



(I P) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 91088 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)
A61K031/735 A

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.07.06	(73) <i>Titular(es):</i> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA 133 S.36 TH STR, S.300, M.B.BLDG PHILAD.PENNSYL.19104-3246 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.07.07 US 216176 1989.06.28 US 373005	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.02.08	(72) <i>Inventor(es):</i> STEVEN A. ROTH US PAUL B. WEISZ US GEORGE FARNBACH US DAVID B. WEINER US MARK I. GREENE US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 07/94 1994.07.12	(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT
(54) <i>Epígrafe:</i> PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES À BASE DE ALFA-,BETA- OU GAMA- -CILCODEXTRINAS	
(57) <i>Resumo:</i>	

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 91 088

REQUERENTE: THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA, norte-americana (Estado de Pennsylvania), com sede em 133 South 36th Street, Philadelphia, PA 19104, Estados Unidos da América.

EPÍGRAFE: " PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES A BASE DE ALFA-,BETA-OU GAMA-CICLODEXTRINAS "

INVENTORES: Steven A.Roth, Paul B. Weisz, George Farnbach, David B.Weiner, Mark I. Greene e William V. Williams.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Estados Unidos da América em 07 de Julho de 1988, em 28 de Junho de 1989, sob os nºs.07/216 176 e 07/373.005, respectivamente.

69 589

Ref: 6749-009-118

PATENTE Nº. 91 088

"Processo de preparação de composições
à base de alfa-, beta- ou gama-ciclo-
dextrinas"

para que

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PEN
NSYLVANIA, pretende obter privilégio
de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se a um processo de preparação de composições à base de ciclodextrinas o qual compreende a mistura de (1) um derivado de oligossacárido cíclico com (2) um agente anti-viral, sendo o derivado caracterizado por possuir uma solubilidade a 0°C, em água destilada, de pelo menos cerca de 20 g/100 ml de água.

As composições preparadas pelo presente invento são úteis na inibição de infecção de células por vírus, na inibição da transmissão, célula a célula, de um vírus e na inibição da formação de sincícios entre células infectadas por um vírus.

MEMÓRIA DESCRITIVA1 - CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se ao campo dos tratamentos para infecções por vírus. Mais particularmente, este invento refere-se ao campo dos agentes activos biologicamente que interferem com, ou inibem, as interacções vírus-célula hospedeira por ligação com o(s) locais receptor(es) nas células hospedeiras, ou nos vírus, ou em ambos.

2 - ANTECEDENTES DO INVENTO2.1 - HIV

O Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida (SIDA) é uma das doenças mais temidas no mundo de hoje. A infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), considerada como a causa da SIDA é quase sempre fatal. Os sintomas da doença podem levar anos a desenvolver-se, facilitando como tal a disseminação desta doença fatal por pessoas que desconhecem que têm o vírus. Os tratamentos para a SIDA são limitados e não têm tido sucesso no controlo da doença.

É geralmente aceite que uma glicoproteína de envólucro de HIV-1 joga um papel chave no processo de infecção das células de tecido humano pelo vírus. A glicoproteína de envólucro consiste em duas porções principais de glicoproteína-gp 120 e gp 41. Crê-se que a gp 120 é a parte mais exterior do complexo composto por estas duas glicoproteínas. Crê-se que a ligação da partícula de HIV-1 às células humanas, um acontecimento chave na infecção das células com o vírus, requer a ligação entre a gp 120 e um complexo proteico receptor conhecido como CD4 em certas células humanas.

A expressão de CD4 nas células humanas revelou aumentar a susceptibilidade da ligação, a penetração e infecção por HIV-1. Pensa-se que a CD4, uma glicoproteína da superfície celular com 55 000 dalton, representa um receptor de superfície celular ao qual a glicoproteína de envólucro do HIV-1 (gp 120) se liga. Esta interacção facilita provavelmente os acontecimentos necessários

-3-

à fusão viral com a membrana de plasma e a subsequente entrada na célula.

Crê-se que há pelo menos três locais de ligação separados na molécula de gp 120 que se combinam para formar um local de ligação de alta afinidade pelo receptor CD4. Esta afinidade pelo receptor CD4 é extremamente forte e esta afinidade de ligação pode deslocar ou impedir a ligação de anticorpos produzidos pelo hospedeiro na sua defesa imunológica standard. Por exemplo, a maior parte dos doentes com SIDA e com ARC (complexo relacionado com a SIDA) têm níveis elevados de anticorpos para gp 120, contudo a interacção gp 120-CD4 pode deslocar o anticorpo ligado de modo que se pode esperar que as vacinas dirigidas contra a gp 120 sejam ineficazes, uma vez que os anticorpos que induzem no hospedeiro serão relativamente ineficazes. Um composto, comercialmente disponível, que é útil como agente anti-infeccioso é uma forma de CD4. Crê-se que o composto resulta porque se liga à gp 120 tão fortemente como a CD4 natural. Deste modo, se administrada em concentrações suficientemente altas, a CD4 livre (administrada) ligar-se-á a toda a gp 120 viral e evitará a sua ligação ao CD4 das células hospedeiras.

O vírus HIV-1 revelou infectar preferencialmente as células que expressam a glicoproteína de superfície CD4. Crê-se que este tropismo resulta de interacções entre a gp 120 de envólucro do vírus e uma glicoproteína de local de ligação de grande afinidade CD4 que permite a absorção viral. Seguidamente à ligação inicial do vírus à molécula de CD4 de superfície da célula, crê-se que são importantes outras regiões do envólucro do vírus na fusão inicial entre as membranas virais e celulares. Pensa-se que esta interacção precede a entrada, descapsulagem e replicação virais.

Embora exista muita evidência a suportar a sequência de acontecimentos anteriormente exposta, vários estudos têm demonstrado que a CD4 pode ser necessária, mas não suficiente, para mediar a entrada de HIV-1 nas células. Estas experiências têm usado células primárias expressando a CD4 e linhas de células humanas transfectadas com CD4; estas células ligam e internalizam o

vírus HIV-1. Adicionalmente, os monócitos e algumas linhas de células B raras que são infectáveis por HIV-1 expressam mRNA codificando potencialmente proteínas CD4. Finalmente, os anticorpos para epítomos específicos CD4 inibem a ligação viral e formação de sincícios bem como a infecção viral.

A maior parte das células murinas que expressam a glicoproteína humana CD4 ligam-se ao HIV-1 mas não formam facilmente sincícios e não são facilmente infectadas. Adicionalmente foi revelado que os anticorpos que quebram as interações vírus-CD4 não bloqueiam a infecção viral de certas linhas de células neurónicas humanas. Estas últimas observações sugerem que outros factores e/ou outras moléculas presentes nas células humanas para lá da CD4 podem ser operantes na penetração do HIV-1.

Sabe-se que os receptores de superfície da célula ocorrem em muitos tipos de células. Crê-se que estes receptores são importantes numa larga variedade de funções celulares tais como os processos de reconhecimento célula-célula, regulação do crescimento, regulação hormonal e metabólica e agregação estrutural das células. Alguns destes receptores de superfície de célula, como por exemplo o receptor CD4, são considerados glicoproteínas. As glicoproteínas são moléculas compreendendo uma região proteica ligada a uma região polissacarídica. A região proteica constitui tipicamente a maior parte da molécula. Os ligandos de alguns receptores, tais como a gp 120, a glicoproteína de envólucro do HIV-1 que se liga ao receptor CD4, são também glicoproteínas. Crê-se que a porção polissacarídica da molécula de glicoproteína joga um papel na interacção entre o receptor e o seu ligando e é importante para conferir especificidade à ligação receptor-ligando pelo menos nalguns casos.

2.2 - POLISSACÁRIDOS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS

Os polissacáridos são polímeros biologicamente importantes compostos por moléculas de açúcares simples ligadas. Estas substâncias estão sempre presentes em organismos biológicos. O amido é um polissacárido usualmente conhecido tal como o são muitas composições de ocorrência natural. Sabe-se que pequenos segmen-

-5-

tos de cadeias de polissacáridos são importantes nas propriedades físicas e químicas de muitas proteínas - particularmente em organismos eucariotas. Sabe-se que vários polissacáridos e seus derivados são importantes nos fenômenos de superfície em sistemas biológicos. A heparina, por exemplo, é uma mistura de polissacáridos polissulfatados com pesos moleculares variando entre cerca de 5 000 e 40 000; é preparada comercialmente a partir de material biológico tal como tecido do pulmão. As substâncias contidas na heparina são surfactantes biológicos importantes e também previnem a formação de coágulos no sangue. Sabe-se que a heparina e as substâncias semelhantes à heparina previnem a adesão de bactérias potencialmente infecciosas a superfícies na bexiga urinária, uretra e uretères.

Embora a heparina tenha sido durante muito tempo usada em medicina para tratar coágulos sanguíneos, a heparina tem, recentemente, suscitado a atenção de investigadores para outros usos. Science Focus, New York Academy of Sciences, 2(3): 1, 1988 revela que a heparina pode inibir o HIV, o agente viral que causa a SIDA, em células seleccionadas, num estágio do ciclo, reprodutivo do vírus. Contudo, a heparina é um anticoagulante forte, muito conhecido e o seu uso continuado em mamíferos pode levar a distúrbios hemorrágicos. Mais ainda, a heparina comercial é uma mistura heterogênea de substâncias derivadas de fontes naturais.

Mitsuya et al., Science, 240: 646-649 (1988) demonstraram que o uso de polidextranos lineares poli-sulfatados de alto peso molecular (P.M de aproximadamente 8 000) podem inibir a infecção por HIV-1 de certos glóbulos brancos. Baba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6132-6136 demonstrou que o sulfato de dextrana (P.M. 5 000) e a heparina podem inibir a infecção por HIV-1 de certos glóbulos brancos. A Patente americana Nº. 4 783 446, 1988, revela o uso de carragenanos ou mistura de carragenanos no tratamento da SIDA ou outras infecções por retrovírus. Os carragenanos estarão na gama de P.M. de 5 000 - 500 000 variando a maioria entre P.M. 100 000 e 500 000. Contudo não está claro se este fenómeno é um efeito específico ou não específico deste composto, uma vez que as substâncias de alto peso molecular deste tipo po-

-6-

dem ter efeitos de membrana não específicos nas propriedades lipídicas da superfície da célula e da superfície do envelope viral. Mais ainda, tal como a heparina, o composto de alto peso molecular é fortemente anticoagulante.

O tratamento de indivíduos infectados com HIV-1 tem sido complicado pela capacidade de ligação do vírus às células de mamíferos e a extrema toxicidade de infecção com o vírus. Há um potencial para infectar inadvertidamente indivíduos saudáveis com apenas HIV-1 completo parcialmente inativado ou componentes do vírus, como parte de uma vacina. Os esforços para controlar o vírus através de drogas não tiveram sucesso até à data. São necessários meios alternativos de tratamento de indivíduos infectados com HIV-1, bem como métodos alternativos de prevenção ou inibição de infecção de células com HIV-1 que não sejam tóxicos para o indivíduo infectado com HIV-1 e que sejam seguros para os indivíduos não infectados com o vírus.

