

(11) *Número de Publicação:* **PT 89266 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)
A61K031/445 A

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1988.12.20</p> <p>(30) <i>Prioridade:</i> 1987.12.21 US 136224 1988.03.09 US 166065 1988.09.23 US 248461</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.12.29</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 05/93 1993.05.03</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> MONSANTO COMPANY 800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD ST. LOUIS MISSOURI 63166 US</p> <p>(72) <i>Inventor(es):</i> RAYMOND ALLEN DWEK GB GEORGE WILLIAM JOHN FLEET GB THOMAS WILLIAM RADEMACHER GB</p> <p>(74) <i>Mandatário(s):</i> JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT</p>
--	--

(54) *Epígrafe:* MÉTODO PARA A INIBIÇÃO DE VÍRUS DA IMUNODEFICIENCIA HUMANA UTILIZANDO UM DERIVADO N-N-BUTILO DE DESOXINOJIRIMICINA

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 89.266

REQUERENTE: MONSANTO COMPANY, norte-americana, industrial, com sede em St. Louis, Missouri 63177-7020, Estados Unidos da América do Norte

EPÍGRAFE: "MÉTODO PARA A INIBIÇÃO DE VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA UTILIZANDO UM DERIVADO N-n-BUTILO DE DESOXINOJIRIMICINA"

INVENTORES: RAYMOND ALLEN DWEK, GEORGE WILLIAM JOHN FLEET e THOMAS WILLIAM RADEMACHER, residentes na Inglaterra

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. Estados Unidos da América do Norte, em 21 de Dezembro de 1987, sob o No.136,224, em 9 de Março e 23 de Setembro de 1988, sob os Nos.166,065 e 248,461



MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um método para a inibição do vírus da imunodeficiência humana que compreende a administração a um doente infectado com o referido vírus de uma quantidade inibidora viralmente eficaz do derivado N-n-butilo da desoxinojirimicina ou de um seu derivado sal farmacêuticamente aceitável.

MONSANTO COMPANY

"MÉTODOS PARA A INIBIÇÃO DE VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
UTILIZANDO UM DERIVADO N-n-BUTILO DE DESOXINOJIRIMICINA"

Este invento relaciona-se com um método para inibir o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e, mais particularmente, com o derivado do N-butilico do 1,5-didesoxi-1,5-imino-D-glucitol (desoxinojirimicina) apresentando potencial utilização para o tratamento do síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA).

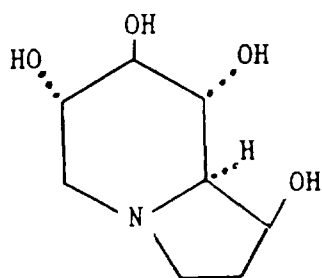
O síndrome da deficiência imunitária adquirida, o qual apenas há cinco anos constituía uma curiosidade médica, constitui hoje em dia uma doença grave. Consequentemente, tem-se feito um enorme esforço para desenvolver (produzir) drogas e vacinas que combatam a SIDA. O vírus da Sida, primeiramente identificado em 1983, foi descrito com vários nomes. E o terceiro vírus do linfócito-T conhecido (HTLV-III) e tem a capacidade de replicação (duplicação) 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, 500-503 (1984), e Popovic et al., Ibid., 497-500 (1984). Este retrovírus tinha sido conhecido como vírus associado a linfadenopatia (LAV) ou vírus relacionado com a SIDA (ARV) e, mais recentemente, como vírus da imunodeficiência humana (HIV). Foram descritos dois vírus da SIDA distintos, HIV-1 e HIV-2. O 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 (1984)], 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 estes vírus num sentido genérico.

Embora a biologia molecular da SIDA comece a ser esclarecida e definida, é necessário aprender e compreender muito mais sobre esta doença. Entretanto, têm sido investigadas muitas aproximações na procura de poten-

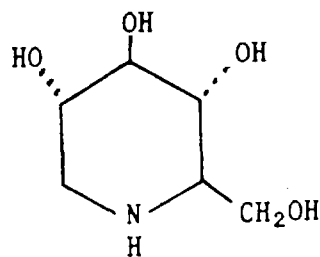
ciais drogas e vacinas anti-SIDA. A produção de uma vacina contra a SIDA tem sido dificultada pela falta de compreensão dos mecanismos da imunidade protectora contra o HIV, pela amplitude da variação genética do vírus, e pela falta de modelos animais eficazes para infecção pelo HIV. Ver, por exemplo, Koff e Hoth, Science 241, 426-432 (1988).

A primeira droga aprovada pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da SIDA foi zidovudine, mais conhecido pelo seu anterior nome azidotimidina (AZT). Quimicamente, esta droga é a 3'-azido-3'-desoxitimidina. Esta droga foi originalmente seleccionada como uma potencial arma contra a SIDA porque se demonstrou que a dita droga inibia a replicação (duplicação) dos virus in vitro. Esses testes in vitro são úteis e constituem virtualmente o único método prático para inicialmente filtrar (escolher, identificar) e testar as potenciais drogas anti-SIDA. Contudo o AZT apresenta graves desvantagens, devido aos seus efeitos secundários tóxicos. Assim, continua a pesquisa para se encontrar melhores drogas anti-SIDA.

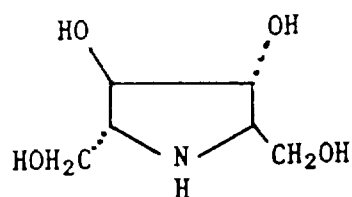
Mais recentemente, certos inibidores da glicosidase foram testados quanto à sua actividade contra o vírus da SIDA. Três desses compostos sugeridos como potenciais drogas anti-SIDA são castanospermina, 1-desoxinojirimicina (DNJ) e 2,5-dihidroximetil-3,4-dihidroxipirrolidina (DMDP). Ver, por exemplo, Sunkara et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 148 (1), 206-210(1987); Tys 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).



Castanospermina



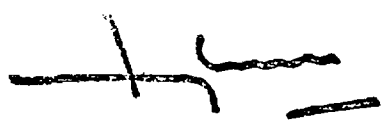
Deoxinojirimicina (DNJ)



Dihidroximetil-dihidroxipirrolidina (DMDP)

Assim, verificou-se que a castanospermina, que é um alcaloide isolado a partir das sementes do carvalho Australiano, interferia com a glicosilação normal dos virions HIV, alterando desse modo o invólucro glicoproteico e evitando a entrada de HIV nas células alvo. Contudo, apenas se verificou uma modesta redução na infectiosidade dos virions.

