. Os ratinhos foram inoculados com $5x10^3$ PFU do HSV-1 (estirpe Kos) ou com $5x10^2$ do HSV-2 (estirpe G) em 50 µl por ratinho. As formulações tópicas a 1 % de tenofovir, adefovir e cidofovir foram preparadas em 100 % de dimetilsulfóxido ou num gel idêntico ao utilizado no ensaio CAPRISA 004. Em cada experiência, foi incluído como um controlo negativo um grupo de animais tratados com uma formulação de placebo que foi a mesma que a da formulação de ensaio sem o fármaco. No protocolo de tratamento, os animais foram administrados com tenofovir, adefovir ou cidofovir topicamente na formulação e concentração de fármaco indicada duas vezes por dia durante um período de cinco dias a partir de 1 - 2 h após a infeção. O dia da inoculação do vírus foi sempre considerado como o dia 0. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo K.U. Leuven Animal Care Committee. O desenvolvimento de

lesões e a mortalidade foram registados ao longo de um período de um mês. Os animais foram sacrificados quando ocorreu a perda de mais do que 30 % em peso do corpo ou o desenvolvimento de paralisia. As taxas de sobrevivência foram estimadas de acordo com o método de Kaplan - Meir e foram comparadas usando o teste de log - rank (Mantel - Cox) teste (GraphPad Prism).

Metabolismo do tenofovir em linfócitos CEM, fibroblastos HEL e culturas de células epiteliais TZM-bl. O metabolismo do tenofovir radiomarcado foi monitorizado tal como se segue: as células CEM, HEL ou TZM-bl foram plaqueadas a $4x10^5$, $5,1x10^5$ e $17x10^5$ células/ml, respetivamente, em frascos de cultura de 5 ml (25 cm^2) e foram incubadas com 2 µM de [2,8-^{3}H] tenofovir (10 µCi / frasco). O fármaco radiomarcado foi adicionado às culturas celulares durante 24 h a 72 h após o momento da inoculação das células. Neste ponto do tempo, as células foram centrifugadas (após o desprendimento do recipiente de cultura para as células HEL e TZM-bl) a 4 °C, foram lavadas cuidadosamente duas vezes com meio gelado (sem soro) e foram precipitadas com metanol frio a 60 %. Após a centrifugação a 10.000 rpm, o [^{3}H] tenofovir marcado radioativamente e os seus metabolitos nos sobrenadantes foram quantificados por análise de HPLC utilizando uma coluna de compressão radial Partisil-SAX-10 tal como descrito anteriormente (19). Os tempos de retenção para o [^{3}H] tenofovir, [^{3}H] tenofovir-MP e tenofovir-DP foram aproximadamente aos 5, 16 e 32 minutos.

Ensaio da polimerase de ADN do HSV-1 e da transcriptase reversa de VIH-1. A mistura de reação (40 µl) para os ensaios da polimerase de ADN do HSV-1 e a RT do VIH-1 continha 4 µl de Premix (200 mM de Tris.HCl, pH 7,5; 2 mM de DTT; 30 mM de $MgCl_2$), 4 µl de BSA (5 mg/ml), 1,6 µl de ADN de timo bovino ativado (1,25 mg/ml), 0,8 µl de dCTP (5 mM), 0,8 µl de dTTP (5 mM), 0,8 µl de dGTP (5

mM), 2 µl de [^{3}H] dATP marcado radioativamente (1 mCi/ml) (3,3 µM), 18 µl de H_2O e 4 µl de tenofovir-DP em diferentes concentrações (isto é, 200, 20, 2, 0,2 µM). A reação foi iniciada pela adição de 4 µl de ADN polimerase recombinante do HSV-1 (gentilmente cedida por M.W. Wathen (Pfizer, Kalamazoo, MI)) ou RT recombinante do VIH-1 (em 20 mM de Tris.HCl, pH 8,0; 1 mM de DTT; 0,1 mM de EDTA; 0,2 M de NaCl; 40 % de glicerol), e a mistura de reação foi incubada durante 60 minutos (ADN polimerase do HSV-1) ou 30 minutos (RT do VIH-1) a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 1 ml de TCA gelado a 5 % em 0,02 M de $Na_4P_2O_7.10H_2O$ para terminar a reação de polimerização, após o que o precipitado insolúvel em ácido (ADN marcado radioativamente) foi capturado em filtros de fibra de vidro Whatman tipo GF/C (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, RU) e foi ainda lavado com 5 % de TCA e etanol para remover o dATP radiomarcado livre. A radioatividade foi determinada num contador de cintilação líquida Perkin Elmer Tri-Carb 2810 TR.