3 - SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento proporciona métodos novos para inibir a infecção de células por um vírus usando um carbo-hidrato como agente de bloqueio. O invento é também dirigido a métodos para a inibição da transmissão célula a célula do vírus usando um carbo-hidrato como agente de bloqueio. O agente de bloqueio carbo-hidrato é capaz de interagir com as células do hospedeiro e interfere com a ligação do vírus às células. De preferência o agente de bloqueio carbo-hidrato é um derivado de um oligossacárido cíclico muito solúvel em água contendo até cerca de doze monómeros de açúcar. O derivado de oligossacárido cíclico pode conter substituintes iônicos e/ou não iônicos. Tal como é usado no presente pedido o termo "muito solúvel em água" pretende englobar uma solubilidade medida a 0°C, de pelo menos cerca de 15 g/100 ml em água destilada, preferencialmente de pelo menos cerca de 20 g/100 ml, mais preferencialmente maior que 30 g/100 ml. De preferência, o oligossacárido cíclico tem cerca de seis a oito monómeros de açúcar.

Este invento também fornece um método de inibição da for-

-7-

mação de sincícios entre células, compreendendo proporcionar um agente bloqueador carbo-hidrato que seja capaz de interagir com as referidas células ou vírus, compreendendo o referido agente bloqueador carbo-hidrato um derivado de oligossacárido cíclico contendo até cerca doze açúcares, em que o dito derivado é caracterizado por uma solubilidade de pelo menos 20 g/100 ml. O agente é administrado às referidas células sob condições seleccionadas para causar a interacção do derivado de oligossacárido cíclico com as referidas células, inibindo assim a formação de sincícios. Noutra concretização, os derivados de oligossacárido cíclicos do presente invento podem inibir a formação de sincícios por administração do agente de bloqueio carbo-hidrato sob condições em que o vírus é impedido de se ligar à célula.

Este invento fornece ainda uma composição para inibir a infecção por vírus, em mamíferos, incluindo o Homem, compreendendo (1) um derivado, muito solúvel em água, de um oligossacárido cíclico em combinação com (2) pelo menos um agente antiviral, sendo o referido derivado caracterizado por uma solubilidade em água destilada de pelo menos cerca de 20 gramas por 100 mililitros de água a 0°C. As composições podem também ser usadas para inibir a transmissão célula a célula do vírus. As composições, noutra concretização, podem ser usadas para inibir a formação de sincícios em células infectadas.

O invento fornece adicionalmente uma composição para inibir a infecção por retrovírus em mamíferos incluindo humanos compreendendo (1) um derivado de um oligossacárido cíclico, muito solúvel em água em combinação com (2) pelo menos um composto orgânico modulador do crescimento celular, esteróide ou não esteróide, em que o composto esteróide é desprovido de actividade glucocorticóide e o referido derivado é caracterizado por uma solubilidade em água destilada de pelo menos 20 gramas por 100 mililitros de água a 0°C. Numa concretização, estas composições podem ser usadas para tratar o sarcoma de Kaposi, muitas vezes manifestado em pacientes com SIDA. As composições podem também ser usadas para prevenir a transmissão célula a célula do vírus.

Ainda é revelada uma composição para inibir a infecção por retrovírus em mamíferos incluindo o Homem, compreendendo (1) um derivado de um oligossacárido cíclico, muito solúvel em água, em combinação com (2) pelo menos um agente antiviral e (3) pelo menos um composto orgânico modulador do crescimento, esteróide ou não esteróide, em que o composto esteróide é desprovido de actividade glucocorticóide e o referido derivado é caracterizado por uma solubilidade em água destilada de pelo menos 20 gramas por 100 mililitros de água a 0°C. Numa concretização, estas composições podem ser usadas para tratar o sarcoma de Kaposi, muitas vezes manifestado em pacientes com SIDA.

4 - BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 mostra a formação de sincícios na presença (A) ou ausência (B) de sulfato de β -ciclodextrina 320 μ M.

A figura 2 ilustra os efeitos de ciclodextrina e derivados da ciclodextrina na infecciosidade do HIV, determinados pela actividade da transcriptase inversa. As amostras ensaiadas foram (A) células de controlo não tratadas, (B) anel de β -ciclodextrina não substituído, (C) anel de β -ciclodextrina parcialmente sulfatado, (D) anel de β -ciclodextrina profilado, (E) anel de β -ciclodextrina sulfatado e (F) anel de β -ciclodextrina metilado. Os números indicam diluições $1/2$ dos compostos teste com 1 = 2,5 mM de concentração do composto.

A figura 3 mostra o efeito do tetradeca-sulfato de beta-ciclodextrina (β -CD-14S ou β -CD-TDS) na produção de RNA de HIV. As partículas de vírus foram incubadas com células alvo na presença ou ausência de β -CD-14S 1M. 72 horas após infecção, as células foram lavadas e realizaram-se testes de "dot blot" para determinar a presença ou ausência de produção de RNA viral. Em (A), as células alvo foram infectadas na presença de β -ciclodextrina sulfatada (faixa A), na ausência de ciclodextrinas (faixa B), ou na presença de β -ciclodextrinas não substituídas (faixa C). As diluições $1/2$ das células processam-se da esquerda para a direita, começando com 10^6 células/cavidade utilizadas. Em (B), as células infectadas viralmente (+) ou não infectadas (-) foram testa-

das quando à sua capacidade de produzir RNA viral por análise "dot blot". CD = células infectadas incubadas com β -CD-14S 1 mM. As diluições $\frac{1}{2}$ das células dispõem-se de cima para baixo, começando com 10^6 células/cavidade.

A figura 4 mostra uma micrografia electrónica de partículas de HIV-1 produzida por células H9 infectadas na presença de β -CD-14S 1 mM. Note-se a morfologia madura das partículas virais produzidas (acima à esquerda) bem como o desenvolvimento do vírus.

A figura 5 mostra a ligação do anticorpo monoclonal na presença de β -CD-14S 1 μ M. A linha humana de células T CEM foi pre-incubada com β -CD-14S 1 M, e depois incubada com vários anticorpos monoclonais como se nota na secção 6.1, infra. Os histogramas de fluorescência mostram a intensidade relativa de fluorescência (abcissa) relativamente ao número de células (ordenada) para cada monoclonal listado. A ligação do anticorpo primária foi determinada na presença (direita) ou ausência (esquerda) de β -CD-14S.

A Figura 6 compara os efeitos do poli-sulfato de dextrana e das β -ciclodextrinas substituídas na infecciosidade de HIV. Em (A), o grau de inibição dos sincícios é mostrado em ordenada para cada composto adicionado. SUL = β -CD-14S 600 μ M, AL = β -CD não substituído 600 μ M, Pro = β -CD propoxilado 600 μ M, 2MET = β -CD metoxilado 300 μ M, DS5 = sulfato de dextrana 5 000 600 μ M, DS500 = sulfato de dextrana 500 000 600 μ M. Apresentam-se os resultados para cada um dos 3 pontos temporais. Apresentam-se em (B) os resultados semelhantes utilizando os testes com transcriptase inversa. As partículas de vírus infecciosas foram incubadas na presença de β -ciclodextrinas sulfatada (faixa 1), sulfato de dextrana 5 000 (faixa 2) ou meios (faixa 3) durante 6 dias, tempo após o qual as células foram ressuspensas em meios frescos e deixadas incubar durante mais 10 dias antes de serem recolhidas. A actividade da transcriptase inversa foi determinada como se descreveu na Secção 6.1, infra. As diluições $\frac{1}{2}$ do composto adicionado são apresentadas de baixo (concentração mais alta a 2,5 mM) para cima (concentração mais baixa).

5 - DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O presente invento fornece métodos para inibir a infecção de células por um vírus que emprega um agente bloqueador carbo-hidrato capaz de interagir com células de modo a interferir com a ligação do vírus com as células. O invento também se refere a métodos para o uso de tais agentes bloqueadores carbo-hidrato para bloquear a transmissão célula a célula do vírus. O invento proporciona ainda métodos que utilizam esses agentes bloqueadores carbo-hidrato para inibir a formação de sincícios. O invento refere-se ainda a uma composição que compreende um agente de bloqueio carbo-hidrato em combinação com pelo menos um agente antiviral. Também é proporcionada uma composição que compreende um agente bloqueador carbo-hidrato em combinação com pelo menos um composto orgânico esteróide ou não esteróide em que o esteróide não contenha actividade glucocorticóide.

5.1 - AGENTES BLOQUEADORES CARBO-HIDRATO: OLIGOSSACÁRIDOS

Os agentes bloqueadores carbo-hidrato adequados para uso de acordo com o método do invento compreendem um ou mais derivados, muito solúveis em água, de oligossacáridos cíclicos possuindo até doze monómeros de açúcar. Os oligossacáridos são geralmente definidos como carbo-hidratos contendo dois até cerca de dez açúcares simples ligados uns aos outros. Contudo, para estes efeitos, o termo oligossacárido é usado para significar carbo-hidratos contendo de dois a cerca de doze açúcares simples ligados uns aos outros. Prefere-se o uso de oligossacáridos com menos de cerca de doze monómeros de açúcar. Os oligossacáridos cíclicos mais preferidos compreendem moléculas cíclicas com seis a oito monómeros de açúcar tais como a alfa-, beta- ou gama-ciclodextrina. As ciclodextrinas (CDs) são oligossacáridos cíclicos não lineares com pelo menos seis unidades de glucopirranose. Embora se conheçam ciclodextrinas com até doze destas unidades, apenas os três primeiros homólogos têm sido estudados extensivamente. As designações comuns das ciclodextrinas de baixo peso molecular são alfa-, beta- e gama-ciclodextrinas que correspondem a 6, 7 e 8 unidades de glucopirranose, respectivamente. As ciclodextrinas são

-11-

também conhecidas, por vezes, como cicloamiloses. São conhecidos um certo número de derivados de ciclodextrina. Em geral, estas ciclodextrinas modificadas quimicamente são formadas por reacção dos grupos hidroxilo primários ou secundários ligados aos carbonos 2, 3 ou 6 sem perturbar as ligações hemiacetal alfa (1-4). Açúcares, que não a glucose, tais como a arabinose, galactose e outros açúcares com 5 a 6 carbonos e muitas outras formas conhecidas dos especialistas no ramo como açúcares podem ser úteis.

De acordo com o presente invento são úteis os derivados de oligossacáridos cíclicos de grande solubilidade em água comportando substituintes não iónicos e/ou iónicos. Os derivados de oligossacárido cíclico, altamente solúveis com água, adequados incluem os derivados alfa, beta e gama CD com substituintes não iónicos incluindo não limitativamente os substituintes alquila tais como metilo, etilo, etc., bem como aqueles em que um número de grupos hidroxilo são substituídos por outros grupos de modo a aumentar a actividade hidrofílica do CD. Estes grupos podem incluir ésteres, éteres (por ex. alcoxi), tioésteres, tioéteres, ácidos carboxílicos, carbo-hidratos ou outros grupos que transmitam actividade hidrofílica através de constituintes polares ou de ligação de hidrogénio. A substituição pode ocorrer em alguns ou todos os grupos hidroxilo. Numa concretização preferida, os oligossacáridos cíclicos contêm cerca de 10 a cerca de 16 grupos.

Os derivados de oligossacárido cíclico úteis no presente invento são altamente hidrofílicos e como tal muito solúveis em água. É provavelmente importante um carácter altamente hidrofílico para permitir a interacção com as superfícies celulares. A actividade hidrofílica é provavelmente indicada grosseiramente pela afinidade pela água, tal como medida pela solubilidade em água. É importante medir a mesma a 0°C uma vez que a temperaturas mais altas o derivado mais adequado tem solubilidades tão elevadas que é difícil obter medidas com sentido.

