

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97 754

REQUERENTE: MARY KATHARINE LEVINGE COLLINS, inglesa, comerciante e industrial, residente em 54 Lascotts Road, Wood Green, Londres, N22 4JN, Inglaterra, FARZIN FARZANEH, inglês, comerciante e industrial, residente em 17 Brantwood Road, Herne Hill, Londres SE24 0DH, Inglaterra, SYDNEY SHALL; Inglês, comerciante e industrial, residente em 45 The Avenue, Lewes, West Sussex BN7 1QT, Inglaterra e MENOOCHEHR TAVASSOLI, inglês, comerciante e industrial, residente em 87 Furzecroft, Furze Hill, Brighton BN3 1PE, Inglaterra

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO PELO MENOS UM AGENTE INIBIDOR DA POLI-(ADP-RIBOSE)-POLIMERASE, PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES PROVOCADAS POR VIRUS"

INVENTORES: -

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

na Inglaterra em 25 de Maio de 1990 sob o N.º 9011833.2.

Wifama

2

RESUMO

A presente invenção refere-se ao processo para a preparação de composições farmacêuticas que contém pelo menos um agente inibidor da poli-(ADP-ribose)-polimerase, para o tratamento de infecções provocadas por vírus cujo ADN se integra no cromossoma ou cromossomas dos pacientes, em especial, retrovirus, lentivirus e virus da imunodeficiência humana, que compreende misturar-se o referido agente inibidor da p(ADP-r)p com os ingredientes veiculares e/ou auxiliares farmaceuticamente aceitáveis nas proporções em peso indicadas nas reivindicações.



3

Sector técnico da invenção:

A invenção situa-se no campo da prevenção das infecções provocadas por vírus, em especial (porém não exclusivamente) das infecções provocadas por retrovírus.

Descrição do estado da técnica:

A infecção das células por vírus envolve uma interacção do receptor, entrada na célula e o desrevestimento do material genético (ADN ou ARN). Alguns vírus (por exemplo os vírus das vacinas) formam réplicas sem integração do material genético do vírus na célula hospedeira do ADN. Alguns vírus do ADN e a família dos retrovírus dos vírus do ARN integram, de facto, o material genético na célula de ADN infectada durante o ciclo de vida do vírus. No caso dos retrovírus, a actividade da enzima reverte a transcriptase codificada pelo retrovírus pol gene, converte o genoma do ARN num provírus do ADN com fita dupla na célula infectada. Este provírus é depois integrado no ADN cromossómico da célula hospedeira. A integração do provírus no genoma da célula hospedeira envolve um conjunto coordenado de ocorrências de quebra e ligação das fitas do ADN. Este processo exige a actuação duma proteína codificada no vírus chamada IN, que tem tanto actividades de endonuclease como actividades de ligase no ADN.



4

No entanto, embora a proteína IN seja tanto necessária, como suficiente para a integração do provírus num sistema modelo, na ausência dos factores codificados na célula, até agora não indentificados, este processo é relativamente insuficiente. Portanto, uma infecção por vírus de elevada eficácia requer, não só a proteína IN do vírus, como também os componentes celulares, O ADN do provírus integrado é então transcripto pela estrutura da célula hospedeira, para produzir os ARN que servem, tanto de novos genomas do vírus, como de ARN.

É necessário desenvolver métodos de prevenção das infecções por retrovírus, em especial as infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os compostos AZT (3'-azido-2', 3'-dideoxi-timidina) e DDI (didesoxinosina), que têm sido utilizados no tratamento da HIV, impedem uma infecção pelos retrovírus por inibirem a transcrição reversa. No entanto, os mencionados compostos são tóxicos. Além disso, tem sido sugerido, geralmente, que a infecção pelos retrovírus precisa de ser tratada por meio duma terapia de combinação, em que o vírus é atacado por um certo número de estratégias. Pretende-se, por conseguinte, combater o citado retrovírus de uma outra maneira, diferente da transcriptase reversa bloqueadora.



Outros aspectos do estado da técnica serão referidos depois do sumário da invenção, sem os quais o seu contexto não seria claro.

Sumário da invenção

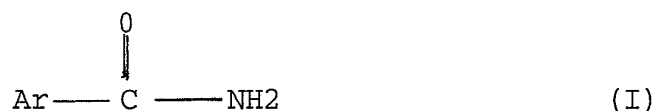
A presente invenção nasceu da ideia de prevenir ou impedir a integração do ADN de vírus ou de provírus no cromossoma ou cromossomas hospedeiros. Constatou-se agora que os agentes inibidores da enzima «poli» conhecida (ADP-ribose) polimerase, em seguida abreviada para p (ADP-r)p também conhecida por ADP-ribosil transferase, poli (ADP-ribose) transferase ou poli (ADP-ribose) sintetase EC 2.4.2.30) irá inibir a referida integração e é, portanto, vantajosa no tratamento das infecções provocadas por vírus.

O mecanismo pelo qual os mencionados agentes inibidores de enzimas impedem uma infecção por retrovírus não está claro. Nesta fase, não se pode estabelecer a regra de que factores diferentes daqueles que estão directamente implicados na actividade da poli (ADP-ribosil) polimerase, que contribui para a integração do ADN dos provírus, estão a contribuir para o efeito observado.

Handwritten signature

6

Os agentes inibidores preferidos são as amidas aromáticas de fórmula geral (I)



na qual

Ar representa um grupo aromático monocíclico, o grupo amido ilustrado está ligado a um átomo de carbono no anel do grupo aromático, e Ar é insubstituído (excepto pelo grupo amido) ou é substituído por pelo menos um átomo ou grupo substituinte simples, compatível com a actividade inibidora.

Continuação da descrição do estado da técnica:

A p(ADP-r)p é uma enzima encontrada no núcleo e citoplasma das células, requerendo um rompimento das fitas do ADN para a sua actividade. A sua função consiste em modificar, duma forma pós-translação, as proteínas por ribosilação de poli ADP usando o ADN^+ como substrato. Verificou-se que a referida enzima estava envolvida numa variedade de processos celulares eucarióticos, os quais implicam a ligação dos rompimentos da fitas de ADN, possivelmente porque ela regula a actividade de ligase do ADN.

Wifama

7

Sabe-se que a referida enzima é inibida por vários compostos (incluindo as benzamidas), alguns dos quais estão na lista que se segue:

1. -- benzamida
2. -- 3-aminobenzamida
3. -- 3-bromobenzamida
4. -- 3-clorobenzamida
5. -- 3-fluorbenzamida
6. -- 3-metilbenzamida
7. -- 3-metoxibenzamida
8. -- 3-hidroxibenzamida
9. -- 3-N-acetilaminobenzamida (3-acetamidobenzamida)
10. -- 3-N-propionilaminobenzamida (3-propionamidobenzamida)
11. -- nicotinamida
12. -- 5-metil-nicotinamida
13. -- hidrazia ftálica
14. -- 3-aminoftal-hidrazida (Luminol ou 5-amino-2,3-di-hidro-ftalazinediona)
15. -- 3-nitro-ftal-hidrazida
16. -- clorotenoxazina
17. -- benzoilenureia (2,4-[1H,3H]-quinazolinediona)
18. -- timidina.

Wifan

Sabe-se que os agentes inibidores são reversíveis, competitivos e impedem a depleção do ADN⁺ intracelular, que é causada pelos agentes danosos ao ADN. Pela aplicação dos referidos agentes inibidores, tem sido comprovado que a enzima p(ADP-r)p está envolvida na reparação duma excisão no ADN (ver Shall S. (1984), Adv. in Rad. Biol. 11, páginas 1 a 69), e na comutação antígenos de Trypanosoma brucei (ver Cornelissen A. W. C. A. et al; (1985)), Biochem. Pharm. 34, páginas 4151-4156). Descobriu-se também que a inibição da enzima p(ADP-r)p nuclear por meio da 3-aminobenzamida produzia um grande aumento das mudanças de cromatido cister espontâneas (Oikawa A. et al., (1980), Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, páginas 1131-1136, Lindahl Kiessling K. & Shall S. (1987), Carcinogenesis, 8, páginas 1185-1188). Estes últimos dois processos acima citados envolvem uma recombinação do ADN homólogo. Constatam-se recentemente que a inibição da p(ADP-r)p pela 3-metoxibenzamida ou 3-aminobenzamida bloqueava a integração do ADN estranho no genoma durante um processo de transfecção do ADN mediado pelo fosfato de cálcio, implicando uma recombinação ADN não homólogo/ilegítimo (veja-se Farzaneh F. et al. (1988), Nucleic Acids Research 16, páginas 11319-11326). Verificou-se que a citada inibição era específica para a fase de integração da transfecção do ADN. Demonstrou-se que a actividade da enzima p(ADP-r)p não influenciava o recebimento do ADN pela



9

célula, a sua manutenção ou réplica episomal, nem a sua expressão, quer antes, quer após a integração no genoma hospedeiro.

A nicotinamida, um outro agente inibidor da enzima p(ADP-r)p também tem sido investigada. O efeito da nicotinamida sobre a réplica do vírus da vaccinia foi determinado pela infecção de monocamadas de células BSC₄₀ com vírus de vaccinia na presença de nicotinamida 1-100 mM e observando a produção de viriões da progénie depois de 24 horas a 37°C.