Em PCT Inter. Appln. WO 87/03903, publicado em 2 de Julho, 1987, o derivado N-metilico da desoxinojirimicina (DNJ) também revelou ter actividade contra o HIV tendo manifestamente como base a sua actividade



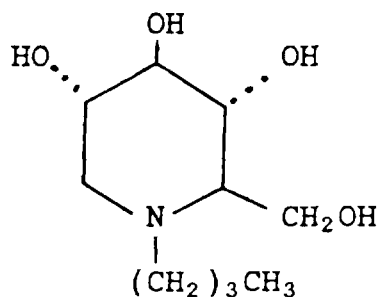
inibidora da glucosidase I. Contudo, foi subseqüentemente verificado por Fleet et al., FEBS Lett, In Press, 1988, que nem todos os inibidores da glucosidase I são inibidores eficazes do HIV. Assim, alguns outros mecanismos podem ser responsáveis pela actividade inibidora do HIV.

Breve Descrição do Invento

De acordo com o presente invento verificou-se que o derivado N-butilico da desoxinojirimicina apresenta uma actividade inibidora substancialmente aumentada contra o virus da imunodeficiência humana (HIV) com concentrações não-tóxicas em comparação com as apresentadas pelos correspondentes derivados N-metímicos e N-etílicos. A N-butil-desoxinojirimicina reduz de modo único o título do vírus mais de cinco logs em concentrações não-citotóxicas enquanto que os derivados N-metil- e N-etil-desoxinojirimicina provocam apenas uma redução da ordem dos dois a quatro logs no rendimento (produção) do HIV infeccioso. Como tal, o derivado N-butilico tem potencial utilização excepcional e significativa para o tratamento do síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Esta importante actividade inibidora do HIV foi surpreendente e inesperada, se e apenas a actividade inibidora da glucosidase I for o mecanismo operador, visto ter sido referido que a actividade inibidora da glucosidase I dos derivados N-metílico e N-butilico da desoxinojirimicina era virtualmente idêntica por Schweden et al., Arch. Biochem. Biophys. 248(1), 335-340 (1986).

O derivado N-butilico da desoxinojirimicina tem a estrutura química que se segue:

~~SECRET~~



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

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Embora a descrição detalhada (especificação) conclua com as reivindicações indicando particularmente e reivindicando distintamente a matéria de base que constitui o invento, pensa-se que o invento será melhor compreendido a partir das descrições que se seguem tomadas em conjunto com os esquemas acompanhantes em que:

A FIG. 1 representa um esboço esquemático do processo do teste usado para avaliar o efeito citotóxico dos compostos do teste sobre as células-T quer infectadas quer não-infectadas com HIV e paralelamente a actividade inibidora do HIV dos compostos do teste. TCID é a dose infecciosa da cultura de tecidos. As células foram desenvolvidas (cultivadas) num meio de cultura RPMI-1640



com 10% de soro de vitelo fetal contendo 100 unidades/ml de penicilina G e 100 μ g/ml de estreptomicina.

A FIG. 2 constitui um esboço esquemático do processo do teste usado para determinar a proporção relativa das células infectadas com HIV em culturas contendo 0,1 mg/ml do composto do teste inibidor. Em várias alturas foram transferidas partes alíquotas de suspensões de células infectadas para um meio sem inibidor e registou-se o tempo necessário para as células apresentarem efeito citopático (CPE).

A FIG. 3 constitui uma representação gráfica em que a inibição do HIV associada a CPE (—% CPE)redução) e a citotoxicidade associada ao composto do teste (---% morte das células) são representadas graficamente em relação à concentração em mg/ml de vários compostos do teste (drogas). Os dados sobre a viabilidade das células foram determinados em relação às células infectadas com não-HIV. Os compostos do teste foram os derivados N-metilico, N-etilico e N-butilico da desoxinojirimicina (DNJ), castanospermina (Cast), N-(5-carboximetil-1-pentil)-1,5-imino-L-fucitol (LFT) e 1,4-didesoxi-1,4-imino-L-arabinitol(LAB).

A FIG. 4 constitui uma representação gráfica em que o titulo viral (determinado como TCID) é representado graficamente em relação à concentração em mg/ml de vários dos compostos do teste (drogas) da FIG,3 em paineis (a) e (b).

A FIG. 5 constitui uma representação gráfica que indica a relação entre o tempo que levam as células infectadas com HIV a crescer na presença de 0,1 mg/ml de N-butil-desoxinojirimicina (droga) para desenvolver CPE quando se utiliza um meio sem droga (dias antes da expressão

de CPE) e o tempo de cultura em presença da droga em dias. Após 55 dias de cultura (0) na presença da droga não apareceu qualquer vírus durante 100 dias adicionais de cultura na ausência da droga (após remoção da droga).

O derivado N-butilico da desoxinójirimicina é um composto conhecido. Pode ser preparado por meio da N-butilação de 1,5-didesoxi-1,5-imino-D-glucitol (desoxinójirimicina). Os métodos de preparação são descritos, por exemplo, nas Patentes dos E.U.A. No. 4.182.767 e 4.639.436.

A eficácia da N-butil-desoxinójirimicina no método do invento foi demonstrada por actividade inibidora positiva em relação à replicação (duplicação) do HIV in vitro. De acordo com este sistema de ensaio, foram usadas células T humanas que são susceptíveis à infecção pelo HIV a fim de determinar visualmente a actividade relativa de vários compostos do teste para inibir a replicação (duplicação) das células infectadas pelo HIV. Como vários compostos análogos apresentam resultados substancialmente divergentes tal como é aqui a seguir descrito, torna-se claro que a eficácia de qualquer um dos compostos como um inibidor do HIV é imprevisível. Foram até agora propostas várias teorias no que se refere ao efeito dos inibidores do HIV das outras técnicas anteriores. A pesquisa feita em vários laboratórios estabeleceu que a interacção entre o invólucro glicoproteico, gp120, e uma certa parte do antígeno CD4 está envolvida no reconhecimento do HIV e da maior parte das células que ele infecta e da ligação do HIV a essas células. Assim, num relatório que comparava o efeito positivo do inibidor da glicosidase desoxinójirimicina (DNJ) sobre a infecciosidade do HIV com a ausência de efeito da manosidase I do inibidor da desoximanojirimicina (DMJ), que é o 2-epímero de DNJ, foi sugerido que a estru-


tura hidrato de carbono perturbada do gp120 ou do seu precursor, imposta pelo bloqueio da via de distribuição (organização) do oligosacárido ligado a N, é responsável pelo efeito. Gruters et al., Nature 330, 74-77 (1987).

