



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

(21) BR 102017011488-0 A2



(22) Data do Depósito: 31/05/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 18/12/2018

(54) **Título:** COMPOSTO ANTIVIRAL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, USO DO COMPOSTO E MÉTODO DE TRATAMENTO

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/7072; A61P 31/14.

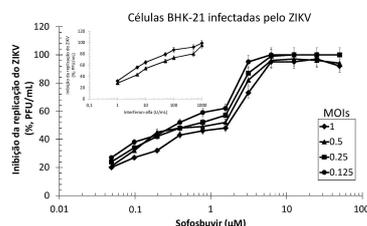
(71) **Depositante(es):** CARLOS MEDICIS MOREL; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ; CONSÓRCIO BMK.

(72) **Inventor(es):** THIAGO MORENO LOPES E SOUZA; NUBIA BOECHAT ANDRADE; PATRICIA TORRES BOZZA; CAROLINA DE QUEIROZ SACRAMENTO; FERNANDO AUGUSTO BOZZA; RITA MARIA RIBEIRO NOGUEIRA; ANA MARIA BISPO DE FILIPPIS; NATÁLIA FINTELMAN RODRIGUES; LUCAS VILLAS BÔAS HOELZ; GABRIELLE RODRIGUES DE MELO; KARIN BRÜNING; JAIME ALBERTO RABI NALLAR; SERGIO JOSE FRANGIONI.

(66) **Prioridade Interna:** BR102016012517-0 de 01/06/2016.

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se a compostos antivirais selecionados do grupo de análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA, ou seus sais, solvatos, derivados ou pró-drogas, ou mesmo combinações dos ditos compostos, para o tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por vírus Zika (ZIKV) e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV. A presente invenção também se refere à composição farmacêutica antiviral que contém os compostos da invenção, bem como ao uso dos compostos e método para o tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por vírus Zika (ZIKV), de indivíduo infectado por ZIKV ou potencialmente exposto ao ZIKV.

Figura 2A



**“COMPOSTO ANTIVIRAL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL,
USO DO COMPOSTO E MÉTODO DE TRATAMENTO”**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a compostos antivirais selecionados do grupo de análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA para o tratamento profilático, curativo, mitigador da infecção por vírus Zika (ZIKV) e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV, a composição farmacêutica antiviral que contém os compostos da invenção, bem como ao uso dos compostos e composições, e método para o tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV, de indivíduo infectado por ZIKV ou potencialmente exposto ao ZIKV.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] O vírus Zika (ZIKV) tem demonstrado grande potencial para surtos e, alguns especialistas têm apontado para a possibilidade de uma pandemia. Entretanto, há pouca informação acerca do vírus e sua interação com o hospedeiro. A relação do vírus com o seu hospedeiro foi negligenciada ao se considerar, ao longo de várias décadas desde o seu descobrimento, que a infecção não geraria grave patologia no hospedeiro. É fato que a circulação do ZIKV tem provocado graves quadros de morbidade, como má-formações congênitas e a síndrome de Guillain-Barré (GBS).

[003] O ZIKV foi originalmente identificado em macacos sentinela, em 1947, na floresta Zika em Uganda. Depois de episódios ocasionais de infecção em humanos na década de 50, surtos da doença somente foram registrados em 2007 nos Estados Federados da Micronésia e, em 2013, na Polinésia Francesa. Análises computacionais sugerem que ZIKV pode ter sido introduzido no Brasil já em 2013 (Musso, D. & Gubler, D. J. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev* **29**, 487-524, doi:10.1128/CMR.00072-15, 2016; DICK, G. W.,

KITCHEN, S. F. & HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **46**, 509-520, 1952; Faria, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **352**, 345-349, 2016).

[004] Em 2015, observou-se uma grande epidemia de infecção por ZIKV em todo o território brasileiro e, atualmente, pode-se observar a presença do vírus Zika em praticamente todos os países do continente americano. Embora os índices epidemiológicos de infecção por vírus Zika no Brasil possam ter sido subestimados – em face dos recursos limitados para avaliação de pacientes em ambientes de difícil acesso e com sérias restrições sócio-econômicas, há consenso na estimativa de mais de 4 milhões de indivíduos infectados. Conseqüentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a infecção ZIKV como uma emergência de saúde pública de preocupação internacional (Solomon, T., Baylis, M. & Brown, D. Zika virus and neurological disease—approaches to the unknown. *Lancet Infect Dis* **16**, 402-404, 2016; Organization, W.-W. H. *Zika virus and complications*, <<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/en/>>, 2016).

[005] Diferentemente da expectativa da comunidade científica, que esperava que a infecção pelo ZIKV se apresentasse de maneira auto-limitada, pode-se observar o aumento dramático, em mais de 30 vezes em alguns estados, no número de casos de recém-nascidos com microcefalia no Brasil. A demonstração clínica e laboratorial da associação entre o ZIKV e os casos de microcefalia em recém-nascidos no Brasil, trouxe grande repercussão, reforçando o posicionamento da OMS ao declarar a infecção por ZIKV como uma emergência de saúde pública de preocupação internacional (Calvet, G. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*, 2016; Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A. & Petersen, L. R. Zika Virus and Birth

Defects - Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med*, 2016; Driggers, R. W. *et al.* Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med*, 2016; Brasil, P. *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro - Preliminary Report. *N Engl J Med*, 2016).

[006] O impacto da circulação do ZIKV no Brasil é representativo do que pode acontecer em outros países tropicais em desenvolvimento. A falta de saneamento básico adequado e o incorreto manejo do lixo urbano fornecem condições adequadas para propagação dos vetores, inclusive do mosquito vetor do ZIKV, do gênero *Aedes*. Além disso, em face da falta de imunidade prévia da população para o vírus, sua propagação não foi contingenciada. Estas condições possibilitam que o vírus seja largamente transmitido, resultando em um grande número de pessoas infectadas ao mesmo tempo, causando graves consequências para a gestão da saúde pública.

[007] Até 2015, não se havia descrito a ocorrência de casos de microcefalia como um risco consequente da infecção por zika. A grande epidemia na população brasileira indicou a vulnerabilidade de determinados grupos com maior risco de alguns sintomas de maior gravidade da infecção (BRASIL, P. *et al.* Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Online), v. 10, p. e0004636, 2016). Após ser anunciada pelo Ministério da Saúde brasileiro, a associação dos casos de microcefalia em recém-nascidos nascidos de mães que durante a gestação apresentaram sintomas compatíveis com a infecção por vírus Zika, a questão tem sido discutida pela comunidade científica (Ministério da Saúde, disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21014-ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia>; 2016).

[008] O ZIKV tem sido isolado em diversos países e a associação da infecção pelo vírus com a microcefalia em recém-natos e outras complicações neurológicas constitui uma emergência de Saúde Pública de impacto para todo o mundo. Esforços para prevenir a dispersão do vírus e coordenar uma resposta à infecção em seus diversos níveis de severidade pode se apresentar como uma possibilidade de diminuir o impacto sobre a saúde pública. E, desta forma, a busca por drogas que possam eficientemente combater o ZIKV se torna de grande importância.

[009] O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, sendo filogeneticamente mais próximo aos vírus da dengue (DENV) e febre amarela (YFV). O gênero ainda inclui o vírus da febre do Oeste do Nilo (WNV), vírus da encefalite transmitido por carrapatos, da encefalite japonesa, da encefalite de Saint Louis, vírus Powassan, vírus da doença da floresta de Kyasanur. Ainda o ponto de vista da relevância clínica, dentro da família *Flaviviridae*, encontramos outro agente importante, o vírus da hepatite C. Contudo, devido a diferenças genômicas e relacionadas a patogênese entre o HCV e os membros do gênero *Flavivirus*, o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) categoriza o HCV dentro de outro gênero, chamado *Hepacivirus*.

[010] Atualmente, não há terapia clínica aprovada disponível para o tratamento de infecções associadas a *Flavivirus* (Lim et al., 2013. Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antivir. Res.*, 100, pp. 500–519). Neste sentido, estratégias para mitigar morbidades associadas ao ZIKV são urgentes, tal como tratamento por antivirais.

[011] Recentemente, grandes esforços têm sido realizados para a apresentação de drogas contra o vírus da dengue. E, em face da proximidade filogenética do vírus da dengue com o ZIKV, o conhecimento alcançado para DENV poderia ser razoavelmente testado para ZIKV. Entretanto, muito cuidado deve ser considerado ao se extrapolar os resultados alcançados para dengue,

para a descoberta de antivirais com atividade para ZIKV. Isto se dá por conta de a biologia dos dois vírus ser bastante diferente. O conhecimento da biologia da doença é crucial para o desenvolvimento da terapêutica apropriada para qualquer patógeno.

[012] Nesse sentido, é importante o conhecimento sobre o tropismo do ZIKV para os sítios anatômicos onde é replicado nos indivíduos infectados durante o curso da doença, guiando a seleção de antivirais de inibição em relação a sua distribuição durante o tratamento. O início dos sintomas, a presença diagnóstica e a duração da viremia nos pacientes também devem ser considerados por determinar a “janela terapêutica”.

[013] Idealmente, para prevenir os efeitos no sistema nervoso central, um inibidor ideal deveria apresentar propriedades farmacológicas de penetração no tecido do cérebro do indivíduo em níveis satisfatórios para impedir a replicação viral e seus efeitos citopáticos. De igual forma, para prevenir a microcefalia de fetos em mulheres grávidas infectadas por ZIKV, um inibidor ideal deveria transpassar a barreira transplacentária e, ainda, penetrar no tecido nervoso do feto. Paralelamente, o inibidor ideal também deve prover uma capacidade de inibição da replicação viral nos demais órgãos, restringindo a viremia e, eventualmente, diminuindo a radicalidade dos efeitos da infecção. Por conta da população de mulheres grávidas ser o maior alvo para a terapia contra ZIKV, este se apresenta o maior desafio para o desenvolvimento clínico. O desenvolvimento da droga ideal também deve considerar ser utilizável tanto para terapias curativas quanto profiláticas, especialmente para viajantes para regiões endêmicas, indivíduos em ambientes com pessoas infectadas ou da mesma família, e à população em geral durante uma epidemia.

[014] Um grande esforço tem sido feito no sentido de melhor compreendermos as características biológicas do ZIKV, embora muitas perguntas ainda existam. Sabe-se que o ZIKV, assim como os outros Flavivírus, apresenta genoma de

aproximadamente 10.800 nucleotídeos. Este genoma é constituído por RNA de fita simples e polaridade positiva. Ou seja, quando o ZIKV entra na célula, o seu genoma atua como um RNA mensageiro celular e a maquinaria celular não consegue discriminar entre o genoma viral e um RNA celular (Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N. & Cropp, C. B. Phylogeny of the genus Flavivirus. *J Virol* **72**, 73-83, 1998).

[015] O RNA viral é traduzido no retículo endoplasmático rugoso, codificando uma poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos. A região de codificação desta poliproteína está flanqueada por extremidades não codificantes, chamadas de 5' e 3' UTR. A ciclização do genoma viral através do pareamento entre as regiões 5' e 3' UTR é fundamental para a replicação do genoma viral. A poliproteína viral é clivada por ação de serina-proteases virais e celulares, levando à liberação das proteínas estruturais C, M e E, que formarão o capsídeo, matriz e proteína da superfície do envelope, respectivamente. Durante a replicação viral, ainda são produzidas as proteínas não estruturais, numeradas sequencialmente de 1 a 5 (NS1 a NS5). Dentre estas, a NS5 apresenta a atividade RNA polimerase, responsável por catalisar a replicação do genoma viral. As proteínas estruturais e o RNA genômico brotam através da membrana plasmática, formando o virion maduro. O virion maduro apresenta aproximadamente 40 nanômetros de diâmetro.

[016] O ZIKV, assim como o vírus da dengue, o vírus da febre do Oeste do Nilo, o vírus Mayaro e o vírus chikungunya é transmitido por artrópodes, sendo categorizado como Arbovírus. O ZIKV é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. A hiperendemicidade da espécie *Aedes aegypti* no Brasil, bem como o perfil hematofágico das fêmeas desta espécie, certamente contribuiu para o alastramento do ZIKV. Embora já tenha sido detectado em laboratório que mosquitos do gênero *Culex* podem abrigar o ZIKV em suas glândulas salivares, sugerindo sua competência vetorial, ainda não existem registros do ZIKV em

Culex no meio ambiente (Musso, D. & Gubler, D. J. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev* **29**, 487-524, doi:10.1128/CMR.00072-15 (2016).

[017] Um importante aspecto que distingue o ZIKV de outros arbovírus é a possibilidade de transmissão sexual. Essa evidência se configura a partir do registro de casos em diversos países. Destacando-se os trabalhos norte-americanos e franceses que tem demonstrado a transmissão do ZIKV por contato sexual, independentemente de vetor.

[018] Do ponto de vista epidemiológico, temos globalmente e também no Brasil a circulação de três principais arbovírus: DENV, CHIKV e ZIKV, com baixos índices de cocirculação destas viroses. A principal característica clínica da infecção pelo ZIKV é a presença de exantema súbito, de origem craniocaudal. Enquanto que os vírus da dengue e do chikungunya causam febre alta, acima de 38 °C, o ZIKV provoca febre baixa ou inexistente.

[019] A dengue causa uma marcante trombocitopenia, enquanto não se observa esta característica para a infecção pelo ZIKV. O CHIKV causa uma importante artralgia, principalmente em membros inferiores, que acompanha o início dos sintomas. No caso da infecção por ZIKV, a artralgia é mais tardia, de mãos e membros superiores, com início mais comumente após o desaparecimento do exantema. O ZIKV pode ser encontrado em fluidos biológicos de diferentes compartimentos anatômicos, como sangue, saliva, urina, sêmen, líquido amniótico e líquor.

[020] No que tange os casos mais severos de morbidade associado à infecção pelo ZIKV, as más-formações congênitas e a síndrome de Guillain-Barré, estão relacionados à detecção do vírus no líquido amniótico e líquor, respectivamente. Os fatores virais ou do hospedeiro relacionados aos mecanismos de translocação do vírus para regiões anatômicas associadas as mais graves morbidades ainda não são conhecidos.