Os vírus de vaccinia, ao contrário dos retrovírus e outros vírus do ADN, forma réplicas no compartimento do citoplasma das células (Child, S. J. et al (1988), Virus Research 2, páginas 119-132). Em concentração de 20mM, a réplica do vírus foi afectada e, em concentração de 60mM, foi reduzida em mais de 99%. Embora a nicotinamida seja um agente inibidor da p(ADP-r)p conhecido, a função desta enzima nuclear no ciclo de réplica dos vírus não foi debatido e as concentrações de nicotinamida utilizadas (20 a 60 mM) seriam altamente tóxicas para as células.

A concentração de 20 mM de nicotinamida iria esgotar rapidamente o fornecimento de ATP das células (tipicamente 2-3 mM). Em vista disso, esta referência não teria sido considerada seriamente.



10

Alguns agentes inibidores da enzima p(ADP-r)p têm desempenhado uma função na terapia do cancro. As danificações do ADN tais como rompimento das fitas, danos na base e na reticulação devidos a uma exposição aos raios X ou a bleomincina durante uma terapia com radio ou uma quimioterapia são reparáveis. Demonstrou-se que os agentes inibidores da enzima p(ADP-r)p, ou seja, a 3-aminobenzamida e a nicotinamida, impediam a recuperação pelo atraso na religação do ADN.

Não se suspeitou que a inibição da integração do ADN estranho nas células mediante a utilização dos agentes inibidores da enzima p (ADP-r)p se aplicasse aos vírus. Os retrovírus e alguns vírus do ADN (diferentes dos vírus de vaccinia) integram-se no ADN dos cromossomas da célula hospedeira durante o ciclo da réplica.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 – mostra a construção dum vector de retrovírus «pWeT-TAC ψ 2» utilizado na infecção de células, a fim de ensaiar os agentes inibidores;

a Figura 2 mostra a construção de um vector de retrovírus «MPSV. sup. 8», que também foi usado como meio de infecção de células;



11

a Figura 3 mostra a construção duma plasmida pM5neo utilizada para produzir uma amostra para um processo de hibridização de Southern, a fim de ensaiar a inibição de incorporação do ADN do provírus, desde o retrovírus de ensaio para dentro dos cromossomas, na presença de agentes inibidores;

a Figura 4 mostra os resultados das experiências de hibridização de Southern do ADN de elevado peso molecular, seguindo-se a infecção por retrovírus na presença ou na ausência de agentes inibidores;

a Figura 5 mostra os resultados do ensaio anti-HIV de 3-metoxi benzamida. Usou-se o A2T como controlo;

a Figura 6 mostra os resultados do ensaio anti-HIV da 4-hidroxi-quinazolina e da clorotenoxazina. Como controlo usa-se a AZT. Os ensaios foram realizados nas células mononucleares periféricas do sangue humano;

a Figura 7 mostra os resultados dos ensaios realizados como no caso ilustrado na Figura 6, excepto pelo facto de os ensaios terem sido efectuados numa linha de células de monócitos humanos.



12

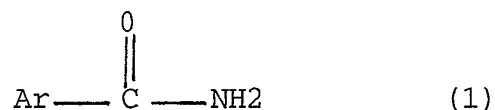
Descrição das formas de realização preferidas

A invenção é aplicável a todos os vírus cujo ciclo de infecção envolve a integração do ADN de vírus ou de provírus no cromossoma ou nos cromossomas da célula hospedeira. O tipo de vírus preferido é o retrovírus. Os retrovírus são vírus do ARN, cujo ciclo de vida implica a integração do material genético do vírus nos cromossomas da célula hospedeira. Os retrovírus são classificados em tipos B, C e D de oncovírus (tal como o vírus do tumor da mama do rato (B), vírus da leucemia no rato (C), vírus do macaco Mason Pfizer (D), lentivírus (como o HIV) e vírus de espuma (por exemplo, vírus de espuma de Simian). No caso dos oncovírus dos tipos clássicos B, C e D, o ADN do provírus integra-se no ADN da célula infectada e observa-se pouco ADN com provírus não integrado. OS provírus de HIV são também integrados no ADN da célula infectada; neste caso, constata-se também, a presença de ADN de provírus não integrado. Crê-se, no entanto, que a integração do HIV é necessária para uma infecção intensa in vivo.

Os agentes inibidores da enzima são aqueles que, como se sabe, inibem a actividade da enzima p(ADF-r)p, mas são os agentes inibidores não tóxicos, que têm uma constante de inibidor de $<25\text{mM}$, com maior preferência $<10\text{mM}$, dado que, com valores

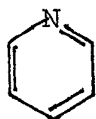
13

inferiores, podem-se empregar concentrações mais baixas. Os agentes inibidores são amidas aromáticas e têm a seguinte fórmula geral (1):

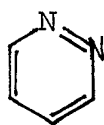


na qual

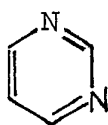
Ar representa um grupo aromático monicíclico. O anel aromático tem, de preferência, 6 componentes, e pode conter um ou mais átomos de azoto, como num anel de piridina:



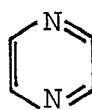
um anel de diazina (3):



(a)



(b)



(c)

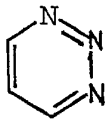
(3)

em que (a) é um anel de piridazina, (b) é um anel de pirimidina e (c) é um anel de pirazina;

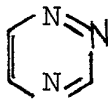
Wifama

14

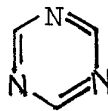
ou um anel de triazina (4):



(a)



(b)



(c)

(4)

em que (a) é uma 1, 2, 3-triazina, (b) é uma 1, 2, 4-triazina, e (c) é uma 1, 2, 5-triazina.

O grupo amido representado na fórmula (1) é ligado a um anel de carbono do grupo aromático, e o grupo Ar não é substituído, excepto pelo grupo amido ilustrado, ou é substituído num átomo de carbono do anel por um ou mais dos seguintes substituintes:

OR^1 , em que R^1 representa:

- um átomo de hidrogénio
- um grupo alquilo com 1 a 4 átomos de carbono, insubstituído ou substituído por halogéneo, hidroxí ou amino, ou
- um grupo acilo (o qual é, de preferência, alquilcarbonilo, mas poderia ser, por exemplo sulfonilo) tendo um comprimento total de cadeia até 4 átomos;

um átomo de halogéneo;

um grupo carboxi;

um grupo carboximetilo;

um grupo alcóxicarbonilo, em que o grupo alcoxi tem entre 1 e 4 átomos de carbono;

um grupo nitro;

um grupo ureido ($-\text{NH}-\text{CONH}_2$);

um grupo alquilo tendo 1 a 4 átomos de carbono, conforme foi acima definido para R^1 ;

um grupo amino de fórmula NR^2R^3 , na qual R^2 e R^3 representam um átomo de hidrogénio um grupo alquilo tendo 1 a 4 átomos de carbono ou um grupo alquilcarbonilo tendo um total entre 1 e 4 átomos de carbono;

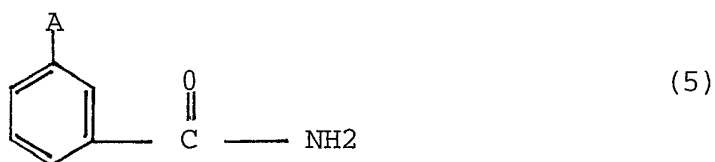
um grupo acilo de fórmula $-\text{COR}^4$, na qual R^4 representa um grupo orgânico, de preferência um grupo alquilo tendo 1 a 4 átomos de carbono.

Para reforçar a actividade inibidora, dá-se muita preferência ao facto de o anel ser substituído, pelo menos na posição meta, em relação ao grupo amido, de preferência somente na posição meta.

[Handwritten signature]

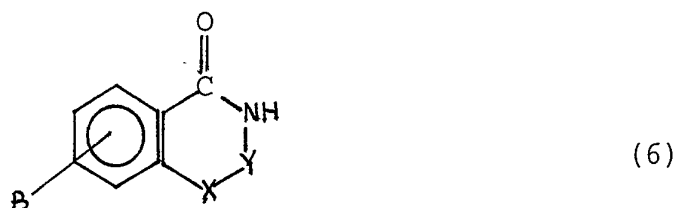
16

Os agentes inibidores preferidos são aqueles em que o grupo Ar é um grupo aromático benzenóide e tem a fórmula (5):



na qual A representa um átomo de hidrogénio ou um substituinte conforme se descreveu anteriormente. Os agentes inibidores que são ainda mais preferidos são os de fórmula geral (5) na qual A significa NH_2 (3-aminobenzamida, CH_3O -(3-metoxibenzamida) e HCONH -(3-N-formilaminobenzamida).

O agente inibidor da enzima pode também ser de fórmula geral (6):



na qual

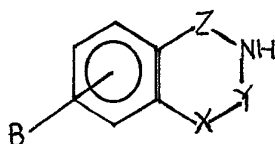
X e Y são átomos do anel ou átomo do anel contendo grupos completando um anel saturado; e B representa um átomo de hidrogénio ou um grupo amino.