O efeito imprevisível de um composto do teste contra o HIV é demonstrado por meio de vários estudos comparativos de derivados do açúcar estruturalmente análogos. Por exemplo, enquanto é confirmada a inibição conhecida do efeito citopático (CPE) pela castanospermina inibidora da α -glucosidase I, nem o epímero L-1,6-diepicastanospermina nem o estereoisómero da castanospermina, L-6-epicastanospermina, revelaram ser inibidores. Ver Fleet et al., FEBS Lett., In Press, 1988.

Assim também, embora ambos os enantiómeros de 1,4-didesoxi-1,4-imino-arabinitol sejam inibidores conhecidos da glucosidase [Fleet et al., Tetrahedron Lett. 26, 3127-3130 (1985); Fleet et al., Chemistry Lett. 1051-1054 (1986)], o enantiómero-L possui uma forte actividade inibidora do HIV /ver também o requerimento co-pendente Sr. No. 136.219, registado em 21 de Dezembro de 1987 enquanto que o enantiómero-D apresenta pouco efeito sobre a replicação (duplicação) do HIV. Para ambos os enantiómeros, a metilação em N em vez de aumentar, reduziu a actividade anti-HIV. Nem o análogo da glucose azofuranose nem o derivado N-benzílico revelaram ter qualquer efeito sobre o CPE. De um modo semelhante, não se observou qualquer inibição do HIV com a fagomina, o análogo da 2-desoxiglucose, embora este também seja conhecido como tendo actividade inibidora da α -glicosidase. Ver Fleet et al., FEBS Lett., In Press, 1988.

A actividade inibidora da N-butildesoxinojirimicina deste invento contra o HIV relativa à actividade inibidora dos compostos do teste análogos é especificamente aqui demonstrada por meio de um sistema de ensaio in vitro em que as células-T são feitas crescer num meio de cultura nutritivo apropriado e são expostas ao inóculo de HIV na presença ou na ausência do composto do teste e são comparadas com as células de controlo (testemunhas) que são feitas crescer apenas em meio de cultura. Após um período apropriado de incubação, as culturas são registadas para se avaliar a presença das chamadas células sinciciais (células gigantes). Exemplos típicos de um teste destes para a avaliação de inibidores do HIV foram apresentados por Fung et al., Bio/Technology 5, 940-946 (1987); Tims et al., Lancet, October 31, 1987, pp. 1025-1026; Gruters et al., Nature 330, 74-77 (1987); e Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8120-8124 (1987).

No presente caso, utilizou-se uma linhagem de células-T leucémicas humanas a qual é descrita por Karpas, Leuk. Res. 1,35-49 (1977). Esta linhagem celular (T-45) foi estabelecida a partir de uma criança com leucemia linfoblástica aguda. Uma outra linhagem de células-T usada para demonstrar a actividade inibidora da N-butildesoxinojirimicina é a linhagem celular MOLT-4. Esta linhagem, celular foi originalmente derivada do sangue periférico de um doente com leucemia linfoblástica aguda. Mais informação sobre a origem e as características desta linhagem celular pode ser encontrada tendo como referência Minowada, J. Natl. Cancer Inst. 49, 891-895 (1972). A linhagem celular MOLT-4 encontra-se depositada sem restrição na colecção permanente da American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, sob o número de acesso ATCC CRL 1582. Podem ser obtidas amostras da linhagem celular pelo público por requisição a este depositário.



As suspensões sem células do HIV foram preparadas a partir de culturas infectadas. A concentração das partículas infecciosas foi avaliada por meio de ensaio de titulação final usando dez diluições seriadas. O número aproximado de partículas infecciosas em cada preparação foi determinado pela diluição mais elevada que contém HIV infeccioso tal como é determinado pela formação sincicial, citopaticidade [Leonard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3570-3574 (1988); Barre Sinoussi et al., Science 220, 868-870 (1983)] e síntese de antigénio HIV [Karpas et al., Lancet 1, 695-697 (1985)] após 10 dias de cultura com 10^4 células-T. Isto representa a concentração das partículas infecciosas, aqui definidas como a dose infecciosa de cultura do tecido (TCID).

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de plástico com recipientes 96 em que 0,2 ml de meio de cultura contendo 10^4 células-T são semeados em cada recipiente. Foi usado como meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro de vitelo fetal. Em cada ensaio, são usados 6 recipientes. Três (1-3) são infectados com 10^4 TCID recipiente de HIV-1 ou HIV-2 e aos outros três adiciona-se apenas meio de cultura. O meio é mudado com os mesmos intervalos para cada composto do teste. O processo detalhado do ensaio é ilustrado nas Figuras 1 e 2.

Os exemplos que se seguem vão ilustrar o invento mais detalhadamente embora seja compreendido que o invento não se limita a estes exemplos específicos ou detalhes neles mencionados.

Exemplo 1

A actividade inibidora do HIV da N-n-butyl-desoxinojirimicina (BuDNJ) foi avaliada em várias comparações com os análogos N-metilico (MeDNJ) e N-etilico (EtDNJ) e com a castanospermina (Cast), 1,4-didesoxi-1,4-imino-L-fucitol (LAB) e N-(5-carboximetil-1-pentil) 1,5-imino-L-fucitol (LFT), e outros derivados de açúcares aminos aqui anteriormente mencionados.

A eficácia dos compostos do teste usados neste exemplo foi avaliada como se segue: 0,2 ml de meio de cultura contendo 10^4 células T-45 foram transferidos para cada recipiente de uma placa plástica de cultura de tecidos de fundo plano com recipientes 96 e as células foram deixadas depositar-se a 37°C (ver Figura 1). Após 4 horas os meios foram aspirados e substituídos por meios que continham o composto do teste. A seguir à incubação durante a noite os meios foram aspirados e adicionou-se 104 TCID de vírus (HIV-1 ou HIV-2) a cada recipiente. A incubação foi mantida a 37°C em CO_2 a 5% durante 1 hora. Em seguida, os meios de crescimento contendo os vários compostos foram adicionados e manteve-se a incubação a 37°C . As culturas de controlo foram mantidas tal como é indicado na Figura 2. No quarto dia as suspensões de células de cada recipiente foram divididas e semeadas em dois novos recipientes e acrescentaram-se 0,2 ml de meio fresco com compostos. Isto foi repetido no sétimo dia. As células foram examinadas ao microscópio durante os dias 1 a 10 para pesquisar a presença de sincícios, a taxa de crescimento e a aparição do efeito citopático (CPE) (células gigantes, núcleos picnóticos, perda de refractibilidade). CPE (100%) foi definido como células restantes uniformes, refrácteis, não redondas;

apenas se encontravam presentes células picnóticas inchadas (tumefactas), gigantes. A viabilidade das culturas infectadas com HIV foi determinada por uma estimativa/contagem grosseira de células que sofreram CPE em relação às células redondas refrácteis uniformes (normais). Células em recipientes que foram incubados com compostos que pareceram inibir ou reduzir a replicação (duplicação) do HIV e em que houve uma acentuada proliferação celular foram ou transferidas para recipientes maiores (de uma placa com 24 recipientes) ou divididos a fim de manter uma densidade celular constante aproximada para promover uma divisão celular contínua.

Para determinar se houve uma redução gradual das células infectadas pelo HIV em culturas mantidas com BuDNJ, partes alíquotas de células infectadas com 10^4 TCID ou HIV-1 e feitas crescer na presença de 0,1 mg/ml de BuDNJ durante períodos de tempo variáveis foram transferidas para recipientes separados e feitas crescer em meio sem droga tal como é indicado na Figura 3. A cultura foi então monitorizada quanto ao desenvolvimento do CPE, indicativo da replicação activa do HIV. Foram registados os tempos de aparição de um CPE avançado. Para confirmar que o HIV-1 ou HIV-2 era a causa do CPE, as células foram fixadas sobre lâminas de vidro a fim de verificar a expressão do correspondente antigénio viral usando o método descrito por Karpas et al., Lancet 1, 695-697 (1985). Os compostos que se verificou inibirem a replicação (duplicação) de HIV-1 e HIV-2 em células T-45 foram subsequentemente usados com a linhagem de células-T leucémicas humanas MOLT-4.

Os resultados dos testes anteriores foram como se segue:

O efeito de várias concentrações de MeDNJ, EtDNJ, Cast, BuDNJ, LFT e BAB, respectivamente,

sobre a formação de CPE é indicado na Figura 3. Estes dados indicam uma dependência da dose em forma de sino para MeDNJ, EtDNJ e Cast. Os dados sobre a viabilidade indicados na Fig. 3 e as taxas de crescimento no Quadro 1 para o crescimento das células não infectadas na presença de MeDNJ, EtDNJ e Cast sugerem que falta a estes compostos uma actividade anti-viral selectiva, e que são citotóxicos, como seria de esperar para inibidores da bio-síntese de oligossacáridos. Assim, a aparente perda de actividade anti-viral (dependência da dose em forma de sino) destas drogas com concentrações elevadas deriva do efeito citotóxico das drogas imitando e sendo registado como um efeito citopático induzido por HIV. Em contraste, os compostos BuDNJ, LFT e LAB não revelaram qualquer citotoxicidade com as taxas de concentração usadas. O BuDNJ evitou completamente o CPE nas células infectadas com HIV com todas as concentrações testadas. A diferença de comportamento entre o BuDNJ e os outros análogos alquilo do DNJ (MeDNJ e EtDNJ), sugere que o seu mecanismo de acção possa ser diferente. De um modo semelhante, o inibidor da α -fucosidase LFT que não interrompe a síntese dos oligossacáridos não revelou ser citotóxico. As propriedades de LAB foram semelhantes às de LFT. A actividade de LAB como um inibidor da α -glucosidase é referida por Fleet et al., FEBS Lett, In Press, 1988, mas tem ainda que ser testada quanto à sua actividade contra a produção de α -glucosidases (isto é I e II). A actividade inibidora do HIV de LFT e LAB é apresentada no correspondente requerimento Ser. No. 136.219, registado em 21 de Dezembro, 1987.

Os dados quantitativos sobre o efeito dos vários compostos sobre as células não infectadas (citotoxicidade) foram obtidos por comparação da sua taxa de crescimento com células de controlo (testemunhas) não expostas a drogas (Quadro 1). A Fig. 4 e o Quadro 2 indi-

cam a relação entre o título de TCID dos produtos flutuantes da cultura de células T-45 infectadas com HIV após 10 dias em cultura e a concentração da droga. Estes dados indicam que LAB e LFT apenas foram capazes de reduzir a TCID parcialmente, mesmo com uma concentração da droga muito elevada. De um modo semelhante, DNJ, MeDNJ e EtDNJ reduziram a TCID apenas parcialmente, embora num nível mais elevado do que LAB e LFT. A incapacidade de qualquer uma destas drogas isoladamente para reduzir totalmente o TCID pode ser devida à heterogeneidade da produção do vírus ou crescimento (propagação). A Figura 4 e o Quadro 2 indicam que apenas a BuDNJ foi capaz de alcançar títulos de TCID do vírus insignificantes com concentrações que eram não-citotóxicas. Estes dados conjuntamente com os dados apresentados na Figura 3 sugerem uma actividade específica em relação ao vírus para este composto. O Quadro 2 indica os resultados de uma comparação directa lado a lado da actividade anti-viral (redução no TCID) de DNJ e dos seus derivados contra HIV-1 e HIV-2. Além disso, foi também usada a linhagem de células MOLT-4. Estes dados revelam que se verifica uma actividade anti-viral semelhante contra HIV-1 e HIV-2 e que esta actividade não se restringe aos vírus feitos crescer na linhagem de células T-45.

A fim de determinar se houve ou não uma real redução nas células infectadas por HIV na presença de BuDNJ, partes alíquotas da suspensão de células infectadas, feitas crescer durante vários períodos de tempo na presença da droga, foram transferidas para um meio sem droga tal como é indicado na Figura 2. A cultura foi então monitorizada quanto ao desenvolvimento de CPE e formação de células gigantes (indicativas de replicação (duplicação) activa de HIV). O aumento no tempo que as células levam para desenvolver CPE uma vez usado meio sem droga (Figura 5) sugere que uma exposição prolongada ao BuDNJ reduziu a proporção de células infectadas nas cul-

turas. Quer este fenómeno seja encarado como uma redução no tempo de duplicação das células infectadas em comparação com células T-45 não infectadas quer como uma replicação (duplicação) viral com citolise não altera a conclusão de que um turnover (uma viragem) natural da população celular in vivo reduziria eventualmente dramaticamente o número de células infectadas e possivelmente quebraria o ciclo de re-infecção.

