

**MEMÓRIA DESCRITIVA**

**DA**

**PATENTE DE INVENÇÃO**

**Nº 95.247**

**NOME:** G.D. SEARLE & CO., norte-americana, industrial  
com sede em Skokie, Illinois 60076, E.U.A.

**EPÍGRAFE:** PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO  
FARMACEUTICA CONTENDO 3'-AZIDO-3'-DESOXITIMIDI-  
NA E N-BUTIL-DESOXINOJIRIMICINA E MÉTODO PARA  
INIBIR HIV UTILIZANDO-A"

**INVENTORES:** MARTIN STANLEY HIRSCH e VICTORIA ANNE JOHNSON

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

2 de Junho de 1989 sob o No. 360.439 nos Estados Unidos  
da América do Norte

94.247

G. D. SEARLE & CO.,  
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA  
CONTENDO 3'-AZIDO-3'-DESOXITIMIDINA E N-BUTIL-DESOXINOJIRIMICINA  
E MÉTODO PARA INIBIR HIV UTILIZANDO-A"

=====

#### MEMÓRIA DESCRITIVA

##### Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de uma composição farmacêutica e um método de inibição do vírus da imunodeficiência humana (HIV), o qual compreende a administração a um doente infectado por HIV de uma composição sinérgica de 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT) e N-butil-desoxinojirimicina (N-butil-DNJ) numa quantidade que atinja eficácia antiviral.

O processo para a preparação da referida composição consiste em se incluir nela os referidos componentes, de modo a obter-se um composição cuja proporção molar de AZT para N-butil-DNJ varia, de preferência entre cerca de 1:50 e cerca de 1:100.

- 2 -

## FUNDAMENTOS DO INVENTO

Este invento relaciona-se com uma composição farmacéutica e com um método de inibição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e, mais particularmente, com uma composição sinérgica do derivado N-butílico de 1,5-didesoxi-1,5-imino-D-glucitol (desoxinojirimicina) e 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT) numa quantidade que atinja eficácia antiviral, sendo de potencial utilização no tratamento do síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) e o complexo afim da SIDA (ARC).

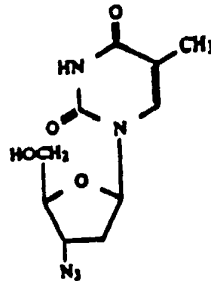
O síndrome de deficiência imunitária adquirida, que há apenas alguns anos era uma curiosidade médica, constitui actualmente uma doença grave. Consequentemente, tem sido feito um grande esforço para desenvolver drogas e vacinas para combater a SIDA. O vírus da SIDA, identificado pela primeira vez em 1983, tem sido descrito com vários nomes e tem a capacidade de réplica no interior das células do sistema imunitário levando desse modo a uma profunda destruição das células-T  $T4^+$  (ou células  $CD4^+$ ). Ver, por exemplo, Gallo et al., Science 224, 500-03 (1984), e Popovic et al., Ibid., 497-500 (1984). Este vírus, que se estabeleceu ser um retrovírus, tinha sido conhecido como vírus associado a linfadenopatia (LAV) ou vírus relacionado com SIDA (ARV). Foram descritos dois vírus distintos da SIDA, HIV-1 e HIV-2. HIV-1 é o vírus originalmente identificado em 1983 por Montagnier e colaboradores no Instituto Pasteur em Paris [Ann. Virol. Inst. Pasteur 135 E, 119-134)], enquanto que o HIV-2- foi isolado mais recentemente por Montagnier e seus colaboradores em 1986 [Nature 326, 662 (1987)]. Tal como é aqui usado, HIV pretende referir-se a estes vírus num sentido genérico.

Embora a biologia molecular da SIDA comece a ser decifrada e definida, muito mais fica ainda para ser aprendido e compreendido acerca desta doença. Entretanto, estão sendo investigadas várias abordagens do problema na procura de potenciais drogas e vacinas contra a SIDA. O desenvolvimento de uma vacina para SIDA é dificultada pela falta de compreensão dos mecanismos de imunidade protectora contra o HIV, pela importância da variação genética do vírus, e pela falta de modelos animais eficazes para a infecção pelo HIV. Ver, por exemplo, Koff and Hoth, Science 241, 426-432 (1988).

Uma abordagem para planejar drogas ou vacinas para o tratamento de seres humanos infectados com HIV depende do conhecimento que os biólogos moleculares tenham adquirido sobre o ciclo de vida replicativo do vírus quando penetra e infecta uma célula hospedeira, sofre replicação, e progride infectando outras células. No ciclo de replicação do HIV existem certos passos específicos dos vírus que constituem potenciais alvos da terapêutica anti-viral. Hirsch et al., Antimicrob. Agents Chemother. 31, 839-43 (1987).

A primeira droga a ser aprovada pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da SIDA foi zidovudine, melhor conhecido pelo seu nome anterior azidothymidina (AZT). Quimicamente, esta droga é 3'-azido-2'-desoxitimidina, e tem a estrutura que se segue:

*[Handwritten signature]*



AZT é convertida pela quinase celular numa forma trifosfato que é um forte inibidor competitivo da transcriptase reversa do HIV, interferindo desse modo com um estadio precoce na replicação do HIV.

Esta droga foi originalmente seleccionada como uma potencial arma contra a SIDA por ter revelado capacidade para inibir a replicação do vírus in vitro. Esses testes constituem virtualmente o único método prático para avaliação e teste iniciais das drogas potencialmente anti-SIDA.

Embora a AZT seja actualmente usada na clinica, uma grave desvantagem da AZT consiste nos seus efeitos secundários tóxicos. Na verdade, a bula requerida pelo FDA para o Retrovir-<sup>(R)</sup>, a composição farmacêutica comercializada contendo AZT como o ingrediente activo, faz advertências em relação à toxicidade hematológica, incluindo granulocitopenia e anemia grave requerendo transfusões. Assim, continua a procura de melhores drogas anti-SIDA.