Wifam

17

X e Y podem ser grupos carboxi, grupos amino, grupos de azoto ou grupos de oxigénio, ou um grupo alquilo tendo 1 a 4 átomos de carbono, que podem ser insubstituídos ou substituídos por grupos de halogénio, de hidroxí ou de amino. Preferivelmente, X significa -CO- e Y significa -NH-, ou então X significa -NH- e Y representa -CO-. Esta fórmula inclui luminol (B significa NH_2 na posição 3 em relação ao azoto de hidrazida; Y significa -NH- e X significa -CO-), isoluminol, benxiolenureia e clorotenoxazina (Y significa $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$, B significa H, e X significa -O-).

O agente inibidor da enzima pode também ter a seguinte fórmula (7):



(7)

na qual Z significa C=O ou C-OH , em conjunto com a insaturação do anel Z=N e os átomos do anel X e Y são átomos do anel ou átomos de anel contendo grupos, conforme se descreveu anteriormente, completando um anel que é saturado ou insaturado. Esta fórmula geral cobre a hidroxiquinazolina (Z significa C-OH , X significa -N- e Y significa -CH-). B representa um átomo de hidrogénio ou um grupo amino.



18

De todos os agentes inibidores 3-metoxibenzamida e 3-N-formil-amino-benzamida são os de maior preferência.

A via de administração preferida é a via oral ou por injeção, por exemplo intravenosa. Quando se entra numa situação de alto risco, impede-se ou reduz-se a infecção se o agente inibidor for administrado durante um período de no máximo 24 horas imediatamente antes da infecção pelo vírus. Este seria o método de utilização preferido. De contrário, os agentes inibidores serão usados num processo de terapia quando se diagnostica uma infecção por vírus. Os agentes inibidores podem ser empregues em concentrações de 1 a 5 mM por quilograma de peso corporal, mas, com maior preferência, num intervalo entre 1 e 3 mM por quilograma de peso corporal, sendo esta proporção mantida no corpo mediante repetidas injeções ou em doses por via oral do agente inibidor, com uma frequência que depende da taxa de remoção do agente inibidor pelo corpo.

Os exemplos seguintes ilustram a invenção.

Exemplo 1

EFEITO DOS AGENTES INIBIDORES DA POLI (adp-RIBOSE) POLIMERASE E AGENTES ANÁLOGOS AO INIBIDOR NO CASO DUMA INFEÇÃO DE NIH-3T3 PELO VECTOR DE RETROVÍRUS P WET-TAC ψ 2.

Introdução

Os vectores dos retrovírus são formados por duas partes, o material genético autêntico a ser transferido e a estrutura (o virião) que actua com o veículo para introduzir o material genético nas células. Começando com a estrutura básica dos provírus, constroem-se os vectores em que a maior parte das sequências com o código para os genes estruturais são apagadas e substituídas pelo(s) gene(s) de interesse, os quais são depois transcritos sob o controlo das sequências reguladoras dos vírus contidas na repetição do terminal longo (LTR). Tais retrovírus recombinantes são, portanto, falhos de réplica e requerem a reunião de linhas de células para a produção de viriões infecciosos. As citadas linhas de células reunidas funcionam por fornecimento das proteínas estruturais dos retrovírus, que foram destruídas no vector do retrovírus. Quando se efectua a transfecção com uma construção adequada do vector portadora dum sinal de reunião apropriado, as mencionadas linhas de células de reunião são capazes de libertar os viriões infecciosos. Os viriões assim libertos permitem somente uma única ronda de infecção, dado que o vector RNA não está presente num ou mais dos genes estruturais, nenhuma progénie de vírus é produzida pelas células infectadas. O vector do retrovírus pWet-TAC Ψ 2 contém a fosfotransferase de neomicina do gene («neo») que confere



20

resistência à droga G418. O vector é construído como se ilustra na figura 1. A região BamHI-PvuI, incluindo as LTR e a região inicial do políoma foi obtida a partir do vector de orientação da direcção dos retrovírus DOL- (Korman, A. J. et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci., EUA, 84, páginas 2150-2154). A região PvuI-XhoI incluindo o gene marcador «neo», origem SV40 e origem pBR, foi obtida do pZIP-Neo-SV(x) (Roberts, B. E. et al (1985), J. Virol. 56, páginas 403-423). O agente promotor ThyI em conjunto com um fragmento de ADN genómico 0,7 Kb foi descrito por Guiguere, V. et al (1985), EMBO J., 4, págs. 2017-2024. O CADN TAC humano é um clone 1 kb descrito por Collins, M. K. L. (1989), Eur. J. Immunol, 19, páginas 1517-1520.

(a) INFECÇÃO DE CÉLULAS NIH-3T3 COM O VECTOR pWET-TAC DO RETROVÍRUS RECOMBINANTE.

24 horas antes da infecção, placas confluentes de 90 mm de células NIH-3T3 foram tripsinizadas e novamente emplacadas numa densidade de 1×10^5 células por cada placa de 90 mm. Na ocasião da infecção, adicionaram-se às células de NIH-3T3 150 unidades formadoras duma colónia de vírus recombinantes (previamente tituladas por infecção de células NIH-3T3 e selecção de colónias resistentes ao G418) e $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ de polibreno (1,5-dimetil-1,5-diazaundecametileno-polimetobrometo). Decorridas 72 horas, as



21

células foram tripsinizados e 1/10 de todas as células, que foram originalmente infectadas, foram emplacadas sobre placas de 90 mm na presença de G418 com uma concentração final de 1 mg ml^{-1} . Contaram-se as colónias depois de 7 dias após a fixação e o manchamento com uma mancha de Glemsa-metanol. O número de controlo das colónias, quando nem os análogos dos inibidores foram utilizados, era de 201 ± 0 , $n=2$.

(b) INIBIÇÃO DA INFECÇÃO PELO VECTOR DOS RETROVÍRUS pWet-TAC Ψ 2 MEDIANTE OS AGENTES INIBIDORES DA ENZIMA POLI (ADP-RIBOSE) POLIMERASE OU ANÁLOGOS NÃO-INIBIDORES.

As células NIH-3T3 foram infectadas com o mesmo título de vírus conforme descrito em (a) e $8 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ de polibremo na presença de um dos compostos listados na Tabela 1 a seguir. As benzamidas 3-substituídas são agentes inibidores da enzima poli (ADP-ribose) polimerase, enquanto o ácido benzóico 3-substituído e as benzamidas 4-substituídas são agentes análogos não inibidores incluídos para comparação.

TABELA 1

<u>Agente inibidor/ análogo inibidor</u>	<u>Percentagem das colónias de controlo contadas</u>	<u>% da inibição conseguida</u>
1. Nenhum (controlo)	—	—
2. 3mM de 4-aminobenzamida (Comparativa)	88	12
3. 3mM de ácido 3-aminobenzóico (Comparativo)	90	10
4. 3mM de 3-aminobenzamida	55	45
5. 1mM de 4-formilaminobenzamida (Comparativo)	92	8
6. 1mM de 3-N-formilaminobenzamida	36	64
7. 2mM de 4-metoxibenzamida (Comparativo)	85	15
8. 2mM de 3-metoxibenzamida	18	82

Seguindo a forma de procedimento em (a), observou-se o efeito dos agentes inibidores e dos análogos não-inibidores na formação de colónias resistentes ao G418. Os resultados estão ilustrados na Tabela 1. O agente 3-aminobenzamida revelou um grau de inibição significativo da formação de colónias, resistentes ao G418; o agente inibidor 3-formilaminobenzamida revelou uma inibição ainda maior da infecção e somente na concentração de 1mM, ao passo que, com 2mM, o agente inibidor 3-metoxibenzamida foi também



23

muito eficaz. Em contraste, os análogos não-inibidores, 4-amino-benzamida, ácido 3-amino-benzóico, 4-formilaminobenzamida e 4-metoxibenzamida não inibiram a formação da colónia G418.

Repetiu-se o ensaio acima, excepto pelo facto de se ter empregado o vector de retrovírus MPSV sup. neo (veja-se o Exemplo 4 a seguir) para infectar células HL-60. Investigou-se o efeito dos agentes inibidores da enzima poli (ADP-ribose) polimerase, ou seja 5-metil-nicotinamida e clorotenoxazina. Os resultados estão indicados na Tabela 2 a seguir:

TABELA 2

Efeito dos agentes inibidores da enzima poli (ADP-ribose) na infecção das células HL-60 pelo vector de retrovírus MPSV sup. neo.



24

<u>Agente inibidor/Análogo inibidor</u>	<u>Percentagem de controlo das colónias contadas</u>	<u>Percentagem da inibição alcançada</u>
Nenhum (controlo)	65	35
2000mM de 5-metil-nicotinamida	70	30
0,500mM " "	183	+ 83
0,100mM " "	49	51
0,100mM de clorotenoxazina	64	36
0,025mM " "		

Exemplo 2

INIBIÇÃO DA POPULAÇÃO NUMA CÉLULA PREVIAMENTE INFECTADA, MEDIANTE OS AGENTES INIBIDORES DA ENZIMA POLI (ADP-RIBOSE) POLIMERASE OU MEDIANTE AGENTES ANÁLOGOS NÃO INIBIDORES

Introdução

Realizou-se uma experiência de controlo, na qual uma população numa célula previamente infectada e seleccionada foi misturada com células NIH-3T3 e infectadas com o vector do retrovírus pWET-TAC Ψ 2. A população na célula foi submetida a uma selecção para resistência ao G418, seguindo-se o tratamento pelos agentes inibidores ou seus análogos.