RESULTADOS

Inibição da replicação do HSV-1 e do HSV-2 pelo tenofovir em vários tipos de células permissivas

A atividade do tenofovir contra as estirpes laboratoriais do HSV foi avaliada em primeiro lugar em monocamadas de células HEL e queratinócitos humanos primários (PHK) e foi comparada com a atividade anti-HSV do nucleósido (por exemplo, aciclovir, penciclovir, ganciclovir e brivudin) e análogos do fosfonato de nucleótido acíclico (ANP) (isto é, cidofovir e adefovir). O tenofovir inibiu a citopaticidade induzida por vírus com valores de EC_{50} de ~ 100 a 200 µg/ml contra o HSV-1 e o HSV-2 em PHK. Os valores de EC_{50} para o adefovir foram de 3,6 a 13 µg/ml e para o cidofovir de 0,63 a 4,4 µg/ml. Exceto para o brivudin, que é conhecido por ter uma atividade marcadamente inferior contra o HSV-2 do que

contra o HSV-1, os análogos de nucleósidos mostraram-se mais ativos do que qualquer dos análogos de fosfonato de nucleótido acíclico testados.

O tenofovir também foi avaliado lado-a-lado com os fosfonatos de nucleósidos acíclicos (ANP), adefovir e cidofovir, e com vários análogos de nucleósidos contra uma variedade de isolados clínicos do HSV-1 e do HSV-2, incluindo do tipo selvagem e estirpes de vírus resistentes ao aciclovir em culturas de células de fibroblastos HEL. O tenofovir inibiu os efeitos citopáticos de todos os isolados clínicos com valores médios de EC_{50} de 130 µg/ml (intervalo de 114 - 160 µg/ml), ≥ 166 µg/ml (intervalo de 117 - ≥ 200 µg/ml), ≥ 157 µg/ml (intervalo de 125 - ≥ 200 µg/ml), e 152 µg/ml (intervalo de 131 - 179 µg/ml) contra, respetivamente, HSV-1 wt, HSV-1 TK^- deficiente em timidina quinase, HSV-2 wt, e HSV-2 TK deficiente em timidina quinase. Quando testados em paralelo, o adefovir mostrou valores médios de EC_{50} que eram 20 a 32 vezes menores do que os observados para o tenofovir, enquanto que o cidofovir foi o ANP mais ativo com valores médios de EC_{50} variando entre 0,35 µg/ml e 0,67 µg/ml. Assim, os valores de EC_{50} anti-herpéticos para o tenofovir foram 181 a 474 vezes mais elevados do que para o cidofovir. Em contraste com os ANP testados que mostraram valores de EC_{50} semelhantes para os isolados clínicos TK- HSV do tipo selvagem e mutante, o aciclovir, o ganciclovir, o penciclovir e o brivudin perderam a sua atividade anti-herpética contra as estirpes de vírus do herpes deficientes em timidina quinase.

O tenofovir, o adefovir e o aciclovir também foram avaliados quanto à sua atividade anti-HSV-2 em culturas primárias de células de monócito / macrófago (M/M). A produção do vírus do herpes ascendeu até 2,8 ± $0,9x10^5$ $TCID_{50}$/ml nos sobrenadantes das culturas infetadas com vírus de controlo, resultando num efeito citopático (CPE)

de 90 - 100 % visível ao microscópio (Fig. 1). O tenofovir nas concentrações de 500 e 100 µg/ml suprimiu completamente a replicação do vírus sem qualquer sinal de CPE visível microscopicamente no dia 6 após a infeção por vírus. Aos 20 e 5 µg/ml, os títulos do vírus nos sobrenadantes da cultura foram mais do que um log inferior do que nos controlos não tratados, resultando em ~ 5 % e 30 % de CPE visível, respetivamente. Às concentrações de fármaco de 1 µg/ml ou 0,2 µg/ml não foi observado qualquer efeito protetor pronunciado do tenofovir ($2,5x10^5$ $TCID_{50}$/ml; ≥ 70 - 80 % de CPE) (Fig. 1). Tal como esperado, o adefovir foi mais ativo antiviral em M/M. Em concentrações de fármaco entre 500 e 5 µg/ml, não foram encontradas nas culturas de células nem partículas virais nos sobrenadantes nem CPE visível. Mesmo concentrações tão baixas de adefovir como 1 e 0,4 µg/ml reduziram marcadamente os títulos de HSV ($8,5x10^2$ e $5,4x10^3$ $TCID_{50}$/ml) e a CPE visível era de 5 % e 45 %, respetivamente. Tal como esperado, o fármaco anti-herpético estabelecido, aciclovir, revelou-se extremamente eficiente na inibição da replicação do vírus do herpes em culturas de células de M/M (supressão completa de vírus libertado nos sobrenadantes e sem citopaticidade visível a concentrações iguais ou superiores a 0,008 µg/ml).