[021] De fato, gestantes com exantema induzido por ZIKV, principalmente no primeiro trimestre de gestação, tem chance de apresentar transmissão vertical do vírus. Estimativas em torno de 2 a 5% são propostas para a incidência de má-formação congênita associada ao ZIKV. Um dos principais distúrbios congênitos associados ao ZIKV é a microcefalia. Em gestantes com diagnóstico positivo de ZIKV, observam-se microcalcificações no cérebro fetal logo nas semanas seguintes pós-exantema. Mesmo com a cessação da viremia no sangue da gestante, é possível a detecção do vírus no líquido amniótico por inúmeras semanas até o parto. O protocolo de manejo de gestantes do Ministério da Saúde prevê a coleta de soro de sangue de cordão umbilical durante o parto de mães com diagnóstico positivo para ZIKV. Com aproximadamente 25 a 27 semanas de gestação, já é possível o estabelecimento do diagnóstico de microcefalia por imagem.

[022] Diversos agentes de natureza viral e hiperimunogênica podem disparar quadros de síndrome de Guillain-Barré. Em geral, herpesvírus e vacinas podem provocar a síndrome de Guillain-Barré em uma parcela da população. Curiosamente, os agentes etiológicos mais associados à síndrome provocam o quadro tardiamente. Diferentemente, no caso da infecção por ZIKV, a síndrome de Guillain-Barré tem sido observada ainda durante a fase aguda da infecção, sugerindo que o ZIKV *per se* pode infectar células do sistema nervoso ou do “H” medular, provocando quadros de comprometimento locomotor, mais uma particularidade da infecção pelo ZIKV.

[023] O uso de drogas antivirais clinicamente aprovadas, tais como interferons (IFNs), ribavirina e favipiravir, conhecidamente com amplo espectro de atividade contra uma grande gama de vírus geneticamente diferentes, não se mostra uma alternativa viável por conta das peculiaridades da infecção pelo ZIKV. O tratamento contra ZIKV deve levar em conta que o vírus causa significativa morbidade no desenvolvimento fetal. Assim, a seleção de drogas

deve considerar se as drogas alvo de pesquisa são seguras para gestantes. As drogas antivirais de amplo espectro mencionadas acima, neste parágrafo, são abortivas, como é o caso do interferon, ou teratogênicas, como a ribavirina e favipiravir.

[024] A necessidade de drogas antivirais clinicamente aprovadas, entretanto, sem evidência de efeitos colaterais nocivos para modelos animais ou mulheres durante a gestação restringe sobremaneira a gama de compostos disponíveis para estudos *in vitro* de atividade contra o vírus.

[025] Considerando, portanto, todas as diferenças e particularidades do ZIKV em relação aos vírus hoje conhecidos, conforme acima exposto, tornam-se evidentes as dificuldades de aplicação imediata dos conhecimentos a respeito de um vírus a outro. Assim, não se pode prever, com expectativa razoável de sucesso, que o tratamento efetivo para um vírus poderá ser útil ao tratamento de condição diversa associada a outro vírus.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[026] A presente invenção se refere a composto antiviral selecionado do grupo de análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA, ou seus derivados, sais, solvatos ou pró-drogas, ou mesmo combinações dos ditos compostos, para o tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por vírus Zika (ZIKV) e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV.

[027] Outra realização da presente invenção se refere a uma composição farmacêutica antiviral que compreende: (i) uma quantidade eficazmente antiviral de um ou mais compostos antivirais da invenção, ou seus derivados, sais, solvatos ou pró-drogas, ou mesmo combinações dos ditos compostos, para o tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV; e (ii)

excipiente(s) farmacologicamente aceitável e compatível com o ingrediente ativo.

[028] Ainda, a presente invenção se refere a usos do composto e da composição da invenção para a fabricação de um medicamento antiviral para: (i) inibir a ação da RNA polimerase dependente de RNA do ZIKV; e (ii) para tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV.

[029] Também é uma realização da presente invenção o método para o tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV, de indivíduo infectado por ZIKV ou potencialmente exposto ao ZIKV, em que é tratado com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais compostos antivirais da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[030] **Figura 1** – Atividade citopática de ZIKV sobre monocamadas de células BHK-21 infectadas a 37 °C por 5 dias, fixadas e coradas com cristal violeta. **Figura 1A** – Aumento de 40 x, apresentando uma unidade formadora de placa (PFU). **Figura 1B** – Aumento de 100 x, apresentando efeito citopático (CPE) induzido pela infecção pelo ZIKV (indicados por setas vermelhas).

[031] **Figura 2** – Atividade antiviral dos compostos sofosbuvir e alfa interferon contra ZIKV. Células de rim de *hamster* BHK-21 (2A) e células de neuroblastoma humano SH-Sy5y (2B), e células de hepatoma humano Huh-7 (2C) foram infectadas com diferentes proporções de ZIKV por células (indicadas pela MOI) e expostas à ação de várias concentrações de sofosbuvir e alfa interferon. Os dados representam médias \pm SEM de três experimentos independentes.

[032] **Figura 3** – Atividade dos compostos antivirais sofosbuvir, ribavirina e azidotimidina sobre a atividade enzimática da RNA polimerase RNA dependente do ZIKV usando o RNA viral como modelo e UTP marcado como

marcador. Os dados representam médias \pm SEM de três experimentos independentes.

[033] **Figura 4** – Tratamento com sofosbuvir inibe replicação de ZIKV em células humanas NSCs. As células foram infectadas por diferentes MOIs de ZIKV, tratadas com diferentes concentrações de sofosbuvir por diferentes períodos de tempo após a infecção. A titulação de carga viral foi realizada por ensaio de formação de placa. Os dados representam a média de cinco experimentos independentes. A produção de vírus na presença de tratamento foi significativamente reduzida quando comparada a células não tratadas ($P < 0.01$).

[034] **Figura 5** – Tratamento com Sofosbuvir protege células humanas NSC de morte celular induzida por ZIKV. As células NSCs foram coradas com caspase ativada (5A e 5C) e para se verificar a permeabilidade celular (5B e 5D), em diferentes períodos após a infecção. Os dados representam a média de cinco experimentos independentes. *** indica $P < 0.001$ para comparações entre células não infectadas e infectadas por ZIKV. ### Indica $P < 0.001$ e ## indica $P < 0.01$ para comparações entre células infectadas por ZIKV tratadas com sofosbuvir ou não.

[035] **Figura 6** – Tratamento com sofosbuvir inibe replicação de ZIKV em organoides cerebrais. A titulação de carga viral foi realizada por ensaio de formação de placa. Os dados representam a média de cinco experimentos independentes. A produção de vírus na presença de tratamento foi significativamente reduzida quando comparada a células não tratadas ($P < 0.01$).

[036] **Figura 7** – Tratamento com sofosbuvir aumenta a sobrevivência e inibe a perda de peso de camundongos infectados com ZIKV. Camundongos suíços neonatos foram infectados com ZIKV e tratados com sofosbuvir previamente a infecção (7A e 7B) ou após a infecção (7C e 7D). As taxas de sobrevivência

(7A e 7C) e de variação de peso (7B e 7D) foram observadas durante os sete dias de tratamento. A seta vermelha indica quando os animais foram infectados. * $P < 0.01$; ** < 0.001 .

[037] **Figura 8** – Tratamento com sofosbuvir diminui o grau de microhemorragias no cérebro de camundongos infectados com ZIKV. (SF) camundongos tratados com sofosbuvir e (nil) camundongos não tratados. Todo o cérebro foi coletado a fim de se quantificar os focos de microhemorragia. * $P < 0.01$.

[038] **Figura 9** – Tratamento com sofosbuvir previne o dano neuromotor em camundongos infectados por ZIKV. Medição da capacidade, em segundos, do animal se virar e ficar na posição de pé. * $P < 0.01$.

[039] **Figura 10** – Inibição dependente de sofosbuvir da replicação de ZIKV em diferentes compartimentos anatômicos durante a infecção aguda. Camundongos infectados com ZIKV não tratados (nil) ou tratados com sofosbuvir (SF) previamente à infecção. Nos dias indicados, os animais foram sacrificados e os níveis de RNA viral foram medidos no plasma (10A), rim (10B), baço (10C) e cérebro (10D). * $P < 0.01$.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[040] A presente invenção refere-se a compostos antivirais selecionados do grupo de análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA, ou seus derivados, sais, solvatos ou pró-drogas, ou mesmo combinações dos ditos compostos, para o tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por vírus Zika (ZIKV) e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV.

[041] Tais compostos antivirais podem ser selecionados particularmente entre análogos de nucleosídeos ou entre análogos de nucleotídeos, que atuam como potentes inibidores da replicação viral RNA dependente.

[042] No estado da técnica, é aceito que o termo “análogo” se refere preferencialmente a compostos nos quais um ou mais átomos ou grupos de átomos tenham sido substituídos por um ou mais átomos ou grupos de átomos diferentes. Assim, a expressão “análogos de nucleosídeos/nucleotídeos” se refere a nucleosídeos/nucleotídeos nos quais um ou mais átomos ou grupos de átomos tenham sido substituídos por um ou mais átomos ou grupos de átomos diferentes daqueles normalmente encontrados em nucleosídeos/nucleotídeos.

[043] No estado da técnica, é aceito que o termo “derivado” se refere preferencialmente a compostos que derivam de outros similares por meio de reações químicas, ou a compostos que se originam a partir um composto inicial semelhante.

[044] No presente pedido, o termo “análogo” compreende e inclui as definições do termo “análogo”, bem como do termo “derivado”, conforme acima apontadas.

[045] A expressão “nucleosídeos/nucleotídeos”, conforme utilizada no presente pedido, se refere a nucleosídeos e/ou a nucleotídeos, bem como a conversão ou derivação de uma forma em outra, encontrados de maneira isolada ou simultânea.

[046] A expressão “RNA polimerase viral”, conforme utilizada no presente pedido, se refere a todas as enzimas RNA polimerases virais, preferencialmente às RNA polimerases virais NS1 a NS5, incluindo NS5A e NS5B, preferencialmente NS5B.

[047] É de notório conhecimento a premente necessidade de medicamentos para o tratamento da infecção pelo ZIKV. Atualmente, não há qualquer tipo de terapia clínica antiviral aprovada específica para o combate do ZIKV. Recentemente, grandes esforços têm sido realizados para o entendimento da biologia desta nova doença, assim como para estabelecimento de modelos

experimentais *in vitro* e *in vivo* para busca e seleção de alvos virais potenciais e drogas eficazes.

[048] A prática de se utilizar conhecimentos já no estado da técnica requer atenção e cuidado, pois o tratamento de uma doença não se resume somente à informação genética do patógeno, mas também às informações atinentes à relação patógeno-hospedeiro. Esta premissa se torna mais contundente em uma infecção viral, pois o patógeno depende quase que estritamente do sistema celular do hospedeiro, gerando grandes interferências não observadas em sistemas *in silico*. Assim não se pressupõe que uma droga bioativa contra um determinado vírus filogeneticamente próximo ao ZIKV, consiga inibir sua replicação, como é visto para outras drogas. Por exemplo, tanto o vírus influenza A e B pertencem à família *Orthomyxoviridae*; no entanto, as adamantanas (inibidoras da proteína M2 do influenza) somente inibem os vírus influenza A.

[049] Surpreendentemente, revelou-se pela presente invenção que os compostos antivirais análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA apresentaram efeitos, em níveis não esperados, de inibição da replicação viral do ZIKV.

[050] Particularmente, os compostos antivirais análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA atuam como inibidores da replicação viral RNA dependente do ZIKV e são úteis para o tratamento, prevenção e mitigação da infecção causada pelo ZIKV e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV.

[051] A presente invenção mais particularmente se refere a compostos antivirais análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA que atuam como inibidores específicos da polimerase NS5 do ZIKV, uma RNA polimerase RNA dependente.

[052] Os compostos antivirais análogos de nucleosídeos/nucleotídeos com atividade antiviral sobre as polimerases virais estão largamente descritos na literatura para diversos vírus, tais como, Herpes, influenza, RSV, coronavírus, astrovírus, HCV, HIV, HTLV, Ebola.

[053] Mais preferencialmente, o composto antiviral da presente invenção pode ser, por exemplo, o sofosbuvir ou a ribavirina.

[054] A capacidade dos compostos análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA de inibir a replicação do ZIKV pode ser demonstrada por qualquer ensaio capaz de medir ou demonstrar a diminuição da replicação ou citotoxicidade do ZIKV sobre culturas de células. Adicionalmente, a capacidade dos compostos análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA de inibir a replicação do RNA viral pode ser demonstrada por qualquer ensaio capaz de medir ou demonstrar a diminuição da atividade RNA polimerase viral dependente de RNA de ZIKV.

[055] A invenção também apresenta composições farmacêuticas contendo (i) uma quantidade eficaz de um ou mais compostos antivirais análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA, ou seus sais, solvatos, derivados ou pró-drogas de tais compostos, e (ii) excipiente(s) farmacêuticamente aceitável e compatível com o ingrediente ativo, para o tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV.

[056] Mais especificamente, a presente invenção se refere à composição farmacêutica tendo o sofosbuvir como composto antiviral para inibição da replicação viral do ZIKV. Ainda, a presente invenção se refere à composição farmacêutica tendo a ribavirina como composto antiviral para inibição da replicação viral do ZIKV.

[057] A presente composição pode compreender de 1 a 1000mg dos compostos antivirais, preferencialmente de 1 a 500mg. Mais preferencialmente 10mg, 15mg, 25mg, 30mg, 40mg, 50mg, 100mg, 200mg, 250mg, 300mg, 400mg, 500mg, 600mg, 700mg ou 800mg.

[058] As composições da presente invenção podem compreender combinações de um composto descrito nesta invenção e um ou mais agentes terapêuticos ou profiláticos adicionais. Neste caso, o composto pode estar presente em proporções de cerca de 10 a 100% da dosagem normalmente administrada em um regime de monoterapia.