QUADRO 1. CITOTOXICIDADE E CRESCIMENTO DAS CELULAS-T

Composto	Dosagem (mg/ml)	crescimento calculado das células Não infectadas por Virus Dia 7
Sem droga	-	1.2×10^6
DNJ	0.50	1.4×10^6
	0.25	1.4×10^6
MeDNJ	0.50	5.0×10^6
	0.25	1.0×10^6
	0.10	1.0×10^6
	0.05	1.2×10^6
	0.01	1.2×10^6
EtDNJ	0.10	1.3×10^6
	0.05	1.2×10^6
	0.01	1.2×10^6
BuDNJ	0.10	1.4×10^6
	0.05	1.2×10^6
	0.01	1.2×10^6
LAB	0.50	1.0×10^6
	0.25	1.5×10^6
	0.10	1.5×10^6
Cast	0.70	Toxic
	0.35	8.0×10^5
	0.18	8.0×10^5
	0.09	1.0×10^6
	0.02	1.2×10^6

QUADRO 2. COMPARAÇÃO DOS DERIVADOS DNJ†

Virus	Dosagem (mg/ml)	HIV-1 (TCID)	HIV-2 (TCID)
Controlo (testemunha) -		10 ⁶	10 ⁶
DNJ	0.10	10 ⁵	10 ⁵
MeDNJ	0.10	10 ²	10 ²
EtDNJ	0.10	10 ³	10 ³
BuDNJ	0.10	<10	<10

† Verificaram-se resultados idênticos quando quer 10⁴ células T-45 quer células MOLT-4 foram tratadas com DNJ e os seus três derivados antes da infecção das células com HIV-1 e separadamente com HIV-2 (10⁴ TCID). O HIV-1, que foi usado para infectar a linhagem de células T-45 foi primeiro feito passar em células T-45. De um modo semelhante, HIV-1 que foi usado para infectar MOLT-4 foi primeiro feito passar em células MOLT-4. O mesmo foi feito com HIV-2. Os TCID foram medidos após o dia 10.

Exemplo 2

A fim de ilustrar particularmente a actividade inibidora do HIV da N-butil-desoxinojirimicina do invento em comparação com a actividade dos análogos N-metilico e N-etilico assim como da desoxinojirimicina não-alquilada e controlos (testemunhas) não tratados, o quadro que se segue indica os resultados dos testes realizados de acordo com o processo do Exemplo 1 em ambas as linhagens de células T-45 e MOLT-4 com HIV-1 e, separadamente, com HIV-2. Isto é, HIV-1 foi primeiro passado em células T-45; de um modo semelhante, HIV-1 foi feito passar primeiro em células MOLT-4. Foi feita a mesma passagem com HIV-2. Os compostos do teste foram usados com uma concentração de $0,1 \text{ mg/ml} \cdot 10^4$ de TCID de HIV-1 e separadamente de HIV-2 foram usados para infectar 10^4 células. Depois do teste ficar completo, os títulos dos vírus foram os seguintes:

QUADRO 3. TITULO DOS VIRUS

	Control o	DNJ	MeDNJ	EtDNJ	BuDNJ
HIV-1	10^6	10^5	10^2	10^3	10
HIV-2	10^6	10^5	10^2	10^3	10



Estes resultados revelam assim que a N-butil-desoxinojirimicina é não apenas duas ordens de log mais eficaz como um inibidor de HIV do que a N-metil-desoxinojirimicina mas também três ordens de log mais eficaz do que a N-etil-desoxinojirimicina em testes de replicação (duplicação) (Quadros 2 e 3) cada um deles com duas estirpes de vírus em duas linhagens diferentes de células.

Exemplo 3

O inibidor N-butil-DNJ do invento foi ainda diferenciado da DNJ e da N-metil-DNJ comparando a incorporação da galactose, manose, glucose e timidina marcadas com rádio nas células do melanoma murino B16-F10 a seguir à incubação das células com o composto do teste. Foram obtidos os resultados que se seguem:

1. DNJ e N-butil-DNJ inibiram cada um deles a utilização de manose enquanto que N-metil-DNJ ou estimulou a incorporação ou, conservativamente (moderadamente), não teve qualquer efeito.

2. DNJ e N-butil-DNJ inibiram cada um deles substancialmente a incorporação da galactose nas células a 1,0mM ou menos enquanto que a N-metil-DNJ foi apenas ligeiramente inibidora.

3. No teste de utilização/inibição da glucose a N-metil-DNJ apresentava uma curva dose-resposta invertida enquanto que a N-butil-DNJ apresentava pouco ou nenhum efeito e a DNJ inibia com uma curva dose-resposta normal.



4. A fixação de ^3H -timidina nas células não foi afetada pela N-butil-DNJ até 2,0 mM enquanto que a N-metil-DNJ inibiu a incorporação a 1,0 mM e a DNJ inibiu a incorporação a 2,0 mM.

O agente anti-viral aqui descrito pode ser usado para administração a doentes infectados com o vírus da imunodeficiência humana por meios convencionais, de preferencia em formulações com diluentes e veiculos farmacologicamente aceitáveis. Este agente pode ser usado sob a forma de amina livre ou sob a forma de sal (salina). Os derivados salinos farmacologicamente aceitáveis são ilustrados, por exemplo, pelo sal de HCl. A quantidade do agente activo a ser administrada deve ser uma quantidade eficaz, ou seja, uma quantidade que seja benéfica sob o aspecto médico (medicina!) mas que não apresente efeitos tóxicos que ultrapassem as vantagens que acompanham a sua utilização. E previsível que a dosagem humana adulta varie normalmente para cima de cerca de um miligrama do composto activo. A via de administração preferida é a oral sob a forma de cápsulas, comprimidos, xaropes, elixires, etc., embora também se possa utilizar a via parentérica. As formulações apropriadas do composto activo em diluentes e veiculos farmacologicamente aceitáveis sob a forma de dosagem terapêutica podem ser preparadas tendo como referência os textos gerais sobre este assunto tais como, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. Arthur Osol, 16th ed., 1980, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Vários outros exemplos tornar-se-ão aparentes para qualquer especialista desta técnica após leitura desta apresentação sem desvio do espírito e âmbito do invento. Pretende-se que todos os outros exemplos sejam incluídos no âmbito das reivindicações apensas.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1ª. - Método para a inibição do vírus da imunodeficiência humana num doente infectado com o referido vírus caracterizado por compreender a administração ao referido doente de uma quantidade inibidora viralmente eficaz do derivado N-n-butilo de desoxinojirimicina ou de um seu derivado sal farmacêuticamente aceitável, sendo a gama de dosagem de cerca de 1 mg até uma quantidade que apresenta efeitos tóxicos indesejáveis.

Lisboa, 20 de Dezembro de 1988



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial do Proprietário Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA

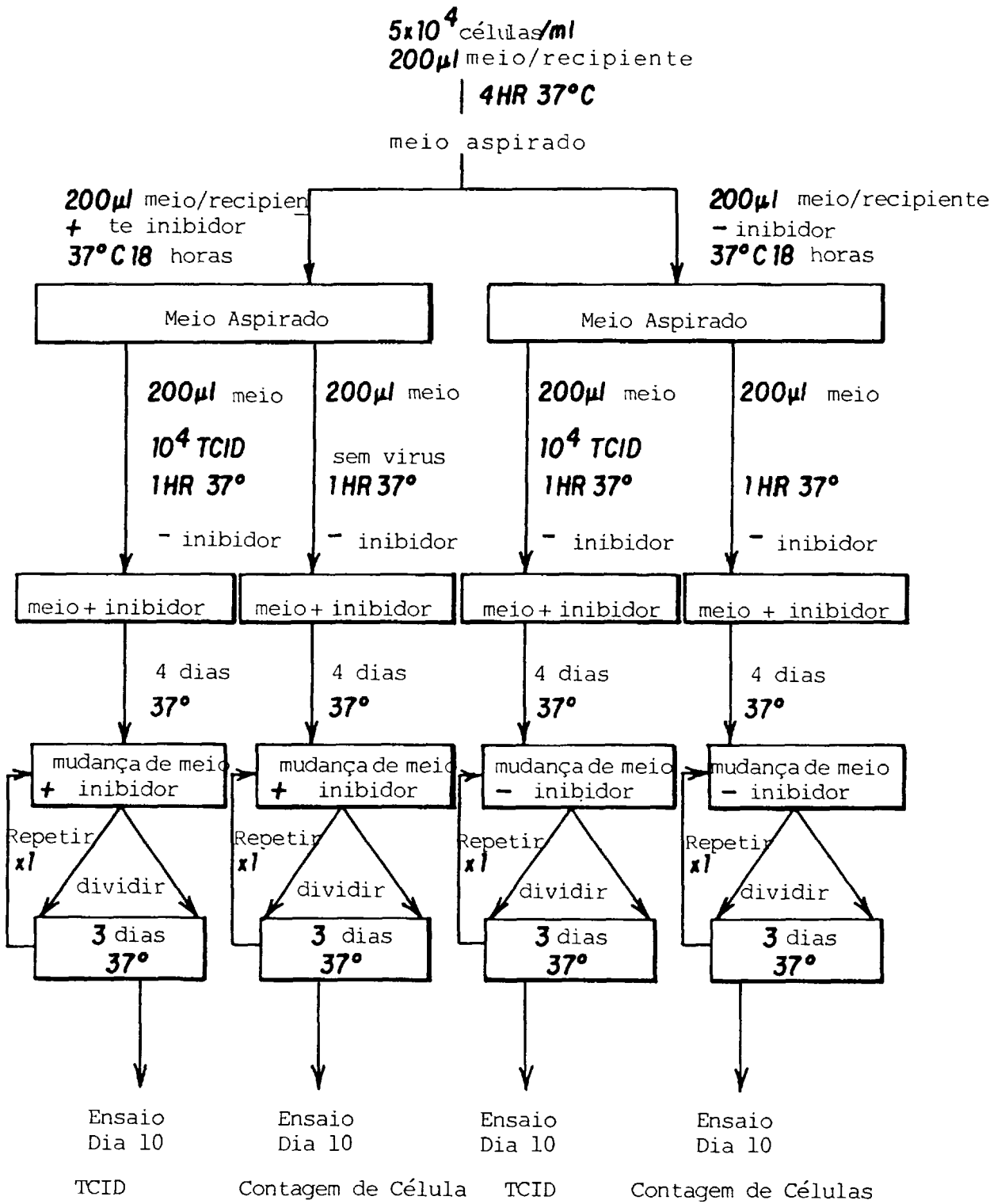


FIG. 1

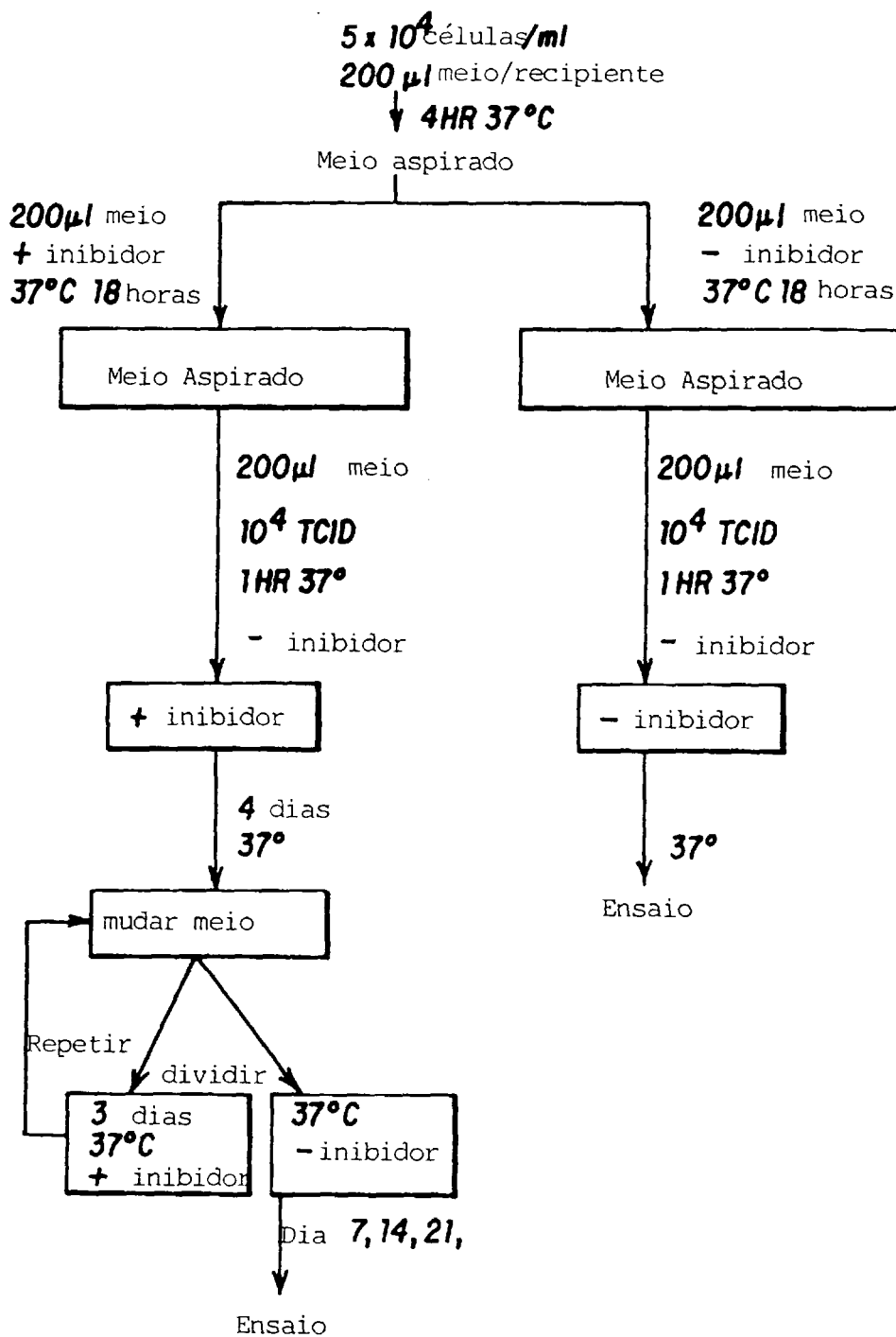


FIG. 2

FIGURA 3
(5 FOLHAS)

11

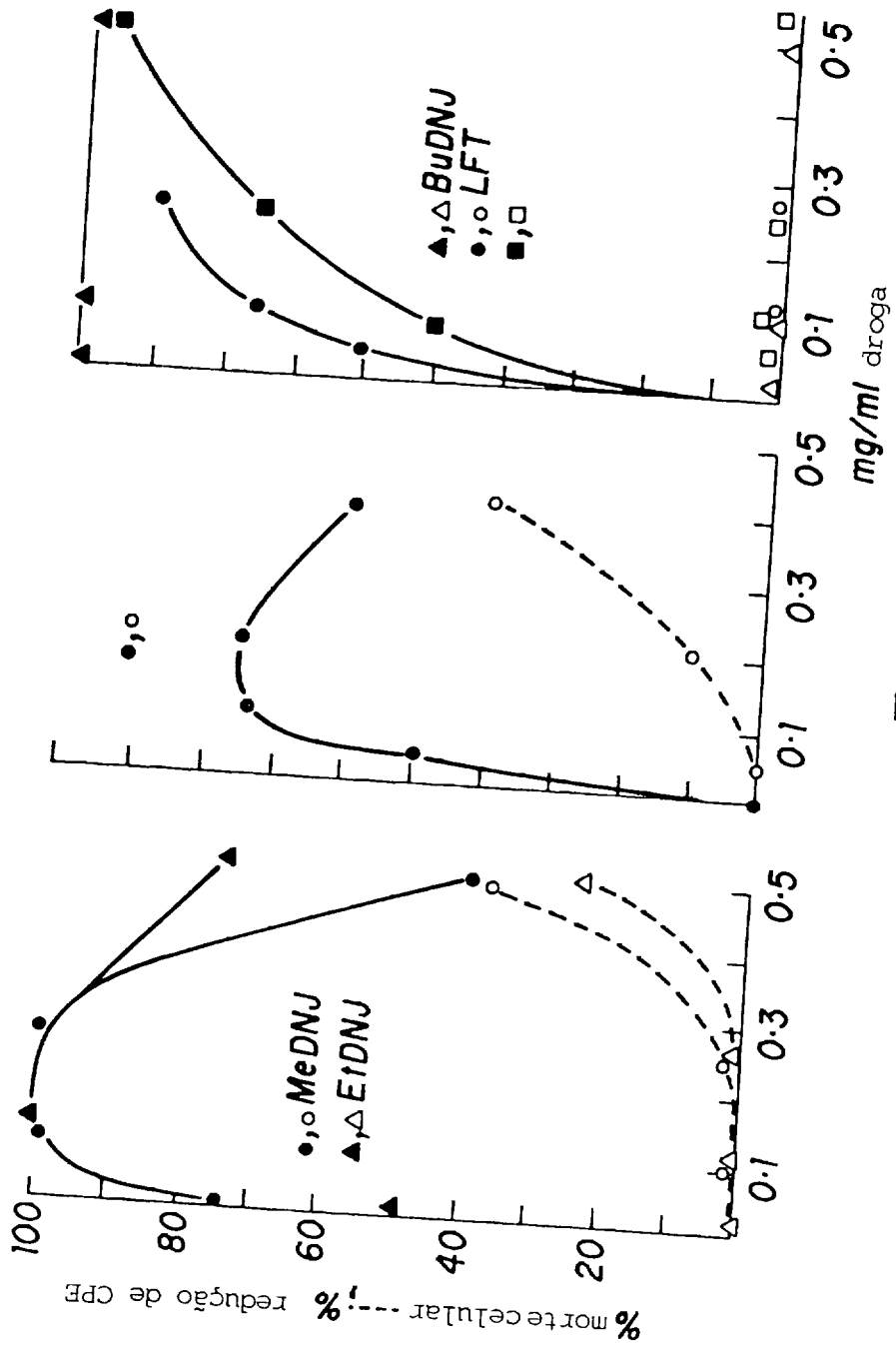


FIG. 3

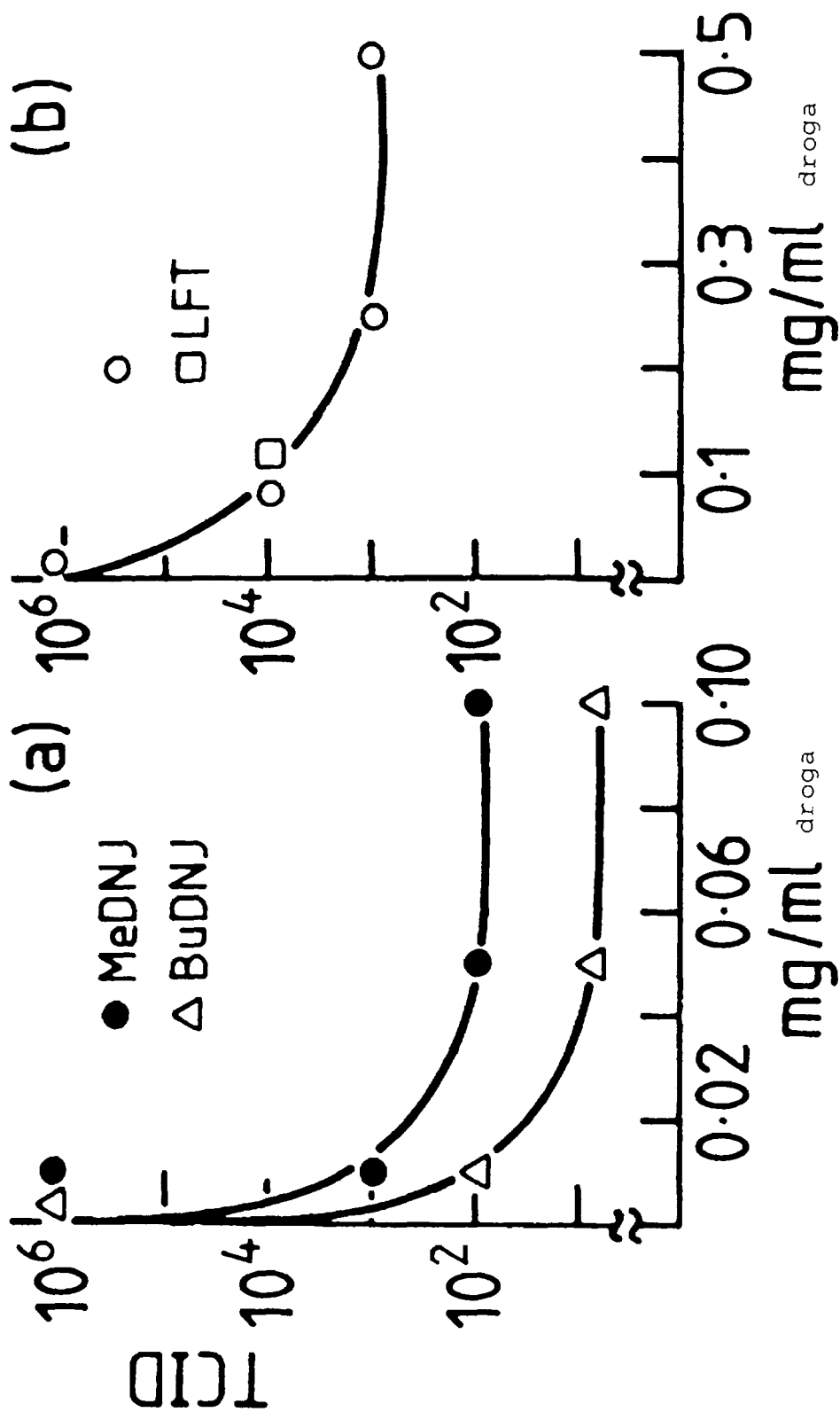


FIG. 4

ff

11

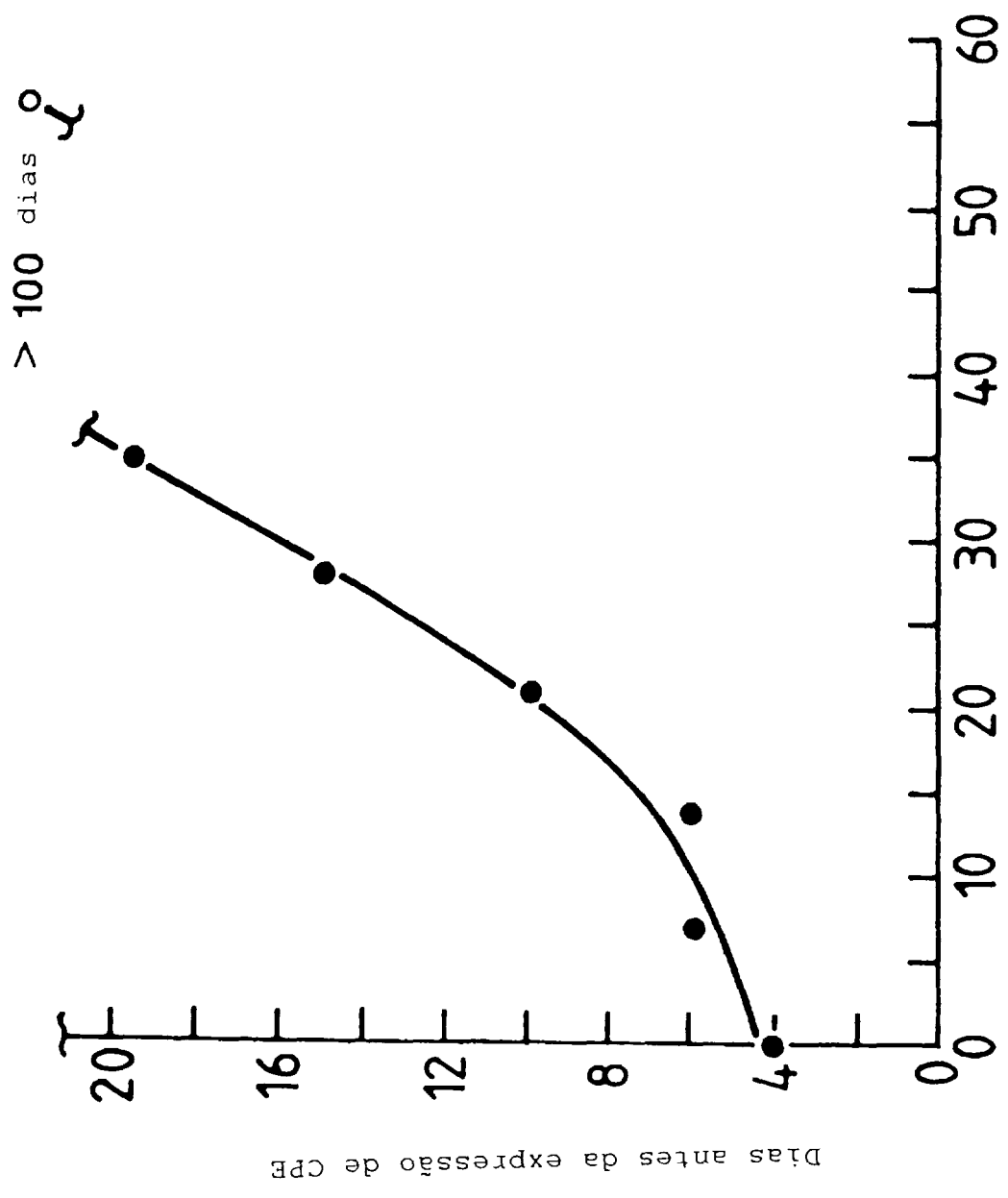


FIG. 5

Tempo de cultura na presença de drogas (dias)

> 100 dias μ

Dias antes da expressão de CPE