É tido em atenção que os derivados de oligossacárido cíclicos, muito solúveis em água, comportando substituintes iónicos e/ou não iónicos podem, em alguns casos, ter propriedades vantajo

-12-

sas e que estas estão dentro do âmbito deste invento. Embora os derivados altamente solúveis em água sejam em geral considerados úteis, preferem-se os derivados salinos. O termo "muito solúvel" tal como usado aqui refere-se a uma solubilidade de pelo menos 20 g/100 ml medida a 0°C, preferencialmente a mais de 30 g/100 ml.

A frase "derivado salino" tal como usada aqui significa um composto iónico derivado de um oligossacárido cíclico por reacção com um reagente adequado. Os derivados salinos preferidos são proporcionados por um oligossacárido cíclico com substituintes seleccionados de entre o grupo consistindo em sulfato, fosfato, carboxilato e misturas destes, associado a um catião não tóxico, fisiologicamente aceitável. Muitos dos referidos derivados preferidos são compostos conhecidos (Croft e Bartech, 1983, Tetrahedron 39:1417-1474). Mas muitas formas potencialmente úteis podem ser variantes, estruturais ou químicas de compostos conhecidos. Algumas das formas salinas preferidas dos derivados são as formas de sódio e potássio, uma vez que estas tendem a conferir uma solubilidade em água aumentada a aníões orgânicos. Os derivados salinos úteis exibirão condutividade electrolítica e propriedades osmóticas características de electrólitos e poli-electrólitos quando em solução aquosa. Um derivado salino particularmente preferido seria um derivado beta-ciclodextrina contendo cerca de 12-16 grupos sulfato. Podem ser usados vários graus de sulfatação por unidade de glucose, tal como uma média de um grupo sulfato por duas unidades de glucose ou de dois grupos sulfato por unidade de glucose. Preferem-se ciclodextrinas com cerca de dois grupos de sulfato por unidade de glucose.

O que se expôs atrás teve o objectivo de proporcionar uma compreensão geral dos oligossacáridos que são provavelmente úteis na prática do presente invento. Deve compreender-se, contudo, que tais oligossacáridos são melhor descritos por aquilo que fazem do que por aquilo que são. Os oligossacáridos que são úteis aqui são os oligossacáridos que são capazes de interaccionar com células hospedeiras potenciais de tal forma que interferem com a ligação dos vírus às células hospedeiras. Os especialistas no ramo

-13-

saberão que o modo de interferência com a ligação de um vírus a uma célula hospedeira variará de acordo com a ligação particular vírus-célula hospedeira que estiver em causa. Supõe-se que estão envolvidas na ligação a células hospedeiras potenciais diferentes porções dos oligossacáridos, de acordo com os requisitos específicos de uma interação particular vírus-célula hospedeira.

5.2 - AGENTES ANTIVIRAIS

De acordo com uma concretização do invento, utiliza-se um derivado de oligossacárido cíclico, muito solúvel em água, em combinação com pelo menos um agente antiviral para interferir com a interação do vírus com uma célula. Um agente antiviral é qualquer composto orgânico ou inorgânico que inibe qualquer estágio do ciclo da replicação viral incluindo, não limitativamente, a ligação do vírus à célula, entrada do vírus na célula, o des-revestimento do vírus, a inibição da replicação do ácido nucleico viral, a inibição da síntese de proteína viral e a maturação da partícula de vírus.

Um exemplo de um agente antiviral é um derivado de nucleósido. Os derivados de nucleósido são formas modificadas dos nucleósidos purina (adenosina e guanosina) e pirimidina (timidina, uridina e citidina) que são os blocos de construção de RNA e DNA. Os derivados de nucleósidos que podem ser usados no invento aqui reivindicado incluem não limitativamente: AZT (3'-azido-2',3'-dideoxitimidina, azidotimidina, zidovudina);

2',3' didesoxinuclósidos incluindo 2',3' didesoxiadenosina, 2',3' didesoxiguanosina, 2',3' didesoxicitidina, 2',3' dideoximitidina, e 2',3' didesoxi-inosina;

3'-desoxitimidina-aleno (3'-desoxi-2',3'-didesidrotimidina; e

D4T (2',3'-didesidro-2',3'-didesoxitimidina).

Outros exemplos de derivados de nucleósidos incluem não limitativamente um péptido CD4 ou seus análogos derivados e hipe-ricina.

5.3 - COMPOSTOS ORGÂNICOS ESTERÓIDES E NÃO ESTERÓIDAI

O presente invento proporciona qualquer composição que compreenda um derivado de oligossacárido cíclico isolado ou em combinação com compostos orgânicos esteróides ou não esteróides que sejam moduladores do crescimento celular, i.e. um composto que seja capaz de alterar ou modificar o comportamento do crescimento, incluindo tanto a promoção como a inibição.

São preferidos entre os compostos esteróides moduladores do crescimento os esteróides inibidores do crescimento latente que não tenham actividade glucocorticóide e mineralo-corticóide, uma vez que tal actividade é um efeito secundário indesejável e limita o tamanho da dose e a extensão do uso do esteróide para os fins do presente invento. Entre estes os esteróides preferidos estão 11 alfa, 17,21-tri-hidroxipregna-4-eno-3,20-diona (11-desoxicortisol ou cortexolona), 17-alfa,21-di-hidroxipregna-4,9,11-tri-hidro-3,20-diona e tetra-hidrocortisol.

Os compostos orgânicos não esteróides podem incluir, não limitativamente compostos que podem ter natureza de péptidos, carbo-hidratos ou lípidos. Exemplos de tais compostos podem incluir não limitativamente interleucina-1, interleucina-2 e alfa, beta e gama interferões.

5.4 - APLICAÇÕES E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO

O presente invento fornece novos métodos de inibição da infecção de células por um vírus. Fornece-se um agente carbo-hidrato bloqueador capaz de interagir com as células hospedeiras de modo a interferir com a ligação do vírus às células. O agente bloqueador carbo-hidrato compreende um ou mais oligossacáridos, com até cerca de doze monómeros de açúcar. As células hospedeiras são contactadas com o agente bloqueador carbo-hidrato numa quantidade, durante um tempo e sob condições seleccionadas para efectuar a interacção do agente, bloqueador carbo-hidrato com as células do que resulta uma interferência com a ligação do vírus às células.

O agente bloqueador carbo-hidrato é administrado às célu-

-15-

las numa concentração eficaz para interferir com a ligação do vírus às células. A concentração de qualquer agente oligossacárid^o particular administrado às células dependerá de parâmetros como a sua solubilidade no meio que rodeia as células, a sua capacidade para interferir com a ligação de um vírus às células hospedeiras potenciais e os seus efeitos nos outros sistemas biológicos da célula. Espera-se que as concentrações variando entre aproximadamente 0,15 e 2 milimolar resultarão em interferência com a ligação do vírus às células. Os agentes bloqueadores carbo-hidrato são administrados às células durante um tempo suficiente para permitir e manter a interferência da ligação do vírus às células. Os especialistas no ramo saberão que o intervalo de tempo que um agente bloqueador carbo-hidrato particular será administrado está dependente de factores como a concentração de agente bloqueador carbo-hidrato administrado, o tipo de interacção vírus-célula hospedeira e a capacidade do agente bloqueador carbo-hidrato interferir com a ligação do vírus às células.

As condições sob as quais um agente bloqueador carbo-hidrato particular realizará a interferência com ligação do vírus às células hospedeiras potenciais podem ser determinadas com ensaios adequados tais como ensaios de inibição de sincícios descrito na secção 6.11, infra. Tais ensaios ajudarão a determinar as concentrações do agente bloqueador carbo-hidrato que são mais eficazes na inibição da infecção de células com o vírus.

Os especialistas no ramo saberão que as concentrações dos agentes bloqueadores carbo-hidrato podem ser apresentadas às células no corpo de um mamífero, incluindo humanos, através de qualquer de várias vias de administração usando dosagens que forneçam pelo menos as concentrações acima mencionadas no meio extracelular do corpo nas superfícies das células. Estas vias de administração incluem, entre outras as vias oral, intravenosa e transdérmica.

Os métodos do invento são adequados para utilização no tratamento de infecções por vírus. Eles podem ser usados com retrovírus, incluindo não limitativamente o vírus-1 da imunodefici-

-16-

ência humana (HIV-1), o vírus-2 da imunodeficiência humana (HIV-2), o vírus-I linfotrópico das células T humanas (HTLV-I), o vírus-II linfotrópico das células T humanas (HTLV-II), o vírus da leucose das aves, o vírus do sarcoma de Rous, o vírus da eritroblastose das aves, o vírus da mieloblastose das aves, o vírus da leucemia felina e o vírus da leucemia bovina. Eles podem também ser usados com paramixovírus (por exemplo o vírus do sarampo e o vírus respiratório sincicial) e o vírus do herpes (por ex. o vírus de Epstein Barr). Tais compostos podem agir de modo a interferir com a ligação do vírus com as células. Tais células podem incluir não limitativamente as células linfoblastóides (células T e células B) e monócitos.

A inibição da ligação de um vírus a uma célula hospedeira potencial é considerada importante na prevenção da infecção da célula com o vírus. No caso de um retrovírus tal como o HIV-1 ou HIV-2, a ligação e entrada numa célula hospedeira são partes importantes do ciclo de vida do vírus. Se o retrovírus for impedido de entrar na célula, a célula não ficará infectada com o vírus. Uma das consequências da infecção com um vírus tal como um retrovírus e mais particularmente o HIV-1, é o facto de as células começarem a fundir-se em conjunto para formar sincícios. A formação de sincícios é letal para as células afectadas.

Crê-se ainda que alguns receptores de superfície da célula são também enzimas que reconhecem certas substâncias extracelulares possuindo resíduos de polissacáridos curtos. Crê-se que alguns destes receptores de superfície de células são glicosiltransferases que reconhecem resíduos de polissacáridos curtos presentes em glicoproteínas e outras moléculas biológicas. Crê-se que as glicoproteínas encontradas nas superfícies virais e através das quais o vírus manifesta específico de tipo de célula ou tropismos específicos da espécie, também usam tais receptores de superfície de célula/enzimas para se ligarem às células hospedeiras antes da infecção das células.

A prevenção de interacção entre o vírus e a célula hospedeira potencial é importante para minimizar a patofisiologia da

-17-

doença em que a formação de sincícios é uma parte importante da acção do vírus ou agente viral no processo da doença.

O invento também fornece métodos para inibição da transmissão célula a célula de um vírus. É fornecido um agente bloqueador carbo-hidrato capaz de interaccionar com células hospedeiras para interferir com a transmissão do vírus de uma célula para outra célula. Exemplos não limitativos de tais células incluem as células T; células B e monócitos. As células hospedeiras são postas em contacto com o agente bloqueador carbo-hidrato numa quantidade durante um tempo e sob condições seleccionadas para se efectuar a interacção do agente bloqueador carbo-hidrato com as células de modo a resultar na interferência com a transmissão do vírus célula para célula. O agente bloqueador carbo-hidrato é um derivado de oligossacárido cíclico, muito solúvel em água. Estes métodos são adequados para uso com retrovírus incluindo, não limitativamente, o vírus-1 da imunodeficiência humana (HIV-1), o vírus-2 da imunodeficiência humana (HIV-2), o vírus-I linfotrófico da célula-T humana (HTVL-I), o vírus-II linfotrófico da célula-T humana HTVL-II, o vírus da leucose das aves, o vírus do sarcoma de Rous, o vírus da mieloblastose das aves, o vírus da leucemia felina e o vírus da leucemia bovina. Estes métodos podem também ser usados com paramixovírus (por ex. vírus do sarampo e vírus respiratório sincicial) e vírus do herpes (por ex. o vírus de Epstein Barr).