[059] Os agentes terapêuticos ou profiláticos adicionais combinados incluem, mas não se limitam a, interferon, interferon-pegilado, ribavirina, aciclovir, cidofovir, docosanol, famciclovir, foscarnet, fomivirisen, ganciclovir, idoxuridina, peciclovir, trifluridina, valaciclovir, vidarabina, amantadinas, oseltamivir, zanamivir, peramivir, imiquimod, lamivudina, zidovudina, didanosina, stavudina, zalcitabina, abacavir, nevirapina, enfavirez, delavirdina, saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, daclastavir, cloroquina, quercetina, vaniprevir, boceprevir, sovaprevir, paritaprevir, telaprevir, favipiravir, palivizumab, ombitasvir, beclabuvir, dasabuvir, outros inibidores de polimerases virais, outros inibidores de RNA polimerase dependente de RNA, outros inibidores de NS5 polimerase de flavivírus, inibidores de outros alvos no ciclo de replicação do ZIKV, que incluem porém não são limitados a agentes anti-helicases, NS2/3, -protease NS3, não-análogos de nucleosídeos/nucleotídeos, anticorpos monoclonais ou policlonais contra as proteínas E, M e C.

[060] Os agentes terapêuticos adicionais podem ser combinados com os compostos desta invenção para serem dispensados em uma única forma de dosagem ou em uma múltipla dosagem.

[061] Em outro aspecto, a composição farmacêutica da presente invenção compreende adicionalmente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou

mais agentes imunomoduladores como agente antiviral contra ZIKV. Exemplos de agentes imunomoduladores adicionais incluem, porém não são limitados a alfa, beta, gama interferons e forma peguilada destes, glicocorticoides e corticoides.

[062] A presente composição pode conter ainda substâncias inativas como corantes, dispersantes, edulcorantes, emolientes, antioxidantes, conservantes, estabilizadores de pH, flavorizantes, entre outros, e suas misturas.

[063] Ademais, a composição da presente invenção poderá ser apresentada na forma sólida preferencialmente como comprimido, tablete ou cápsula e na líquida preferencialmente como suspensão, solução ou xarope.

[064] A presente composição pode ser administrada a crianças, adultos, gestantes e indivíduos com manifestações neurológicas, infectados por ZIKV ou potencialmente expostos ao ZIKV, por via oral ou sistêmica.

[065] A invenção ainda compreende o uso dos compostos antivirais análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA, seus derivados, ou sais, solvatos, ou pró-drogas de tais compostos, ou das composições da presente invenção, para a fabricação de medicamento para tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV.

[066] Também aqui é revelado o uso dos compostos antivirais e das composições farmacêuticas antivirais da presente invenção para a fabricação de medicamento para inibir a ação da RNA polimerase dependente de RNA do ZIKV.

[067] Dito medicamento pode compreender adicionalmente um ou mais compostos antivirais ou imunomoduladores para tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV. Ainda, tal medicamento pode compreender de 1 a 1000mg do composto antiviral, preferencialmente de 1 a 500mg. Mais

preferencialmente 10mg, 15mg, 25mg, 30mg, 40mg, 50mg, 100mg, 200mg, 250mg, 300mg, 400mg, 500mg, 600mg, 700mg ou 800mg.

[068] O composto antiviral da presente invenção pode ser utilizado no tratamento profilático, curativo ou mitigador de indivíduos infectados ao mesmo tempo por ZIKV e outros agentes virais.

[069] Particularmente, o uso dos compostos/composições da invenção para a fabricação de medicamento para tratar de forma profilática, curativa ou mitigadora a infecção associada com o ZIKV e para tratar indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV é direcionado a gestantes e indivíduos com manifestações neurológicas mais agressivas da infecção, tal como síndrome Guillain-Barré.

[070] Mais especificamente, a presente invenção compreende o uso do composto sofosbuvir para a fabricação de medicamento para tratar de forma profilática, curativa ou mitigadora a infecção associada com o ZIKV, de indivíduo infectado por ZIKV ou potencialmente exposto ao ZIKV.

[071] Mais especificamente, a presente invenção compreende o uso do composto ribavirina para a fabricação de medicamento para tratar de forma profilática, curativa ou mitigadora a infecção associada com o ZIKV, de indivíduo infectado por ZIKV ou potencialmente exposto ao ZIKV.

[072] Ainda, os compostos/composições da invenção são utilizados para tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV e para inibir a ação da RNA polimerase dependente de RNA do ZIKV.

[073] A invenção ainda compreende método de tratamento profilático, curativo e mitigador de indivíduos acometidos por infecção por ZIKV ou potencialmente expostos ao ZIKV, ao prover a tais pacientes uma quantidade terapêuticamente eficaz de um ou mais compostos análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA, ou seus derivados,

sais, solvatos ou pró-drogas de tais compostos, ou suas composições farmacêuticamente aceitáveis, para tratar de forma profilática, curativa ou mitigadora a infecção associada com o ZIKV, indivíduo infectado por ZIKV ou potencialmente exposto ao ZIKV.

[074] Particularmente, a invenção compreende método de tratamento, de acordo com a invenção ora apresentada, para tratar de forma profilática, curativa ou mitigadora a infecção associada com o ZIKV, indivíduo infectado por ZIKV ou potencialmente exposto ao ZIKV, gestantes, crianças, adultos e em indivíduos com manifestações neurológicas mais agressivas da infecção, tal como, síndrome Guillain-Barré.

[075] Mais especificamente, a presente invenção compreende método de tratamento utilizando o composto sofosbuvir para tratar de forma profilática, curativa ou mitigadora a infecção associada com o ZIKV, indivíduo infectado por ZIKV ou potencialmente exposto ao ZIKV, principalmente gestantes e indivíduos com manifestações neurológicas mais agressivas da infecção.

[076] Mais especificamente, a presente invenção compreende método de tratamento utilizando o composto ribavirina para tratar de forma profilática, curativa ou mitigadora a infecção associada com o ZIKV, indivíduo infectado por ZIKV ou potencialmente exposto ao ZIKV

[077] Ainda, a presente invenção compreende um método de tratamento profilático, curativo ou mitigador de um indivíduo infectado por ZIKV ou potencialmente exposto ao ZIKV, que compreende administrar ao indivíduo uma combinação do dito composto de acordo com a presente invenção e um ou mais compostos antivirais e/ou imunomoduladores.

[078] Os métodos de tratamento da presente invenção podem ser administrados oralmente ou sistemicamente nos indivíduos infectados ou potencialmente expostos ao ZIKV.

[079] Para a administração oral, a composição da presente invenção pode ser formulada em formas de dosagem unitária tais como xarope, cápsulas, tabletes ou comprimidos, cada qual contendo uma quantidade pré-determinada do ingrediente ativo, variando de cerca de 1 a cerca de 1000mg, preferencialmente de 1 a 500mg, mais preferencialmente 10mg, 15mg, 25mg, 30mg, 40mg, 50mg, 100mg, 200mg, 250mg, 300mg, 400mg, 500mg, 600mg, 700mg ou 800mg, em excipientes farmacologicamente aceitáveis.

[080] Para a administração sistêmica, a composição da presente invenção pode ser administrada por injeção intravenosa, subcutânea ou intramuscular. Para administração por injeção são preferidas composições com os compostos na solução em um excipiente aquoso estéril, que pode da mesma forma conter outros solutos tais como tampões ou preservativos, bem como quantidades suficientes de sais farmacologicamente aceitáveis ou de glicose para preparo da solução isotônica.

[081] Veículos ou excipientes adequados que podem ser empregados para as composições supracitadas são descritos em textos farmacêuticos, por exemplo, em Remington's, The Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, 2005 ou em Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drugs Delivery Systems, 9th edition, 2011.

[082] A dosagem do composto irá variar a partir da forma de administração e do ingrediente ativo selecionado. Em geral, o composto descrito nesta invenção é administrado em uma concentração que permita resultados antivirais eficazes, contudo, evitando qualquer efeito colateral indesejado ou prejudicial.

[083] Para administração oral, o composto descrito nesta invenção pode ser administrado na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000mg por quilograma de peso corporal por dia, preferencialmente de 0,03 a 600mg, mais preferencialmente de 0,05 a 400mg.

[084] Ainda como faixa preferida pode ser citada de cerca de 0,05 a cerca de 100mg por quilograma por dia. Para administração sistêmica, o composto descrito nesta invenção pode ser administrado em uma dosagem de cerca de 0,01 a cerca de 100mg por quilograma de peso corporal por dia, contudo, atenção deverá ser tomada para as peculiaridades individuais de cada paciente. Em um modelo desejável, a dosagem poderá estar na faixa de cerca de 0,05mg a cerca de 50mg por quilograma de peso corporal por dia, conforme as peculiaridades individuais de cada paciente.

[085] A composição farmacêutica antiviral da presente invenção pode ser utilizada no tratamento curativo ou mitigador de indivíduos infectados ao mesmo tempo por ZIKV e outros agentes virais.

[086] A presente invenção é descrita detalhadamente através dos exemplos apresentados abaixo. É necessário frisar que a invenção não está limitada a esses exemplos, mas que também inclui variações e modificações dentro dos limites nos quais pode ser desenvolvida.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

[087] A cepa viral utilizada foi isolada de uma amostra de soro de paciente com diagnóstico positivo para o ZIKV, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. A amostra foi encaminhada e diagnosticada como positiva pelo Laboratório de Referência para Flavivírus, na Fundação Oswaldo Cruz.

[088] A cepa viral foi originalmente isolada em cultura de células C6/36. Passagens em cultura de células foram realizadas pela inoculação em cultura de células C6/36 por 1 h a 26 °C. Em seguida, os vírus não adsorvidos foram retirados a partir de lavagens com solução salina tamponada fosfatada. As células permaneceram em incubação por 9 dias. Após este período, as células foram rompidas por congelamento e descongelamento, formando um lisado. Em seguida, o lisado foi centrifugados a 1.500 x g a 4 °C por 20 minutos para

remoção dos *debris* celulares (restos de células de rompidas). A solução resultante foi submetida a um gradiente de sacarose para purificação da cepa viral.

[089] O gradiente foi feito em tubos de ultracentrífuga com capacidade de 40 mL em solução salina tamponada fosfatada sem Ca^{++} e Mg^{++} (pH 7.4). Os tubos permaneceram inertes por 2 h a temperatura ambiente. Em seguida, 20 mL da solução contendo os vírus foi adicionada ao tubo de gradiente de sacarose e centrifugados a 10.000 rpm por 4 h a 4 °C em uma ultracentrífuga rotor SW28 (Beckman). Frações do gradiente foram coletadas e ensaiadas para aferição do quantitativo de proteínas totais e para o ensaio de hemaglutinação (HA) viral com hemácias de peru.

[090] As frações entre 50 e 20% de sacarose apresentaram atividade de hemaglutinação ≥ 16 UHA/50 μL e, portanto, agrupadas e dialisadas contra solução salina tamponada fosfatada sem Ca^{++} e Mg^{++} (pH 7,4) contendo sacarose a 10%, durante aproximadamente 8 h. O material dialisado foi submetido a filtração por membrana de 0,22- μm para sua esterilização.

[091] A titulação das soluções contendo vírus foi realizada por técnica de ensaio de placa em células de rim de *hamster* BHK-21 e estocadas a -70 °C.

EXEMPLO 2

[092] Dois diferentes tipos celulares foram testados com relação à citotoxicidade dos compostos testados. O ensaio de citotoxicidade foi realizado a partir de monocamadas com 10^4 células de rim de *hamster* BHK-21 ou com 5×10^4 de células de neuroblastoma SH-Sy5y, $1,5 \times 10^4$ de células de Huh-7 em microplacas de 96 orifícios. As monocamadas foram tratadas com várias concentrações de sofosbuvir ou ribavirina por 5 dias. Em seguida, XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide), a 5 mg/ml, foi adicionado ao meio de cultura celular na presença de 0,01% de PMS

(N-methyl- dibenzopirazina methyl sulfate), por 4 h a 37 °C. Em seguida, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 492 nm e 620 nm⁴. A concentração de 50% de citotoxicidade (CC₅₀) foi calculada por análise regressiva não linear a partir das curvas de dose-resposta.

[093] Os compostos sofosbuvir e ribavirina demonstraram citotoxicidade dependente do tipo celular, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Citotoxicidade de compostos sobre linhagens celulares

Parâmetro farmacológico	CC₅₀ (µM)			
	Composto/Célula	BHK-21	SH-Sy5Y	Huh-7
Sofosbuvir		360 ± 43	421 ± 34	381 ± 25
Ribavirina		177 ± 22	300 ± 21	284 ± 12

[094] A ribavirina produziu maior citotoxicidade nas duas linhagens celulares testadas quando comparada com sofosbuvir. Em relação ao sofosbuvir, este composto se apresentou menos tóxico para as linhagens celulares de SH-Sy5Y de neuroblastoma e Huh-7 de hepatoma humano em relação à linhagem celular BHK-21.

EXEMPLO 3

[095] Ensaio de formação de placa em cultura de células permitiu observar quais os efeitos citopáticos da replicação viral sobre a cultura de células. Monocamadas de células BHK-21, em placas com 6 orifícios, foram expostas a diferentes diluições do sobrenadante produzido pelo ensaio de redução de rendimento, por 1 h a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas em solução salina tamponada fosfatada e mantidas em DMEM contendo 1% de soro fetal bovino e 3% de carboximetilcelulose. Após 5 dias a 37 °C, as monocamadas de células foram fixadas com 10% de formaldeído em solução salina tamponada fosfatada e coradas com solução de 0,1% de cristal violeta em metanol a 70%.

Os títulos de vírus foram calculados pelo número de unidades formadoras de placas (PFU).

[096] O ZIKV foi capaz de produzir efeito citopático (CPE) visíveis nas monocamadas das linhagens celulares, com nítida capacidade de formação de placas (PFU) no tapete celular, como pode ser visto na Figura 1.

EXEMPLO 4

[097] A atividade dos compostos sobre a produção de partículas virais foi verificada a partir de células infectadas pelo ZIKV. Monocamadas com 10^4 células de BHK-21, $1,5 \times 10^4$ de células de Huh-7 ou com 5×10^4 células de SH-Sy5y, em microplacas de 96 orifícios, foram infectadas com ZIKV, em diferentes multiplicidades de infecção (MOI), por 1h a 37 °C. MOI remete a proporção entre o título infeccioso e o número de células. As células foram lavadas em solução salina tamponada fosfatada a fim de remover vírus não adsorvidos. Diferentes concentrações de sofosbuvir e ribavirina foram adicionadas ao meio de cultura (MEM), suplementado com soro fetal bovino a 1% e adicionado às monocamadas de célula. Interferon alfa foi utilizado como controle positivo.

[098] Após 24 h, as células foram lisadas, e os *debris* celulares foram retirados por centrifugação. O quantitativo de vírus foi determinado a partir de sua titulação e mensurado por unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL). A análise por regressão não linear das curvas de dose-resposta foi utilizada para calcular a atividade inibitória dos compostos sobre a capacidade de induzir a formação de PFU em cultura de células por ZIKV (EC_{50}).

[099] Os resultados são apresentados na Tabela 2. Em relação ao controle positivo, o interferon alfa demonstrou a capacidade de inibir a atividade viral do ZIKV. Em relação aos compostos sofosbuvir e ribavirina, ambos apresentaram melhores atividades de inibição da atividade viral do ZIKV quando comparados

ao controle positivo. Especificamente no que se refere ao composto sofosbuvir, este apresenta melhor capacidade inibitória da atividade do ZIKV, em ambas as linhagens utilizadas e nos diferentes parâmetros de MOI utilizados, chegando a ser quase três vezes mais potente que a ribavirina.

[100] A capacidade de inibição dos compostos também se mostrou dose dependente, como pode ser visto na Figura 2.

Tabela 2. Atividade inibitória dos compostos sobre a capacidade do ZIKV em induzir unidades formadoras de placa em cultura de células

Parâmetro Farmacológico	EC ₅₀ (µM)						
	Tipo celular	BHK-21		SH-Sy5Y		Huh-7	
		MOI	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
Sofosbuvir		1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,65 ± 0,08	0,41 ± 0,04	0,12 ± 0,03
Ribavirina		5,3 ± 0,8	3,1 ± 0,6	2,9 ± 0,4	1,2 ± 0,2	66,9 ± 0,8	3,8 ± 0,04
IFN-alpha		7,3 ± 0,3	2,8 ± 0,3	9,8 ± 1,2	4,9 ± 0,6	8,2 ± 0,3	3,4 ± 0,1

EXEMPLO 5

[101] A atividade inibitória dos compostos sobre a RNA polimerase RNA dependente do ZIKV foi testada a partir de células BHK-21 infectadas com o vírus. As células foram infectadas com ZIKV a uma MOI de 10 por 24 h, lisadas com tampão contendo 0,25 M de fosfato de potássio (pH 7,5), 10 mM 2-mercaptoetanol (2-ME), 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,5 mM de PMSF (fenilmetano sulfonilfluoride) e 20% de glicerol, e submetidas a sonicação e centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante resultante foi novamente submetido a centrifugação a 100.000 x g por 90 min a 4 °C.

[102] O ensaio de inibição de atividade da RNA polimerase RNA dependente foi realizado em uma mistura de reação contendo 50 mM de Hepes (pH 7,3), 0,4 mM de cada ribonucleotídeo (ATP, GTP, CTP, e UTP marcado), 0,4 mM de dithiothreitol, 3 mM de MgCl₂, 500 ng de RNA genômico de ZIKV obtido de

células BHK-21 infectadas como descrito acima. A mistura de reação foi incubada por 1h a 30 °C na presença ou ausência dos compostos sofosbuvir trifosfato, ribavirina trifosfato e azidotimidina (AZT) trifosfato. A reação foi interrompida a partir da adição de EDTA para uma concentração final de 10 mM.

[103] O composto azidotimidina (AZT) trifosfato foi utilizado como controle negativo da ação de inibição de RNA polimerase RNA dependente. Extratos de células não infectadas por ZIKV e submetidas ao mesmo processo de extração celular descrito acima foram ensaiadas como controle positivo da atividade de RNA polimerase RNA dependente não relacionada com o ZIKV (resultados designados como mock). O RNA genômico de ZIKV foi obtido a partir do uso do mini kit QIAmp RNA viral (Qiagen), conforme as instruções do fabricante.

[104] O UTP marcado representa uma razão equimolar entre UTP biotilado e UTP digoxigenina. A detecção da incorporação de nucleotídeos UTP marcados foi realizada pelo ensaio de proximidade homogênea da luminescência/fluorescência amplificada (ALPHA) por tecnologia ALPHA usando o instrumento de leitura de placa multimodal EnSpire®. Diferentes tipos de controles negativos foram utilizados além dos já anteriormente citados, tal como a mistura de reação sem extrato celular, a mistura de reação sem inibidor, e um controle somente com as microesferas do sistema ALPHA.

[105] A análise por regressão não linear das curvas de dose-resposta foi utilizada para calcular a atividade inibitória dos compostos sobre a capacidade da RNA polimerase dependente de RNA (IC_{50}). Os dados representam a média \pm SEM de cinco experimentos independentes.

[106] Sofosbuvir trifosfato inibiu a atividade de RNA polimerase dependente de RNA com valores de IC_{50} de $0,38 \pm 0,03 \mu\text{M}$. Ribavirina trifosfato e AZT trifosfato, que foram utilizados como controle positivo e negativo,

respectivamente, apresentaram valores de IC₅₀ de 0,21 ± 0,06 e > 10 µM, respectivamente, conforme Figura 3.

EXEMPLO 6

[107] A atividade neuroprotetora do sofosbuvir contra ZIKV, em um modelo celular correspondente aos estágios iniciais do desenvolvimento do cérebro foi demonstrada. Células tronco neurais humanas (NSC) derivadas de células tronco pluripotentes humanas (iPS) (Lancaster, et al., Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Nature 501, 373–379, 2013). foram infectadas com ZIKV e tratadas com sofosbuvir.

[108] As células NSC, em uma densidade de 20 x 10³ células/poço em uma placa de 96 orifícios, foram infectadas com MOIs de 1,0 a 10 de ZIKV, por 2h a 37 °C. A seguir, as células foram lavadas e meio de cultura fresco contendo sofosbuvir foi adicionado. As células foram tratadas diariamente com sofosbuvir em concentrações específicas, a 2 µM e 10 µM, e observadas por 8 dias após a infecção.

[109] Os títulos virais foram determinados a partir dos sobrenadantes das culturas celulares usando o ensaio de formação de placa, conforme o exemplo 3. A morte celular foi medida a partir da adição do reativo CelleVENT a 2 µM (qual detecta caspases 3/7 ativadas) e do corante fluorescente de homodímero de etídeo, no quarto e oitavo dias após a infecção, momento em que o sobrenadante das culturas foi coletado. As imagens do tapete celular foram obtidas em sistema de alta resolução, a partir de sete campos microscópicos independentes de experimentes em triplicata.

[110] Observou-se que o sofosbuvir produziu uma pronunciada inibição da replicação do ZIKV nas células NSC infectadas, tanto com MOIs de 1,0 ou 10, após 4 a 8 dias de infecção (Figura 4).

[111] A drástica redução na replicação viral em células tratadas com sofosbuvir impediu a neuropatogênese causada por ZIKV. Enquanto que as células infectadas por ZIKV e não tratadas exibiram altos níveis de ativação de caspase e permeabilidade celular, levando a morte celular em 8 dias após a infecção, as células infectadas mas tratadas com sofosbuvir foram significativamente protegidas contra a morte celular (Figura 5).

EXEMPLO 7

[112] A atividade neuroprotetora do sofosbuvir contra ZIKV, em um modelo celular correspondente aos estágios iniciais do desenvolvimento do cérebro novamente foi demonstrada. Células tronco neurais humanas (NSC) derivadas de células tronco pluripotentes humanas (iPS) foram estimuladas a formar estruturas denominadas organoides cerebrais (Lancaster et al, Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Nature 501, 373–379, 2013).

[113] Organoides cerebrais a partir de células NSC humanas se apresentam como um importante e sofisticado modelo tridimensional celular para se estudar o impacto do ZIKV em estágios iniciais do desenvolvimento do cérebro. Deste modo, atua como um sistema translacional para investigações aprofundadas de eventos celulares e moleculares relacionados a microcefalia.

[114] Os organoides cerebrais foram infectados com ZIKV, a 5×10^7 PFU/mL, por 2 h. Em seguida, o meio de cultura contendo o vírus foi removido e novo meio fresco foi adicionado à cultura celular. Sofosbuvir, em concentrações de 2 μ M e 10 μ M, foi adicionado ao novo meio de cultura, diariamente, durante uma semana. O sobrenadante da cultura celular foi coletado a fim de monitorar a produção viral a partir do organoide cerebral.

[115] Observa-se que o sofosbuvir produziu uma pronunciada inibição da replicação do ZIKV nos organoides cerebrais infectados após uma semana de

infecção (Figura 6). Esta inibição é superior a 5-log_{10} , demonstrando que o sofosbuvir, a despeito de prévio entendimento que o colocava como uma droga de ativação exclusiva no fígado, atua no modelo humano *ex vivo* de cérebro.

[116] Estes resultados indicam indubitavelmente que o sofosbuvir é efetivo contra o ZIKV em sistemas celulares neuronais relevantes para a fisiopatologia do vírus.

EXEMPLO 8

[117] A capacidade de estudar o progresso da infecção por ZIKV em um modelo animal foi demonstrada. Camundongos neonatos suíços (*Mus musculus*) foram mantidos a temperatura constante de 25 °C, com acesso livre a comida e água, e sob um ciclo de 12 h de luz e noite. Animais com 3 dias de vida foram infectados, por via intraperitoneal, com 2×10^7 PFU de ZIKV. Os animais foram monitorados diariamente com relação ao ganho de peso, à indução de sequelas e à sobrevivência.

[118] Os animais foram sacrificados quando diferenças de ganho de peso entre os grupos infectados e controle foram maiores que 50% ou severa enfermidade foi observada. Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. Amostras de tecidos do rim, fígado e cérebro também foram coletadas e analisadas macroscopicamente quanto à presença de evidências patológicas de doença.

[119] Todos os animais infectados morreram 8 dias após a infecção, indicando a grande letalidade da infecção por ZIKV, nas condições do estudo (Figura 7A). Em relação ao ganho de peso, os animais infectados apresentaram severa deficiência em relação ao grupo controle, conforme pode ser visto na Figura 7B, sugerindo que a infecção interfere drasticamente no desenvolvimento pós-natal do animal.

[120] A presença de microhemorragias no cérebro dos animais infectados e do grupo controle foi analisada. Após a morte dos animais, o cérebro foi coletado

para observação. Marcantemente, os animais infectados por ZIKV apresentaram mais de 60 focos de microhemorragia no cérebro, diferentemente do grupo controle que não apresentou pontos de hemorragia, como pode ser visto na Figura 8.

[121] Testes comportamentais dos animais infectados também foram avaliados a fim de se testar seu reflexo em se manter na posição em pé. Os animais infectados e controle foram postos deitados, com as patas no ar por 5 segundos. Em seguida, os animais foram liberados e mediu-se o tempo gasto pelo animal para se virar e ficar em pé, com as quatro patas tocando o solo. Os animais foram testados duas vezes ao dia, com um intervalo mínimo de cinco minutos entre os testes. O tempo máximo permitido para o teste foi de 60 segundos. Animais que falharam em alcançar a posição de pé, foram incluídos no gráfico com o tempo de 60 segundos.

[122] Os resultados apontaram para um drástico prejuízo neuromotor agudo para os animais infectados em relação ao grupo controle (Figura 9). Os animais infectados precisaram de 12 vezes mais tempo para se colocarem na posição em pé que o grupo controle.

[123] Em outros testes comportamentais, camundongos de 6 a 8 semanas foram submetidos ao estudo de Labirinto de água de Morris (MWM) e teste de memória aversiva dependente de amígdala (teste de congelamento).

[124] O teste de MWM tem por intuito avaliar o aprendizado e a memória espacial dependentes do hipocampo. Os animais foram submetidos ao treinamento por 4 dias a fim de que encontrassem uma plataforma 2 cm abaixo da superfície da água. Animais sadios controles e sobreviventes da infecção por ZIKV responderam similarmente ao aprendizado, independentemente de terem sido tratados ou não. No quinto dia, ao se remover uma plataforma de acesso, a memória foi avaliada ao se medir o tempo de permanência no quadrante da plataforma (latência). Animais infectados por ZIKV e não tratados

não permaneceram no quadrante onde a plataforma havia sido previamente disposta, diferentemente dos animais controle (não infectados) e infectados mas tratados com sofosbuvir que permaneceram mais tempo, evidenciando que nestes dois últimos grupos houve a prevenção de sequelas que comprometessem o comportamento e de danos neuromotores e de perda de memória.

[125] O teste de congelamento foi realizado a partir do treinamento dos animais submetidos a pequenos estímulos por choques elétricos. Após o treinamento dos animais, o tempo despendido pelos animais sem movimento (congelamento) após o estímulo foi medido. Os dados demonstram que animais infectados por ZIKV não tratados perdem a memória aversiva, enquanto que os animais infectados por ZIKV tratados com sofosbuvir e os animais controle se comportaram normalmente. Os resultados indicam que, além do aumento das taxas de sobrevivência decorrentes do tratamento por sofosbuvir, este medicamento também previne de sequelas comportamentais, danos neuromotores e perda de memória causadas pela infecção.

EXEMPLO 9

[126] A capacidade de produzir ZIKV em determinados tecidos em animais infectados foi avaliada. Os tecidos de animais infectados, analisados no exemplo 8, foram submetidos à lise química e mecânica e posterior homogenização, clareamento e extração de RNA. O RNA extraído dos tecidos e plasma foi analisado a fim de se mensurar a carga viral presente.

[127] A detecção de RNA viral em diferentes amostras foi avaliada em diferentes modelos de infecção, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O RNA viral foi mensurado em sobrenadantes celulares ou mesmo em culturas de células ou em amostras de plasma ou tecido de animais infectados.

[128] O material foi submetido a extração usando o kit QIAamp Viral RNA ou RNeasy Mini Kits (ambos da Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A técnica de reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR) foi desenvolvida usando o kit QuantiTect ou QuantiNova Probe RT-PCR (ambos da Qiagen) no aparelho ABI PRISM 7300 Sequence Detection System. As reações de amplificação foram realizadas em reações de mistura de 25 µL contendo tampão de reação 2 x concentrado, 50 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 10 µM da sonda e 5 µL do RNA molde. Os oligonucleotídeos iniciadores e as condições de ciclagem utilizadas foram as recomendadas pelo Centers for Disease Control and Prevention - CDC (CDC, Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya, and dengue viruses in US Public Health Laboratories, <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/denvchikvzikk-testing-algorithm.pdf> 2016). O método de curva padrão foi utilizado para quantificação do vírus. Como referência da quantidade de células utilizada, o gene sentinela *RNAse P* foi amplificado.