Processo

24 horas antes da infecção placas confluentes com 90mm (diâmetro de células NIH-3T3 foram tripsinizadas e novamente emplacadas numa densidade de 1×10^5 células por cada placa de 90mm. 75 células NIH-3T3 previamente infectadas e seleccionadas foram misturadas com as mencionadas 1×10^5 células. Adicionaram-se 80 mg ml^{-1} de polibreno e incubaram-se as células na presença ou na ausência dos mesmos compostos utilizados no Exemplo 1.

Depois dum período de incubação de 72 horas, as células foram tripsinizadas e 1/10 das células foram emplacadas numa placa de 90mm, na ausência dos compostos acima mencionados, mas na presença de 1mg ml^{-1} do G418. Contaram-se as colónias depois de 7 dias, após a fixação e o manchamento. O número de controlo das colónias, quando nem os agentes inibidores, nem os seus análogos inibidores foram utilizados, foi de 79,7; os dados obtidos representavam a média das infecções triplicadas.

Os resultados (Tabela 3) mostram que, nesta situação, os agentes inibidores da enzima em questão não tiveram nenhuma actividade significativa. Portanto, os citados inibidores da enzima não impediram a expressão do gene «neo» vindo da LTR dos vírus, depois de o ADN dos provírus ter ficado integrado, nem eles exterminaram selectivamente as células infectadas.

Wifama

26

TABELA 3

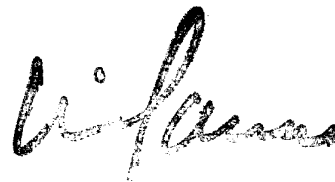
<u>Agente inibidor/análogo inibidor</u>	<u>Percentagem de inibição da formação da colônia de controlo</u>
3mM 4-aminobenzamida	+11
3mM ácido 3-aminobenzóico	16
3mM 3-aminobenzamida	+ 6
1mM 4-formolaminobenzamida	+10
1mM 3-N-formilaminobenzamida	7
2mM 4-metoxibenzamida	16
2mM 3-metoxibenzamida	13

+ Indica aumento das colónias, em vez da inibição

Exemplo 3

EFEITO DA DOSE NA INIBIÇÃO DA INFECÇÃO DOS RETROVÍRUS PELA 3-AMINO-
NOBENZAMIDA.

Procedendo conforme se descreveu no Exemplo 1, todavia com a aplicação de 3-aminobenzamida como agente inibidor da enzima poli (ADP-ribose) polimerase, observou-se um pequeno grau de inibição da formação de colónias resistentes ao G418, com 1mM do agente inibidor, sendo 50% na concentração de 3mM e 60% na concentração de 5mM.



Exemplo 4

INFECÇÃO DAS CÉLULAS NIH-3T3 E HL-60 COM O VECTOR DE RETROVÍRUS MPSV. SUP. 28.

Introdução

O MPSV. sup. 28 é um vector de retrovírus recombinante baseado no vírus do sarcoma mieloproliferativo no murino e é construído como se mostra na Figura 2. Este vector porta o gene da fosfotransferase da neomicina («neo»). Este vector contém também a mutação do supressor sup F. Um mutante de supressor é um mutante que é capaz de dominar os efeitos dum outro mutante. Nos sistemas de supressor +ARN, a mutação primária muda o codão num mARN, de forma que o produto da proteína não mais é funcional; a mutação secundária do supressor muda o anticodão dum +ARN, de forma que ele reconhece o codão mutante, em vez de (ou assim como) o seu codão original. O aminoácido que é agora inserido restaura a função da proteína. Os supressores são designados como errados ou falhos, dependendo da natureza da mutação original. A mutação Sup F. pertence à primeira categoria.

Numa célula do tipo selvagem, reconhece-se uma mutação errada somente por um factor de libertação que termina a síntese da



28

proteína. A mutação do supressor produz um +ARN de amioacilo que pode reconhecer o codão de terminação; mediante a inserção dum aminoácido, permite-se prosseguir a síntese da proteína para lá da zona da mutação errada, para sintetizar uma proteína dum comprimento total.

O efeito dos compostos candidatos (agentes inibidores ou análogos não inibidores) sobre a infecção de células NIH-3T3 e HL60 foi ensaiado, tanto através da contagem das colónias resistentes ao G418 (seguindo o processo descrito no Exemplo 1) e através da análise da hibridização de Southern do ADN de elevado peso molecular.

ANÁLISE DO EFEITO DOS AGENTES INIBIDORES DO EFEITO DA ENZIMA POLI (ADP-RIBOSE) POLIMERASE NA INFECÇÃO POR RETROVÍRUS.

24 horas antes da infecção trataram-se as células com 0,8% de sulfóxido de dimetilo (DMSO) e 6mg de polibreno ml^{-1} . Na ocasião da infecção, este meio foi removido e substituído por um meio fresco contendo a mesma quantidade de sulfóxido de dimetilo (DMSO) e de polibreno mais 2×10^5 de c.f.u. (unidades formadoras de colónias) do vector, tanto na presença (+) como na ausência (-) de 2mM de 3-metoxibenzamida. Trinta placas sub-confluentes de células de NIH/3T3 (15 placas com o agente inibidor e 15 placas



29

sem agente inibidor) foram infectadas de forma descrita. Após a infecção, mantiveram-se as células na presença ou ausência contínua (+ ou -) do agente inibidor da enzima durante o número de horas indicado (veja-se a Figura 4) antes da recolha. O total ADN genómico foi isolado das 3 placas (aproximadamente 3×10^6 células) para cada condição (isto é, com ou sem o agente inibidor) e digeridas com a enzima de restrição SstI, que conta as duas sequências de repetição do terminal longo (LTR), libertando um fragmento de 4,9 Kb MPSV do ADN do provírus contendo o gene da fosfotransferase de neomicina («neo»). Aplicaram-se 10mg de ADN a cada extensão sobre um gel de agarose a 0,8%. Depois da electroforese, os géis foram manchados em filtros «Gene Screen» e hibridizados para se obter um fragmento de a^{-32p} oligorotulado de 1,6 kb de XbaI/Hind III do plasmido pM5neo contendo o gene neo mais 400 bp das sequências de vírus MPSV. «Gene Screen» (marca registada) é um filtro de membrana à base de nylon disponível no comércio e produzido pela firma Du Pont de Nemours (Alemanha) GmbH, Divisão NEN. D-6072 Dreieich, R. F. A.

Esta amostra hibridiza-se tanto para originar o fragmento de provírus de 4,9 kb de SstI MPSV, como um certo número de outras sequências de provírus endógeno, existentes no genoma do rato, dos quais o mais importante (3,7 kb) serve de controlo interno



30

para o processo de hibridização de Southern (Figura 4A). A presença da fita de 3,7 kb em todas as amostras (tanto na presença, como na ausência do agente inibidor confirma que as variações na intensidade da fita de 4,9 kb, que se hibridiza para originar um fragmento de provirus de 1,6 Kb de Xba I/Hind III não é um artefacto de possíveis variações da quantidade de ADN carregado em cada troço do gel, ou variações na eficácia da transferência do ADN desde o gel para o filtro de "Gene Screen". Numa hibridização de controlo, o filtro utilizado na figura 4A foi limpo da amostra de provírus, deixando no filtro o ADN genómico (Sambrook, J. et al, (1989), «Molecular Cloning», Cold Spring Harbour Laboratory Press, pág. 14). O filtro liga somente o ADN de fita única (a natureza exacta da ligação não é conhecida, mas pensa-se que envolve tanto ligações covalentes, como ligações electrostáticas. Durante o processo de hibridização, a amostra liga-se por meio duma ligação de hidrogénio, à sua sequência homóloga (se existir) e, devido à sua rotulação radioactiva, pode ser detectada por autoradiografia. O processo de limpeza quebra a ligação de hidrogénio entre a amostra e as sequências do ADN genómico ligadas ao filtro e, assim, a amostra pode ser retirada pela lavagem, deixando somente o AN genómico ligado ao filtro. O filtro pode então ser reamostrado com um outro fragmento de ADN rotulado de forma radioactiva. O filtro foi reamostrado com plasmido pAL41 rotulado 32p (Alonso et al. (1986), J. Mol. Evol.



31

23 páginas 11-12) que contém um fragmento de 1,2 kb de cADN de a-actina de rato. A presença de fitas com intensidade semelhante em todos os troços serve como um controlo adicional para o carregamento e transferência do ADN no processo de hibridização de Southern. A hibridização da fita de 2,3 kb SstI para a amostra de actina encontra-se ilustrada na Figura 4B.

Quando, num ensaio semelhante, o filtro foi amostrado com um fragmento de 762 bp de Pvu 11 do plasmido pSU2 neo (veja-se Southern P- J- e Berg P- J- (1982), «J. Mol. Appl. Genet.», 1, páginas 327-332) contendo parte do novo gene «neo» (que é transportado pelo vetor MPSV sup. 28), mas não se detectaram nenhuma sequência de vector de provírus, somente se assinalou a fita de 4,9 kb MPSV.