Inibição da replicação do HSV-2 pelo tenofovir em culturas de células epiteliais TZM-bl infetadas pelo VIH

As células epiteliais TZM-BI são derivadas a partir de células HeLa transfetadas com os (co)recetores do VIH CD4, CXCR4 e CCR5. Estas podem ser infetadas tanto pelo VIH como pelo HSV. Nós coinfectamos estas células com VIH-1 (NL4.3) e HSV-2 (G) e monitorizamos a replicação do VIH através da expressão da luciferase conduzida por LTR (luminescência), e a replicação do HSV-2 por leitura microscópica de citopaticidade induzida por vírus. O tenofovir preveniu a infeção pelo HSV-2 em culturas

coinfetadas com uma concentração de fármaco de ~ 60 µg/ml, que é semelhante à concentração de tenofovir necessária para inibir isoladamente as culturas de células TZM-bl infetados pelo HSV-2. Para além disso, o VIH-1 foi igualmente suprimido pelo tenofovir na presença ou na ausência de uma infeção em curso do HSV-2 (dados não mostrados). Assim, sob as condições experimentais de dupla infeção por VIH-1 e HSV-2, cada um dos vírus não afetou a atividade antiviral do tenofovir contra o outro vírus.

Supressão da replicação viral pelo tenofovir em culturas organotípicas raft epiteliais

À medida que os queratinócitos diferenciados são as principais células alvo para a infeção produtiva do HSV *in vivo*, foi avaliada a atividade antiviral do tenofovir em culturas organotípicas raft de queratinócitos. Neste modelo de cultura tridimensional, os queratinócitos diferenciam-se totalmente, assemelhando-se assim fielmente ao estado do tecido *in vivo*. Nós comparamos neste sistema a capacidade do tenofovir, do adefovir e do cidofovir para reduzir a replicação do HSV. As culturas organotípicas raft epiteliais foram infetadas depois de 10 dias de diferenciação e foram tratadas com diluições em série dos compostos de teste. Quinze dias após o desprendimento (ou seja, após 5 dias de tratamento), os rafts foram processados para exame histológico e para quantificação viral. O exame histológico de secções de cultura mostraram um epitélio completamente diferenciado com camadas características em rafts de controlo, enquanto que os rafts infetados pelo HSV mostraram uma pronunciada infeção viral e propagação viral ao longo de todo o epitélio (Fig. 2). A infeção dos rafts com HSV produziu efeitos citopáticos, resultando em dilatação e degeneração reticular dos queratinócitos em conjunto com a ocorrência de corpos de inclusão eosinófilos intranucleares, formação de vesículas intraepiteliais típicas e multinucleação.

A análise morfológica das culturas organotípicas mostrou que o tratamento com o tenofovir a 200 µg/ml e a 50 µg/ml protegeu todo o epitélio contra a citopaticidade induzida por HSV-2, enquanto que a 20 µg/ml e a 5 µg/ml, o composto foi parcialmente protetor, com áreas de um epitélio normal e áreas com rafts destruídos (Fig. 2). A uma concentração de 2 µg/ml o tenofovir foi inativo contra o HSV-2. A administração do adefovir a ≥ 2 µg/ml e do cidofovir a 0,2 µg/ml resultou numa proteção completa do tecido epitelial (dados não mostrados). Não foram observados efeitos tóxicos, medidos como um aumento no número de células mortas ou alteração da diferenciação, na concentração mais elevada de todos os compostos testados (200 µg/ml para o tenofovir, e 50 µg/ml para o adefovir e o cidofovir). O efeito seletivo anti-HSV do tenofovir, do adefovir e do cidofovir foi também confirmado quando as culturas raft foram infetadas com uma estirpe de laboratório de HSV-1 de referência. Neste caso, foi observada uma proteção completa do efeito citopático induzido pelo vírus a uma concentração de 200 µg/ml de tenofovir, 2 µg/ml de adefovir, e ≥ 0,5 µg/ml de cidofovir. As concentrações baixas dos compostos resultaram em proteção parcial (isto é, 50 µg/ml de tenofovir) ou a destruição total (isto é, 20 µg/ml de tenofovir) do epitélio.