Mais recentemente, foram testados certos inibidores da glucosidase quanto à sua actividade contra o vírus da SIDA. Porque as glicoproteínas que envolvem o HIV são intensamente

glicosiladas, os compostos que interferem com o processamento co- e pós-translacional da glicoproteína gp120 e da glicoproteína da membrana gp41 podem evitar a entrada do vírus para o interior de uma célula. Karpas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9229-9233 (1988). Estes compostos interferem, ou interrompem um estágio do processo replicativo do HIV diferente do estágio atingido por AZT.

Três desses compostos sugeridos como potenciais drogas anti-SIDA são castanospermine, 1-desoxinojirimicina (DNJ) e 2,5-dihidroximetil-3,4-dihidroxi-pirrolidina (DMDF). Ver, por exemplo, Sunkara et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 148(1), 206-210 (1987); Gys et al., Lancet, Oct. 31, 1987, pp. 1025-1026; Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8120-8124 (1987); e Gruters et al., Nature 330, 74-77 (1987).

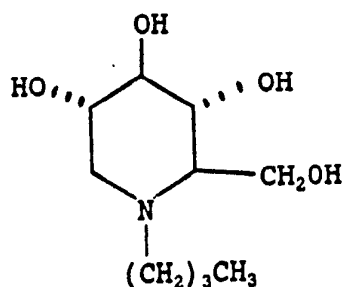
Assim, castanospermine, que é um alcaloide isolado a partir de sementes do castanheiro Australiano, revelou a capacidade de interferir na glicosilação normal dos virions do HIV, alterando desse modo o invólucro de glicoproteínas e evitando a entrada do HIV no interior das células alvo. Contudo, porque o fornecimento de castanospermine é limitado devido à sua fonte natural, ele torna-se extremamente dispendioso, não sendo desse modo um candidato prático para uma droga urgentemente requerida em grande escala. Adicionalmente, a castanospermine revelou citotoxicidade nos níveis de dosagem de 0,70 mg/ml. Karpas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9229-9233 (1988).

Em PCT Inter. Appln. WO 87/03903, publicado em 2 de Julho, 1987, o derivado N-metilico de desoxinojirimicina (DNJ) foi também apresentado como possuindo actividade contra o HIV baseada aparentemente na sua actividade inibidora da glucosidase I. Contudo, foi subsequentemente revelado por Fleet et al., FEBS

Lett 237, 128-132 (1988), que nem todos os inibidores da glucosidase I são inibidores eficazes do HIV. Assim, podem ser responsáveis pela actividade inibidora do HIV alguns outros mecanismos.

Verificou-se que o derivado N-butilico da desoxinojirimicina (N-butil DNJ) apresenta uma melhor actividade inibidora contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) em concentrações não tóxicas em comparação com as apresentadas pelos correspondentes derivados N-metilico e N-etilico.

N-butil DNJ tem a seguinte estrutura química:



A fim de indicar estereoisomerismo linhas contínuas ou tracejadas indicam ligações dirigidas para cima ou para baixo, respectivamente, do plano do papel.

O N-butil DNJ reduz de um modo único a titulação do vírus para cima de cinco logs em concentrações não citotóxicas enquanto que os derivados N-metil- e N-etil-desoxinojirimicina levam apenas a uma redução da ordem dos dois a quatro logs na produção de HIV infeccioso. Assim, o derivado N-butilico

apresenta uma significativa potencial utilização para o tratamento do síndrome de deficiência imunitária adquirida (SIDA), e foram recentemente anunciados ensaios clínicos deste agente na fase I.

Apesar dos progressos anteriormente referidos na terapêutica farmacêutica para indivíduos infectados com HIV, pensa-se que uma terapêutica não tóxica eficaz dirigida contra o HIV pode requerer uma técnica quimioterapêutica que envolva a utilização de terapêuticas combinadas. Uma tal técnica não tem sido amplamente utilizada na terapêutica anti-HIV, mas tem tido êxito no tratamento de uma série de infecções bacterianas e, por fungos, assim como na quimioterapia do cancro. Combinações de terapêuticas anti-HIV que incluem agentes que atacam o ciclo de replicação do HIV em vários sítios oferecem várias vantagens, particularmente se ocorrerem interacções favoráveis das drogas.

Quando dois agentes são combinados, eles podem ter um dos três tipos de actividade contra a replicação do HIV in vitro, tal como é estabelecido pelo Combination Index (CI) discutido aqui a seguir.

1. Efeito aditivo: Diz-se que duas drogas são aditivas quando a actividade das drogas em combinação é igual à soma (ou um soma parcial) das suas actividades independentes quando estudadas separadamente.

2. Sinergismo: O efeito combinado de um par de agentes sinérgicos é superior à soma das suas actividades independentes quando medidas separadamente.

3. Antagonismo: Se duas drogas forem antagonistas, a actividade da combinação é inferior à soma dos seus efeitos independentes quando medidos isoladamente.

Os objectivos da terapêutica de combinação devem incluir a capacidade de atingir sítios diferentes no ciclo de replicação do HIV, e a de afectar a replicação viral numa ampla série de tipos celulares. Também, os agentes não devem apresentar toxicidade aditiva em combinação. Os benefícios da terapêutica em combinação incluem interacções in vitro aditivas ou sinérgicas, as quais podem permitir a utilização de drogas individuais abaixo das suas concentrações tóxicas. Também, a terapêutica de combinação pode evitar a emergência de mutantes de HIV resistentes à droga.

Foram já realizados estudos combinando vários agentes anti-HIV conhecidos. Por exemplo, combinações de ou AZT ou de 2',3'-didesoxicitidina e interferon alfa-A recombinante revelaram a capacidade de inibir sinérgicamente o HIV in vitro. Hartshorn et al., *Antimicrob. Ag. Chemother.* 31, 168-72 (1987); Vogt et al., *J. Infect. Dis.* 158, 378-85 (1988). Outras combinações, tais como AZT mais aciclovir revelaram sinergismo. Mitsuya et al., em S. Broder (ed.) *AIDS, Modern Concepts and Therapeutic Challenges*, Marcel Dekker, Inc., New York. Contudo, outras combinações de drogas testadas tais como AZT e ribavirin (1,β-D-ribofuranosil-11-1,2-triazole-3-carboxamida) revelaram ser antagonistas in vitro. Vogt et al., *Science* 235, 1376-79 (1987).

Descrição Breve do Invento

De acordo com o presente invento, descobrimos actualmente que a combinação de N-butil DNJ e AZT inibe o HIV sinérgicamente sem toxicidade aditiva in vitro. Assim, podem ser usadas doses mais baixas tanto de AZT como de N-butil DNJ, minimizando desse modo os efeitos secundários tóxicos de cada um deles, particularmente os associados ao AZT.

As doses apropriadas para o tratamento de seres humanos sofrendo de SIDA ou de ARC para o componente AZT da combinação do presente invento variam entre cerca de 50 mg/dia a cerca de 1,2 g/dia.

As doses apropriadas para o tratamento de seres humanos sofrendo de Sida ou de ARC para o componente N-butil DNJ da combinação do presente invento variam entre cerca de 1 mg/kg/dia e cerca de 500 mg/kg/dia. Os estudos de toxicidade em animais de laboratório estabeleceram que o N-butil DNJ apresenta uma baixa toxicidade.

As drogas devem ser combinadas em quantidades suficientes para conseguir as vantagens aditivas ou sinérgicas da sua combinação.

Descrição Detalhada do Invento

Embora a especificação conclua com reivindicações indicando particularmente e reivindicando distintamente o assunto

considerado como constituindo o invento, pensa-se que o invento será melhor compreendido a partir da descrição que se segue.

#### Fonte da AZT e do N-butil DNJ

A AZT foi obtida sob uma forma em pó a partir de Dr. F. A. Furman, Burroughs-Wellcome Co., Research Triangle Park, North Carolina. Foi dissolvida em solução salina estéril tamponada com fosfato e foi armazenada numa concentração de 1 mM em porções alíquotas de 0,5 ml/frasco a -20°C antes da utilização.

O N-butil DNJ foi obtido sob a forma em pó a partir de Dr. R. Mueller, G.D. Searle & Co. Foi armazenado sob a forma em pó a 4°C até à sua utilização, sendo preparadas soluções recentes da droga para cada mudança de meio. O N-butil DNJ foi dissolvido em água duplamente destilada filtrada em condições estéreis, sendo em seguida filtrado em condições estéreis antes da preparação das diluições da droga.

#### Ensaios Sobre a Actividade Anti-Viral

Nestes exemplos, avaliámos as actividades antivirais das várias combinações deste invento usando modificações de vários ensaios in vitro usados para estudar agentes anti-virais [Ho et al., Lancet, 1, pp. 602-04 (1985); Hartshorn et al., Antimicrob. Ag. Chemother. 30, 189-91 (1986)].

Para cada um destes ensaios, cultivámos células H9 não infectadas, uma doação do Dr. Robert Gallo, National Cancer

Institute, Bethesda, Maryland, [Popovic et al., Science, 224, pp. 497-500 (1984)] numa concentração inicial de  $0,4 \times 10^6$  células/ml em 5 ml de volume final de meio de cultura R-20 compreendendo meio de RPMI-1640, 20% de soro de vitelo fetal inativado pelo calor (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.), L-glutamina (2mM), e antibióticos (penicilina, 250 U/ml e estreptomicina, 250 µg/ml) num frasco T-25 (Falcon, Becton Dickinson Laboratory, Lincoln Park, New Jersey).

Nas experiências, células H9 não infectadas ( $2 \times 10^6$  células) foram suspensas em 5 ml de meio R-20 em frascos T-25. A multiplicidade da infecção foram 250 doses infecciosas da cultura de tecidos (TCOD<sub>50</sub>) de HIV-1 sem células (HTLV-III<sub>B</sub>) (obtidas a partir de Dr. Robert C. Gallo) por  $1 \times 10^6$  células. Ver Hartshorn et al., Antimicrob. Ag. Chemother. 31, 168-72 /1987). O meio de cultura foi mudado nos dias 4, 7 e 11, com 2 ml de suspensão celular sendo resuspenso em 5 ml de meio de substituição contendo as concentrações originais do(s) agente(s) antiretroviral(ais). Várias concentrações graduadas de N-butil DNJ ou de AZT, quer isoladamente quer em combinação, foram adicionadas às culturas de células simultaneamente com o isolado de HIV-1. O meio de cultura foi mudado nos dias 4, 7 e 11 e de novo N-butil DNJ, AZT, ou ambos, foram adicionados com as mudanças de meio a fim de manter a concentração de cada um dos agentes originalmente presentes.

Nestes ensaios, os produtos flutuantes sem células das culturas foram armazenados em um ou mais dos dias 7, 11 e 14 para determinação da produção de antigénio p24 em relação ao núcleo do HIV-1, da actividade da transcriptase reversa viral (RT) ou da produção de vírus infecciosos a fim de avaliar os efeitos dos agentes isoladamente, ou em combinação, sobre a replicação do HIV in vitro.

Para cada ensaio de replicação dos vírus, células não infectadas foram expostas ao inóculo de HIV-1 sem subsequente lavagem. Simultaneamente, combinações de agentes de taxa fixa com múltiplas diluições, ou agentes simples, foram adicionados a cada frasco. Avaliámos a proliferação celular e a viabilidade pelo método de exclusão pelo corante azul tripan. Em todos os ensaios, as culturas não infectadas e infectadas foram mantidas em paralelo. Os controlos de toxicidade tratados com droga foram mantidos com a mais elevada concentração de cada agente testado (quer isoladamente quer em combinação), para excluir um efeito anti-HIV-1 devido a um efeito anti-proliferativo de qualquer agente testado.

#### Ensaio da Transcriptase Reversa

Medimos a actividade da transcriptase reversa como um indicador dos efeitos das combinações de AZT e de N-butil DNJ de acordo com este invento sobre a replicação viral do HIV [tal como foi descrito por Popovic et al., Science, 224, 497-500 (1984); Gallo et al., Science, 224, 500-03 (1984); ou Ho et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7588-90 (1984); Ho et al., Science, 226, 451-53 (1984)].

Mais especificamente, no ensaio de transcriptase reversa, utilizamos os reagentes indicados a seguir. O ditiotreitól (DTT) foi fornecido por Boehringer Mannheim Bio-Chemicals, Indianapolis, Indiana. O PEG 8000 (poletilene glicol) foi fornecido por Fisher Scientific, Medford, Massachusetts. O tRNA usado foi do tipo X-S, fornecido por Sigma Chemical, St. Louis, Missouri. O 3H-TTP (trifosfato de timidina tritiada) foi fornecido por DuPont, New England Nuclear Research Products, Boston, Massachusetts.

Tampão A

*Tris 1,0 M (pH 7,8)	12,5 ml
*Ácido tetraacético etilenediamina 0,1 M	1,25 ml
*10% Triton X-100	1,25 ml
*Glicerol	250,00 ml
Água	235,10 ml
DTT (cristal)	0,77 g
KCl (cristal)	<u>3,72 g</u>
	500,00 ml

Solução 2

*10% Triton X-100	45,00 ml
Água duplamente destilada	455,00 ml
KCl (cristal)	<u>1,53 g</u>
	500,00 ml

PEG (30%), NaCl 0,4 M

PeG 8000	150,00 g
NaCl	11,70 g
Água	até 500,00 ml

Ácido Tricloroacético (TCA) (10%)

TCA	50,00 g
Pirofosfato de Sódio	4,45 g
Água	até 500,00 ml

-----  
\* Soluções feitas em água destilada.

Ácido Tricloroacético (5%)

TCA	1.000,00 g
Pirofosfato de Sódio	178,00 g
Água	até 20,00 l

Tampão Universal

Tris 0,01 M (pH 8,0) e solução de NaCl 0,015 M

Ditiotreititol 0,2 M

0,309 g DTT  
10,0 ml de tampão universal

Esta solução foi armazenada congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  e descongelada apenas uma vez antes da utilização.

10 mg/ml tRNA

tRNA foi levado a 10 mg/ml em tampão universal e armazenado a  $20^{\circ}\text{C}$ .

10 unidades/ml de padrão dA ou rA

Primeros de padrão oligo dT (# 27-7878 e # 27-7868, Pharmacia/P-L Biochemicals, Piscataway, New Jersey) foram dissolvidos em 2,5 ml de tampão universal para dar origem a 10 unidades/ml de solução. A solução foi armazenada em porções alíquotas de 0,5 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$  e descongelada antes da utilização.

Realizámos precipitação em PEG de partículas de vírus a partir de produtos flutuantes sem células pela adição de 2 ou 3 ml de fluido flutuante de cultura clarificada, tanto como metade da solução de precipitação em PEG, fizemos redemoinhar bem e colocámos a mistura em gelo durante a noite a  $4^{\circ}\text{C}$ . Foi então que centrifugámos a 800 vezes a gravidade ( $\sim 2100$  rpm) durante 45

minutos até se precipitar uma pílula. Subseqüentemente, separámos por aspiração todo o fluido flutuante, deixámos o precipitado repousar, aspirámos então de novo para proporcionar a pílula seca. Tornámos então a fazer suspensão do precipitado num tampão compreendendo 100µl de tampão A e 50µl de solução 2, onde o produto flutuante original usado tinha o volume de 2 ml, com volumes proporcionais de tampão de ressuspensão a serem usados para diferentes volumes de fluido flutuante. Tornámos a suspender a pílula colocando uma pipeta de pasteur no tubo e submetendo-o a redemoinho. Congelámos a amostra a -20°C no caso desta não ser ensaiada imediatamente. Todos os passos de precipitação com PEG foram realizados usando tubos de centrifugação com tampa. Qualquer passo requerendo exposição ao ar foi realizado numa cobertura ao acaso biológico até após a adição de tampão A e solução 2, que inactivaram o vírus.

Ensaíamos amostras usando o seguinte cocktail de transcriptase reversa (RT):

<u>cocktail RT</u>	# amostras cocktail rA X <u>(<math>\mu</math>l/tubo)</u>	# amostras cocktail dA X <u>(<math>\mu</math>l/tubo)</u>
Tris 1 M (pH 7,8)	4	4
DTT 0,2 M	4	4
MgCl <sub>2</sub> 0,2 M	5	5
água duplamente destilada	47	47
Tampão universal	22,5	22,5
3H-TTP	2,5	2,5
Oligo dT, poli rA (ou dA)	5	5

Preparámos o cocktail RT multiplicando o volume de reagentes pelo número de amostras mais 2 para controlos (o cocktail dA foi um controlo negativo interno) mais 2 para perdas ao pipetar. Subsequentemente, adicionámos 90  $\mu$ l de cocktail rA ou dA a tubos eppendorf mantidos num banho de água gelada (1 tubo rA e 1 tubo dA para cada amostra). Adicionámos então 10 $\mu$ l de cada amostra a um tubo rA e a um tubo dA, submetemo-los a redemoinho incubando-os então num banho de água a 37°C durante 1 hora.

Para terminar a actividade da transcriptase reversa, removemos amostras do banho de água e colocámo-las num banho de água gelada. Adicionámos então 10 µl de solução fria de tRNA a cada tubo, seguindo-se 1 ml de solução fria de 10% de TCA. Deixámos os tubos repousar no banho de água gelada durante 20-30 minutos.

Embebemos então filtros de fibra de vidro de 2,4 cm (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts) em 5% de solução de TCA. Colocámos os filtros num tubo de distribuição de amostras (Millipore, Model 1225) ligado a uma fonte de vácuo. Subsequentemente, aplicámos uma amostra ao filtro e lavámos cada tubo de amostra quatro vezes para o tubo de distribuição com a solução de 5% de TCA usando uma seringa de parede dura ("cornwall" regulada para 1 ml. Lavámos então os filtros duas vezes com 5% de TCA enchendo os recipientes do tubo de distribuição rapidamente enquanto sob vácuo. Secámos os filtros desligando o vácuo e enchendo cada recipiente do tubo de distribuição com 70% de etanol, deixando os filtros repousar durante cerca de 15 segundos antes de tornar a aplicar o vácuo.

Subsequentemente, colocámos os filtros sob uma lampada de aquecimento durante 10-20 minutos para secagem. Os filtros secos foram colocados em frascos de cintilação de 18 ml (Beckman Instruments, Wakefield, Massachusetts). Adicionámos então 10-12 ml de fluido de cintilação de Betafluor para contagem (National Diagnostics, Manville, New Jersey) a cada frasco e fechámos os frascos. Também testámos cada amostra usando um padrão não específico poli (dA)-oligo(dT)<sub>12-18</sub>.

Calculámos os resultados do ensaio subtraindo as contagens/minuto de dA das contagens/minuto de rA e multiplicando então o resultado por 7,5 para conversão em contagens/minuto/ml

líquidas da amostra flutuante da cultura original. Amostras tendo valores de  $10^3$  contagens/minuto/ml ou superiores foram consideradas positivas em relação ao HIV-1.

#### ELISA p24

Testámos N-butil DNJ e AZT como inibidores da replicação viral num ELISA p24 (ensaio de imunoabsorção ligada a enzima). A detecção do antígeno HIV p24 foi associada com a progressão da SIDA e foi proposta como um ponto final importante para a avaliação das drogas antiretrovirais candidatas. Spector et al., J. Infect. Dis. 159, 822-28 (1989).

Especificamente, fizemos amostras do fluido flutuante da cultura sem células para antígeno p24 como se segue. Obtivemos um estojo para ensaio [p24 Core Antigen ELISA, Catalogue Nos. NEK-045, NEK-046 e NEK-047, DuPont-NEN Research Products, Billerica, Massachusetts], de acordo com o protocolo incluído no estojo, que contém anticorpos policlonais de coelho para antígeno p24 imobilizado nos recipientes da microplaca a fim de capturar qualquer antígeno p24 lisado a partir de uma amostra do teste. O antígeno p24 capturado foi transformado num complexo com anticorpos policlonais biotinilados para antígeno p24 e investigado cuidadosamente com um conjugado de peroxidase streptavidin-rábano. Incubámos então o complexo com ortofenildiamina-HCl, o que produz cor amarela proporcional à quantidade de antígeno p24 capturado. Medimos então a absorvência de cada recipiente usando um leitor de microplaca e calibrado em relação à absorvência de uma curva padrão de antígeno p24.

Análise Matemática das Interações das Drogas

Avaliámos as interações dos agentes pelo princípio do efeito mediano e pela técnica do isoblograma com software de computador usando um IBM-PC (Armonk, New York) [Chou et al. "Dose-Effect Analysis With Microcomputers: Quantitation of  $ED_{50}$ ,  $LD_{50}$ , Synergism And Antagonism, Low-Dose Risk, Receptor Binding And Enzyme Kinetics. A Computer Software For Apple II Or IBM PC (Elsevier Biosoft, Cambridge, England, 1986)]. Uma análise do efeito de múltiplas drogas [T.C. Chou and P. Talalay, Adv. Enzyme Regul., 22, pp. 27-55 (1984)] foi usada para calcular os efeitos de agentes combinados. Este método envolve o registo de curvas dose-efeito para cada agente e para combinações de taxa fixa com múltiplas diluições dos agentes usando a equação do efeito mediano. Tendo como base este método, determinámos o índice de combinação (CI) para várias combinações de acordo com este invento. Os valores CI foram determinados a partir dos parâmetros  $m$  (slope) e  $D_m$  ( $ED_{50}$ ) de cada agente registados para efeito mediano e suas combinações tendo como base a equação de isoblograma.

Um valor de índice de combinação inferior a 1 indica sinergia, enquanto que um valor igual a 1 indica efeitos aditivos e um valor superior a 1 indica antagonismo tal como foi aqui anteriormente definido. Também analisámos os dados pela técnica de isoblograma, que avalia as interações das drogas por meio de um método geométrico orientado para a dose.

Os dados representativos que se seguem são expressos ou como ng de proteína/ml ou como ng de proteína/número  $\times 10^6$  de células viáveis (a fim de excluir um efeito anti-HIV-1 devido a um efeito anti-proliferativo do agente testado).

*[Handwritten signature]*

N-butyl DNJ/AZT em Células H9 - Dia 7

Ensaio: ELISA antigénio p24 (ng/ml)

	N-butyl DNJ ( $\mu$ M)					
	0	,71	2,85	11,4	45,6	182,45
0	88,6	55,5	204,0	20,6	15,1	2,1
,01	74,5	30,6				
,04	52,0		14,9			
AZI						
( $\mu$ M), 16	16,0			11,2		
,64	3,5				0,6	
2,65	0,2					0,08

CONTROLO NAO INFECTADO = 0

N-butyl DNJ/AZT em Células H9 - Dia 7

Ensaio: ELISA Antígeno p24/Células Viáveis  
(ng/células  $\times 10^5$ )

N-butyl DNJ ( $\mu$ M)

	0	,71	2,85	11,4	45,6	182,45
0	31,3	21,9	82,3	7,0	6,2	0,7
,01	25,4	8,9				
AZT ,04	15,3		4,7			
( $\mu$ M),16	5,7			3,4		
,64	1,1					
2,56	0,05				0,2	
						0,03

CONTROLO NAO INFECTADO = 0

N-butyl DNJ/AZT em Células H9 - Dia 11

Ensaio: ELISA antigénio p24 (ng/ml)

	N-butyl DNJ ( $\mu$ M)					
	0	,71	2,85	11,4	45,6	182,45
0	4125,0	4300,0	3850,0	3950,0	3650,0	365,0
AZT .01	4200,0	3850,0				
( $\mu$ M), 04	4050,0		3750,0			
,16	3850,0			3600,0		
,64	3505,0				154,5	
2,56	39,0					1,4

CONTROLO NAO INFECTADO = 0

N-butyl DNJ/AZT em Células H9 - Dia 11

Ensaio: ELISA antigénio p24/Células Viáveis  
(ng/células x 10<sup>5</sup>)

N-butyl DNJ (µM)

	0	,71	2,85	11,4	45,6	182,45
0	5422,9	6231,9	7264,2	4817,1	4011,0	176,3
AZT ,01	6461,5	5202,7				
(µM),04	7500,0		3571,4			
,16	6416,7			3913,0		
,64	3074,6				72,5	
2,56	18,8					0,8

CONTROLO NÃO INFECTADO = 0

*[Handwritten signature]*

N-butyl DNJ/AZT em Células H9 - Dia 14

Ensaio: ELISA Antígeno p24 (ng/ml)

	N-butyl DNJ ( $\mu$ M)					
	0	,71	2,85	11,4	45,6	182,45
0	2797,5	2940,0	2460,0	3000,0	2545,0	4170,0
AZT ,01	3065,0	2635,0				
( $\mu$ M), 04	2545,0		2660,0			
,16	2530,0			2785,0		
,64	3550,0				4450,0	
2,56	2845,0					29,5

CONTROLO NAO INFECTADO = 0

N-butyl DNJ/AZT em Células H9 - Dia 14

Ensaio: ELISA Antigénio p24/Células Viáveis  
(ng/células x 10<sup>6</sup>)

N-butyl DNJ (µM)

	0	,71	2,85	11,4	45,6	182,45
0	5768,6	6000,0	5020,4	5650,4	4713,0	4088,2
AZT ,01	6385,4	4705,4				
(µM),04	6207,3		3746,5			
,16	5060,0			3129,2		
,64	4863,0				4944,4	
2,56	2411,0					11,5

CONTROLO NÃO INFECTADO = 0

N-butyl DNJ/AZT em Células H9 - Dia 11

Ensaio: Actividade Transcriptase Reversa ( $10^4$  CPM/ml)

	N-butyl DNJ ( $\mu$ M)					
	0	,71	2,85	11,4	45,6	182,45
0	510	680	680	650	610	130
AZT ,01	500	690				
( $\mu$ M),04	510		640			
,15	660			600		
,64	560				59	
2,55	19					0,47

CONTROLO NÃO INFECTADO = 0

N-butil DNJ/AZT em Células H9 - Dia 11

Ensaio: Actividade transcriptase Reversa/Células Viáveis  
( $10^4$ CPM/células  $\times 10^5$ )

	N-butil DNJ ( $\mu$ M)					
	0	,71	2,85	11,4	45,6	182,45
0	685,2	985,5	1283,0	804,9	670,3	62,8
AZT ,01	769,2	932,4				
( $\mu$ M),04	944,4		609,5			
,15	1100,0			652,2		
,64	491,2				32,4	
2,56	9,1					0,3

CONTROLO NÃO INFECTADO = 0

Em células H9 infectadas agudamente, a combinação de N-butil DNJ ( $\geq 45,6 \mu$ M) e AZT ( $\geq 0,64 \mu$ M) inibiu HVI-1 sinérgicamente sem toxicidade aditiva in vitro.

A avaliação matemática de todos os dados anteriores pelo princípio de efeito mediano e pela técnica do isoblograma a fim de determinar os valores do índice de combinação (CI) para AZT e N-butil DNJ proporcionou os valores que se seguem:

VALORES INDICE DE COMBINAÇÃO (CI) PARA AZT  
E N-butyl DNJ

CI NA PERCENTAGEM

DE INIBIÇÃO

---

<u>Dia</u>	<u>Ensaio</u>	<u>90</u>	<u>95</u>
7	ELISA	,3998	,4133
11	ELISA	,2380	,2270
7	ELISA/10 <sup>6</sup> células	,3889	,4035
11	ELISA/10 <sup>6</sup> Células	,2921	,3265
11	Transcriptase Reversa	,2799	,2571
11	Transcriptase Reversa/ 10 <sup>6</sup> Células	,4651	,5154

A análise matemática destes resultados demonstrou que N-butyl DNJ ( $\geq 45,6 \mu\text{M}$ ) e AZT ( $\geq 0,64 \mu\text{M}$ ) inibiram HIV-1 sinérgicamente em células H9 agudamente infectadas in vitro. Mais especificamente, a combinação dos valores dos índices era inferior a 1 para 90-95% de inibição da replicação viral em diferentes dias de colheita, indicando sinergismo. Não se verificou

qualquer toxicidade celular destes agentes, quer isoladamente quer em combinação, nos frascos de controlo paralelos tratados com droga não infectados.

As experiências anteriormente referidas foram repetidas usando o mesmo tipo de células, ensaios, drogas e concentrações de drogas e verificou-se que os resultados eram reprodutíveis.

Embora presentemente, os métodos de demonstração da eficácia terapêutica contra o HIV sejam controversos, é habitualmente reconhecido que a eficácia anti-viral tal como é indicada pelo declínio nos níveis do antigénio p24 e pela capacidade diminuída para isolar HIV a partir dos indivíduos infectados pode levar a um aumento de sobrevivência e a uma diminuição na incidência de infecções oportunistas. Assim, tendo como base os testes in vitro anteriormente mencionados, espera-se que a droga de combinação e método do presente invento sejam eficazes no tratamento de seres humanos com SIDA ou ARC atribuível a infecção pelo HIV.

#### Composições Farmacêuticas

Embora seja possível administrar directamente os ingredientes activos AZT e N-butil DNJ, é preferível que eles façam parte de uma formulação farmacêutica. As formulações do presente invento compreendem pelo menos uma combinação sinérgica de AZT e N-butil DNJ numa quantidade que atinja eficácia antiviral juntamente com um ou mais seus veiculos aceitáveis e facultativamente outros ingredientes terapêuticos.

Tal como é aqui usada, a expressão "uma quantidade que atinja eficácia antiviral" é uma quantidade que seja do ponto de vista médico benéfica para os doentes infectados com HIV mas que não apresente efeitos secundários tóxicos que ultrapassem os benefícios da sua utilização.

Enquanto que AZT é habitualmente formulada para administração oral e intravenosa, e o N-butil DNJ seja habitualmente formulado para administração oral, não temos conhecimento de quaisquer restrições nas suas vias de administração ou formulação.

Assim, formulações aplicáveis incluem as apropriadas para administração oral, rectal, nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), vaginal ou parentérica (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). As formulações podem convenientemente ser apresentadas sob uma forma de unidade de dosagem, por exemplo, comprimidos e cápsulas de libertação prolongada, e podem ser preparados por quaisquer métodos bem conhecidos na técnica farmacêutica.

Esses métodos incluem o passo de levar AZT e N-butil DNJ a associarem-se com o veículo que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as formulações são preparadas associando uniformemente e intimamente os ingredientes activos com veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos, e então se necessário moldando o produto.

As formulações do presente invento apropriadas para administração oral podem encontra-se presentes como unidades descontínuas tais como cápsulas, pílulas ou comprimidos contendo cada um deles uma quantidade pré-determinada do ingrediente activo; como um pó ou grânulos; como uma solução ou uma suspensão

num líquido aquoso ou num líquido não aquoso; ou como uma emulsão líquida óleo-em-água ou uma emulsão líquida água-em-óleo tal como um bolus, etc.

Um comprimido pode ser feito por prensagem ou moldagem, facultativamente com um ou mais ingredientes acessórios. Os comprimidos prensados podem ser preparados por prensagem numa máquina apropriada dos ingredientes activos sob uma forma fluindo livremente tal como um pó ou grânulos, facultativamente misturados com um agente de ligação, lubrificante, diluente inerte, preservativo, agente tensio activo ou agente de dispersão. Os comprimidos moldados podem ser feitos por moldagem numa máquina apropriada de uma mistura do composto em pó humidificado com um diluente líquido inerte. Os comprimidos podem facultativamente ser revestidos ou marcados com riscos e podem ser formulados de modo a proporcionarem libertação lenta ou controlada dos ingredientes activos neles contidos.

Formulações apropriadas para administração tópica incluem pastilhas compreendendo os ingredientes numa base aromatizada, usualmente sucrose e acácia ou tragacanto; pastilhas compreendendo os ingredientes activos numa base inerte tal como gelatina e glicerina, ou sucrose e acácia; e loções para a boca compreendendo os ingredientes a ser administrados num veículo líquido apropriado.

Formulações apropriadas para administração tópica à pele podem ser apresentadas sob a forma de unguentos, cremes, geles, pastas, e pensos transdérmicos compreendendo os ingredientes a ser administrados e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Formulações para administração rectal podem ser apresentadas sob a forma de um supositório com uma base apropriada compreendendo, por exemplo, manteiga de cacau ou um salicilato.

Formulações apropriadas para administração oral em que o veículo é um sólido incluem um pó grosseiro tendo um tamanho particular, por exemplo, variando entre 20 e 500 microns o qual é administrado do modo pelo qual a aspiração pelo nariz é feita, isto é, por rápida inalação através da passagem nasal a partir de um recipiente do pó mantido muito perto do nariz. Formulações apropriadas em que o veículo é um líquido, para administração, como por exemplo, um spray nasal ou como gotas nasais, incluem soluções aquosas ou oleosas dos ingredientes activos.

Formulações apropriadas para administração vaginal podem ser apresentadas como pessários, tampões, cremes, geles, pastas, espumas ou formulações para spray contendo para além dos ingredientes activos veículos que sejam considerados apropriados nesta técnica.

Formulações apropriadas para administração parentérica incluem soluções para injeção estéreis aquosas e não aquosas que podem conter anti-oxidantes, tampões, agentes bacteriostáticos e solutos que tornem a formulação isotónica com o sangue do recipiente planeado; e suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem incluir agentes de suspensão e agentes de espessamento. As formulações podem ser apresentadas em recipientes com uma dose ou com múltiplas doses, por exemplo, ampolas e frascos selados, e podem ser armazenadas numa condição seca por congelação (liofilizadas) requerendo apenas a adição de veículo líquido estéril, por exemplo água para injeções, imediatamente antes da utilização. Soluções e suspensões para injeção extemporânea podem ser

preparadas a partir de pós estéreis, grânulos e comprimidos do tipo previamente descrito.

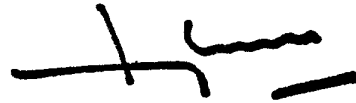
Formulações de unidade de dosagem preferidas são as que contêm uma dose ou unidade diária, uma sub-dose diária, tal como foi aqui anteriormente referido, ou uma sua fracção apropriada, dos ingredientes administrados.

Deve ser tomado em consideração que para além dos ingredientes particularmente mencionados anteriormente as formulações deste invento podem incluir outros agentes convencionais na técnica tomando em consideração o tipo de formulação em questão, por exemplo, as apropriadas para administração oral podem incluir agentes de aromatização.

Dosagens apropriadas para o componente AZT da combinação deste invento no tratamento da SIDA ou ARC podem variar entre cerca de 50 mg/dia e cerca de 1,2 g/dia. Uma variação mais preferida vai de cerca de 200 mg/dia a cerca de 1.000 mg/dia. Uma variação ainda mais preferida vai de cerca de 300 mg/dia a cerca de 800 mg/dia.

Dosagens apropriadas para o componente N-butil DNJ da combinação deste invento no tratamento da SIDA ou de ARC podem variar entre cerca de 1 mg/kg/dia e cerca de 500 mg/kg/dia. Uma variação preferida vai de cerca de 8 mg/kg/dia a cerca de 165 mg/kg/dia. Uma variação mais preferida vai de cerca de 20 mg/kg/dia a cerca de 130 mg/kg/dia. Uma variação ainda mais preferida vai de cerca de 25 mg/kg/dia a cerca de 100 mg/kg/dia.

Para se obter os benefícios do presente invento, pensa-se que formulações farmacêuticas apropriadas contendo AZT e N-butil DNJ devem ser preparadas de modo a que a relação entre



estes dois ingredientes varie entre cerca de 1:50 e cerca de 1:100 moles de AZT:N-butil DNJ. Mais preferida é uma relação de cerca de 1:50 a cerca de 1:80. A mais preferida é uma relação de cerca de 1:70 moles entre AZT e N-butil DNJ.

As concentrações de N-butil DNJ e AZT requeridas para uma inibição completa da replicação do HIV-1, como agentes simples e em combinação, variam em cada experiência dependendo do input do inóculo de vírus, do tipo de célula testada, e da sensibilidade do ensaio replicativo de HIV-1 usado, tal como é de esperar em ensaios biológicos. Contudo, foram demonstrados facilmente efeitos sinérgicos entre N-butil DNJ ( $\geq 45,6 \mu\text{M}$ ) e AZT ( $\geq 0,64 \mu\text{M}$ ).

Embora os dados indicados nos exemplos tenham como base as duas formas específicas de AZT e N-butil DNJ, deve ser tomado em consideração que qualquer sal de AZT farmacêuticamente aceitável ou a amina livre ou sal farmacêuticamente aceitável de N-butil DNJ podem ser utilizados na preparação ou administração da combinação do presente invento.

Além disso, embora as composições farmacêuticas do presente invento compreendam ambos os AZT e N-butil DNJ na mesma forma de dosagem, deve ser tomado em consideração que ao praticar o método do invento apresentado, a AZT e o N-butil DNJ podem ser administrados em formas de dosagem distintas separadas em diferentes tempos, em formas de dosagem distintas separadas, mas essencialmente simultaneamente, ou em conjunto na mesma composição farmacêutica.

Reivindicações

12. - Método de tratamento de um doente infectado por HIV, caracterizado por compreender a administração, de preferência oralmente ou intravenosamente, de uma combinação de 3'-azido-3'-desoxitimidina e N-butil-desoxinojirimicina, ou seus sais farmacologicamente aceitáveis, numa quantidade que atinja eficácia antiviral e que proporcione um nível de dosagem que produza um índice de combinação inferior a ou igual a 1, em que a 3'-azido-3'-desoxitimidina e a N-butil-desoxinojirimicina podem ser administradas quer em dosagens distintas, separadas, quer combinadas sob uma forma de dosagem única.

22. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a 3'-azido-3'-desoxitimidina ser administrada numa quantidade variando entre cerca de 50 mg/dia e cerca de 1,2 g/dia.

32. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a 3'-azido-3'-desoxitimidina ser administrada numa quantidade variando entre cerca de 200 mg/dia e cerca de 1.000 mg/dia.

42. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a 3'-azido-3'-desoxitimidina ser administrada numa quantidade variando entre cerca de 300 mg/dia e cerca de 800 mg/dia.

52. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a N-butil-desoxinojirimicina ser administrada numa quantidade variando entre cerca de 1 mg/kg/dia e cerca de 500 mg/kg/dia.

6a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a N-butil-desoxinojirimicina ser administrada numa quantidade variando entre cerca de 8 mg/kg/dia e cerca de 165 mg/kg/dia.

7a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a N-butil-desoxinojirimicina ser administrada numa quantidade variando entre cerca de 20 mg/kg/dia e cerca de 130 mg/kg/dia.

8a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a N-butil-desoxinojirimicina ser administrada numa quantidade variando entre cerca de 25 mg/kg/dia e cerca de 100 mg/kg/dia.

9a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a relação molar de 3'-azido-3'-desoxitimidina para N-butil-desoxinojirimicina administradas variar entre cerca de 1:50 e cerca de 1:100.

10a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a relação molar de 3'-azido-3'-desoxitimidina para N-butil-desoxinojirimicina administradas variar entre cerca de 1:60 e 1:80.

11a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a relação molar de 3'-azido-3'-desoxitimidina para N-butil-desoxinojirimicina ser de cerca de 1:70.

12a. - Método de tratamento de um doente infectado com HIV, caracterizado por compreender a administração, de preferência oralmente ou intravenosamente, de uma combinação de 3'-azido-3'-desoxitimidina e N-butil-desoxinojirimicina de tal modo que o

doente receba cerca de 50 mg/dia a cerca de 1,2 g/dia de 3'-azido-3'-desoxitimidina e cerca de 1 mg/kg/dia a cerca de 500 mg/kg/dia de N-butil-desoxinojirimicina, ou de um sal farmacêuticamente aceitável de cada, e em que a relação molar de 3'-azido-3'-desoxitimidina para N-butil-desoxinojirimicina varia entre cerca de 1:50 e cerca de 1:100, em que a 3'-azido-3'-desoxitimidina e a N-butil-desoxinojirimicina podem ser administradas quer em dosagens distintas, separadas, quer combinadas sob uma forma de dosagem única.

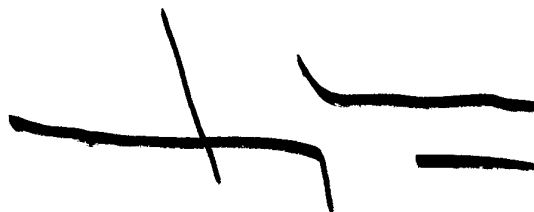
13a. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica, de preferência para administração oral ou intravenosa, caracterizado por se incluir na referida composição uma combinação de 3'-azido-3'-desoxitimidina e N-butil-desoxinojirimicina, ou seus sais farmacêuticamente aceitáveis, numa quantidade que atinja eficácia antiviral e que proporcione um nível de dosagem que produz um índice de combinação inferior a ou igual a 1.

14a. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a relação molar de 3'-azido-3'-desoxitimidina para N-butil-desoxinojirimicina na referida composição varia entre cerca de 1:50 e cerca de 1:100.

15a. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por a relação molar variar entre cerca de 1:69 e cerca de 1:80.

162. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por a relação molar ser de cerca de 1:70.

Lisboa, 1 de Junho de 1990



**J. PEREIRA DA CRUZ**  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORON, 10-A, 1.º  
1200 LISBOA