[129] Observou-se carga viral no plasma e nos rins dos animais infectados a partir do primeiro dia de infecção, alcançando os maiores níveis no terceiro dia. Diferentemente, a carga viral do baço e cérebro foi percebida somente a partir do quarto dia, conforme pode ser observado na Figura 10).

[130] A infecção por ZIKV em camundongos suíços neonatos se mostrou como um modelo eficiente, em razão destes animais apresentarem ampla resposta, mesmo a partir de populações heterogêneas, tal como os humanos. Outra vantagem em se utilizar modelos com camundongos neonatos ocorre pela oportunidade de se examinar as sequelas comportamentais provocadas pela infecção e seus possíveis efeitos clínicos, principalmente no cérebro, e a habilidade de se testar tratamentos específicos contra a doença.

EXEMPLO 10

[131] A atividade *in vivo* do sofosbuvir contra a infecção por ZIKV foi testada em camundongos suíços. Camundongos suíços neonatos, com três dias de vida, foram infectados via intraperitoneal com 2×10^7 UFP de ZIKV. O tratamento foi realizado a partir da administração de 20 mg/Kg/dia de sofosbuvir, via intraperitoneal. Dois esquemas de tratamento foram utilizados, o tratamento prévio: com a primeira dose de sofosbuvir administrada no dia anterior a infecção; ou o tratamento tardio: com a primeira dose de sofosbuvir administrada dois dias após a infecção. O tratamento foi conduzido por sete dias, com monitoramento diário. Grupos controle de animais sem tratamento, ou que recebiam placebo foram utilizados.

[132] A infecção extremamente agressiva do ZIKV em camundongos gerou em torno de 100% de mortalidade em alguns dias, em condições experimentais. O tratamento com sofosbuvir, com a dose de 20 mg/Kg/dia, é compatível com os estudos pré-clínicos anteriores conduzidos para a aprovação clínica da droga.

[133] O tratamento com sofosbuvir significativamente protegeu os camundongos infectados que receberam tratamento previamente. Os resultados demonstram que 40% do grupo infectado que recebeu tratamento prévio sobreviveu, em contrapartida ao grupo controle infectado sem tratamento que apresentou 100% de mortalidade (Figura 7).

[134] O ganho de peso dos animais neonatos também foi avaliado nos animais infectados e tratados com sofosbuvir. Os valores de ganho de peso entre o grupo de animais infectados e tratados com sofosbuvir e o grupo controle não infectados são indistinguíveis, demonstrando que o tratamento com sofosbuvir impede que ocorram os drásticos efeitos da infecção por ZIKV no desenvolvimento pós-natal do animal (Figura 7).

[135] Com relação ao tratamento com sofosbuvir dois dias após a infecção por ZIKV, ainda pode-se observar um importante nível de proteção dos animais contra a infecção. Os resultados demonstram que 25% do grupo infectado que

recebeu tratamento tardio sobreviveu, em contrapartida ao grupo controle infectado sem tratamento que apresentou 100% de mortalidade (Figura 7). Em relação ao ganho de peso, estes animais submetidos ao tratamento tardio ganharam mais peso do que os animais não tratados (Figura 7).

[136] Marcantemente, ambos os regimes de tratamento com sofosbuvir, tanto prévio quanto tardio, resultaram em aumentada taxa de sobrevivência quando comparados com o grupo controle infectado e não tratado. Entretanto, deve-se salientar que o tratamento prévio apresentou melhores taxa de sobrevivência. O tratamento prévio dobrou o aumento nas taxas de sobrevivência e a média de tempo de sobrevivência (T_{50}), quando comparado com o tratamento tardio (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem e tempo de sobrevivência de camundongos infectados por ZIKV e tratados com sofosbuvir

	Esquemas de tratamento			
	Controle	Prévio Tratado com sofosbuvir	Controle	Tardio Tratado com sofosbuvir
Taxa de sobrevivência (%)	95	40	100	25
T_{50} (dias)	3	7	5	7

[137] Estes dados concluem que a administração prévia de sofosbuvir a camundongos infectados por ZIKV determina melhores resultados contra a infecção, inclusive reduzindo a mortalidade; e que, independentemente de quando se inicia a administração do sofosbuvir, é mais proveitoso administrar o antiviral do que deixar o animal sem qualquer tratamento em face das taxas de sobrevivência.

EXEMPLO 11

[138] A capacidade do sofosbuvir em mitigar ou impedir a produção de ZIKV em tecidos de animais infectados foi avaliada. Os tecidos de animais infectados

por ZIKV, tratados e não tratados com sofosbuvir, com diferentes regimes de tratamento (prévio ou tardio, conforme exemplos anteriores) foram submetidos à lise química e mecânica e posterior homogeneização, clareamento e extração de RNA. O RNA extraído dos tecidos e plasma foi analisado a fim de se mensurar a carga viral presente.

[139] Ao se considerar que o sofosbuvir inibe a replicação do ZIKV, a maior taxa de sobrevivência dos animais decorrente do tratamento foi associada à redução dos níveis de carga viral durante a infecção aguda. Os dados de carga viral obtidos dos tecidos de animais tratados e não tratados ratificam esta premissa. Observou-se que o tratamento com sofosbuvir reduziu a viremia do animal em mais de 90%, especialmente durante os três primeiros dias após a infecção, quando um aumento exponencial na carga viral no plasma dos animais foi notada (Figura 10). O tratamento com sofosbuvir também reduziu em até 60% o pico de detecção do vírus no rim entre o segundo e quarto dias após a infecção; e, em relação ao baço e cérebro, o tratamento reduziu em até 80% dos níveis de vírus nestes tecidos. Especificamente em relação ao cérebro, os animais tratados previamente com sofosbuvir não apresentaram ou reduziram em até 90% a presença de microhemorragias induzidas por ZIKV.

[140] Estes resultados, conjuntamente, indicam que os efeitos do sofosbuvir nas taxas de sobrevivência dos camundongos são consequência de uma redução na detecção do vírus em diferentes compartimentos anatômicos.

EXEMPLO 12

[141] A proteção contra o desenvolvimento de sinais e sintomas da infecção por ZIKV, em pacientes em tratamento contínuo contra a hepatite C pela administração de sofosbuvir foi avaliada.

[142] Um grupo de 89 pacientes diagnosticados com o vírus da hepatite C (HCV), em monitoramento clínico ativo, no Instituto Nacional de Infectologia

Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), foi avaliado. Este grupo de pacientes se mostra como um grupo piloto singular a fim de que se poder mensurar os potenciais benefícios do tratamento baseado em sofosbuvir, em uma perspectiva clínica, pois foi conduzido em um período de grande circulação do ZIKV no Rio de Janeiro, Brasil.

[143] Destes 89 pacientes, um subgrupo de 21 indivíduos recebeu terapia baseada em sofosbuvir em combinação com outros antivirais: ribavirina (2 pacientes), simeprevir (3 pacientes), daclastavir (4 pacientes) ou daclastavir/ribavirina (12 pacientes). Os demais pacientes não receberam tratamento durante o período de análise.

[144] No que concerne ao subgrupo sem tratamento, 72% são mulheres, com média de idade de 58 anos, 80% destes pacientes apresentam infecção por HCV genótipo 1 e 67% com lesão hepática nível F3/4 (Tabela 3). Deste grupo sem tratamento, oito pacientes foram diagnosticados com doença compatível com ZIKV, apresentando uma taxa de incidência de 11,75%, condizente com a observada em investigações de casos suspeitos na população em geral.

[145] No subgrupo sob tratamento com sofosbuvir em combinação com outros antivirais, 63% são mulheres, com média de idade de 57 anos, 100% destes pacientes com infecção por HCV genótipo 1 e 90% com lesão hepática nível F3/4 (Tabela 4). Surpreendentemente, a partir da anamnese dos pacientes, não foi observado nenhum caso de doença compatível com ZIKV neste subgrupo de pacientes sob terapia utilizando sofosbuvir.

Tabela 4. Diagnóstico da infecção por ZIKV, dados clínicos e demográficos de pacientes HCV positivos tratados com terapias baseadas em sofosbuvir ou sem tratamento.

	Sem tratamento	Tratamento com sofosbuvir + outro antiviral
Número de indivíduos (n)	68	21
Média de idade (em anos)	58	57
Mulheres %	72	63
Genótipo de HCV 1 (%)	80	100
Lesão hepática F3/4	67	90
Diagnóstico por ZIKV (n)	8	0

[146] Estes achados apontam para o potencial uso clínico do sofosbuvir contra a infecção por ZIKV, ao mostrar que indivíduos sob tratamento com sofosbuvir tem maior probabilidade de estarem protegidos contra a infecção por ZIKV, corroborando para o entendimento da atividade antiviral direta deste medicamento contra o vírus.

**“COMPOSTO ANTIVIRAL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL,
USO DO COMPOSTO E MÉTODO DE TRATAMENTO”**

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSTO ANTIVIRAL, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo de análogos de nucleosídeo/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA, ou seus derivados, sais, solvatos ou pró-drogas, ou mesmo combinações dos ditos compostos, para o tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por vírus Zika (ZIKV) e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV.

2. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo de análogos de nucleosídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA.

3. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo de análogos de nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA.

4. COMPOSTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para a inibição da polimerase NS5 do ZIKV.

5. COMPOSTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de o análogo de nucleosídeo/nucleotídeo inibidor de RNA polimerase viral dependente de RNA ser o composto sofosbuvir.

6. COMPOSTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de o análogo de nucleosídeo/nucleotídeo inibidor de RNA polimerase viral dependente de RNA ser o composto ribavirina.

7. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, caracterizada pelo fato de compreender:

i. uma quantidade eficaz de um ou mais compostos antivirais, conforme definidos em uma das reivindicações 1 a 6; e

ii. excipiente(s) farmacêuticamente aceitável e compatível com o ingrediente ativo,

para o tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV.

8. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de o composto antiviral ser o sofosbuvir.

9. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com uma das reivindicações 7 a 8, caracterizada pelo fato de conter de 1 a 1000mg dos compostos antivirais, preferencialmente de 1 a 500mg, mais preferencialmente 10mg, 15mg, 25mg, 30mg, 40mg, 50mg, 100mg, 200mg, 250mg, 300mg, 400mg, 500mg, 600mg, 700mg ou 800mg.

10. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com uma das reivindicações 7 a 9, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente um ou mais compostos antivirais adicionais.

11. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o composto viral da invenção está presente em proporções de cerca de 10 a 100% da dosagem normalmente administrada em um regime de monoterapia.

12. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com uma das reivindicações 10 a 11, caracterizada pelo fato de o um ou mais compostos antivirais adicionais serem selecionado entre interferon, interferon-pegilado, ribavirina, aciclovir, cidofovir, docosanol, famciclovir, foscarnet, fomivirisen, ganciclovir, idoxuridina, peciclovir, trifluridine, valaciclovir, vidarabina, amantadinas, oseltamivir, zanamivir, peramivir, imiquimod, lamivudina, zidovudina, didanosina, stavudina, zalcitabina, abacavir, nevirapina, enfavirez, delavirdina, saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, daclastavir, cloroquina, quercetina, vaniprevir, boceprevir, sofavprevir,

paritaprevir, telaprevir, favipiravir, palivizumab, ombitasvir, beclabuvir, dasabuvir, outros inibidores de polimerases virais, outros inibidores de RNA polimerase dependente de RNA, outros inibidores de NS5 polimerase de flavivírus, inibidores de outros alvos no ciclo de replicação do ZIKV, que incluem porém não são limitados a agentes anti-helicases, NS2/3, -protease NS3, não-análogos de nucleosídeos/nucleotídeos, anticorpos monoclonais ou policlonais contra as proteínas E, M e C.

13. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com uma das reivindicações 7 a 12, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais compostos imunomoduladores.

14. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de o um ou mais compostos imunomoduladores serem selecionados entre alfa, beta, gama interferons e forma peguiladas destes, glicocorticoides e corticoides.

15. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com uma das reivindicações 7 a 14, caracterizada pelo fato de compreender ainda substâncias inativas como corantes, dispersantes, edulcorantes, emolientes, antioxidantes, conservantes, estabilizadores de pH, flavorizantes, entre outros, e suas misturas.

16. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com uma das reivindicações 7 a 15, caracterizada pelo fato de ser apresentada na forma sólida ou líquida.

17. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de a forma sólida ser como comprimido, tablete ou cápsula.

18. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de a forma líquida ser como suspensão, solução ou xarope.

19. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com uma das reivindicações 7 a 18, caracterizada pelo fato de ser administrada a crianças, adultos, gestantes e indivíduos com manifestações neurológica, infectados por ZIKV ou potencialmente expostos ao ZIKV.

20. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com uma das reivindicações 7 a 19, caracterizada pelo fato de ser para administração oral ou sistêmica.

21. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de a administração oral ser por xarope, comprimido, tablete ou cápsulas.

22. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de a administração sistêmica ser intravenosa, subcutânea ou intramuscular.

23. USO DO COMPOSTO, conforme definido em uma das reivindicações 1 a 6, ou da composição, conforme definida em uma das reivindicações 7 a 22, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento antiviral para tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV.

24. USO DO COMPOSTO, conforme definido em uma das reivindicações 1 a 6, ou da composição, conforme definida em uma das reivindicações 7 a 22, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento antiviral para inibir a ação da RNA polimerase dependente de RNA do ZIKV.

25. USO DO COMPOSTO ou da composição, de acordo com uma das reivindicações 23 a 24, caracterizado pelo fato de o medicamento conter adicionalmente um ou mais compostos antivirais ou imunomoduladores para tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV.

26. USO DO COMPOSTO ou da composição, de acordo com uma das reivindicações 23 a 25, caracterizado pelo fato de o medicamento conter de 1 a 1000mg do composto antiviral conforme descrito em uma das reivindicações 1 a 6, preferencialmente de 1 a 500mg, mais preferencialmente 10mg, 15mg, 25mg, 30mg, 40mg, 50mg, 100mg, 200mg, 250mg, 300mg, 400mg, 500mg, 600mg, 700mg ou 800mg.