Para quantificar os efeitos antivirais do tenofovir em comparação com o adefovir e o cidofovir, foi determinado o rendimento de vírus por raft por PCR quantitativa. Tal como mostrado na Fig. 3, foi observada uma inibição dependente da concentração da produção viral por raft após o tratamento dos rafts com concentrações em série dos compostos. O tenofovir demonstrou uma redução de 2,6-log (HSV-1) e 5,4-log (HSV-2) na produção de vírus (unidades formadoras de placas (PFU)) na maior concentração testada (isto é, 200 µg/ml). A uma concentração de tenofovir de 50 µg/ml, foi observada uma redução no rendimento de vírus

por 0,81-log (HSV-1) e 1,75-log (HSV-2). Mesmo a 20 µg/ml, foi observada uma redução de 0,9-log na produção de vírus em rafts infetados com HSV-2. Concentrações baixas do composto não foram capazes de reduzir a replicação do vírus nos rafts. Tal como esperado, tanto o adefovir como o cidofovir revelaram-se mais ativos contra a replicação do HSV do que o tenofovir (Fig. 3A e 3B).

Supressão do vírus herpes simplex tipo 2 pelo tenofovir em tecido linfoide humano *ex vivo* infetado individualmente e em coinfetados com VIH-1

O efeito do tenofovir na replicação da estirpe F do HSV-1 (HSV-1_F), na estirpe G do HSV-2 (HSV-1_G) e na estirpe MS do HSV-2 (HSV-2_{MS}) foi investigado em tecidos infetados das amígdalas humanas *ex vivo* (Fig. 4). Este sistema suporta a replicação de vírus diferentes (17) sem estimulação exógena ou ativação. Após a inoculação neste sistema de tecido semelhante a *in vivo*, o HSV-1_F, o HSV-2_G ou o HSV-2_{MS} replicaram-se eficientemente tal como mostrado pela presença de ADN viral no meio de cultura que banha os blocos de tecido. Os tecidos de todos os dadores testados suportaram uma pronunciada infeção viral produtiva com uma acumulação média do ADN do genoma viral no meio de cultura ao longo dos 9 dias de cultura atingindo 7,8 log_{10} cópias de ADN / ml [intervalo interquartil (IQR) 7,1 - 8,1, n = 5], 7,25 log_{10} cópias / ml (IQR 7,2 - 7,9, n = 6) e 6,4 log_{10} cópias / ml (IQR 6,1 - 7,5, n = 3) para o HSV-1_F, o HSV-2_G e o HSV-2_{MS}, respetivamente.

Para testar o efeito do tenofovir na replicação do HSV, os blocos de tecidos das amígdalas humanas foram tratados durante a noite com as concentrações de fármaco variando de 3 a 240 µg/ml e foram infetados com HSV-1_F, HSV-2_G ou HSV-2_{MS}. O tenofovir foi mantido ao longo de todo o período de cultura e foi substituído com cada mudança de meio. O tenofovir suprimiu a replicação do HSV-1_F, do HSV-2_G e do HSV-2_{MS} de um modo dependente da dose com uma EC_{50} de 7

µg/ml [95 % de intervalo de confiança (CI): 10 - 44] para o HSV-1_F; 14 µg/ml (CI: 10 - 163) para o HSV-2_G (Fig. 4A), e 19 µg/ml (CI: 27 - 127) para o HSV-2_{MS}. Por conseguinte, o tenofovir à concentração de 66 µg/ml reduziu a replicação do HSV-1_F, do HSV-2_G e do HSV-2_{MS}, por respetivamente, 99 ± 0,1 %, 94 ± 7 % (Fig. 4A) e 89 ± 2 % em comparação com o tecido não tratado compatível com dador infetado ($p < 0,01$). No dia 9 após a infeção nos tecidos tratados com 66 µg/ml de tenofovir, a replicação do HSV-1_F tal como medida pela libertação de ADN viral no meio de cultura foi de 4 $\log_{10}$ cópias de ADN / ml (IQR 3,9 - 4,3) em comparação com 8 $\log_{10}$ cópias de ADN / ml (IQR 7,87 - 8,04) no tecido não tratado compatível com dador (n = 3). Do mesmo modo, no dia 9 após a infeção, a replicação do HSV-2_G e do HSV-2_{MS} resultou em 7,6 $\log_{10}$ cópias de ADN / ml (IQR 7,4 - 7,8) e 7,3 $\log_{10}$ cópias de ADN / ml (IQR 6,9 - 7,6), respetivamente, em tecidos não tratados, enquanto que foi 5,2 $\log_{10}$ cópias de ADN / ml (IQR 3,6 - 6,1, n = 14) e 5,8 $\log_{10}$ cópias de ADN / ml (IQR 5,7 - 6,1, n = 3) em tecidos dadores tratados compatíveis com 66 µg/ml de tenofovir.

Mesmo nas concentrações mais elevadas de fármaco, a supressão da replicação do HSV-1_F, do HSV-2_G e do HSV-2_{MS} não foi associada com depleção mensurável de linfócitos no tecido das amígdalas: não houve diferença estatisticamente significativa no número absoluto quer de células T totais ($CD3^+$), quer de células B totais ($CD19^+$) ou de subconjuntos de células T naive e de memória entre os tecidos tratados com 60 µg/ml de tenofovir e os tecidos não tratados compatíveis com dadores (n = 3, $p > 0,4$).

Para avaliar a atividade antiviral dupla do tenofovir contra o HSV-2 e o VIH-1, nós coinfectamos tecidos das amígdalas com o HSV-2_G e o VIH-1_{X4LAI} tal como descrito anteriormente (16) e tratamo-los com o tenofovir na concentração de 66 µg/ml ao longo de todo o período de

cultura. Nos tecidos de controlo não tratados, a libertação de ADN do HSV-2_G no meio de cultura foi de 7,3 log_{10} cópias / ml (IQR 6,8 - 7,4), enquanto que nos tecidos tratados com tenofovir compatíveis com dadores coinfetados com o VIH-1, a libertação de ADN do HSV-2_G no meio de cultura foi de 5 log_{10} cópias / ml (IQR 4,3 - 5,7, n = 6). Assim, nestes tecidos, 66 µg/ml de tenofovir suprimiram a replicação do HSV-2_G por 96 ± 1 % (n = 6; p < 0,01) (Fig. 4B). No dia 9 após a infeção, a replicação do VIH-1_{X4LAI} tal como medida pela libertação de p24 no meio de cultura foi totalmente suprimida em todos os tecidos testados (2462 ± 1117 pg/ml em controlos não tratados vs. 0 pg/ml em tecidos tratados com tenofovir compatíveis com dadores (Fig. 4B).

Para confirmar a especificidade da atividade antiviral do tenofovir no HSV-2_G, nós tratamos os tecidos com o potente inibidor da transcriptase reversa de nucleósido do VIH (NRTI), lamivudina, na concentração de 33 µg/ml. Em tecidos de dois dadores não encontramos nenhum efeito da lamivudina na replicação do HSV-2_G em comparação com tecidos infetados pelo HSV-2_G compatíveis com dadores não tratados (dados não apresentados). Tal como esperado, a lamivudina mostrou um efeito potente sobre a replicação do VIH-1. Assim, o efeito anti-herpético do tenofovir não é uma propriedade geral dos NRTI.

Para além disso, para avaliar possíveis efeitos imunomoduladores do tratamento do tenofovir em tecidos das amígdalas *ex vivo*, nós medimos a concentração de 20 citocinas (IL-1, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IFN, CCL3/MIP-1, CCL4/MIP-1, CCL20/MIP-3, CCL5/RANTES, CXCL12/SDF-1, TGF, TNF, CCL2/MCP-1, CCL11/Eotaxina, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10') em meio de cultura de tecidos compatíveis com dadores tratados durante 9 dias com tenofovir a uma concentração de 66 µg/ml. No dia 9 após a infeção não se verificaram diferenças significativas entre

as concentrações de qualquer uma das citocinas avaliadas em tecidos não tratados e em tecidos tratados com tenofovir ($p > 0,15$).

Supressão do HSV-2 pelo tenofovir em tecidos cérvico-vaginais humanos *ex vivo*

Para investigar a atividade anti-HSV do tenofovir em tecidos cérvico-vaginais foram cultivados blocos deste tecido tal como descrito anteriormente, foram inoculados com $HSV\text{-}2_G$ e foram tratado com o fármaco. O tenofovir na concentração de 166 µg/ml foi adicionado no momento da infeção por $HSV\text{-}2_G$ e foi mantido durante toda a duração da experiência, sendo reposto com cada mudança de meio. A replicação do $HSV\text{-}2_G$ foi avaliada pela libertação de ADN viral no meio de cultura que banha os blocos de tecido cérvico-vaginais (16 blocos por condição). Em tecidos de controlo não tratados com o tenofovir, a replicação viral foi detetada em tecidos de todos os 5 dadores testados com uma produção cumulativa média de 6,6 $\log_{10}$ cópias / ml (IQR 5,3 - 8,2) ao longo de 12 dias de cultura. Em tecidos cérvico-vaginais tratados com o tenofovir, a produção viral foi reduzida para 5,5 $\log_{10}$ cópias / ml (IQR 4,8 - 5,7, n = 5) (Fig. 4C e Fig. 4D), o que reflete uma redução de 78 ± 9 % quando foi feita a média das reduções da replicação do vírus em cada experiência ($p < 0,01$).