O invento também proporciona métodos de inibição da formação de sincícios entre as células. Proporciona-se um agente bloqueador carbo-hidrato que evita a interacção do vírus com a célula. Exemplos não limitativos de tais células incluem as células T, células B e monócitos. O agente bloqueador carbo-hidrato é administrado às células sob condições seleccionadas para permitir ao agente interaccionar com as células, inibindo assim a formação de sincícios. O agente bloqueador carbo-hidrato no presente invento é um derivado de oligossacárido cíclico, muito solúvel em água. Estes métodos são adequados para uso com retrovírus, incluindo não limitativamente o vírus-1 da imunodeficiência humana (HIV-1), o vírus-2 da imunodeficiência humana (HIV-2), o vírus

-18-

-I linfotrófico das células T humanas (HTVL-1), o vírus-II linfotrófico das células-T humanas, o vírus de leucose das aves, o vírus do sarcoma de Rous, o vírus da mieloblastose das aves, o vírus da leucemia bovina e o vírus da leucemia felina. Estes métodos podem também ser usados com paramixovírus (por ex. vírus de sarampo e o vírus respiratório sincicial) e o vírus do herpes (por ex. vírus de Epstein Barr).

A eficácia dos agentes bloqueadores carbo-hidrato na infecção pelo vírus, transmissão célula a célula do vírus e formação de sincícios pode ser determinada utilizando procedimentos conhecidos no ramo. Uma descrição desses procedimentos é dada na Secção 6.1, infra.

O invento fornece ainda composições de derivados de oligossacáridos cíclicos, muito solúveis em água, descritas na Secção 5.1, supra em combinação com agentes antivirais descritos na Secção 5.2, supra. Tais composições podem ser usadas para inibir a ligação de um vírus a uma célula. Noutra concretização, as composições podem ser usadas para inibir a transmissão célula a célula do vírus. Numa outra concretização, tais composições podem ser usadas para inibir a formação de sincícios. Estas composições podem ser usadas com retrovírus, tais como o vírus-1 da imunodeficiência humana, o vírus-2 da imunodeficiência humana, o vírus-I linfotrófico das células-T humanas (HTLV-I), o vírus-II linfotrófico das células-T humanas (HTLV-II), o vírus da leucose das aves, o vírus do Sarcoma de Rous, o vírus da mieloblastose das aves, o vírus da leucemia felina e o vírus da leucemia bovina. Adicionalmente estas composições podem ser usadas com paramixovírus (por ex. vírus do sarampo ou vírus respiratório sincicial) ou vírus do herpes (por ex. vírus de Epstein Barr). A eficácia das composições do presente invento na infecção com o vírus ou na formação de sincícios, pode ser determinada usando os procedimentos conhecidos no ramo. Uma descrição de tais procedimentos é dada na Secção 6.1, infra.

O invento fornece ainda composições de derivados de oligossacáridos cíclicos, muito solúveis em água, descritos na Secção 5.1, supra. Tais composições podem ser usadas para inibir a

-19-

ligação de um vírus a uma célula em combinação com compostos orgânicos, esteróides ou não esteróides, que contenham uma actividade moduladora de crescimento descrita na Secção 5.3, supra. Estas composições podem ser usadas com retrovírus, tais como o vírus-1 da imunodeficiência humana, o vírus-2 da imunodeficiência humana, o vírus-I linfotrófico das células-T humanas (HTLV-I), o vírus-II linfotrófico das células-T humanas (HTLV-II), vírus da leucose das aves, o vírus do sarcoma de Rous, o vírus da mieloblastose das aves, o vírus da leucemia felina e o vírus da leucemia bovina. Adicionalmente, estas composições podem ser usadas para tratar o Sarcoma de Kaposi, o qual se manifesta frequentemente nos pacientes com SIDA. A eficácia das composições do presente invento na infecção com vírus ou na formação de sincícios, pode ser determinada usando procedimentos conhecidos no ramo. Uma descrição de tais procedimentos é dada na Secção 6.1, infra.

O invento fornece ainda composições de derivados de oligossacáridos cíclicos, muito solúveis em água, descritas na Secção 5.1, supra. Tais composições podem ser usadas para inibir a ligação de um vírus a uma célula em combinação com compostos orgânicos, esteróides ou não esteróides, que contenham actividade moduladora do crescimento celular descritas na Secção 5.3 e agentes antivirais descritos na Secção 5.2, supra. Estas composições podem ser usadas com retrovírus, tais como o vírus-1 da imunodeficiência humana, o vírus-2 da imunodeficiência humana, o vírus-I linfotrófico das células-T humanas (HTLV-I), o vírus-II linfotrófico das células-T humanas, o vírus da leucose das aves, o vírus do Sarcoma de Rous, o vírus da mieloblastose das aves, o vírus da leucemia bovina, e o vírus da leucemia felina. Adicionalmente, estas composições podem ser usadas para tratar o sarcoma de Kaposi que se manifesta frequentemente nos pacientes com SIDA. A eficácia das composições do presente invento na infecção com vírus ou na formação de sincícios, pode ser determinada usando os procedimentos conhecidos no ramo. Uma descrição de tais procedimentos é dada na Secção 6.1, infra.

6 - EXEMPLO: CICLODEXTRINAS SINTÉTICAS INIBEM A INFECÇÃO POR HIV IN VITRO

Os exemplos seguintes são apresentados como ilustrações e não como limitações. O invento foi aqui descrito com referência a certas concretizações preferidas e exemplos. Contudo variações óbvias serão evidentes para os especialistas na matéria. O invento não deve ser considerado limitado às concretizações particularmente exemplificadas.

6.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio de inibição da fusão (sincícios) foi levado a cabo de acordo com procedimentos publicados (Dalglish et al., Nature 312:763, (1984) e Sodroski et al., Nature 322:470, (1986)). As células Sup-T1 são células alvo preferidas pelo seu alto grau de fusão celular quando co-cultivadas com linhas de células produtoras de HIV-1. A cultura celular é levada a cabo de acordo com o método de Dalglish et al. (Nature 312:763, (1984)). As células Sup-T1 foram cultivadas em placas de 96 orifícios (10^5 células/orifício em RPMI 1640 + 10% de FCS) e incubadas com ou sem diluições de tetradecassulfato de beta-ciclodextrina (β -CD-TDS ou β -CD-14S) a 37°C. Adicionaram-se então células H9 infectadas com HTLV-IIIB (HIB-1) ou WMJ, 5×10^4 /orifício, e o número de células gigantes mononucleadas por campo de 16 X foi contado com um microscópio Zeiss de contraste de fase e campo invertido após 18 horas. Os sincícios são facilmente identificados e a sua inibição de sincícios por diferentes diluições de β -CD-TDS pode ser comparada com preparações sem β -CD-TDS. Será evidente para os especialistas no ramo, que a formação de sincícios entre células susceptíveis de infecção por HIV-1 e células expressando glicoproteínas de envelope de HIV-1 representa os mesmos fenómenos moleculares envolvidos na infecção por HIV-1, mas é muito menos perigosa e pode ser empregue no estudo dos mecanismos de infecção e dos efeitos dos factores moduladores nos mecanismos de infecção intracelulares do HIV-1 sem receio de exposição ao próprio vírus.

Para se testarem diferentes diluições, prepararam-se diluições de 10 vezes de uma solução 150 micromolar de β -CD-TDS e adi

-21-

cionaram-se directamente aos ensaios de sincícios descritos acima.

6.1.1 - ENSAIOS COM SINCÍCIOS

Para o ensaio de fusão de HIV-1, usaram-se células Supt T1 como células alvo. Elas fundem rapidamente quando co-cultivadas com linhas celulares produtoras de HIV-1 (H9/IIIB). Para o ensaio da fusão de célula mediada por HIV-2, usaram-se células H9 como células alvo. Elas fundem rapidamente quando co-cultivadas com linhas celulares produtoras de HIV-2 (CEMROD-2). As células infectadas com HIV foram cultivadas em placas com 96 orifícios (10^4 células/orifício em RPMI 1640 + 10% de FCS) e incubadas com ou sem diluição dos compostos durante 30 minutos a 37°C. As células alvo foram então adicionadas a 5×10^5 /orifício e o número de sincícios foi qualitativamente determinado após os períodos de incubação descritos no texto.

6.1.2 - ENSAIO DA TRANSCRIPTASE INVERSA

As células infectadas foram transformadas em pelotas por centrifugação e recolheram-se 50 μ l de sobrenadantes de cultura em cada orifício para ensaio. O sobrenadante da cultura (25 μ l) foi cultivado em placas de fundo recondo de 96 orifícios e adicionaram-se 50 μ l do "cocktail" de transcriptase a cada orifício. O "cocktail" é composto por Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, DTT 20 mM, $MnCl_2$ 0,6 mM, NaCl 60 mM, 0,05% de NP-40, 5 μ g/ml de dt ácido oligodesoxitimidílico, 10 μ g/ml de poli A (ácido poli-riboadenílico), dTTP 10 μ M, de 1 Ci/mm dTTP 32 P. As placas foram então incubadas durante 60 minutos a 37°C. Após incubação as amostras foram colocadas em papel Whatman DEAE-81, lavadas e analisadas por contagem ou auto-radiografia directa.

6.1.3 - ANÁLISE DO RNA VIRAL

Fizeram-se crescer células tratadas com vírus em cultura de tecidos e recolheram-se para ensaio 72 h após infecção. As concentrações celulares foram então ajustadas a 1×10^6 células/ml com solução salina tamponada com fosfato e espalhado ("spot-

ted") directamente num screen para gene, previamente molhado, utilizando um equipamento de "dot blot". O filtro foi depois lavado com NaCl a 3%, NaH_2PO_4 10 mM, (pH 7,2) contendo 1% de glutaraldeído a 4°C durante 1 h. A mancha fixada foi então lavada três vezes com tampão proteolítico (EDTA 50 mM, Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinase K) durante 30 minutos a 37°C. O filtro foi seco ao ar até ser sondado. Uma sonda de Sall-xhoI derivada do plasmídeo pIIIenv1 (uma oferta generosa do Dr. J. Sodrofsky) e que codifica a região de envólucro do vírus HIV-1, HXB2, foi marcada pelo método aleatório usando tecnologia standard e hibridado ao filtro como se descreveu anteriormente (Weiner et al., 1986, Cell Immunol. 100:197).

6.1.4 - ESTUDOS ESTRUTURAIS

As células infectadas com o vírus foram lavadas e ressuspensas em meios frescos na presença ou ausência de compostos teste. Após um período de cultura de 48 horas, as culturas foram transformadas em pelotas e fixadas em 1% de glutaraldeído, Cacodylate-HCl 0,1 M, pH 7,3 seguido por OsO_4 , e embebido em resina "spur" para exame dessas secções por microscopia electrónica.

6.1.5 - CITOFUOROMETRIA

Centrifugaram-se linhas de células T humanas e lavaram-se 2 X em tampão FACS (1% de albumina de soro bovino em solução salina tamponada com fosfato com 0,1% de NaN_3). As células foram resuspensas a $10^7/\text{ml}$ e pré-incubadas com ou sem β -CD-TDS como indicado. Adicionou-se então anticorpo primário durante 30 minutos adicionais e as amostras foram preparadas como se descreveu anteriormente (Williams et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:6498).