27. USO DO COMPOSTO ou da composição, de acordo com uma das reivindicações 23 a 26, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento curativo ou mitigador de indivíduos infectados ao mesmo tempo por ZIKV e outros agentes virais.

28. USO DO COMPOSTO ou da composição, de acordo com uma das reivindicações 23 a 27, caracterizado pelo fato de o dito tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV e o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV ser direcionado a gestantes ou indivíduos com manifestações neurológicas mais agressivas da infecção.

29. USO DO COMPOSTO ou da composição, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de a manifestação neurológica mais agressiva da infecção ser a síndrome Guillain-Barré.

30. USO DO COMPOSTO ou da composição, de acordo com uma das reivindicações 23 a 29, caracterizado pelo fato de o composto ser o sofosbuvir.

31. USO DO COMPOSTO ou da composição, de acordo com uma das reivindicações 23 a 29, caracterizado pelo fato de o composto ser a ribavirina.

32. USO DO COMPOSTO, conforme definido em uma das reivindicações 1 a 6, ou da composição, conforme definida em uma das reivindicações 7 a 22, caracterizado pelo fato de ser para tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por ZIKV e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV e para inibir a ação da RNA polimerase dependente de RNA do ZIKV.

33. MÉTODO DE TRATAMENTO profilático, curativo ou mitigador de um indivíduo infectado por ZIKV ou potencialmente exposto ao ZIKV, caracterizado pelo fato de administrar a este indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um ou mais compostos antivirais, conforme definidos em uma das reivindicações 1 a 6, ou da composição, conforme definida em uma das reivindicações 7 a 22.

34. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de o indivíduo infectado ou potencialmente exposto ao ZIKV ser gestante, criança, adulto e indivíduos com manifestações neurológicas.

35. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de as manifestações neurológicas serem a síndrome Guillain-Barré.

36. MÉTODO DE TRATAMENTO de um indivíduo infectado por ZIKV, de acordo com uma das reivindicações 32 a 34, caracterizado pelo fato de os indivíduos estarem infectados ao mesmo tempo por ZIKV e outros agentes virais.

37. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com uma das reivindicações 32 a 35, caracterizado pelo fato de a administração do composto antiviral ser via oral ou sistêmica.

38. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de a administração oral ser por meio de xarope, cápsulas, tabletes ou comprimidos.

39. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de a administração sistêmica ser por meio intravenoso, subcutâneo ou intramuscular.

40. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com uma das reivindicações 32 a 38, caracterizado pelo fato de administrar a este indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de cerca de 0,01 a cerca de 1000mg por quilograma de peso corporal por dia, do composto conforme descrito em uma das reivindicações 1 a 6, preferencialmente de 0,03 a 600mg, mais preferencialmente de 0,05 a 400mg.

41. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de a quantidade terapêuticamente eficaz ser de 0,05 a 100mg por quilograma de peso corporal por dia do composto.

42. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de a quantidade terapêuticamente eficaz ser de 0,05 a 50mg por quilograma de peso corporal por dia do composto.

43. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com uma das reivindicações 32 a 41, caracterizado por administrar ao indivíduo uma combinação do dito composto, conforme definido em uma das reivindicações 1 a 6, e um ou mais compostos antivirais e/ou imunomoduladores.

FIGURAS

Figura 1A



Figura 1B

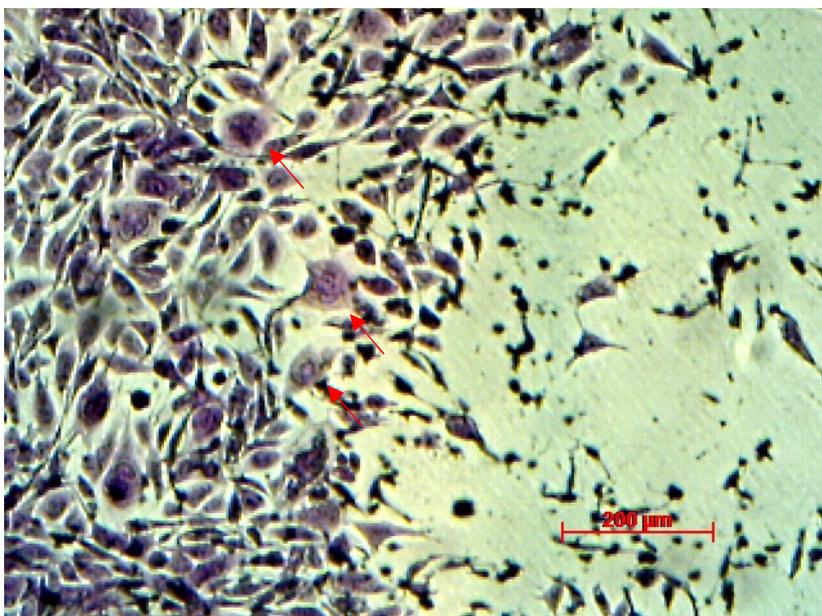


Figura 2A

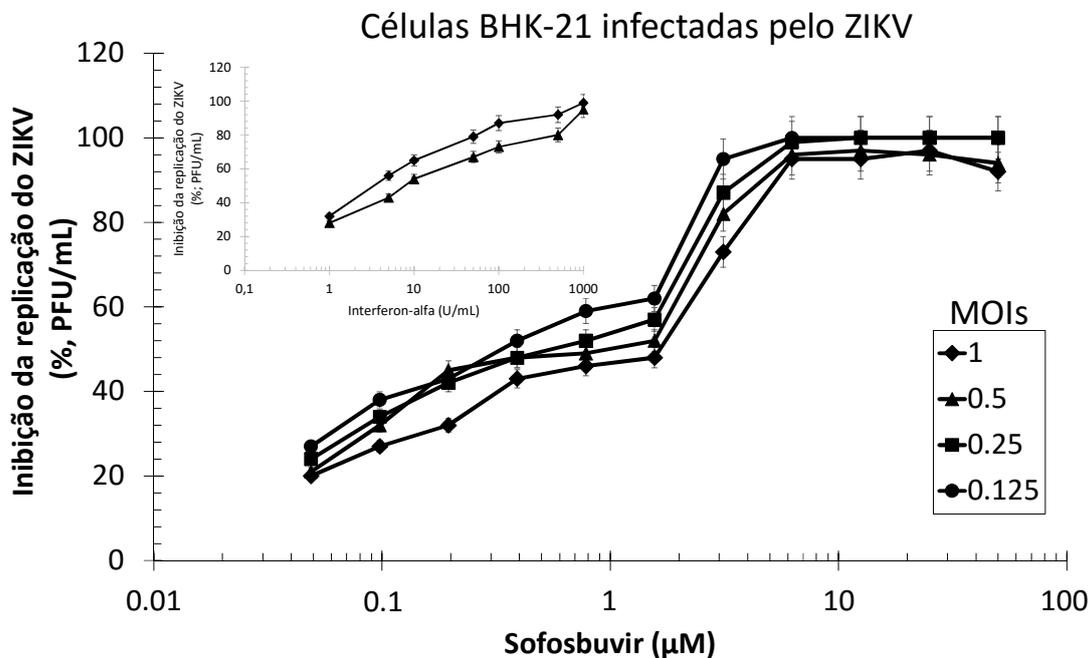


Figura 2B

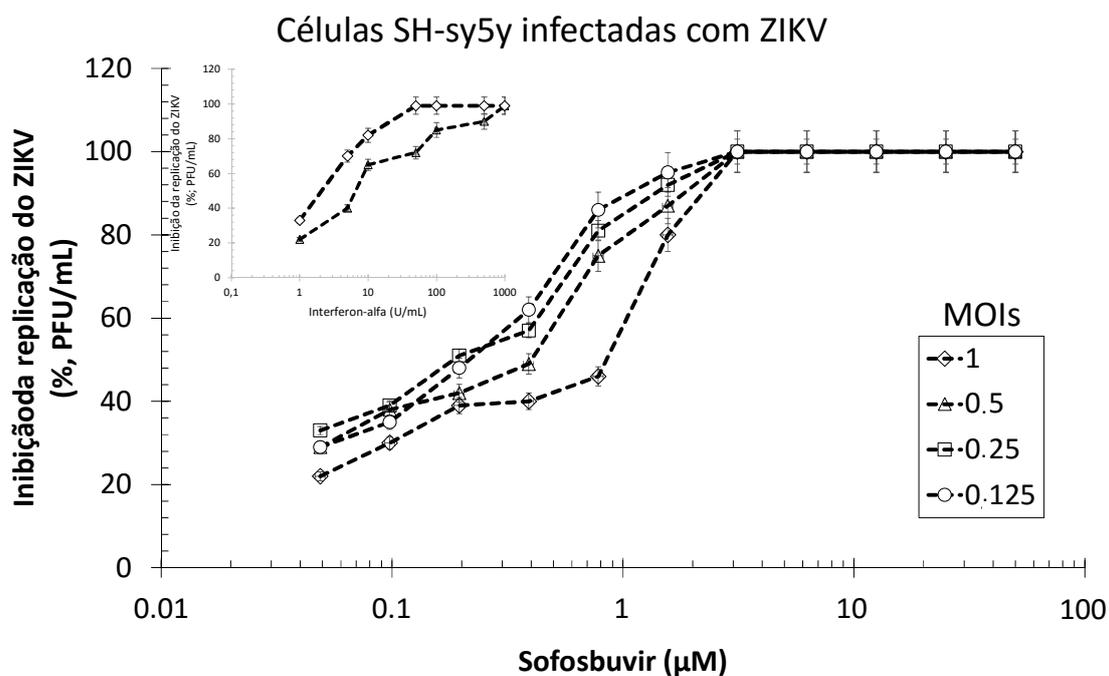


Figura 2C

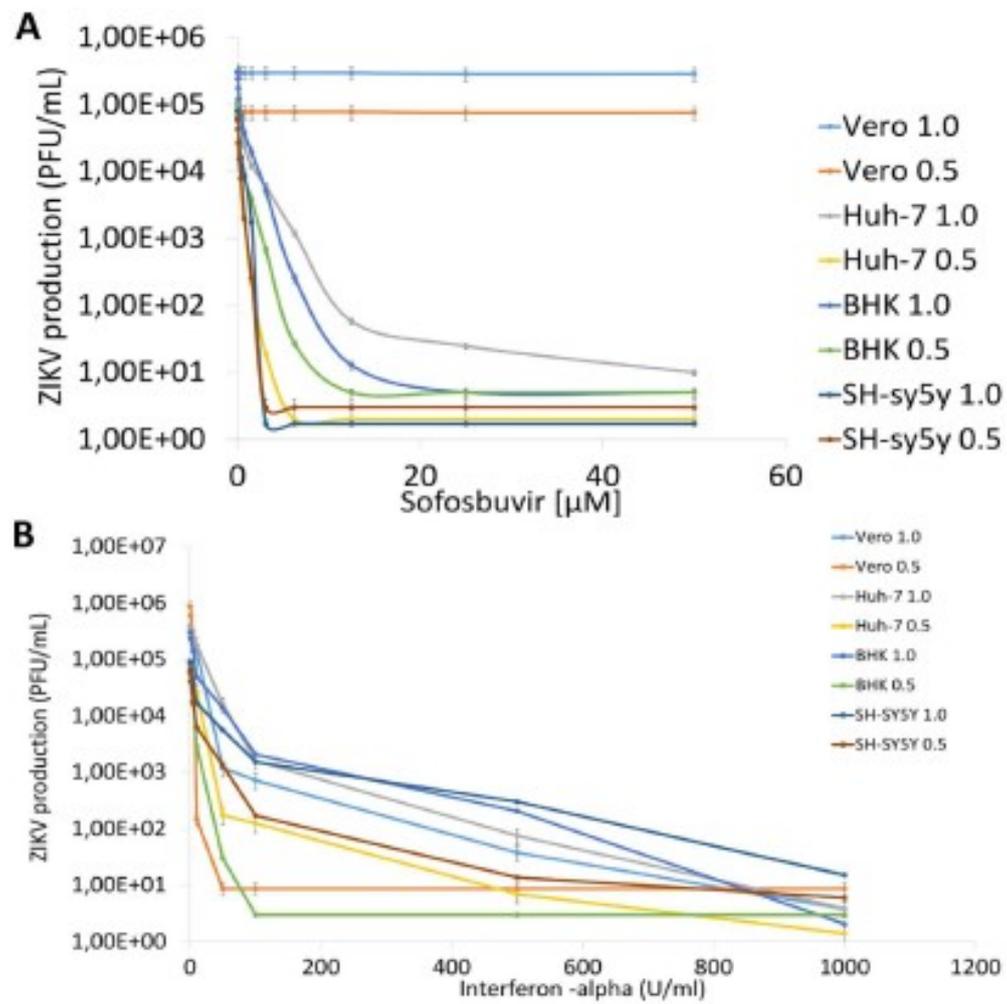


Figura 3

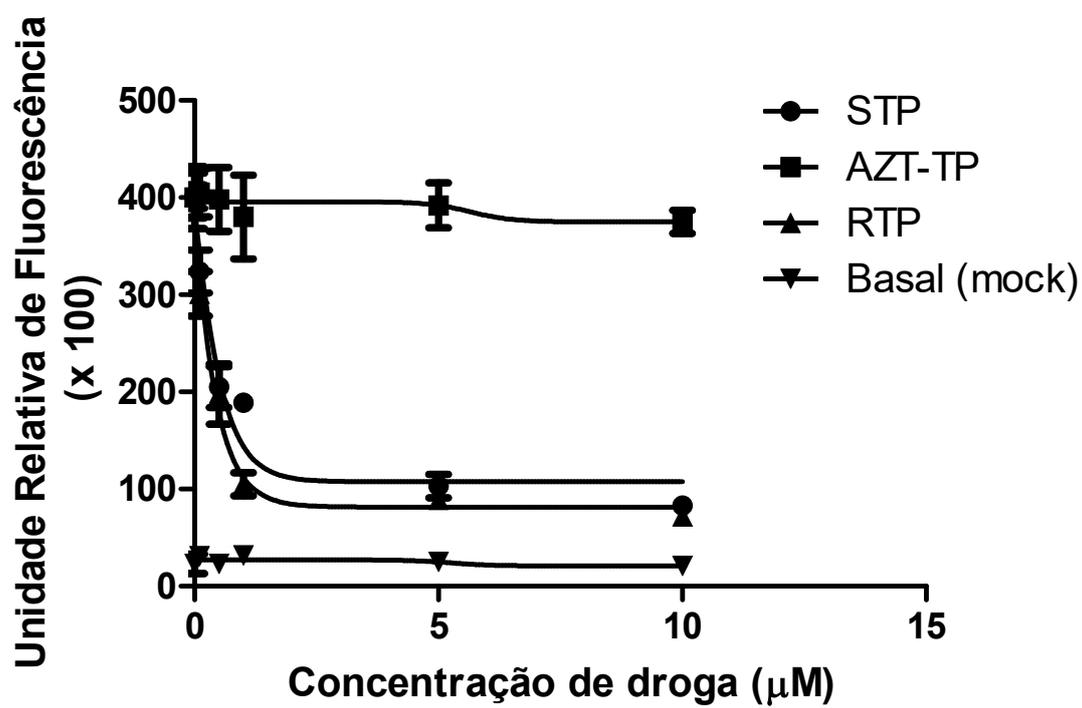


Figura 4

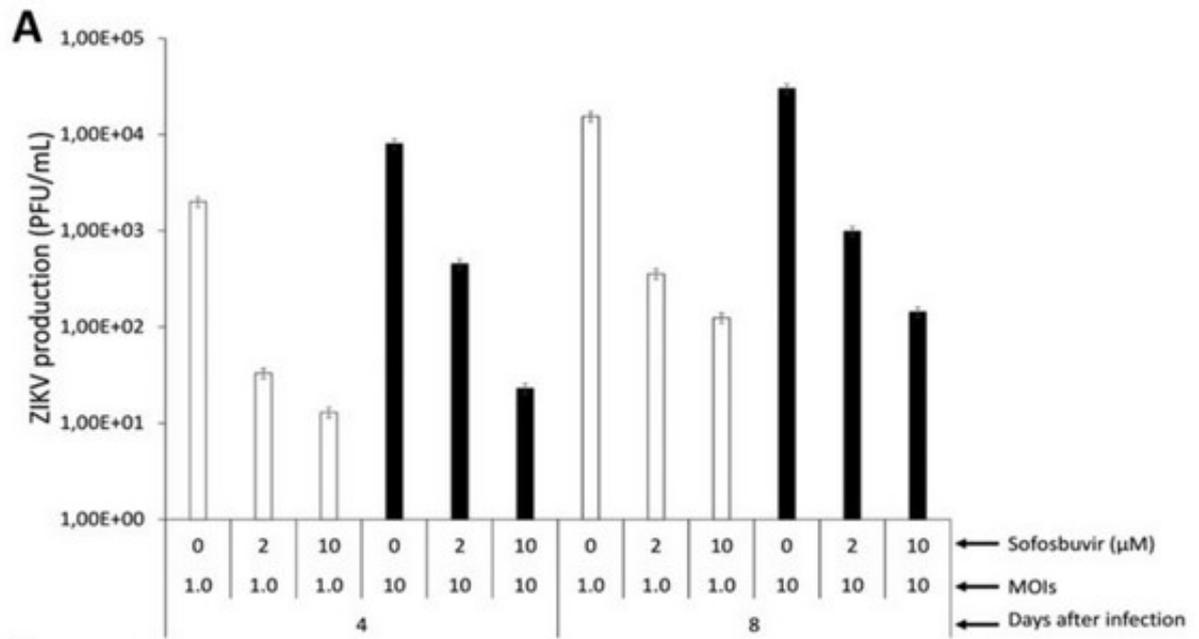


Figura 5

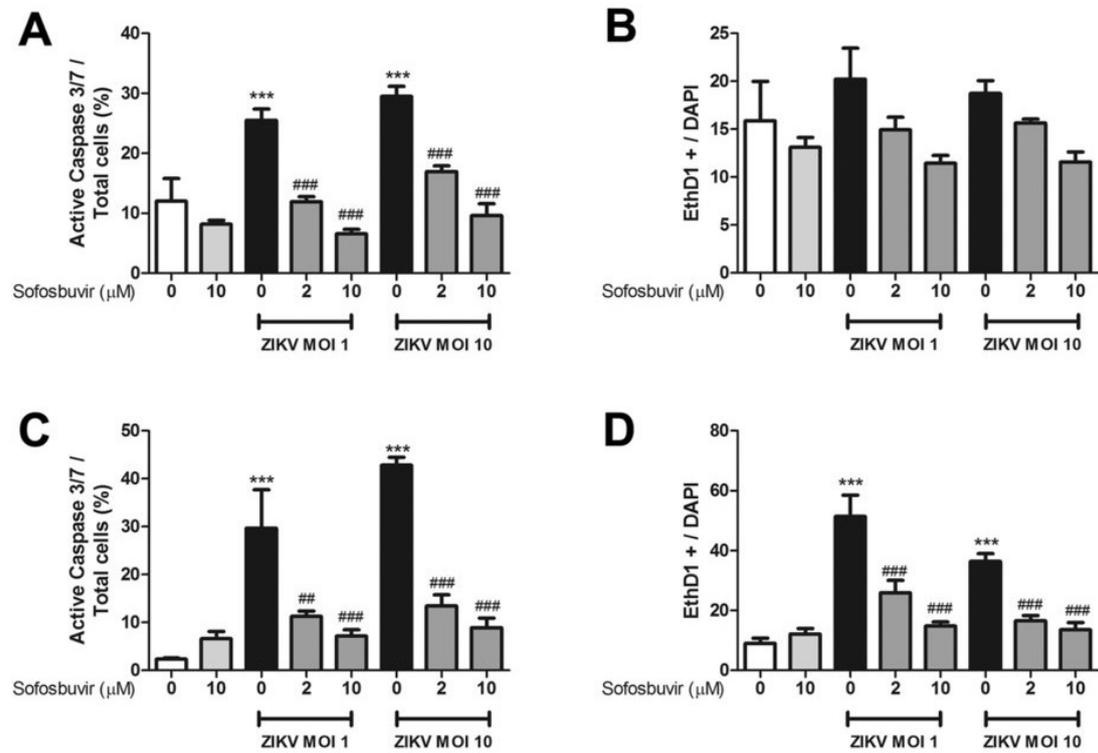


Figura 6

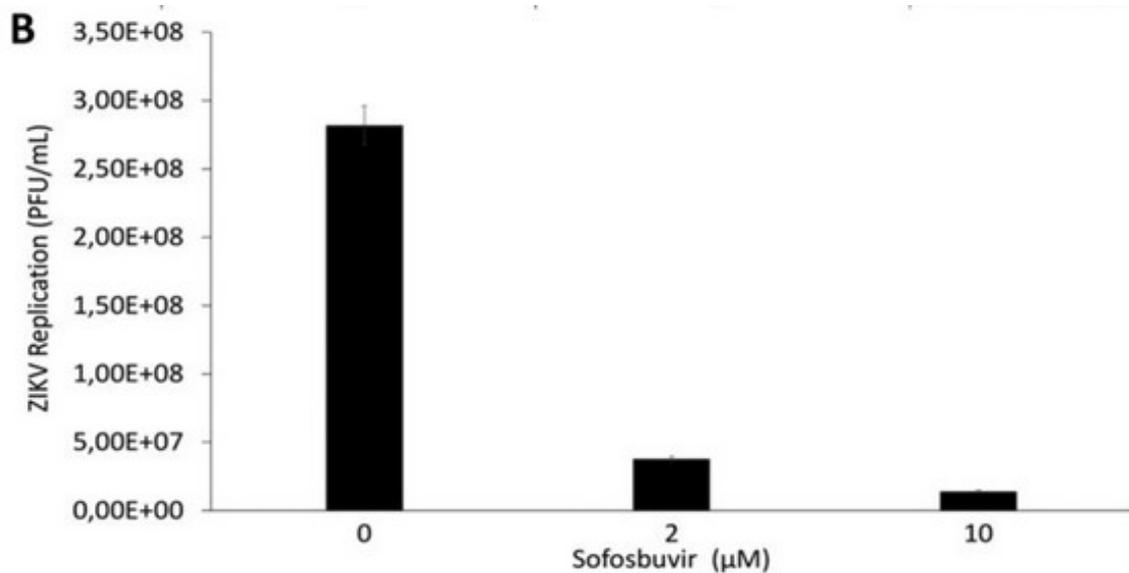


Figura 7A

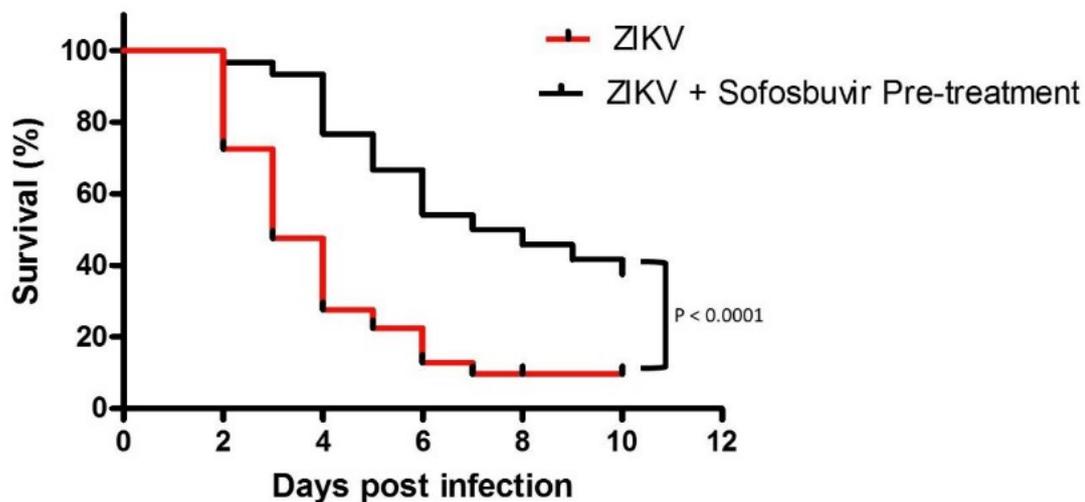


Figura 7B

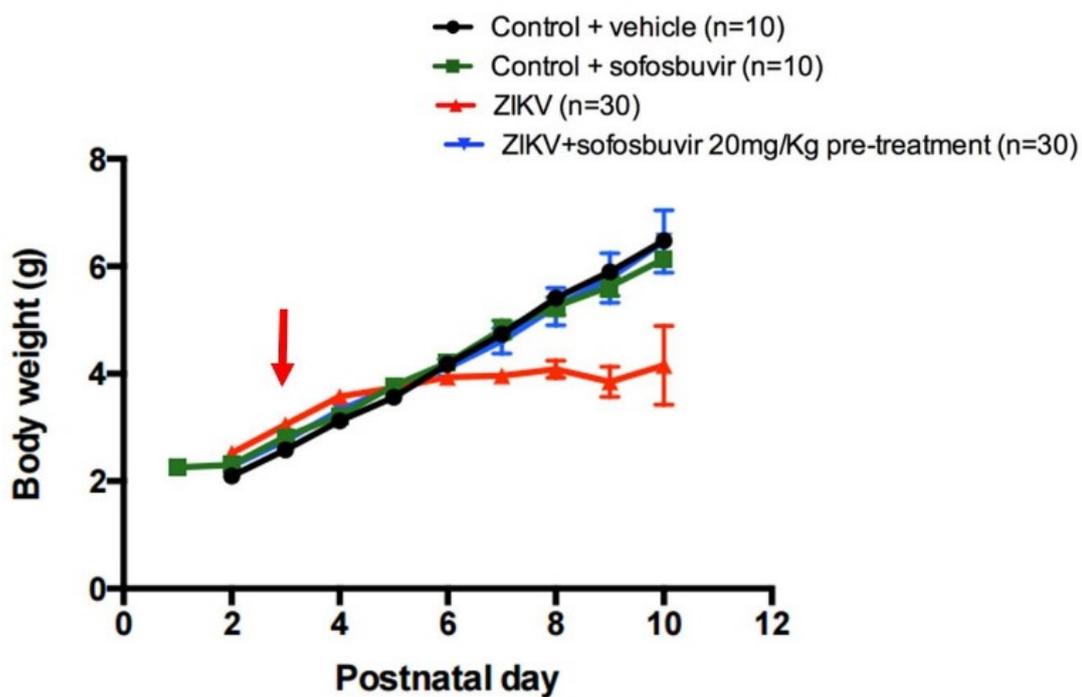


Figura 7C

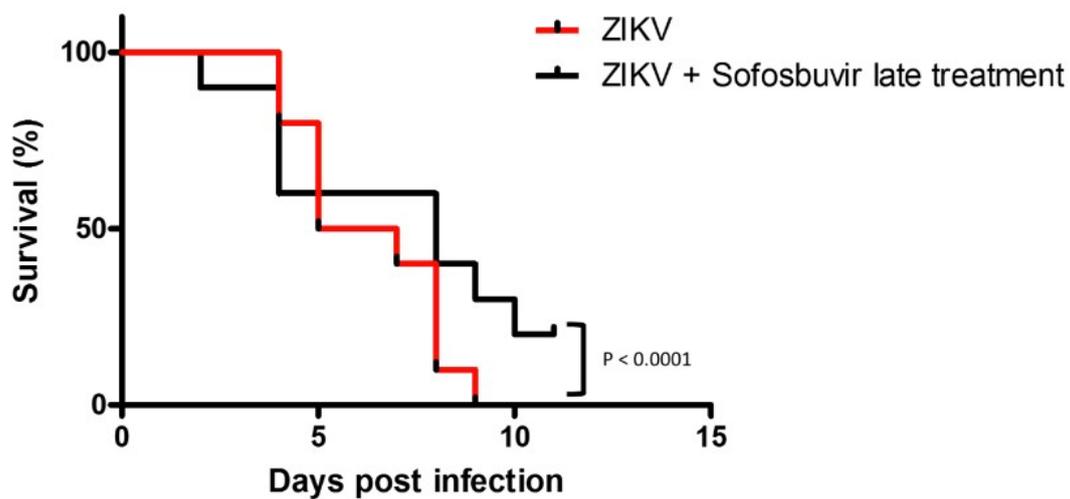


Figura 7D

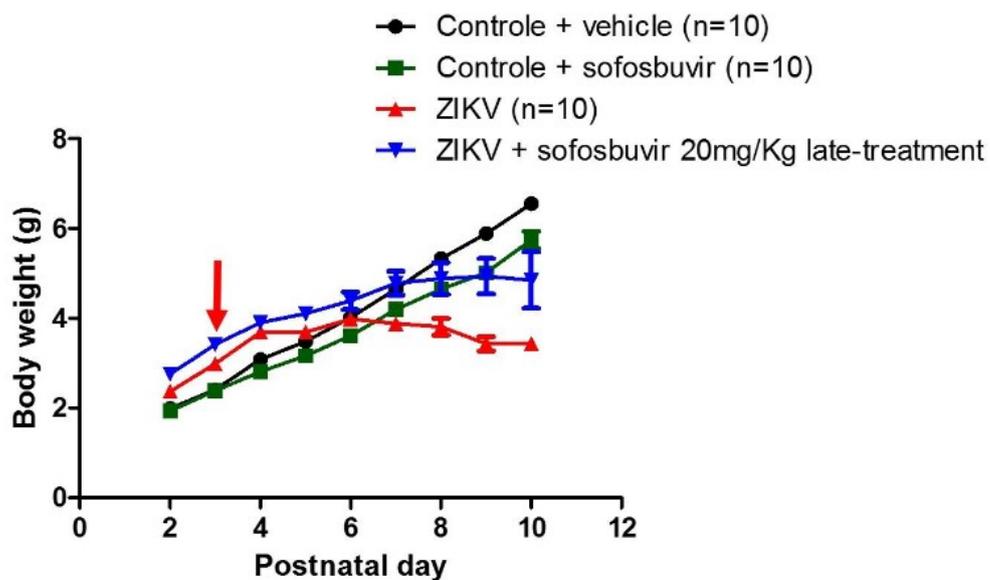


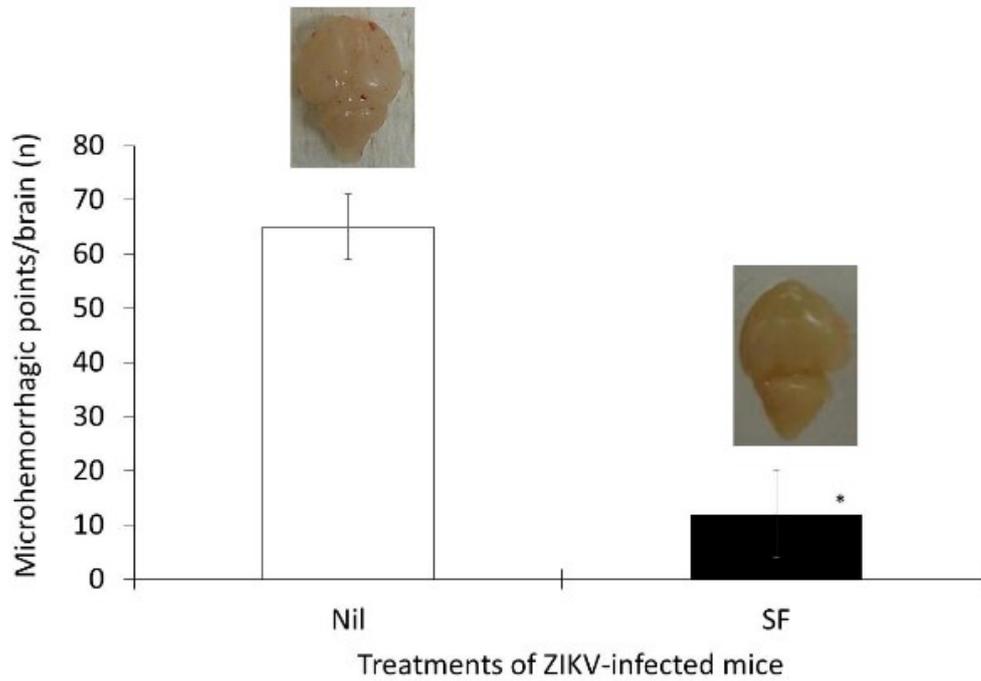
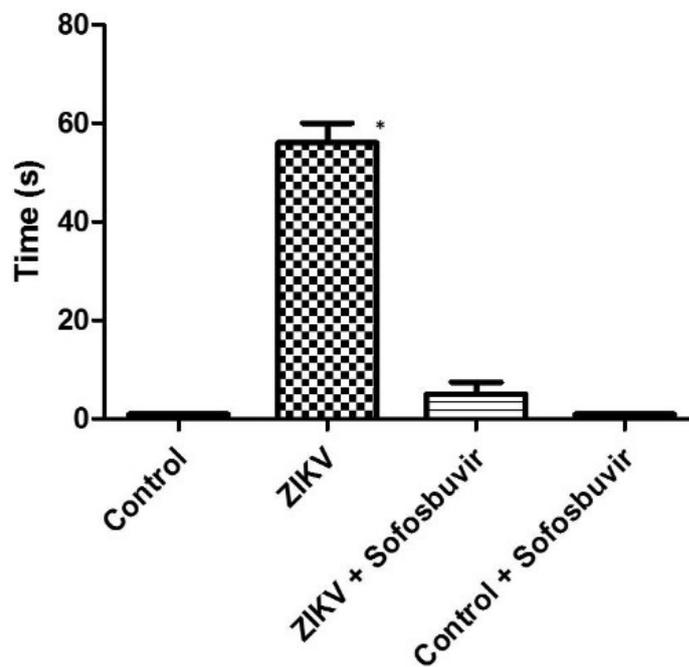
Figura 8**Figura 9**

Figura 10A

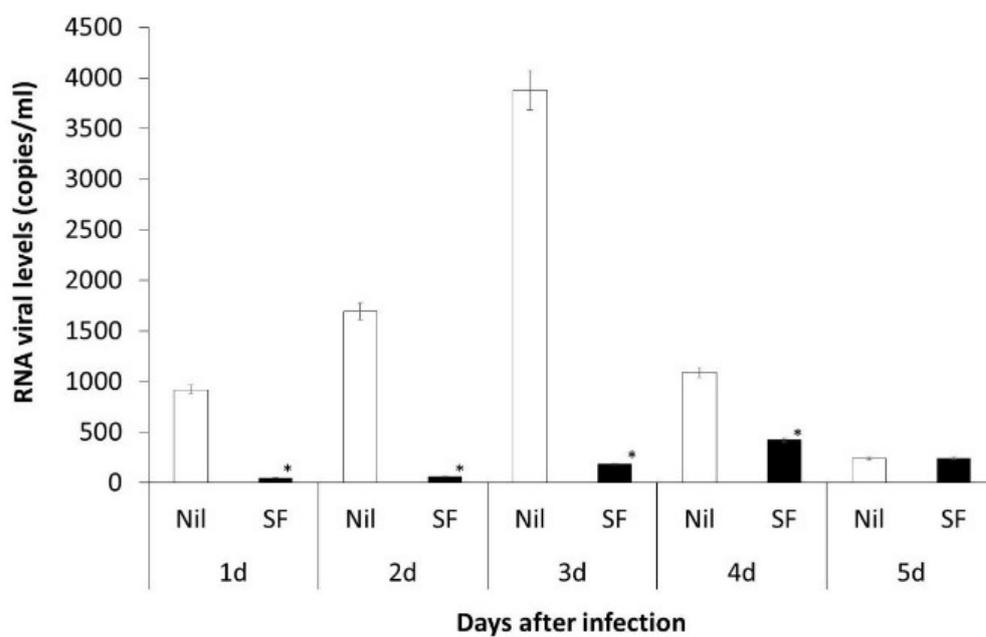


Figura 10B

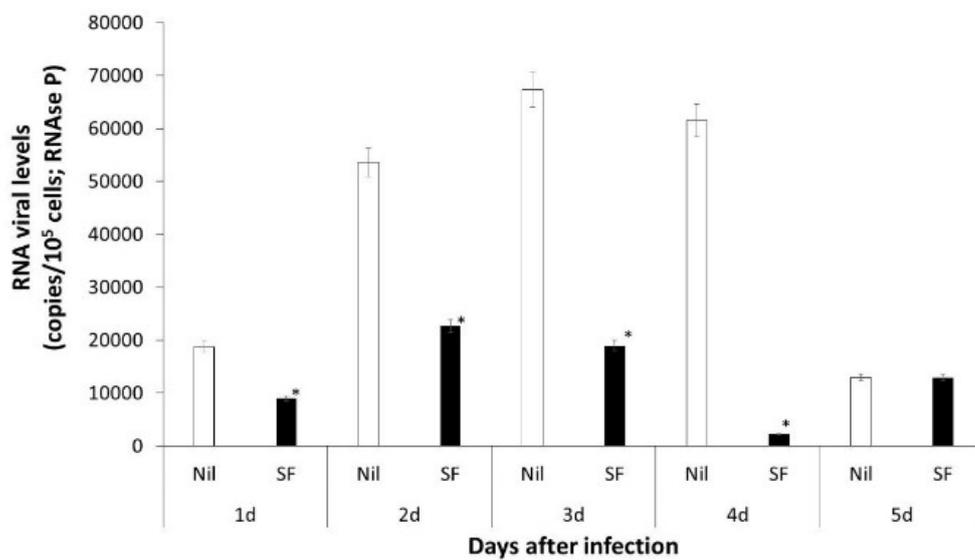


Figura 10C

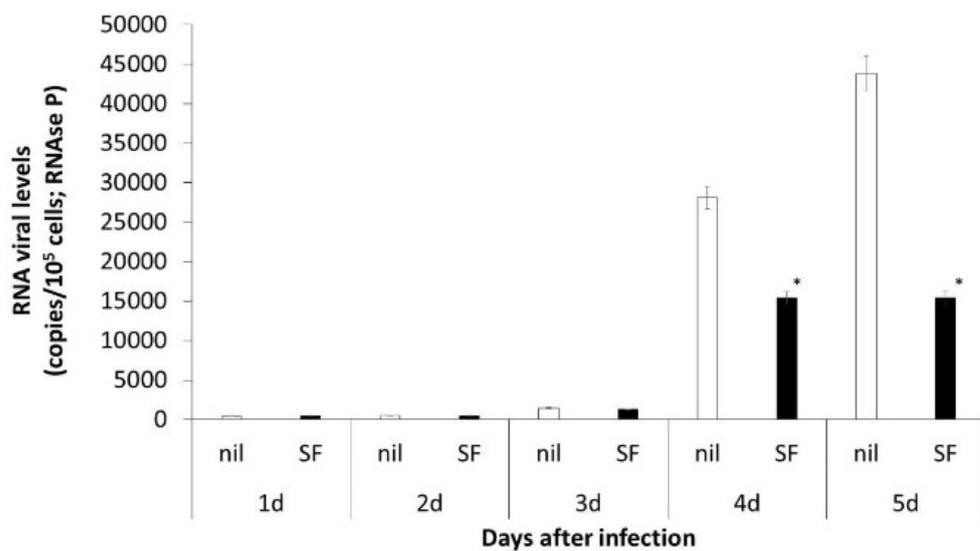