Atividade do tenofovir em ratinhos infetados com o HSV

O tenofovir, o adefovir e o cidofovir foram avaliados como anti-herpéticos em ratinhos infetados com o HSV-1 e o HSV-2 utilizando dois veículos diferentes - DMSO (Fig. 5) e um gel utilizado no estudo CAPRISA 004 (dados não apresentados). Todos os compostos foram administrados aos ratinhos infetados com o HSV-1 e o HSV-2 a uma concentração de 1 %, durante 5 dias, começando no dia da infeção. Tanto a morbilidade como as curvas de sobrevivência de ratinhos infetados com o HSV-1 e tratados com 1 % de tenofovir foram significativamente retardadas

em comparação com o grupo tratado com placebo. Tal como esperado, o adefovir provou ser mais eficaz, tanto nas formulações de DMSO (Fig. 5A) como de gel (dados não mostrados) em comparação com o tenofovir, uma vez que foi observada 80 % e 100 % de sobrevivência quando os animais receberam 1 % de adefovir em DMSO ou em gel, respetivamente. Deve ser mencionado que os ratinhos tratados com 1 % de adefovir na formulação de DMSO morreram sem o desenvolvimento de lesões na pele (Fig. 5a). O tratamento com o cidofovir, quer na formulação em DMSO quer em gel, protegeu completamento os ratinhos contra a mortalidade e morbilidade induzida por vírus.

Quando o tenofovir foi avaliado na formulação em DMSO contra o HSV-2, houve de novo uma diferença estatisticamente significativa nas curvas de sobrevivência e nas curvas de morbilidade entre o grupo que recebeu o tenofovir a partir do dia da infeção em relação ao grupo placebo. O tratamento de ratinhos infetados com o HSV-2 com 1 % de adefovir ou com 1 % de cidofovir resultou em 80 % e 100 % de proteção contra a mortalidade e a morbilidade por indução viral, respetivamente (Fig. 5B). Da mesma forma, quando formulado em gel a 1 %, o tenofovir atrasou o aparecimento de lesões relacionadas com o vírus do herpes e a morte subsequente dos animais (dados não mostrados). O cidofovir formulado em gel resultou em 80 % de proteção contra a morbilidade e a mortalidade induzidas pelo HSV-2, enquanto o adefovir, sob as mesmas condições experimentais, originou um atraso significativo no aparecimento de lesões e morte subsequente.

O tenofovir é convertido de forma eficiente no seu metabolito ativo antiviral em culturas de células de linfócitos, epitélio e de fibroblastos

A conversão metabólica do tenofovir no seu metabolito ativo antiviral (difosforilado) foi estudada em culturas de células de linfócitos humanos CEM (usados para

experiências de infeção pelo VIH) e TZM-bl epiteliais humanas e fibroblastos HEL (usados para experiências de infeção pelo HSV) de acordo com procedimentos previamente estabelecidos (19). O tratamento das células com 2 µM de [2,8-^{3}H] tenofovir durante 24 h a 72 h após o inicio das culturas resultou na formação de difosfato de tenofovir, atingindo os níveis de 13, 6 e 15 pmol/10^{9} células em células T linfoides, células epiteliais e fibroblastos, respetivamente. Assim, o tenofovir é eficientemente convertido no seu metabolito ativo antiviral em vários tipos de células diferentes que representam as células alvo relevantes quer para a infeção *in vivo* pelo VIH quer pelo HSV.

O metabolito ativo do tenofovir inibe eficientemente ambas a polimerase de ADN do HSV e a transcriptase reversa do VIH

Para se tornar ativo como um inibidor da polimerase de ADN do vírus do herpes codificada por vírus ou da transcriptase reversa do VIH-1, o tenofovir precisa de ser convertido por enzimas celulares para o seu derivado difosforilado (tenofovir-DP). O metabolito ativo foi avaliado quanto à sua atividade inibidora contra as enzimas alvo, utilizando o ADN do timo de bovino ativado como o oligonucleótido iniciador / molde e o [2,8-^{3}H] dATP como o substrato concorrente. O tenofovir-DP inibiu de forma eficiente tanto a RT do VIH-1 (IC_{50}: 4,3 µM) e a polimerase de ADN do HSV-1 (IC_{50}: 1,3 µM). Assim, a atividade anti-herpética do tenofovir em cultura de células, em culturas organotípicas raft epiteliais, em tecido linfoide e do colo do útero humano *ex vivo*, e em ratinhos infetados com vírus pode ser explicada pela inibição da polimerase de ADN viral pelo seu metabolito ativo tenofovir-DP.

Formulação (gel vaginal)

	(% p/p)
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulose, NF (Natrasol®250H)	2,50
Propilparabeno, NF	0,02
Metilparabeno, NF	0,18
Edetato dissódico, USP	0,05
Glicerina, USP	20,00
Ácido cítrico, USP	1,00
Água purificada, USP	75,25
Total	100,00

O hidróxido de sódio e o ácido clorídrico são usados como soluções a 10 % p/p para ajustar o pH para um alvo de 4,4. O metilparabeno e o propilparabeno são dissolvidos em glicerina aquecida. A hidroxietilcelulose é adicionada e dispersa para formar uma fase orgânica. O edetato dissódico e o ácido cítrico são dissolvidos em água purificada, o tenofovir é adicionado e disperso, o pH é ajustado para 4,4 e a solução é clarificada por passagem através de um filtro de 0,22 µm. As fases aquosa e orgânica são misturadas, bem agitadas e, em seguida, enchidas em tubos ou aplicadores.

Segurança e tolerância

O gel vaginal de tenofovir usado a 1 % BID foi bem tolerado em mulheres VIH(-) e VIH(+) em abstinência e sexualmente ativas, com absorção sistémica limitada e com possíveis efeitos benéficos sobre a microflora vaginal.

PROCEDIMENTO DO ESTUDO

O objeto do estudo foi avaliar a eficácia do gel de tenofovir quando aplicado vaginalmente na prevenção da transmissão do vírus herpes simplex, em particular do HSV-2.

O estudo foi um ensaio de fase IIb, de dois braços, duplo-cego, aleatório, controlado, que comparou o efeito

de 1 % do gel de tenofovir com um gel placebo entre 889 mulheres sexualmente ativas com idades entre 18 - 40 anos, com alto risco de infeção por transmissão sexual do VIH.

O gel placebo (conhecido como o gel placebo "universal") foi formulado para minimizar quaisquer efeitos possíveis - negativos ou positivos - em pontos finais do estudo. É isotónico para evitar o inchaço celular epitelial ou a desidratação. Foi formulado a um pH de 4 - 5, mas tem capacidade tamponante mínima. Quando misturado com um volume igual de sémen, o gel placebo induziu apenas uma diminuição trivial no pH do sémen (de 7,8 para 7,7). O gel placebo continha hidroxietilcelulose (HEC) como um agente de gelificação, e a sua viscosidade é comparável à do gel de tenofovir. O gel não tem propriedades anti-VIH ou anti-HSV-2. O gel continha ácido sórbico como conservante. O ácido sórbico não tem qualquer atividade anti-VIH e é rapidamente metabolizado pelas células humanas. O gel placebo foi formulado tal como se segue:

Nome químico	% p/p	Quantidade
Água purificada	96,34	674,4 litros
Cloreto de sódio	0,85	6,545 kg
Hidroxicelulose NF	2,7	20,79 kg
Ácido sórbico EP/NF	0,10	770,0 g
Hidróxido de sódio NF (qb para pH 4,4)	0,0020	15,4 g
Hidróxido de sódio NF	0,0080	61,6 g

Os participantes foram treinados nos métodos adequados de armazenamento e aplicação do produto de estudo designado. Os participantes foram instruídos a inserir uma dose (todo o conteúdo de um aplicador) de produto na vagina até 12 horas antes de cada ato sexual vaginal (a relação sexual pode ocorrer imediatamente após

a inserção do produto) e a inserir uma segunda dose assim que possível depois do coito mas dentro de 12 horas.

Os participantes do estudo foram aconselhados a:

- Apenas aplicar o produto atribuído por via vaginal.
- Não lavar ou limpar a vagina, ou inserir outros objetos ou produtos vaginais, durante 2 horas após a inserção do gel. Se uma mulher planeava tomar um duche após o coito, ela foi aconselhada a inserir o gel depois do duche.
- Armazenar adequadamente os seus produtos do estudo (em um lugar fresco e seco, longe da luz solar direta)
- Usar o produto do estudo quer fosse ou não usado um preservativo.

Os participantes do estudo realizaram visitas mensais de acompanhamento durante a duração da sua participação, e foi-lhes retirado sangue no momento da inscrição e, em seguida, em pontos pré-especificados durante o acompanhamento e na saída do estudo, a fim de testar para o VIH e o HSV-2.

Resultados

A presença do HSV-2 foi determinada nas amostras de sangue recolhidas usando o Kalon EIA específico do tipo de HSV-2 (Kolon Biological Ltd., Reino Unido). No momento da inscrição, 454 das 888 mulheres (1 mulher não tinha sangue arquivado para testes) tinham infeção por HSV-2 preexistente, resultando numa prevalência de 51,1 %. As restantes 434 mulheres foram consideradas como suscetíveis ao HSV-2 à entrada no ensaio, e o estado do HSV-2 à saída foi determinado em 426 dessas mulheres. Deve notar-se que 4 de estas mulheres não tinham nenhum espécime arquivado da saída do estudo e 4 tiveram resultados indeterminados de HSV-2 à saída do estudo.

Das 205 mulheres que utilizam a formulação de tenofovir durante a duração do estudo, 29 foram infetadas com HSV-2. Das 224 mulheres a quem foi fornecido o placebo

durante a duração do estudo, 58 foram infetadas com HSV-2. Assim, o gel de tenofovir proporcionou 51 % de proteção contra o HSV-2.

	Formulação de tenofovir N.º de participantes = 202	Placebo N.º de participantes = 224
N.º de infeções HSV-2	29	58
Mulheres - anos de seguimento	293,3	287,3
Taxa de infeção HSV-2 por 100 mulheres	9,9	20,2

Embora determinadas formas de realização tenham sido descritas em detalhe anteriormente, aqueles que possuem habilidade normal na tecnologia irão compreender claramente que são possíveis muitas modificações nas formas de realização sem se sair do âmbito das reivindicações.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 2006017044 A **[0006]**
- US 4808716 A **[0025]**
- US 5733788 A **[0025]**
- US 6057305 A **[0025]**
- US 4537776 A **[0029]**
- US 4552872 A **[0029]**
- US 4557934 A **[0029]**
- US 4130667 A **[0029]**
- US 3989816 A **[0029]**
- US 4017641 A **[0029]**
- US 4954487 A **[0029]**
- US 5208031 A **[0029]**
- US 4499154 A **[0029]**

Documentos de não patente citados na descrição

- **LAWRENCE COREY.** The Effects of Herpes Simplex Virus-2 on HIV acquisition and Transmission. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2004, vol. 35 (5 **[0004]**
- **ABDOOL KARIM et al.** *Science*, 2010, vol. 329, 1168-1174 **[0006]**
- **J. BALZARINI.** Differential Antiherpesvirus and Antiretrovirus effects of the (S) and (R) Enantiomers of Acyclic Nucleoside Phosphonates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, February 1993, 312-338 **[0006]**
- **NOESANS et al.** *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 1977, vol. 8 (1), 1-23 **[0006]**

- **DE CLERQ et al.** *Clinical Microbial Reviews,* 2003, vol. 16 (4), 569-596 **[0006]**

Lisboa, 28 de Outubro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. O composto antiviral ácido (R)-(1-(6-amino-9H-purin-9-il) propan-2-iloxi) metilfosfónico (tenofovir) para a utilização na redução ou na prevenção da transmissão de HSV-2 a um mamífero, em que o tenofovir é aplicado vaginalmente a uma fêmea humana como uma formulação em gel, que compreende

Ingrediente	(% p/p)
Tenofovir	0,2 - 2,00
Hidroxietilcelulose, NF (Natrasol®250H)	1 - 5,0
Propilparabeno, NF	0,01 - 0,10
Metilparabeno, NF	0,1 - 0,25
Edetato dissódico, USP	0,02 - 0,10
Glicerina, USP	3,00 - 30,00
Ácido cítrico, USP	0,5 - 2,00
Água purificada, USP	para 100 %.

2. O composto antiviral ácido (R)-(1-(6-amino-9H-purin-9-il) propan-2-iloxi) metilfosfónico (tenofovir) para a utilização na redução ou na prevenção da aquisição de HSV-2 por um mamífero, em que o tenofovir é aplicado vaginalmente a uma fêmea humana como uma formulação em gel, que compreende

Ingrediente	(% p/p)
Tenofovir	0,2 - 2,00
Hidroxietilcelulose, NF (Natrasol®250H)	1 - 5,0
Propilparabeno, NF	0,01 - 0,10
Metilparabeno, NF	0,1 - 0,25
Edetato dissódico, USP	0,02 - 0,10
Glicerina, USP	3,00 - 30,00
Ácido cítrico, USP	0,5 - 2,00
Água purificada, USP	para 100 %.

3. O composto antiviral para a utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a formulação é aplicada antes da atividade sexual.

4. O composto antiviral para a utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a formulação é aplicada após a atividade sexual.

5. O composto antiviral para a utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a formulação é aplicada tanto antes como depois da atividade sexual.

6. O composto antiviral para a utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a formulação é aplicada uma ou duas vezes por dia.

7. O composto antiviral para a utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o hidróxido de sódio e o ácido clorídrico são adicionados para ajustar o pH para 4,4.

8. O composto antiviral para a utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a formulação compreende:

	(% p/p)
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulose, NF (Natrasol®250H)	2,50
Propilparabeno, NF	0,02
Metilparabeno, NF	0,18
Edetato dissódico, USP	0,05
Glicerina, USP	20,00
Ácido cítrico, USP	1,00
Água purificada, USP	75,25
Total	100,00

9. O composto antiviral para a utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o hidróxido de sódio e o ácido clorídrico são adicionados para ajustar o pH para 4,4.

10. O composto antiviral para a utilização de acordo com a reivindicação 9, em que a formulação é revestida sobre um preservativo.

Lisboa, 28 de Outubro de 2015