6.2 - RESULTADOS

6.2.1 - INIBIÇÃO DA INFECCIOSIDADE DO HIV POR β -CICLODEXTRINAS SUBSTITUÍDAS

Uma faceta importante dos lentivírus humanos é a sua capacidade de se fundirem com células alvo. Quando analisada in vitro

-23-

em linhas de células alvo humanas, a infecção mediada por HIV resulta na formação de células gigantes multinucleadas ou sincícios. Observou-se que tais sincícios contribuem para a patologia da perda de imunidade das células característica da infecção observada em pacientes com SIDA. Este processo de fusão difere do mecanismo de entrada na célula de muitos outros retrovírus no facto da fusão não requerer o pH ácido das vesículas endocitóticas. Pensa-se que a fusão da célula mediada por HIV in vitro ocorre por uma via análoga à da entrada do vírus in vivo.

Numa série de experiências preliminares, foi levado a cabo um ensaio de sincícios induzido por fusão de células Sup-T1 por HIV-1 como se descreveu na secção 6.1.1, supra. Os resultados foram ilustrados na Tabela 1.

Como se mostra na Tabela 1, observou-se inibição de sincícios, numa gama de concentrações de β -CD-TDS entre 1,5 micromolar e 1500 micromolar. Pelo contrário, não se observou inibição da formação de sincícios a concentrações de 0,15 micromolar.

TABELA 1

Actividade de inibição de sincícios; grau de formação de sincícios^a

<u>Estirpe viral</u>	<u>Concentração de β-CD-TDS (micromolar)</u>				
	<u>1500</u>	<u>150</u>	<u>15,0</u>	<u>1,50</u>	<u>0,15</u>
HTLV III-B (HIV-1 IIIB)	0	2M	4L	4L	4L
HTLV III WMJ	0	0	1S	3M	4L

a Grau de formação de sincícios Tamanhos dos sincícios formados
 4=Total S=Pequeno
 0=Nula M=Médio
 L=Grande

Numa série de experiências adicionais, a análise dos sincícios induzidos por HIV-1 foi levada a cabo por co-cultura de células H9 infectadas com o isolado III-b com células Supt-1 não infectadas (linha de células CD4 + T humanas) como alvos. Para o ensaio de HIV-2, 78 células HUT infectadas, com isolado ROD-2 foram co-cultivadas com células alvo H9 (uma linha de células CD4 + T humanas). A β -ciclodextrina sem substituintes (β -CD), com 4 grupos sulfato (β -CD-4S) e com 4 grupos propoxi (β -CD-4Pr) foram tão ineficazes como os meios isoladamente, na inibição da formação de sincícios por HIV-1. Pelo contrário, a β -ciclodextrina com 14 grupos sulfato por molécula (β -CD-TDS) mediou grandemente a actividade anti-sincícios como se mostra na Tabela 2 e Figura 1.

Tabela 2

Capacidade das ciclodextrinas para bloquear a entrada da HIV-1^a

Compostos ^b	Solubili dade 0°C g/100 ml H ₂ O	Concentração (mM) de β -ciclodextrinas								
		2,5	1,3	0,63	0,32	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01
Controlo		4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L
Beta-CD	0,7	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L
Beta-CD-Pr	20	1m	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L
Beta-CD-4-7S	13	3m	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L
Beta-CD-14S	42	0	0	0	0	1s	2m	3L	4L	4L
Beta-CD-M	32	0	0	0	0	0	0	3m	4L	4L

a Os resultados foram expressos como o número de sincícios formados: os sincícios foram cotados numericamente de 0 a 4, sendo 4 correspondente a sincícios múltiplos largamente distribuídos e indicando 0 a ausência de sincícios. O tamanho dos sincícios é registado como sincícios s=pequenos, m=médios e L=grandes.

b Beta-CD é um anel de ciclodextrina não substituído, Beta-CD-Pr é a estrutura de anel básica substituída com grupos propoxi Beta-CD-14S é a estrutura anel básica completamente substituída com sulfatos, Beta-CD-M é a estrutura básica anelar completa-

mente substituída com grupos metoxi

A β -ciclodextrina com 14 grupos metoxi (β -CD-14Me) exibiu um maior grau de inibição de sincícios que a que foi observada com B-CD-TDS. A inibição da formação de sincícios foi observada em doses abaixo de 80 μ M.

Resultados similares de indução de sincícios mediada pelo isolado ROD-2 de HIV-2 foram obtidos como se mostra na Tabela 3.

TABELA 3

Capacidade das ciclodextrinas para bloquear a entrada de HIV-2^a

Compostos ^b	Solubili- dade 0 ^o g/100 ml H ₂ O	Concentração (mM) de β -ciclodextrina								
		2,5	1,3	0,63	0,32	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01
Controlo		4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L
Beta-CD	0,7	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L	4L
Beta-CD-14S	42	0	0	0	1s	2m	3L	4L	4L	4L
Beta-CD-M	32	0	0	0	0	0	0	3m	4L	4L

a Os resultados foram expressos como o número de sincícios formados: os sincícios foram cotados numericamente de 0 a 4, sendo 4 correspondente a sincícios múltiplos largamente distribuídos e indicando 0 a ausência de sincícios. O tamanho dos sincícios é registado como sincícios s=pequenos, m=médios e L=grandes.

b Beta-CD é anel de ciclodextrina não substituído, Beta-CD-14S é a estrutura de anel básica completamente substituída com sulfatos, Beta-CD-M é a estrutura ~~anelar~~ básica completamente substituída com grupos metoxi.

Tanto o β -CD poli-sulfatado como a β -ciclodextrina poli-metoxilada inibiram a formação de sincícios mediada por ROD-2. Contudo, o grau de inibição foi substancialmente maior com β -CD-14Me.

A capacidade das ciclodextrinas para inibir a infecção por HIV foi determinada in vitro utilizando ensaios de transcriptase inversa descritos na Secção 6.1.2, supra. Os "stocks" de vírus isentos de células HTVL-IIIb foram inoculados em células al vo na presença ou ausência dos compostos sintéticos. Após um período de incubação de 10 dias, os orifícios foram recolhidos e a actividade da transcriptase inversa determinada (Figura 1). A β -ciclodextrina em si mesma (faixa B) não exibiu inibição da infeciosidade viram uma vez que a actividade de transcriptase inversa se mostrou semelhante ao controlo de infeciosidade positivo (faixa A). A β -ciclodextrina parcialmente sulfatada (caixa C) e propoxilada (faixa D) foi essencialmente ineficaz, com uma inibição mínima da actividade transcriptase inversa. Pelo contrário, a β -CD-14S altamente sulfatada foi extremamente eficaz na inibição da infeciosidade in vitro (faixa E). Embora alguma actividade fosse aparente a concentrações tão altas como 320 μ M (diluição 4), a actividade de transcriptase inversa foi dramaticamente inibida a concentrações tão baixas como 80 μ M (diluição 6). A β -CD-14Me (faixa F) foi pelo menos tão eficaz, sem actividade da transcriptase inversa aparente em culturas de células em contacto com o vírus na presença de doses tão baixas como 80 μ M a 40 μ M (diluição 7). Embora estes resultados sejam idênticos aos dos ensaios de sincícios eles sugerem que a infeciosidade viral na presença de baixas quantidades de algumas ciclodextrinas substituídas é marcadamente diminuída mesmo a concentrações que não inibem totalmente a formação de sincícios.

6.2.2 - LOCAIS DE ACÇÃO DAS CICLODEXTRINAS

De modo a determinar os locais específicos de patogénese viral interrompidos pelos compostos de ciclodextrina, determinou-se a capacidade de tratamento com ciclodextrinas para afectar os níveis de transcriptase inversa das células já infectadas com HIV-1. Contrariamente aos resultados observados quando o vírus foi adicionado a células não infectadas (ver acima, Secção 6.2.1) não se observou inibição significativa da transcriptase inversa. Isto sugere que as ciclodextrinas devem exercer os seus efeitos

nos primeiros estágios do ciclo de vida do vírus.

Para determinar se as ciclodextrinas interferem com os passos relevantes para a replicação viral, determinou-se a capacidade destes compostos para inibir a síntese do ácido nucleico viral. As partículas de vírus foram incubadas com células alvo na presença ou ausência de β -CD-14S 1 mM. Após 72 horas de infecção, as células foram lavadas e realizaram-se ensaios "dot blot" para determinar a presença ou ausência de produção de RNA viral. Não se detectou ou detectou-se muito pouco RNA específico do HIV-1 nas células alvo infectadas na presença β -ciclodextrina sulfatada (Figura 3A, faixa A). Nas faixas do anel não substituído e na do controlo positivo, detectou-se uma quantidade substancial de RNA viral nesta mesma altura. Contudo, a inibição da replicação do ácido nucleico viral não teve um efeito directo na máquina replicadora do vírus. As células infectadas incubadas com β -ciclodextrina sulfatada não foram inibidas na sua capacidade de produzir RNA viral (Figura 3B). Estes resultados complementam os ensaios sinciais e da transcriptase inversa sugerindo que os efeitos antivirais mediados por estes compostos operam cedo no ataque viral à célula.

Embora as β -ciclodextrinas substituídas não inibam a actividade do RNA viral ou da transcriptase inversa nas células infectadas, é possível que estes compostos interfiram com a maturação viral. Para salientar este ponto, analisámos a produção de partículas de vírus na presença de ciclodextrinas especificamente substituídas por exame de microscópico e electrónico. As células infectadas por vírus foram lavadas e ressuspensas em meios frescos na presença ou ausência dos compostos de teste. Após um período de cultura de 48 horas, as culturas foram transformadas em pelotas e fixadas em glutaraldeído 1%, Cacodilato-HCl 0,1 M, pH 7,3 seguido por OsO_4 e embebidas em resina "spur" para exame das secções finas.

As preparações de vírus tratadas na presença de ciclodextrinas sulfatadas 300 M demonstraram regiões de grande densidade de membranas correspondentes ao desenvolvimento e separação do vírus. A morfologia do HIV observada neste vírus de separação

-28-

("shed") era típica da família lentivirus (Figura 4). O exame morfológico detalhado das partículas virais produzidas na presença de ciclodextrinas substituídas exibiram um fenotipo normal maturo de HIV. Adicionalmente, não se observou desvio significativo na razão de vírus maduro presente após o tratamento com ciclodextrina ou no número total de partículas de vírus produzidas na presença destes compostos. Em conjunto, estes resultados sugerem que as β -ciclodextrinas substituídas não exercem efeitos directos na produção ou maturação do vírus HIV. Elas exercem os seus efeitos, aparentemente, na membrana celular durante as fases iniciais do ataque à célula.

6.2.3 - INFLUÊNCIA DAS CICLODEXTRINAS NAS INTERACÇÕES COM CD4

As células infectadas com ambos o HIV-1 e HIV-2 expressam o antígeno de superfície CD4 das células humanas T. O tropismo estrito observado é uma manifestação de locais de ligação de alta afinidade revelados na glicoproteína de envólucro do retrovírus que medeiam a ligação com as células portadoras de CD4. A capacidade de algumas moléculas de ciclodextrina completamente substituídas de interferirem especificamente com a formação de sincícios, actividade de transcriptase inversa e a transferência do RNA viral infeccioso é idêntica aos efeitos dos anticorpos dirigidos à molécula de CD4. Um subconjunto de anticorpos anti-CD4 destrói especificamente a capacidade dos envólucros virais de interagirem com este receptor específico. Um modo possível de acção destes compostos é a interacção com estes locais específicos no CD4. Como tal determinou-se a capacidade de β -ciclodextrina substituída 1 mM para interferir com a ligação de anticorpos monoclonais dirigidos a diferentes epitopos da glicoproteína CD4. Utilizou-se citometria de fluxo nesta investigação.