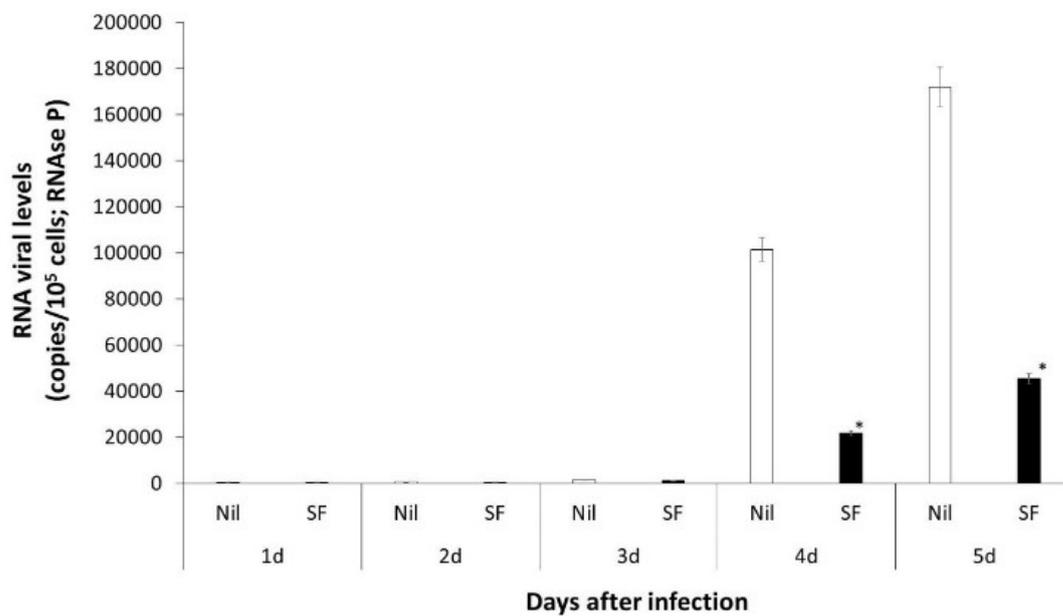


Figura 10D



Resumo**“COMPOSTO ANTIVIRAL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIVIRAL,
USO DO COMPOSTO E MÉTODO DE TRATAMENTO”**

A presente invenção refere-se a compostos antivirais selecionados do grupo de análogos de nucleosídeos/nucleotídeos inibidores de RNA polimerase viral dependente de RNA, ou seus sais, solvatos, derivados ou pró-drogas, ou mesmo combinações dos ditos compostos, para o tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por vírus Zika (ZIKV) e para o tratamento de indivíduos potencialmente expostos ao ZIKV.

A presente invenção também se refere à composição farmacêutica antiviral que contém os compostos da invenção, bem como ao uso dos compostos e método para o tratamento profilático, curativo ou mitigador da infecção por vírus Zika (ZIKV), de indivíduo infectado por ZIKV ou potencialmente exposto ao ZIKV.