Estes resultados confirmam a presença de sequências do ADN dos vírus somente na ausência do agente inibidor (-), e que a adição do agente inibidor (+) impediu a presença de sequências do ADN do MPSV sup. 28 no genoma das células. A constituição do plasmido pM5 neo, do qual se preparou a amostra Xba1/Hind III, encontra-se ilustrada na figura 3 dos desenhos.

Foi evidente nos resultados que o agente inibidor 3-metoxibenzamida na concentração de 2mM inibiu o aparecimento do completo ADN de



32

provírus no ADN genómico, sendo esta inibição mais evidente depois de 24 horas e 48 horas após a infecção.

Uma análise semelhante de manchas em pontos, do ADN de elevado peso molecular, obtido 72 horas após a infecção, revelou claramente que o agente 3-metoxibenzamida em 1,5mM impedia o aparecimento do ADN dos provírus nas células HL-60 (Figura 4C). Neste caso, as células foram previamente tratadas com 0,4% de sulfóxido de dimetilo (DMSO) e 6mg de polibreno durante 24 horas. Na ocasião da infecção removeu-se este meio e adicionaram-se um meio fresco contendo a mesma concentração de DMSO e polibreno mais 5×10^5 de unidades c. f. u do vector, a 10^7 células, quer na presença (+) ou na ausência (-) do agente inibidor (5×10^6 para cada condição). 24 horas após a infecção removeu-se o meio e colocaram-se as células em meio fresco não contendo nenhum DMSO ou polibreno. Incubaram-se células neste meio durante mais 48 horas antes de serem recolhidas (cerca de 2×10^7 células com o agente inibidor e 2×10^7 células sem o agente inibidor).

Exemplo 5

ENSAIO IN VITRO DE 3-METROXIBENZAMIDA SOBRE A TOXICIDADE CELULAR
E ACTIVIDADE ANTI-HIV

A) ENSAIO SOBRE TOXICIDADE CELULAR

A toxicidade numa linha contínua de células T humanas e nas células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foi ensaiada através da adição de iguais volumes de 3-metoxibenzamida (dissolvida em 20mM em RPMNI1640) em duas vezes a concentração para as células em $10^6/\text{ml}$, para se obterem concentrações finais de 3000, 300, 30, 3 e 0,3 μM em 2ml. Realizaram-se contagens viáveis de células usando-se a técnica de exclusão de tripiano azul no 1.º e 5.º dias. Todas as concentrações foram ajustadas para o dobro e incluíram-se controlos sem o agente inibidor 3-metoxibenzamida. Efectuaram-se cálculos suplementares sobre a citotoxicidade da composição o fim do ataque dos antivírus durante quatorze dias, examinando-se visualmente o estado das células.

Calculou-se a percentagem das células viáveis para cada concentração de 3-metoxibenzamida e consideravam-se tóxicas determinadas concentrações, se a percentagem das células viáveis descia abaixo de 50% da do controlo isento de composição. Nas culturas durante cinco dias a 3-metoxibenzamida não era tóxica na concentração de 3000 μM , tanto para uma linha contínua de células T humanas, como para as PBMC. No ataque pelos antivírus no 14.º dia, as células eram ainda em mais de 50% viáveis com

composto B em todas as concentrações. Não se efectuaram contagens exactas.

B) ENSAIO ANTI-HIV

Neste processo experimental incubaram-se 180 μ l de células não infectadas, com 3-metoxibenzamida nas concentrações de 3000, 600, 120, 24, 4, 8, 0,96 e 0,19 μ M durante 1 hora, na temperatura de 37°C numa placa de microtítulo. Adicionaram-se, então, 20 μ l de HIV-1 sobrenadante, diluído nos mesmo meios de cultura de tecido. O meio foi aspirado e substituído por um novo meio (contendo 3-metoxibenzamida) no 1.º e 3.º dias, a fim de retirar o inóculo do vírus. No 14.º dia realizou-se um ataque com o antígeno P25, utilizando camadas sobrenadantes de todos os recipientes, diluídas 1 em 10, e comparando o aumento do nível de P24 com o do controlo positivo, isento de composição. Estabeleceu-se um controlo AZT nas concentrações de 2,4, 4,8, 0,96, 0,19, 0,38, 0,007 e 0,001 μ M. Todos os ensaios e controlos foram realizados em duplicado.

Os resultados do ataque de antígeno P24 estão ilustrados na Figura 5. A Figura 5(a) mostra o nível de antígeno P24 na camada sobrenadante no 14.º dia, utilizando HIV-1 adaptado às células T e uma linha contínua de células T humanas.



35

A Figura 5(b) mostra o nível de antígeno P24 na camada sobrenadante, usando-se um HIV-1 adaptado aos monócitos e PMBC humanos normais estimulados com PHA.

Ensaaiaram-se duas estirpes de HIV. O vírus T é uma estirpe adaptada às células T e foi ensaiado numa linha contínua de células T humanas. O vírus M é uma estirpe adaptada aos monócitos e foi ensaiado nos PBMC.

Com o vírus T e a linha de células humanas, o agente inibidor 3-metoxibenzamida revelou uma actividade especial. Com vírus M e os PBMC, o agente 3-metoxibenzamida inibiu parcialmente a produção de vírus em todas as concentrações ensaiadas. O AZT inibiu o vírus com uma resposta em boa dose em todas as concentrações. Os índices terapêuticos (TI) foram calculados nos diferentes sistemas e estão representados nas Tabelas 4 e 5. Pode-se ver que a 3-metoxibenzamida possui um TI elevado (> 15 800) e, como não se atingiu o limite tóxico da 3-metoxibenzamida, não se pode predizer qual é o TI final.

Os resultados encontram-se ilustrados nas Tabelas a seguir.



36

TABELA 4

Índices terapêuticos na linha de células T com o vírus T

Composto (μ M)	Concentração máxima não tóxica	Concentração mínima anti-vírus	Índice terapêutico
AZT	1000,0	0,007	142 900
3-metoxibenzamida	3000,0	0,19	>15 800

TABELA 5

Índices terapêuticos nas PBMC com o vírus M

Composto Composto (μ M)	Concentração máxima não tóxica	Concentração mínima anti-vírus	Índice terapêutico
AZT	1000,0	0,007	142 900
3-metoxibenzamida	3000,0	0,19	>15 800*

* somente uma inibição parcial.



37

Nos resultados apresentados acima pode-se verificar que a 3-metoxibenzamida possui uma actividade anti-HIV.

Exemplo 6

ENSAIO IN-VITRO SOBRE A 4-HIDROXI-QUINAZOLINA E A CLOROTENOXAZINA QUANTO À TOXICIDADE CELULAR E À ACTIVIDADE ANTI-HIV-1.

Os compostos ensaiados foram codificados com A e B:

A: 4-hidroxi-quinazolina

B: clorotenoxazina

A) ENSAIO SOBRE A TOXICIDADE NAS CÉLULAS:

Adicionaram-se 200 μ l de cada composto (dissolvido em DMSO (sulfóxido de dimetilo) em 150 μ M) a 1,8 ml de RPMI 1640 com L-glutamina, hepes e 10% de FCS contendo 10^6 células mononucleares do sangue periférico estimuladas com fotohemoglutinina (PHA), ou seja as PBMC, numa placa de cultura com tecido de 24 grupos, fizeram-se então diluições em série, decuplicadas, nas células contendo RPMI, para um total de cinco concentrações diferentes, dando 1,8 ml de células e composto em cada grupo em duplicado. Realizou-se um ensaio semelhante numa linha contínua de células T humanas. As concentrações ensaiadas foram de 150, 15, 1,5, 0,15 e 0,015 μ M.

Wifama

38

Realizaram-se contagens viáveis usando-se a exclusão de tripano azul nos 1.º, 6.º e 10.º dias.

Os compostos A e B não eram tóxicos numa concentração de 150 µM para os PBMC e uma linha contínua de células T humanas. O controlo AZT não era tóxico para ambos os tipos de células, numa concentração de 150 µM.

B) ENSAIO ANTIVÍRUS

Prepararam-se as PBMC e uma linha contínua de monócito para $2,0 \times 10^6$ células/ml. Devido a problemas técnicos, não se utilizou a mesma linha contínua de células que fora empregue nos ensaios sobre toxicidade. A linha de monócitos e as PBMC não foram afectadas, ao passo que todas as linhas de células T foram gravemente danificadas. No entanto, tem sido revelado na literatura técnica publicada que, se um composto não for tóxico para as células T, então ele não será tóxico para as células dos monócitos. Assim, os dados sobre a toxicidade efectuados em células T eram compatíveis com os ensaios anti-HIV realizados em monócitos e nas PBMC e justificava-se, pois, a comparação dos mesmos para os objectivos deste Exemplo. Adicionaram-se 100 µl de cada composto a 900 µl da citada suspensão de células e depois



diluíram-se dez vezes em células contendo meios para se obter um total de cinco concentrações diferentes da composição farmacêutica, tal como no caso do ensaio sobre toxicidade.

Após a incubação durante trinta minutos na temperatura de 37°C, adicionou-se HIV-1 para uma concentração final de cerca de 1 em 10. Utilizou-se uma estirpe de laboratório adaptada aos monócitos, com a linha de monócitos, e usou-se o AZT resistente, clinicamente isolado, com as células PBMC. O vírus isento de células foi retirado por lavagem depois duma outra incubação durante 5 horas na temperatura de 37°C e as células foram novamente suspensas em 2,5 ml de meio isentos de composição e incubadas durante 7 dias na temperatura de 37°C.

No 7.º dia retirou-se 200 µl da camada sobrenadante e ensaiou-se quanto ao antígeno p24 utilizando o sistema de ensaio ELISA de Coulter.

Os resultados foram registados como antígeno p24 sobrenadante (pg/ml) em relação à concentração da composição no 7.º dia e estão indicados nas Figuras 6 e 7. As Figuras 6(a), (b) e (c) mostram os resultados obtidos sobre os compostos A, B e AZT, respectivamente.

A Figura 6 mostra os resultados obtidos no sistema que utiliza as células PBMC e o HIV isolado, resistente ao AZT. O AZT não suprimiu o vírus nas concentrações normais do agente inibidor (nomeadamente, na concentração de $0,015\mu\text{M}$), ainda que se verifique uma clara resposta à dose (Figura 6d) e o vírus seja inibido totalmente na concentração de $1,5\mu\text{M}$. Este isolado tem uma substituição de aminoácido na posição 70, o que tem sido demonstrado como sendo uma das mutações responsáveis pela resistência do AZT (Larder, B. A. e Kemp. S. (1989), «Science **246**, páginas 1155-1158). O composto A não é activo nas concentrações ensaiadas. O composto B é possivelmente activo na concentração de $0,15\mu\text{M}$, mas não há uma resposta de dose suave. Note-se, contudo, que em comparação com os ensaios anteriores, o desafio ao vírus tem aumentado em cerca de dez vezes.

A Figura 7 mostra os resultados obtidos com a utilização da linha de monócitos e da estirpe de HIV obtida em laboratório. As Figuras 7 (a), (b) e (c) mostram os resultados conseguidos em relação aos compostos A, B e AZT, respectivamente. Os compostos A parecem novamente ser inactivos como agentes antivírus nas concentrações ensaiadas. Nos ensaios anteriores, a linha de monócitos e as linhas de células T têm sido perfis de toxicidade semelhantes em relação a uma variedade de compostos e por isso se justifica a

comparação entre eles para os objectivos do mencionado ensaio. O composto B é activo e tem uma clara resposta de dose embora os seus fundamentos tornem difícil a determinação da concentração mínima com acção antivírus. A composição do controlo, o AZT, tem uma importante actividade antivírus na concentração de 0,15 μ M, com uma clara resposta de dose.

É possível que a linha de células (linhagem monócito/macrofase) utilizada tenha reduzido os níveis de quinase de timidina, necessários para a fosforilação do AZT na sua forma activa, o que explicaria a razão porque a concentração inibidora do vírus é dez vezes superior do que seria de esperar normalmente com um vírus sensível numa linha e células T ou células PBMC. Esta concentração relativamente elevada, exigida para a inibição é consistente com as constatações dum outro grupo que utilizou o mesmo tipo de células (Boulerice, F. e Wainberg, M. A. (1990), *Journal of Leucocyte Biology*, **47**, páginas 498-505).

Dentro das limitações do sistema de ensaio, parece que o composto B tem uma potencial actividade anti-HIV. O limite tóxico do composto A ainda não foi atingido, portanto não se pode dizer categoricamente que ele é inactivo.



42

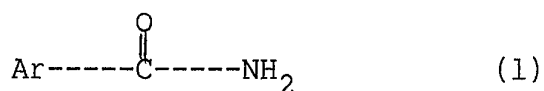
As reivindicações seguintes definem alguns aspectos importantes da invenção, mas não pretendem incluir todo o aspecto concebível para o qual seria pedida uma protecção numa subsquente continuação do pedido de patente e pedidos de patentes estrangeiras, e a invenção não deve ser concretizada em afastamento dos conceitos inventivos gerais descritos no texto acima.

W. J. A. M.

REIVINDICAÇÕES:

1^a - Processo para a preparação de composições farmacêuticas contendo um agente inibidor da poli-(ADP-ribose)-polimerase [p(ADP-r)p], para tratamento de infecções provocadas por vírus cujo ADN ou o ADN dos provírus se integra no cromossoma ou nos cromossomas, nomeadamente retrovírus, leutivírus e vírus da imunodeficiência humana, caracterizado pelo facto de se misturar o referido agente inibidor da poli-(ADP-ribose)-polimerase com os ingredientes veiculares e/ou auxiliares farmacêuticamente aceitáveis, de preferência, numa proporção compreendida entre cerca de 0,1 a 99,9 partes em peso de ingrediente(s) activo(s) para 99,9 a 0,1 partes em peso de ingredientes auxiliares.

2^a - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de, como ingrediente activo inibidor da poli-(ADP-ribose)-polimerase se empregar uma amida aromática de fórmula geral (1):



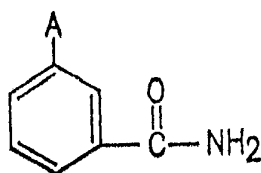
na qual Ar representa um grupo aromático monocíclico, sendo o grupo de amida ligado a um átomo de carbono do anel do grupo aromático e Ar é substituído apenas pelo grupo amida representado ou é substituído num átomo de carbono do anel por um ou mais dos seguintes substituintes:

OR¹, em que R¹ representa um átomo de hidrogénio, um grupo alquilo com 1 a 4 átomos de carbono não substituídos ou substituídos por halogénio, hidróxi ou amino, ou

um grupo acilo tendo um comprimento total de cadeia de até quatro átomos;
um átomo de halogéneo;
um grupo carboxi;
um grupo carboximetilo;
um grupo alcoxycarbonilo, em que o grupo alcoxi tem 1 a 4 átomos de carbono;
um grupo nitro;
um grupo ureído ($-\text{NHCONH}_2$);
um grupo alquilo com 1 a 4 átomos de carbono como se definiu acima para R^1 ;
um grupo amino de fórmula NR^2R^3 , em que R^2 e R^3 representam um átomo de hidrogénio, um grupo alquilo com 1 a 4 átomos de carbono ou um grupo alquilcarbonilo com um total de 1 a 4 átomos de carbono;
um grupo acilo de fórmula $-\text{CO}-\text{R}^4$, em que R^4 é um grupo organico de preferencia um grupo alquilo com 1 a 4 átomos de carbono; ou um grupo tio.

3^a - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de, na fórmula (1) Ar representar um grupo aromático benzenóide.

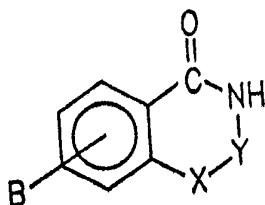
4^a - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de se empregar uma composição inibidora de fórmula geral (5)



na qual A representa um átomo de hidrogénio ou um substituinte como se definiu na reivindicação 2.

5^a - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de, na citada fórmula (5), A representar NH_2 (3-aminobenzamida), CH_3O (3-metoxibenzamida) ou HCONH_2 (3-formilaminobenzamida).

6^a - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de, como agente inibidor de p(ADP-r)p, se empregar uma amida aromática de fórmula geral (6)

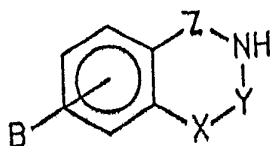


na qual

X e Y são átomos do anel que completam um anel saturado e B representa um átomo de hidrogénio ou um grupo amino.

7^a - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de, na fórmula (6), X significar $-\text{CO}-$ e Y significar $-\text{NH}-$, ou
X representar $-\text{NH}$ e
Y representar $-\text{CO}-$.

8^a - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de, como agente inibidor de poli-(ADP-ribose)-polimerase, se empregar uma amida aromática de fórmula geral (7)



na qual Z significa C = O ou C - OH em conjunto a insaturação do anel e X e Y são átomos do anel ou grupos que contém átomos de anel e completam um anel saturado ou insaturado, e B representa um átomo de hidrogénio ou um grupo amino.

9^a - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se empregar 3-formilaminobenzamida como agente inibidor da poli-(ADP-ribose)-polimerase.

10^a - Processo para o tratamento de infecções provocadas em seres humanos por virus ou provirus cujo ADN se integra no cromossoma ou cromossomas durante o seu ciclo de replicação, nomeadamente retrovirus, lentivirus e virus da imunodeficiência humana, caracterizado pelo facto de se administrar aos pacientes que precisam esse tratamento uma dose diária de uma composição farmaceutica de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, de uma só vez ou distribuida por várias administrações se necessário, de tal maneira que se mantenha no organismo um nivel do agente inibidor de poli-(ADP-ribose)-polimerase de preferencia compreendido entre cerca de 1 e 3 mM por kg de peso corporal.

Lisboa, 23 de Maio de 1991

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

Al de li / am

Wifan

500bp



Mary Katharine Levinge Collins, Farzin Farzaneh,
Cynthia A. Chell - *Mammotrophic Tarsus*

Desenhos 7-Nº2

Handwritten signature

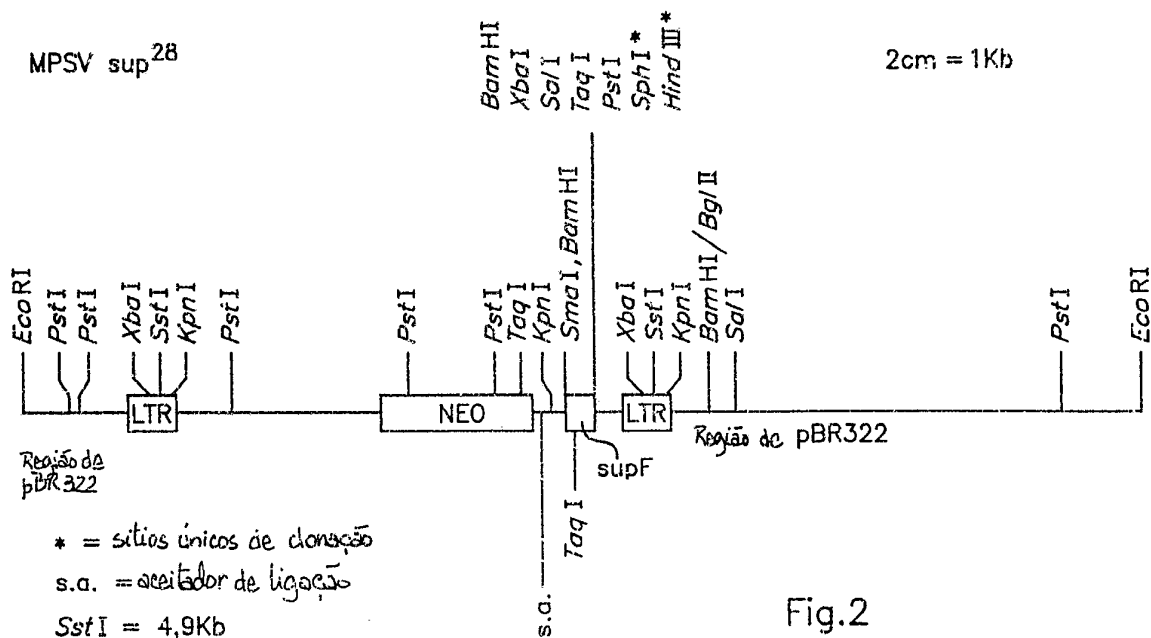


Fig.2

Mary Katharine Levinge Collins, Farzin farzaneh,
Chahine Chahine, Mansourah Chahine

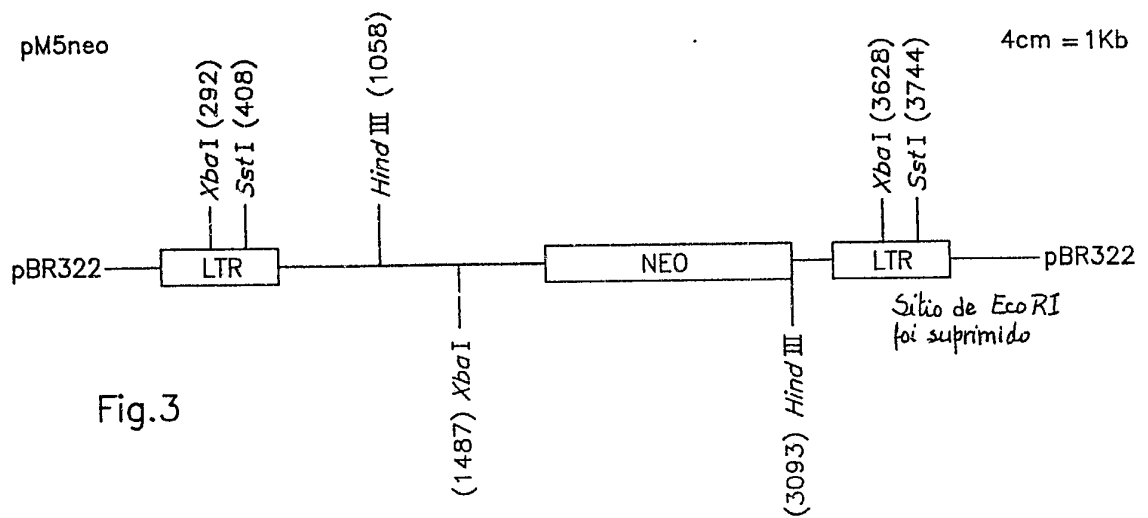


Fig.3

W. J. L.



Mary Katharine Levinge Collins, Farzin Farzaneh,

DESENHOS 7-nº5

Wifann

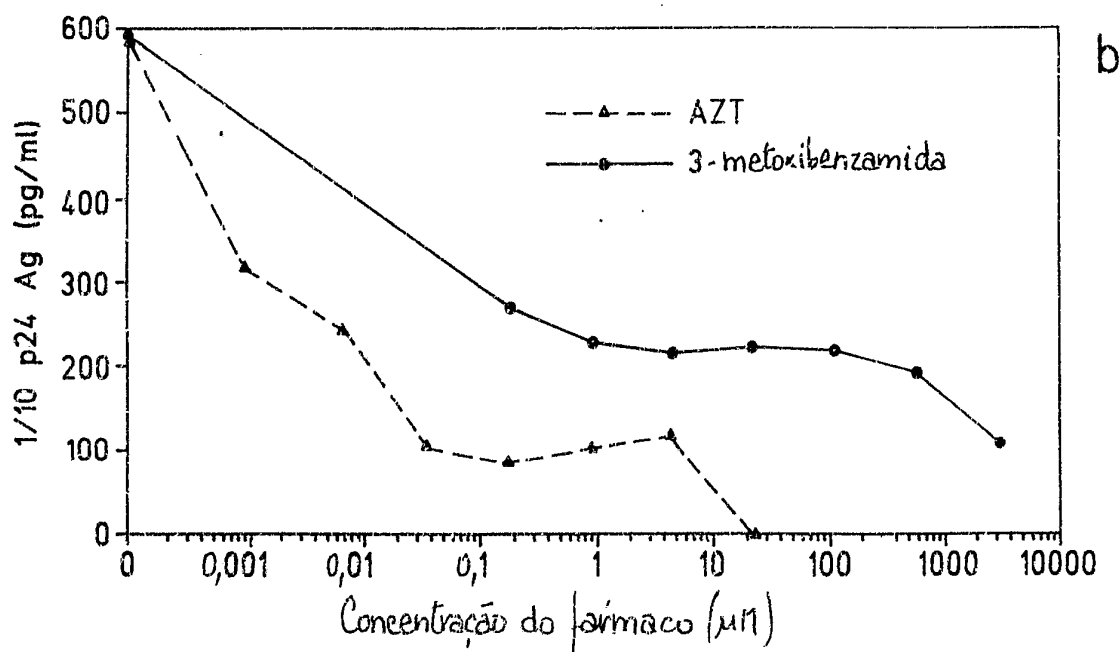
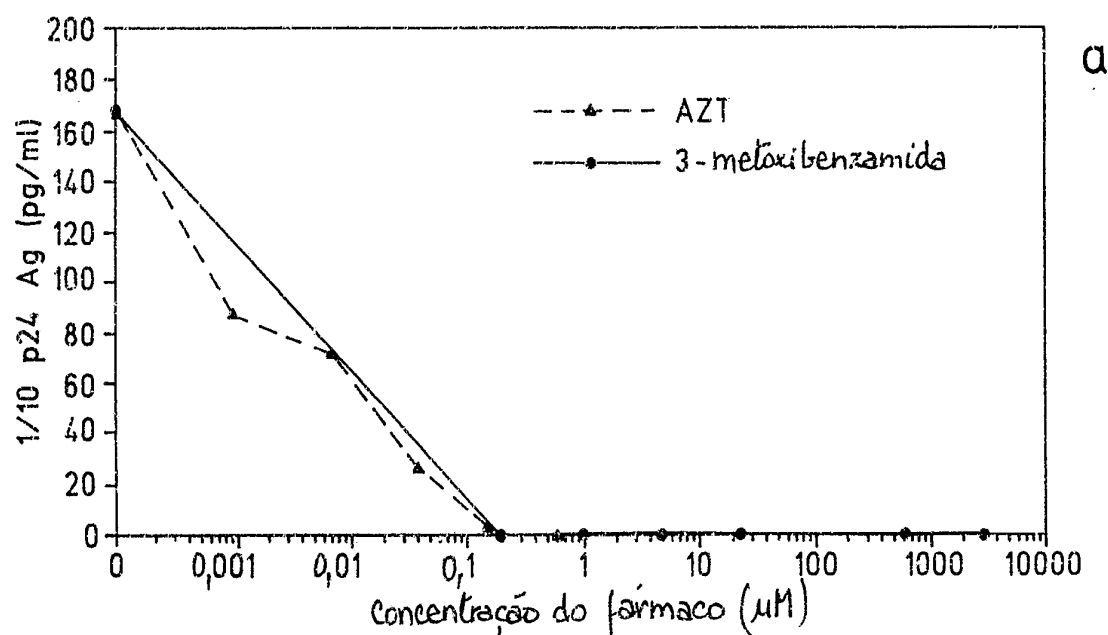


Fig.5

Mary Katherine Levinae Collins, farzin farzaneh,

Desenhos 7-4º6

Handwritten signature

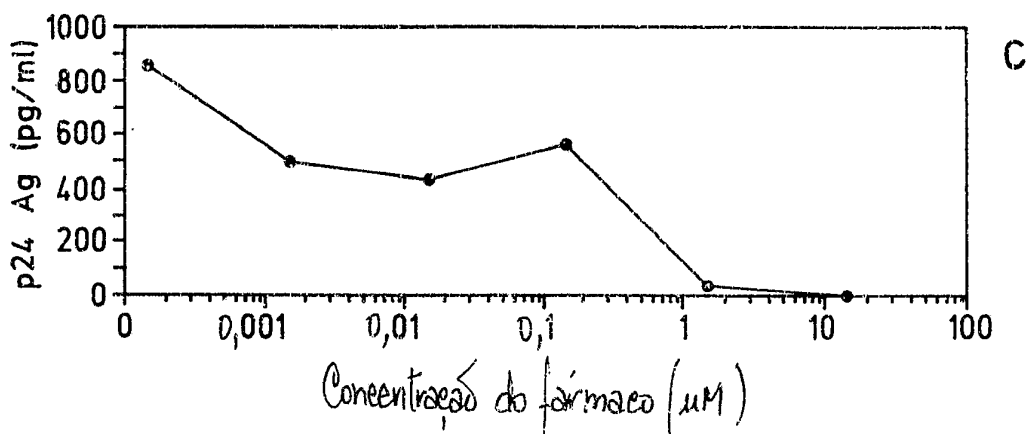
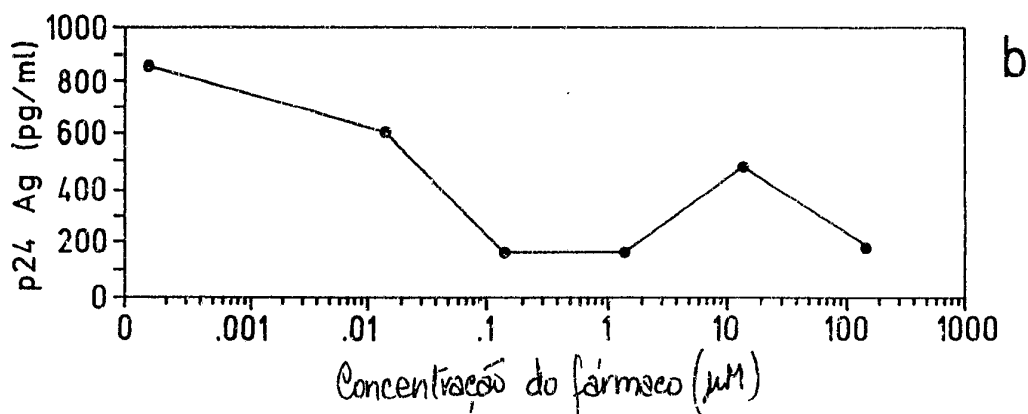
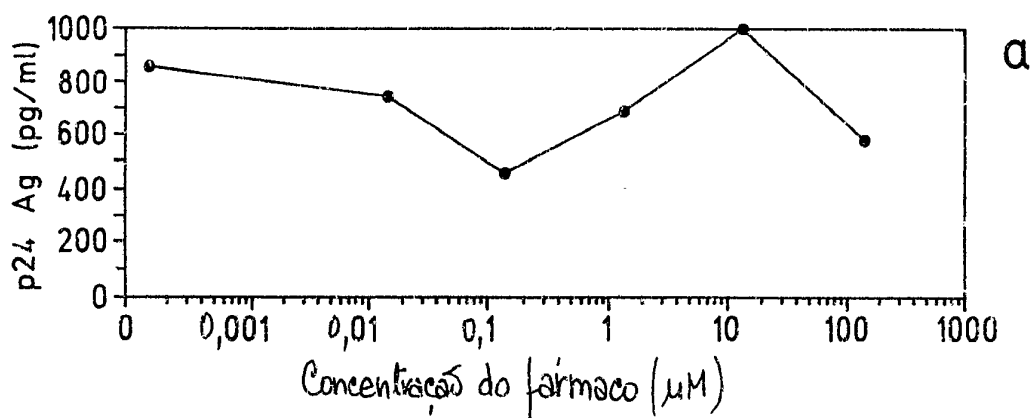
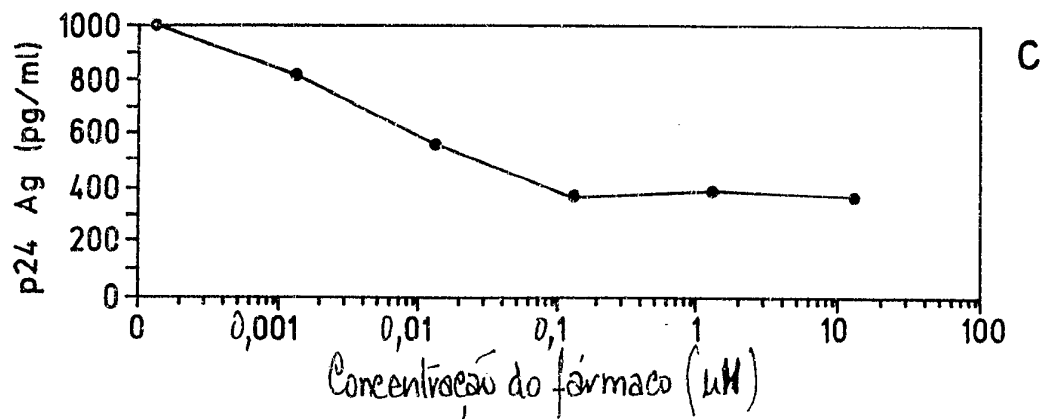
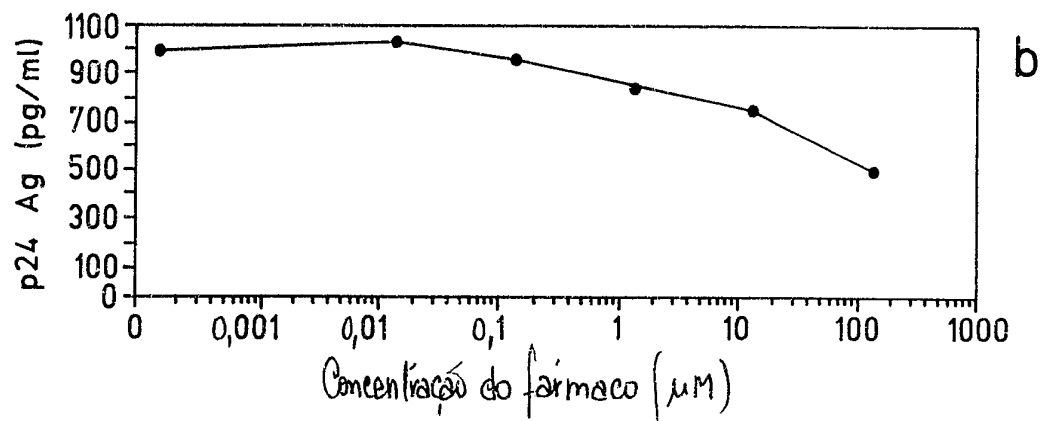
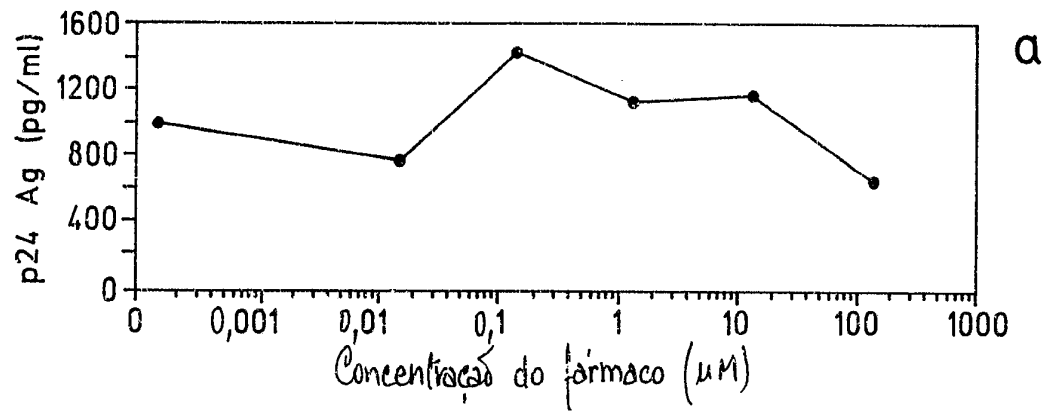


Fig.6

Mary Katherine Levine Collins, Farzin Farzaneh,

DESENHOS 7-107

Wifama



Mary Katharine Levinge Collins Farzin Farzaneh, Fig.7