O anticorpo monoclonal Leu3a liga-se à primeira região delimitada pela cisteína da glicoproteína CD4 e demonstrou-se que interfere directamente com a ligação com HIV-1, HIV-2 bem como com SIV. O anticorpo monoclonal MT1151 tem sido "mapeado" até à segunda região delimitada pela cisteína de CD4 e está implicado em restrições estruturais secundárias necessárias para interacções

gp120-CD4. O anticorpo monoclonal OKt4 liga-se a uma região distal destes primeiros dois anticorpos monoclonais e está "mapeada" numa região que não é necessária para a reacção de ligação entre o vírus HIV e a célula CD4 positiva.

Uma comparação dos padrões de reactividade destes anticorpos em células tratadas e de controlo demonstrou que dentro dos limites desta análise, nenhum dos epitopos reconhecidos por estes anticorpos monoclonais diminuiu a sua capacidade de interagir com CD4 (Figura 5). Estes resultados sugerem que as interacções proteicas importantes para ligação com o CD4, de forma análoga à ligação do vírus não são alteradas pelo tratamento com ciclodextrina. Mais ainda, os resultados também sugerem que estes compostos não interferem com a expressão do CD4 nas células alvo. Embora estes resultados não excluam um efeito nas interacções gp120-CD4, eles indicam que as ciclodextrinas não têm efeito directo nas interacções específicas proteína-proteína no local CD4.

6.2.4 - COMPARAÇÃO DAS CICLODEXTRINAS SUBSTITUÍDAS COM POLI-SULFATOS DE DEXTRANO

Estudos recentes demonstraram a capacidade dos sulfatos de dextrano poli-aniónicos inibirem a infecção por HIV-1 in vitro (Mitsuya et al., 1988, Science 240:646-649 e Baba et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:6132-6136). A inibição da actividade do vírus observada com β -ciclodextrinas substituídas parece semelhante à que se observou para os sulfatos de dextrano. Determinámos e comparámos os efeitos destes compostos e das β -ciclodextrinas substituídas na formação de sincícios induzida por HIV (Figura 6A).

Após 24 horas, as β -ciclodextrinas totalmente sulfatadas e β -ciclodextrinas totalmente metiladas exibiram uma capacidade semelhante para bloquear a infecção por HIV-1 à do sulfato de dextrano 5 000. Todos estes compostos foram mais eficazes que o sulfato de dextrano 500 000 maior, no bloqueio da formação de sincícios. Contudo, houve uma grande diferença no tamanho do efeito anti-viral evidenciado pelas duas classes de açúcares complexos (Figura 6A e B). Após 48 horas, a actividade do sulfato de dex-

-30-

trano 5 000 descreceu de quase 90%. Nas culturas tratadas com as ciclodextrinas metiladas ou sulfatadas, a actividade anti-sin-cial permaneceu imutável durante o período de cultura. Este resultado tornou-se mais pronunciado após 144 horas em cultura após o que não há ou há muito pouco efeito anti-viral do sulfato de dextrano 5 000 mesmo quando presente numa gama de várias centenas de micromolar. Contrariamente, as β -ciclodextrinas substituídas perderam apenas 50% da sua potência depois de 6 dias em cultura contínua.

Estes resultados foram confirmados utilizando ensaios de transcriptase inversa como indicador específico de entrada e infecciosidade virais (Figura 6B). As partículas de vírus infecciosas foram incubadas na presença de β -ciclodextrina sulfatada (faixa 1). Sulfato de dextrano (faixa 2) ou meios (faixa 3) durante 6 dias após o que as células foram ressuspensas em meios frescos e deixadas a incubar durante mais 10 dias antes de serem recolhidas e a actividade da transcriptase inversa foi ensaiada. A β -ciclodextrina sulfatada mediou uma actividade anti-viral significativa mesmo após períodos prolongados de cultura de tecidos. Este resultado pode ser relacionado com diferenças de susceptibilidade entre o sulfato de dextrano e a β -ciclodextrina sintética à degradação enzimática durante a cultura de tecidos.

6.3 - DISCUSSÃO

Demonstrámos os efeitos anti-virais dramáticos dos agentes de bloqueio viral carbo-hidrato, particularmente as β -ciclodextrinas sulfatadas ou metiladas completamente substituídas. Estes efeitos anti-virais estão intimamente associados com as cadeias laterais apresentadas pelo anel de ciclodextrina e não são uma função do próprio anel. Mais ainda, examinámos o efeito de várias moléculas diferentemente substituídas e concluímos que apenas um subgrupo específico de cadeias laterais são capazes de mediar efeitos significativos anti-HIV. Estes compostos parecem interferir com um passo inicial associado à patogénese do HIV. Há várias evidências para estas conclusões. As β -ciclodextrinas totalmente sulfatadas não exibem efeitos detectáveis em células que já tenham

-31-

sido infectados com HIV-1. Não se observaram efeitos na actividade da transcriptase inversa, produção de partículas virais, ou morfologia das partículas de vírus nas linhas celulares infectadas incubadas com concentrações de ciclodextrinas que se mostraram ser protectoras em ensaios de sincícios, por ex. antes da infecção viral das células. Em contraste, a ciclodextrina, em concentrações equivalentes, bloqueia a infecção por HIV de células não infectadas como se demonstrou por ensaios de transcriptase inversa e a presença de RNA viral, em conjunto com a formação de sincícios. Conjuntamente, estes dados suportam um modelo de interferência na função viral nos primeiros passos do encontro entre o vírus e a célula.

Testámos a capacidade destes compostos de inibir especificamente a ligação de anticorpos monoclonais ao receptor conhecido do HIV. Os resultados demonstram que não houve inibição significativa de anticorpos que se ligam especificamente a regiões de CD4 necessárias à função viral. Esta observação é importante uma vez que sublinha o facto do tratamento das células humanas com estes compostos provavelmente não afectar a função deste receptor imunológico importante.

Vários estudos indicavam uma grande afinidade para absorção (adesão) às superfícies das células por glicosaminoglicanos e sacáridos sulfatados altamente hidrofílicos, incluindo polissulfatos de ciclodextrina (Folkman et al., 1989, Science 243:1490-1493 e Folkman e Weisz, 1989, Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 392: 19-32) numa variedade de circunstâncias (Folkman et al., 1989, Science 243: 1490-1493; Folkman e Weisz, 1989, Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 392: 19-32; Mitsuya et al., 1988, Science 240: 646-649; Ito et al., 1987, Antiviral Res. 7: 361-367; Declerq, 1986, J. Med. Chem. 29: 1561-1569; Cole et al., 1986, Nature 323: 723; Hook et al., 1984, Ann. Rev. Biochem. 53:847-869 e Desomer et al., 1968, J. Virol 2:886-893). Com isto em vista, os nossos resultados sugerem que uma forte ligação dos agentes à membrana celular e/ou ao invólucro viral resulta em velocidades de difusão reduzidas dos receptores, influenciando como tal criticamente as cinéticas das interacções intermoleculares entre o ligando espe-

BRL ORIGINAL

-32-

cífico viral e as moléculas celulares receptoras, através dos princípios físico-químicos clássicos (Lauffenburger e DeLisi, 1983, Internat. Rev. Cytol. 84:268-302).

Comparámos moléculas de poli-sulfatos de dextrano e de β -ciclodextrina substituídos em ensaios de sincícios de HIV-1 e transcriptase inversa. Observámos efeitos semelhantes em ambas as classes de compostos, mas encontrámos uma diferença especial na longevidade dos efeitos anti-virais mediados pelas ciclodextrinas em oposição aos sulfatos de dextrano. Os resultados indicam que o composto ciclizado substituído pode ser mais estável ao contacto prolongado com células e sugerem um potencial para estes compostos serem eficazes com uma frequência de administração menor sem diminuir os desejados efeitos anti-virais. Finalmente, a observação de que esta classe de composto interfere com os estágios iniciais de patogénese dos lentivírus sugere que estes compostos sejam úteis no tratamento de outros patogénios humanos e animais com mecanismos semelhantes de entrada.

-33-

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1 - Processo de preparação de uma composição para inibição de infecção indesejável de células por um vírus, em mamíferos, incluindo seres humanos, caracterizado por compreender a mistura de (1) um derivado de oligossacárido cíclico com (2) um agente anti-viral, sendo o derivado caracterizado por possuir uma solubilidade a 0°C, em água destilada, de pelo menos cerca de 20 g/100 ml de água.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico conter cerca de seis a cerca de doze monômeros de açúcar.

3 - Processo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico conter cerca de seis a oito monômeros de açúcar.

4 - Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico ser alfa-, beta- ou gama-ciclodextrina.

5 - Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o derivado de oligossacárido cíclico ser um derivado de sal aniônico da referida ciclodextrina tendo substituintes selecionados do grupo consistindo em sulfato, fosfato, carboxilato, nitrato e suas misturas e ser associado a um catião fisiologicamente aceitável.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico ser um sulfato de ciclodextrina.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o referido sulfato de oligossacárido cíclico conter cerca de 10-16 grupos sulfato.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o referido sulfato de oligossacárido cíclico ser tetradeca-sulfato de beta-ciclodextrina.

-34-

9 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico ser um derivado não iônico do referido oligossacárido tendo substituintes se leccionados do grupo consistindo em porções alquilo, éster, éter, tio-éster, tio-éter, ácido carboxílico e carbo-hidrato.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico ser um oligossacárido cíclico substituído com alcóxilo.

11 - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído com alcóxilo conter cerca de 10-16 grupos metóxilo.

12 - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído por alcóxilo ser o tetradeca-metoxi-betaciclodextrina.

13 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico conter substituintes iônicos e não iônicos.

14 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido agente anti-viral ser um derivado de nucleósido.

15 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido agente anti-viral ser um péptido CD4 ou um seu análogo.

16 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido agente anti-viral ser a hipericina.

17 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido vírus ser um retrovírus.

18 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido retrovírus ser o vírus de imunodeficiência humana-1.

1 19 - Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por o referido retrovírus ser o vírus de imunodeficiência humana-2.

-35-

20 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido vírus ser um paramixovírus.

21 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido vírus ser um vírus herpes.

22 - Processo de preparação de uma composição para inibição de infecção indesejável de células por um vírus, em mamíferos, incluindo seres humanos, caracterizado por compreender a mistura de (1) um derivado de oligossacárido cíclico com (2) um agente anti-viral, sendo derivado caracterizado por possuir uma solubilidade a 0°C, em água destilada, de pelo menos 20 g/100 ml de água.

23 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico conter cerca de seis a cerca de doze monômeros de açúcar.

24 - Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico conter cerca de seis a cerca de oito monômeros de açúcar.

25 - Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico ser alfa-, beta- ou gama-ciclodextrina.

26 - Processo, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o derivado de oligossacárido cíclico ser um derivado de sal aniônico do referido oligossacárido tendo substituintes selecionados do grupo consistindo em sulfato, fosfato, carboxilato, e suas misturas associadas com um catião fisiologicamente aceitável.

27 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico ser o sulfato de oligossacárido cíclico.

28 - Processo de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por o referido sulfato de oligossacárido cíclico conter cerca de 10-16 grupos sulfato.

29 - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por o referido sulfato de oligossacárido cíclico ser o tetradeca-sulfato de beta-ciclodextrina.

-36-

30 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico ser um derivado não iônico do referido oligossacárido tendo substituintes seleccionados do grupo consistindo em porções alquilo, éster, éter, tio-éster, tio-éter, ácido carboxílico, carbo-hidrato, halogeneto e halogeneto de alquilo.

31 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico ser um oligossacárido cíclico substituído com alcóxilo.

32 - Processo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído com alcóxilo conter cerca de 10-16 grupos metóxilo.

33 - Processo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído por alcóxilo ser o tetradeca-metoxi-beta-ciclodextrina.

34 - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído por alcóxilo conter cerca de 10-16 grupos propoxi.

35 - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído por alcóxilo ser a tetradecapropoxi-ciclodextrina.

36 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico conter substituintes iônicos e não iônicos.

37 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o referido vírus ser um retrovírus.

38 - Processo de acordo com a reivindicação 37, caracterizado por o referido retrovírus ser o vírus de imunodeficiência humana-1.

39 - Processo de acordo com a reivindicação 37, caracterizado por o referido retrovírus ser o vírus de imunodeficiência humana-2.

40 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o referido vírus ser um paramixovírus.

-37-

41 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o referido vírus ser um vírus herpes.

42 - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado por o referido agente anti-viral ser um derivado de nucleósido.

43 - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado por o referido agente anti-viral ser um péptido CD4 ou um seu análogo.

44 - Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado por o referido agente anti-viral ser a hipericina.

45 - Processo de preparação de uma composição para inibição da formação de sincícios entre células infectadas por um vírus, em mamíferos, incluindo seres humanos, caracterizado por compreender a mistura de (1) um derivado de uma ciclodextrina de oligossacárido cíclico com (2) um agente anti-viral, sendo derivado caracterizado por possuir uma solubilidade a 0°C, em água destilada, de pelo menos 20 g/100 ml de água.

46 - Processo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado por o referido derivado oligossacárido cíclico conter cerca de seis a cerca de doze monómeros de açúcar.

47 - Processo, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado por o referido derivado oligossacárido cíclico conter cerca de seis a cerca de oito monómeros de açúcar.

48 - Processo, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado por o referido derivado de alfa-, beta- ou gama-ciclodextrina ser um sulfato de ciclodextrina.

49 - Processo, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado por o derivado do referido oligossacárido ser um derivado de sal aniônico da referida ciclodextrina tendo substituintes selecionados do grupo consistindo em sulfato, fosfato, carboxilato, nitrato e suas misturas associadas com um catião fisiologicamente aceitável.

50 - Processo de acordo com a reivindicação 49, caracterizado por o referido sulfato de ciclodextrina conter cerca de 10-16

grupos sulfato.

51 - Processo de acordo com a reivindicação 49, caracterizado por o referido sulfato de ciclodextrina ser o tetradeca-sulfato de beta-ciclodextrina.

52 - Processo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado por o referido derivado de alfa-, beta- ou gama-ciclodextrina ser uma alcoxiciclodextrina.

53 - Processo de acordo com a reivindicação 52, caracterizado por a referida ciclodextrina de alcóxido conter cerca de 10-16 grupos metóxido.

54 - Processo de acordo com a reivindicação 52, caracterizado por a referida ciclodextrina de alcóxido ser a tetradeca-metoxi-beta-ciclodextrina.

55 - Processo de acordo com a reivindicação 52, caracterizado por a referida ciclodextrina de alcóxido conter cerca de 10-16 grupos propoxi.

56 - Processo de acordo com a reivindicação 52, caracterizado por a referida ciclodextrina de alcóxido ser a tetradecapropoxi-ciclodextrina.

57 - Processo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado por o referido agente anti-viral ser um derivado de nucleósido.

58 - Processo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado por o referido agente anti-viral ser um péptido CD4 ou um seu análogo.

59 - Processo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado por o referido agente anti-viral ser a hipericina.

60 - Processo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado por o referido vírus ser um retrovírus.

61 - Processo de acordo com a reivindicação 60, caracterizado por o referido retrovírus ser o vírus de imunodeficiência humana-1.

62 - Processo de acordo com a reivindicação 60, caracteri

-39-

zado por o referido retrovírus ser o vírus de imunodeficiência humana-2.

63 - Processo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado por o referido vírus ser um paramixovírus.

64 - Processo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado por o referido vírus ser um vírus herpes.

65 - Processo de preparação de uma composição para inibição de infecção indesejável de células por um vírus, em mamíferos incluindo seres humanos, caracterizado por compreender a mistura de (1) um derivado de oligossacárido cíclico com (2) um composto orgânico esteróide ou não esteróide modulador do crescimento celular latente, não possuindo o referido esteróide actividade glucocorticoide, sendo o derivado de oligossacárido cíclico caracterizado por possuir uma solubilidade a 0°C, em água destilada, de pelo menos 20 g/100 ml de água.

66 - Processo de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico conter cerca de seis a cerca de doze monómeros de açúcar.

67 - Processo, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico conter cerca de seis a cerca de oito monómeros de açúcar.

68 - Processo, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico ser alfa-, beta- ou gama-ciclodextrina.

69 - Processo, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por o derivado de oligossacárido cíclico ser um derivado de sal aniónico do referido oligossacárido tendo substituintes seleccionados do grupo consistindo em sulfato, fosfato, carboxilato e suas misturas associadas com um catião fisiologicamente aceitável.

70 - Processo de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico ser sulfato de oligossacárido cíclico.

-40-

71 - Processo de acordo com a reivindicação 70, caracterizado por o referido sulfato de oligossacárido cíclico conter cerca de 10-16 grupos sulfato.

72 - Processo de acordo com a reivindicação 70, caracterizado por o referido sulfato de oligossacárido cíclico ser o tetradeca-sulfato de beta-ciclodextrina.

73 - Processo de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico ser um derivado não iônico do referido oligossacárido tendo substituintes seleccionados do grupo consistindo em porções alquilo, éster, éter, tio-éster, tio-éter, ácido carboxílico e carbo-hidrato.

74 - Processo de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico ser um oligossacárido cíclico substituído com alcóxilo.

75 - Processo de acordo com a reivindicação 74, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído com alcóxilo conter cerca de 10-16 grupos metóxilo.

76 - Processo de acordo com a reivindicação 74, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído por alcóxilo ser o tetradeca-metoxi-beta-ciclodextrina.

77 - Processo de acordo com a reivindicação 74, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído por alcóxilo conter cerca de 10-16 grupos propoxi.

78 - Processo de acordo com a reivindicação 74, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído por alcóxilo ser a tetradecapropoxi-ciclodextrina.

79 - Processo de acordo com a reivindicação 74, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico conter substituintes iônicos e não iônicos.

80 - Processo de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por o referido retrovírus ser o vírus de imunodeficiência humana-1.

81 - Processo de acordo com a reivindicação 65, caracteri

-41-

zado por o referido retrovírus ser o vírus de imunodeficiência humana-2.

82 - Processo de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por o esteróide ser cortisona, hidrocortisona, cortexolona ou tetra-hidrocorticol.

83 - Processo de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por o composto não esteróide ser interferão-alfa, interferão-beta ou interferão-interferão.

84 - Processo de acordo com a reivindicação 65, caracterizado por o composto não esteróide ser interleuquina-1 ou interleuquina-2.

85 - Processo de preparação de uma composição para inibição de infecção indesejável de células por um retrovírus, em mamíferos, incluindo seres humanos, caracterizado por compreender a mistura de (1) um derivado de oligossacárido cíclico com (2) um composto orgânico esteróide ou não esteróide modulador do crescimento celular latente, e (3) um agente anti-viral, no qual o referido esteróide não possui actividade glucocorticoide e sendo derivado de oligossacárido cíclico caracterizado por possuir uma solubilidade a 0°C, em água destilada, de pelo menos 20 g/100 ml de água.

86 - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico conter cerca de seis a cerca de doze monómeros de açúcar.

87 - Processo, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico conter cerca de seis a cerca de oito monómeros de açúcar.

88 - Processo, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico ser alfa-, beta- ou gama-ciclodextrina.

89 - Processo, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o derivado de oligossacárido cíclico ser um derivado de sal aniônico do referido oligossacárido tendo substituintes seleccionados do grupo consistindo em sulfato, fosfato, carboxilato,

-42-

e suas misturas associadas com um catião fisiologicamente aceitável.

90 - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico ser o sulfato de oligossacárido cíclico.

91 - Processo de acordo com a reivindicação 90, caracterizado por o referido sulfato de oligossacárido cíclico conter cerca de 10-16 grupos sulfato.

92 - Processo de acordo com a reivindicação 90, caracterizado por o referido sulfato de oligossacárido cíclico ser o tetradeca-sulfato de beta-ciclodextrina.

93 - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico ser um derivado não iônico do referido oligossacárido tendo substituintes seleccionados do grupo consistindo em porções alquilo, éster, éter, tio-éster, tio-éter, ácido carboxílico e carbo-hidrato.

94 - Processo de acordo com a reivindicação 88, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico ser um oligossacárido cíclico substituído com alcóxido.

95 - Processo de acordo com a reivindicação 94, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído com alcóxido conter cerca de 10-16 grupos metóxido.

96 - Processo de acordo com a reivindicação 94, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído por alcóxido ser a tetradeca-metoxi-beta-ciclodextrina.

97 - Processo de acordo com a reivindicação 94, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído por alcóxido conter cerca de 10-16 grupos propóxido.

98 - Processo de acordo com a reivindicação 94, caracterizado por o referido oligossacárido cíclico substituído por alcóxido ser a tetradecapropoxi-ciclodextrina.

99 - Processo de acordo com a reivindicação 94, caracterizado por o referido derivado de oligossacárido cíclico conter substituintes iônicos e não iônicos.

-43-

100 - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o referido retrovírus ser o vírus de imunodeficiência humana-1.

101 - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o referido retrovírus ser o vírus de imunodeficiência humana-2.

102 - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o esteróide ser cortisona, hidrocortisona, cortexolona ou tetra-hidrocorticol.

103 - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o composto não esteróide ser interferão-alfa, interferão-beta ou interferão-interferão.

104 - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o composto não esteróide ser interleuquina-1 ou interleuquina-2.

105 - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o referido agente anti-viral ser um derivado de nucleósido.

106 - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o referido agente anti-viral ser um péptido CD4 ou um seu análogo.

107 - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado por o referido agente anti-viral ser a hipericina.

Lisboa,

Por THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF PENNSYLVANIA

- O AGENTE OFICIAL -



1/7

FIG. 1A

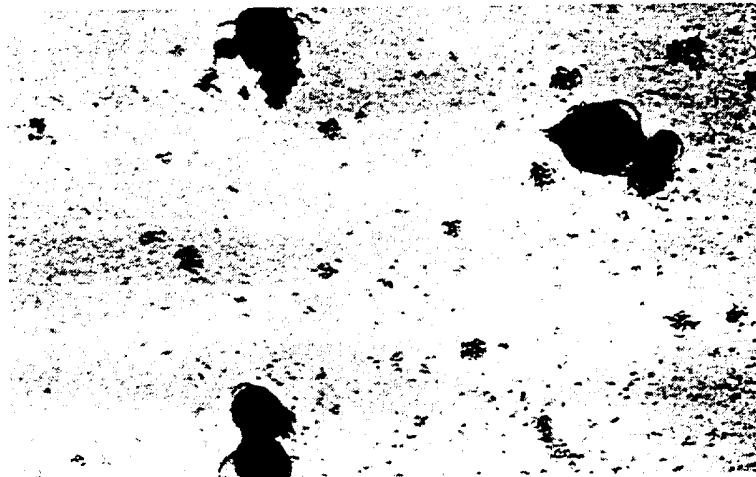
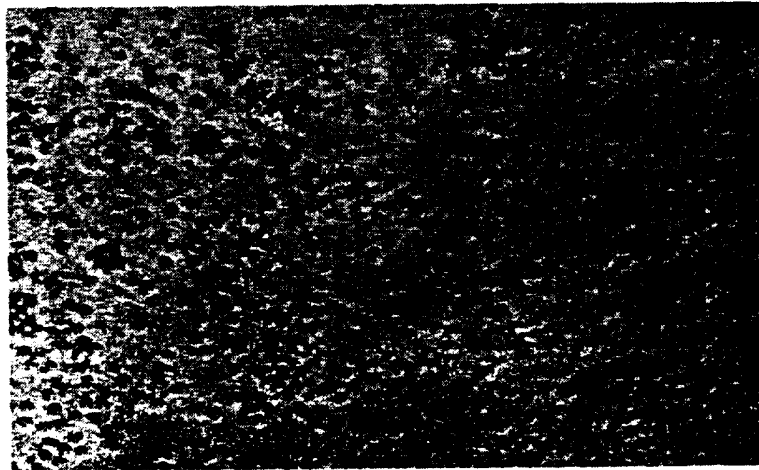
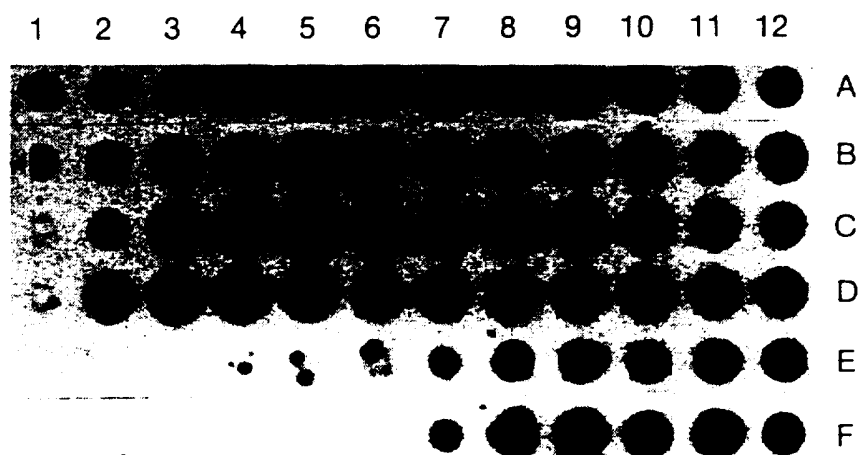


FIG. 1B

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

2/7

FIG. 2



THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

FIG. 3A

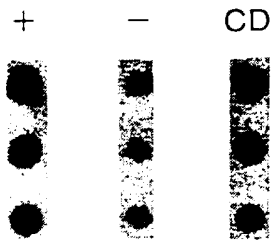
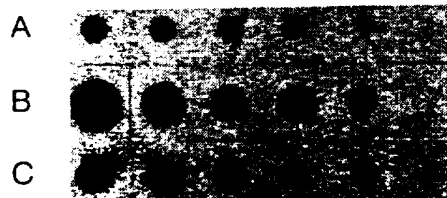


FIG. 3B

4/7

FIG. 4



THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

5/7

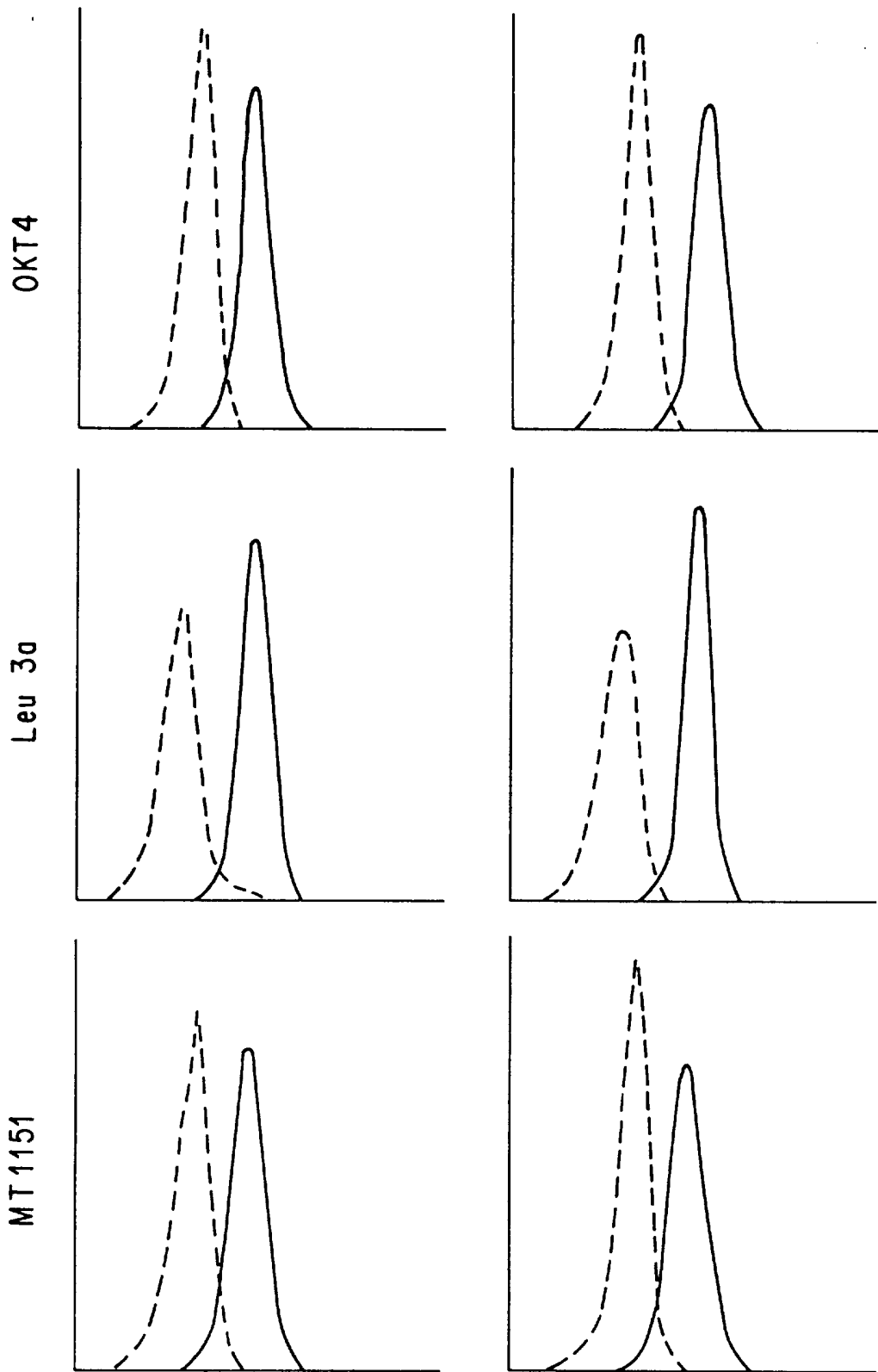


FIG. 5

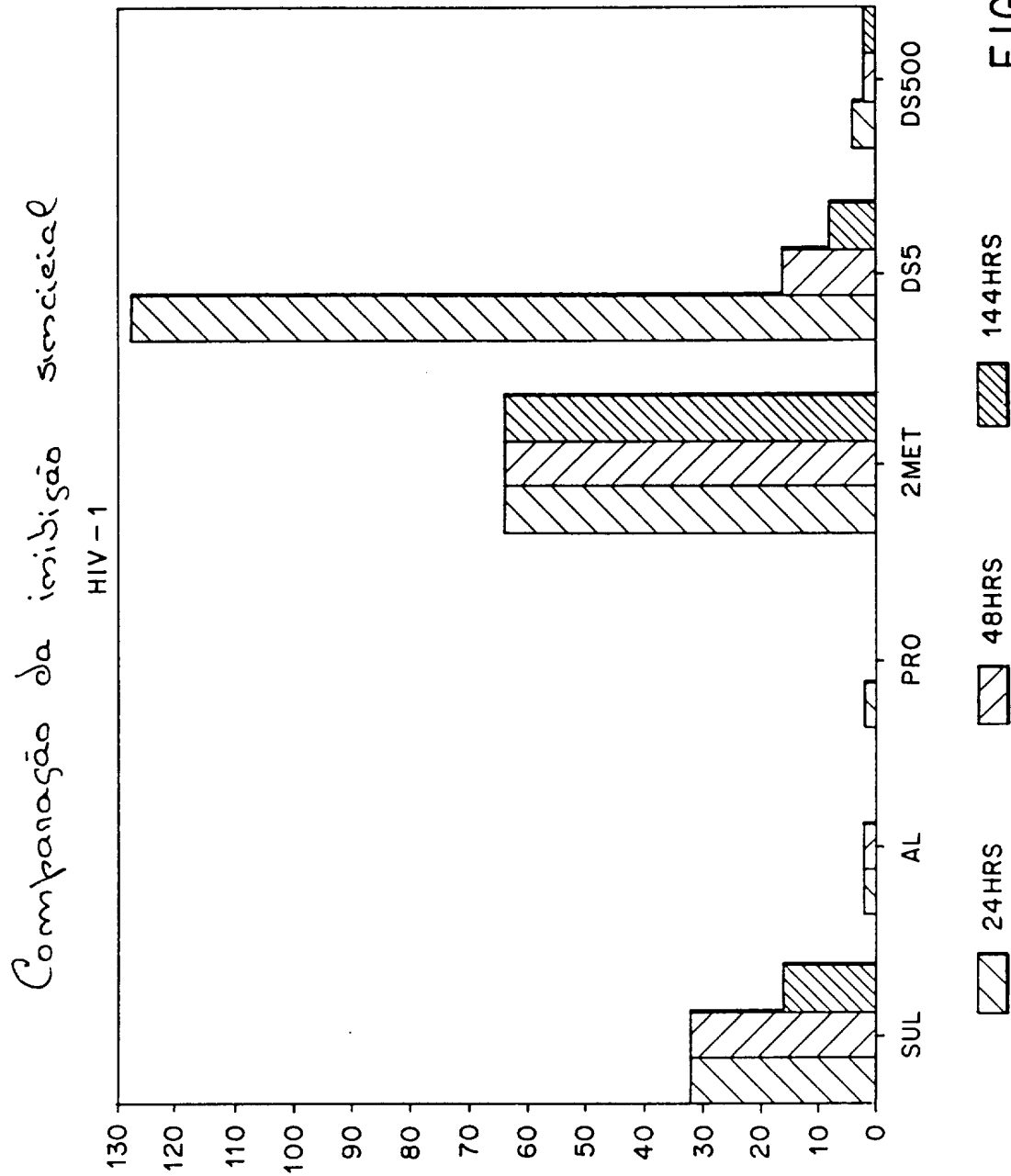
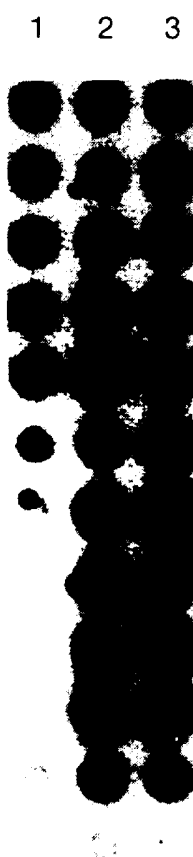


FIG. 6a

7/7.

FIG. 6b



THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA