

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 96796

REQUERENTE:MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT BESCHRANKTER HAFTUNG,
alemã, industrial, com sede em 6100 Darmstadt,
República Federal da Alemanha

EPÍGRAFE: "Processo para a preparação de diterpenos com activi-
dade imunomodulatória"

INVENTORES: HANS-ECKART RADUNZ, MICHAEL WOLF, MANFRED BAUMGARTH,
WILLY KINZY e LUCKENBACH

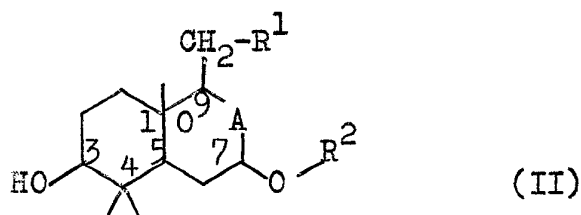
Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Prioridade na República Federal da Alemanha em 17.02.90 sob o N.º
P 40 05 159.5

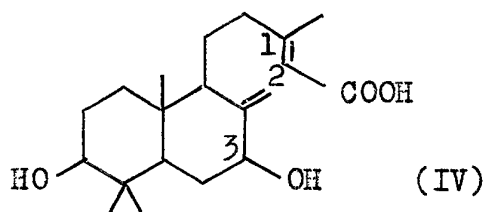
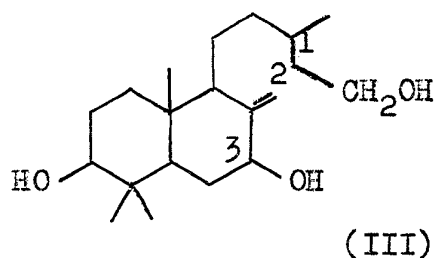
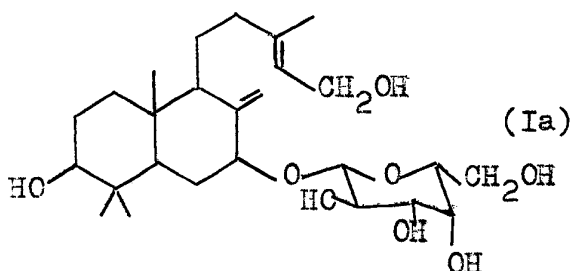
Wifama

RESUMO:

A presente invenção refere-se ao processo para a preparação de diterpenos com actividade imunomodulatória de fórmula geral II



na qual A, R¹ e R² possuem as significações referidas nas reivindicações que compreende isolar e purificar um composto du ma das fórmulas Ia, III ou IV



a partir de plantas dos géneros Acanthospermum, Brickellia, Halimium ou Ayapana e se submeter o composto assim obtido pe lo menos a uma das seguintes operações de síntese:

W. J. J. J.

- hidrogenação da dupla ligação trissubstituída;
- oxidação do grupo CH_2OH para obtenção do aldeído ou do ácido carboxílico ou do éster de ácido carboxílico;
- desidrogenação da ligação simples $\text{C}_1\text{-C}_2$ do composto da fórmula III;
- esterificação do ácido carboxílico do composto da fórmula IV;
- redução do ácido carboxílico do composto da fórmula IV;
- substituição do éster de galactose por outro açúcar;
- glicosidação do grupo hidroxilo no átomo de C_3 ; e
- redução do ácido carboxílico.

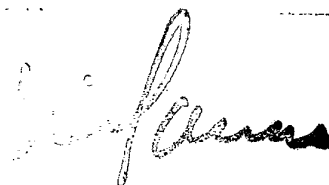
Os compostos de acordo com a invenção têm actividade de imunomodulatória e, por isso, são empregados na preparação de composições farmacêuticas imunomodulatórias que são administráveis a seres humanos para melhorar o sistema de defesa imune dos seus organismos.



A invenção refere-se a derivados de diterpeno, que possuem uma actividade imunomodulatória, em especial, uma actividade estimulante das células T e são, portanto, apropriados como substâncias activas farmacêuticas.

A ocorrência de doenças significa, em última análise, que o sistema imunológico do indivíduo atacado pela doença foi, de certo modo, pelo menos transitoriamente atacado e enfraquecido. Além do tratamento medicamentoso totalmente específico da maior parte das doenças provocadas por agentes específicos, tem um papel importante o fortalecimento geral da resistência imunológica, em especial, desde que se verificou que também o aparecimento de tumores e de doenças da autoimunidade pode ser impedido, em parte, mediante substâncias imunomodulatórias de efeito geral, ou ser influenciado de forma positiva. Na busca de substâncias correspondentemente apropriadas, a indústria farmacêutica tem utilizado em quantidade crescente, entre outras, substâncias naturais de tipos diversos, na maior parte sob a forma de extractos ou essências indefinidos. Exemplos conhecidos destes produtos são os extractos de equinácea (Echinacea) ou Thuja (árvore da vida). Todos os extractos deste tipo têm a desvantagem de as próprias substâncias activas não serem geralmente conhecidas; além disso, existem somente em concentrações muito pequenas, o seu isolamento e a identificação das estruturas químicas em geral complicadas originam dificuldades consideráveis; o efeito em parte não é específico e, não raramente, apresentam um efeito de combinação, ou o extracto em si mesmo é, em numerosos casos, tóxico.

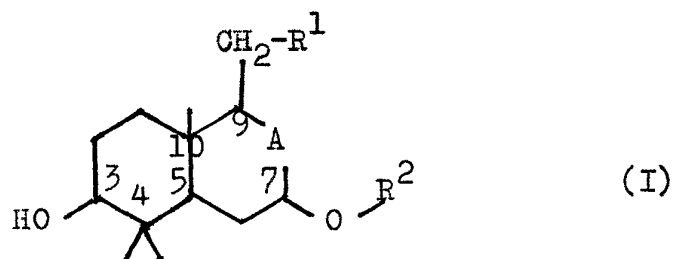
Existe, portanto, a necessidade de se colocar à disposição novas substâncias activas farmacêuticas que possam ser utilizadas para o reforço da resistência imunológica e que possam ser isoladas, de forma nítida, de preparados de substâncias naturais de plantas adequadas, e possam ser ca-



racterizadas e quimicamente modificadas a fim de que se possa produzir um medicamento bem definido nas suas propriedades, na sua estrutura e na sua maneira de actuar farmacológica.

A Requerente descobriu agora que determinados derivados de diterpenos, por exemplo, de plantas dos géneros *Acanthospermum* (acantospermo), *Brickellia* (brichélia), *Halimium* (halímio) ou *Ayapana* (aiapana), assim como as suas variantes quimicamente modificadas depois do seu isolamento têm uma actividade imunomodulatória que é, de modo surpreendente, fortemente acentuada. Observa-se, em especial, uma estimulação significativa das células T, que desempenham um papel fundamental na defesa imunológica. As substâncias activas de acordo com a invenção, dentro do intervalo de dosagens empregado, não são tóxicas, não têm acção mitogénica sobre os linfócitos e também não têm nenhuma influência negativa sobre o sistema nervoso central. Portanto, elas são adequadas, preferencialmente, para aplicação na imunoterapia.

São, por conseguinte, objecto da invenção substâncias activas farmacêuticas de fórmula I



na qual

R^1 significa $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-R^3$ ou $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-R^3$;

R^3 significa $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COOH}$ ou $-\text{COOR}^4$;

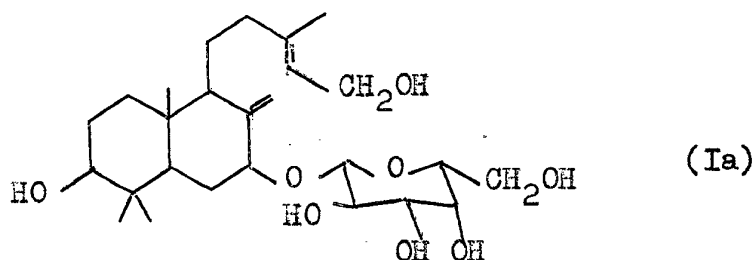
R^4 significa alquilo com 1 a 5 átomos de carbono;

A significa $>\text{CH}-\text{CH}_3$ ou $>\text{C}=\text{CH}_2$ e

Vianna

R^2 significa hidrogénio ou radicais de pentoses, hexoses, dissacáridos/oligossacáridos ou amino-açúcares.

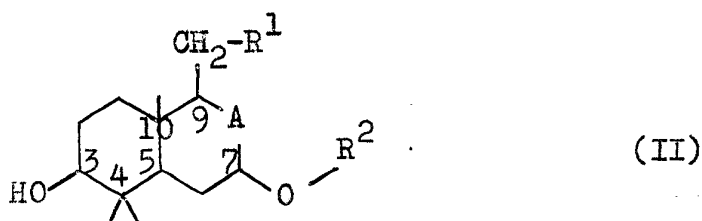
O objecto da invenção é constituído especialmente pela substância activa farmacêutica da fórmula Ia



É ainda objecto da invenção uma composição farmacêutica caracterizada pelo facto de conter pelo menos um composto de fórmula I e/ou de um dos seus sais de adição de ácido fisiologicamente aceitáveis.

Além disso, é objecto da invenção um processo para a preparação de composições farmacêuticas, caracterizado pelo facto de se misturar, um composto de fórmula I e/ou de um dos seus sais de adição de ácido fisiologicamente aceitáveis, pelo menos com uma substância veicular ou auxiliar sólida, líquida ou semilíquida e se conferir à mistura uma forma de dosagem apropriada.

São ainda objecto da invenção os novos compostos de fórmula geral II



na qual

Wifama

R^1 significa $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-R^3$ ou $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-R^3$;

R^3 significa $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COOH}$ ou $-\text{COOR}^4$;

R^4 significa alquilo com 1 a 5 átomos de carbono;

A significa $>\text{CH}-\text{CH}_3$ ou $>\text{C}-\text{CH}_2$; e

R^2 significa radicais de pentoses, hexoses, dissacáridos /oligosacáridos ou amino-açúcares,

com a condição de que, simultaneamente, R^1 não pode significar

$-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ou $\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CHO}$,

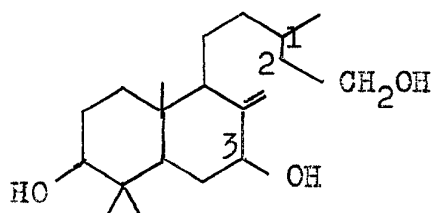
A significar $>\text{C}=\text{CH}_2$ e R^2 significar galactose.

Além disso, constitui objecto da invenção um processo para a preparação dos compostos da fórmula II, caracterizado pelo facto de, à escolha,

(a) se isolar e purificar o composto da fórmula Ia a partir de plantas do género *Acanthospermum* (acantospermo) e se realizar pelo menos uma das seguintes operações de síntese

- hidrogenação da ligação dupla trissubstituída;
- hidrogenação da ligação dupla exocíclica;
- oxidação do grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ da parte de diterpeno para a obtenção de aldeído ou de ácido carboxílico ou de éster de ácido carboxílico;
- substituição do radical galactose por um outro açúcar;

(b) se isolar e purificar o composto da fórmula III

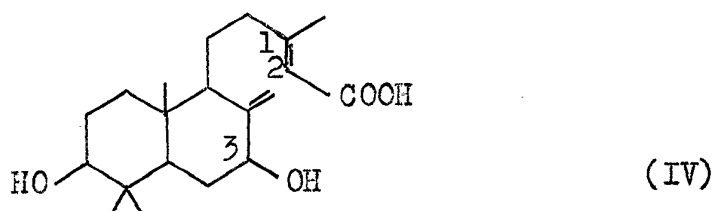


(III)

Infância

a partir de plantas dos géneros *Brickellia* (brichélia) ou *Halimium* (halímio) e se realizar pelo menos uma das seguintes operações de síntese

- desidrogenação da ligação C_1-C_2 da fórmula III;
 - hidrogenação da ligação dupla exocíclica;
 - oxidação do grupo $-CH_2OH$ para se obter aldeído ou ácido carboxílico ou o éster de ácido carboxílico;
 - glicosidação do grupo hidroxilo no átomo C_3 ;
- (c) se isolar e purificar o composto da fórmula IV



a partir de plantas da espécie *Ayapana* (aiapana) e se realizar pelo menos uma das seguintes operações de síntese

- hidrogenação da ligação supla trissubstituída;
- hidrogenação da ligação dupla exocíclica;
- esterificação do ácido carboxílico;
- redução do ácido carboxílico ou do éster de ácido carboxílico para originar aldeído ou álcool;
- glicosidação do grupo hidroxilo no átomo de C_3 .

Finalmente, é objecto da invenção também a aplicação dos compostos de fórmula I na preparação de medicamentos com actividade imunomodulatória, em especial com actividade estimulante das células T.

Os compostos de fórmula I já são em si mesmos em

parte conhecidos.

Especialmente, são já conhecidos os compostos de fórmulas Ia, III e IV. Pelo contrário, o seu efeito terapêutico é novo. Podem-se obter os compostos de fórmulas Ia, III e IV de maneira conhecida, por exemplo, a partir de plantas ou de partes de plantas dos géneros *Acanthospermum*, *Brickellia*, *Halimium* ou *Ayapana*. Eles já foram suficientemente caracterizados quanto à sua estrutura (Nair et al. (1976), *Phytochemistry* 15, 1776; Bohlmann et al. (1979), *Phytochemistry* 18, 1997; de Pasmal Teresa et al (1985) *Phytochemistry* 24, 791; Achmed et al., (1986), *Phytochemistry* 25, 1385). As plantas mencionadas são plantas silvestres de zonas tropicais e subtropicais, mas também de zona temperadas, como, por exemplo, Américas Central e do Sul, Índia ou regiões mediterrânicas. As operações de isolamento e purificação dos compostos de fórmulas Ia, III e IV, a partir de fragmentos de folhas ou de raízes, encontram-se suficientemente descritas nas referidas obras de literatura técnica.

As espécies preferidas são *Acanthospermum hispidum*, *Ayapana amygdalina*, *Halimium iscosum* e *Brickellia vernicosa*.

Os novos compostos de fórmula II, que possuem igualmente actividade imunomodulatória, respectivamente um efeito imunoestimulante, podem ser preparados, por exemplo, a partir das substâncias naturais purificadas de fórmulas Ia, III e IV, de maneira em si conhecida, consoante procedimentos padrão da Química Orgânica.

Assim, por exemplo, pode-se hidrogenar cataliticamente, de maneira convencional, a ligação dupla trissubstituída dos compostos de fórmulas Ia, II e IV, de preferência, com platina em ácido acético.

A hidrogenação da ligação dupla exocíclica
(A : $>C=CH_2$ com obtenção de $>CH-CH_3$) realiza-se de prefe-

Vigilante

também cataliticamente. Neste caso, é especialmente adequada a utilização de paládio sobre carvão activo em metanol, mas podem empregar-se também outros catalisadores.

A oxidação dos grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ alílicos, por exemplo, nos compostos de fórmulas Ia, II e III, para se obterem os correspondentes alilaldeídos, realiza-se preferivelmente com bióxido de manganês activo de acordo com uma maneira de proceder em si conhecida. Se a ligação dupla alílica já estiver hydrogenada, pode-se realizar a oxidação do álcool primário do radical de diterpeno para originar aldeído também com outros agentes oxidantes usuais para estes casos; no entanto, preferem-se cobre, cromito cúprico ou prata, visto que, com estes agentes oxidantes, se inibe a posterior oxidação que origina ácido carboxílico.

A oxidação do respectivo álcool primário ou do aldeído para se obter ácido carboxílico faz-se de maneira simples e conhecida, por exemplo, com KMnO_4 , CrO_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ em piridina.

A esterificação do radical $-\text{COOH}$ com os álcoois do tipo R^4OH realiza-se por exemplo cataliticamente em meio ácido ou básico, de acordo com processos convencionais. Também se pode introduzir o desejado radical R^4 por meio de trans-esterificação.

A glicosidação do grupo hidroxilo no átomo de C_3 dos compostos de fórmulas III e IV ou do grupo hidroxilo no átomo de C_7 dos compostos de fórmula I ($\text{R}^2=\text{H}$) realiza-se de acordo com processos habituais da Química dos hidratos de carbono. Preferencialmente insere-se o radical de açúcar por meio de síntese de Fischer, síntese de Helferich ou da síntese de Koenigs-Knorr na estrutura principal de diterpeno. Durante as reacções, obtêm-se glicósidos alfa e beta. Por meio de determinadas variantes processuais, podem preparar-se, por



exemplo, glicósidos beta, que são obtidos preferivelmente por síntese de Koenigs-Knorr, que são anomerizados por tratamento com, por exemplo, tetracloreto de titânio no seio de solventes apolares e, assim, são transformados, numa forma quase quantitativa, nos correspondentes alfa-glicósidos. De acordo com a invenção, são apropriados tanto os glicósidos alfa como os glicósidos beta. Pode-se realizar a ligação do açúcar também numa forma particularmente vantajosa pelo processo de imidato (R. Schmidt (1986), Angewandte Chemie 98, 213).

Para a obtenção das substâncias activas isentas de açúcar de acordo com a invenção, a partir dos respectivos compostos glicosados de fórmulas I, Ia e II, o glicósido é tratado de forma em si conhecida com ácidos minerais, de preferência, no entanto, com uma resina permutadora de iões ácida.

Também se pode realizar uma separação enzimática com glicosidasas, como, por exemplo, alfa, beta-glicosidasas, ou alfa, beta-galactosidasas.

De acordo com a invenção, R^2 significa, nos compostos de fórmulas I e II, hidrogénio, pentoses, hexoses, dissacáridos/oligossacáridos ou açúcar aminado. Preferem-se, no entanto, os respectivos glicósidos, visto que, em regra, eles possuem as melhores características de substâncias activas no sentido duma actividade estimulante das células T e, especialmente, no caso dos monossacáridos/dissacáridos, possuem uma melhor solubilidade. Entre os açúcares preferem-se os monossacáridos. Nestes incluem-se, por exemplo, radicais de pentoses como ribose, treose ou xilose; hexoses, como glucose, manose, frutose ou galactose, ou então também açúcares aminados, tal como glucosamino ou galactosamino. De acordo com a invenção prefere-se especialmente a galactose. Como dissacáridos devem citar-se, principalmente, lactose, maltose ou celobiose. Os exemplos de oligossacáridos ou polissacáridos são preferivelmente rafinose ou também outros trissacáridos ou tetras

Resumo

sacáridos. O amido e a amilose são apenas pouco adequados devido à sua reduzida solubilidade.

De acordo com a invenção, R^1 significa $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{R}^3$ ou $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{R}^3$, em que R^3 significa $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COOH}$ ou $-\text{COOR}^4$. Preferem-se particularmente os radicais R^1 que significam $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}-\text{CHO}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{COOH}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ e $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

No éster $-\text{COOR}^4$, R^4 significa de preferência metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, isopropilo, terc-butilo ou 2-metilpropilo.

O significado preferido de A é $>\text{C}=\text{CH}_2$.

Nos compostos de fórmulas I ou II especialmente preferidos,

R^1 significa $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CHOH}$ ou $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}-\text{CHO}$;

A representa $>\text{C}=\text{CH}_2$ e

R^2 significa galactose, glucose, frutose ou ribose, em especial todavia, galactose.

Os compostos de acordo com a invenção possuem, na estrutura diterpénica, vários átomos de carbono assimétricos, que condicionam uma correspondente estereoespecificidade. Neste caso são particularmente importantes as posições 3, 7, 9 e 10 dos compostos de fórmulas I e II, visto que estas posições são, por vezes, distintas nas diferentes composições de substâncias naturais. Assim, por exemplo, na espécie Acanthospermum hispidum existe a configuração 3R, 7R, 9S, 10R; na espécie Ayapana amygdalina existe a configuração 3R, 7R, 9R, 10S e na espécie Brickellia vernicosa existe a configuração 3S, 7R, 9S, 10R. Dado que a configuração relativa nos respectivos centros de assimetria não tem importância essencial para a citada actividade farmacêutica ou terapêutica dos medicamentos de acordo com a presente invenção, preferem-se, por

Wifan

razões de disponibilidade mais fácil, as configurações que as substâncias naturais possuem. É evidente que, de acordo com a invenção, podem preparar-se, por isomerização química consoante processos convencionais, os correspondentes compostos com outras configurações.

Pode-se transformar uma base de fórmulas I e II com um ácido, para se obter o correspondente sal de adição de ácido. Para esta reacção interessam em especial os ácidos que originam sais fisiologicamente aceitáveis. Assim, podem empregar-se ácidos inorgânicos, como por exemplo ácido sulfúrico, ácido nítrico; hidrácidos halogenados, tais como, por exemplo, ácido clorídrico ou ácido bromídrico; ácidos fosfóricos, como ácido ortofosfórico, ácido sulfâmico; e ainda ácidos orgânicos, em especial, ácidos carboxílicos, ácidos sulfônicos ou ácidos sulfúricos alifáticos, alicíclicos, aralifáticos, aromáticos ou heterocíclicos, monopróticos e polipróticos, por exemplo ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido pivalico, ácido dietilacético, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico, ácido benzóico, ácido salicílico, ácido 2-fenil-propiónico, ácido 3-fenil-propiónico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido nicotínico, ácido isonicotínico, ácido metanossulfônico ou ácido etanossulfônico; ácido 2-hidroxi-etanossulfônico, ácido benzossulfônico, ácido p-toluenossulfônico, ácidos naftalenomonossulfônicos e ácidos naftalenodissulfônicos, ácido laurilsulfúrico.

Inversamente, podem transformar-se os compostos de fórmula I, por tratamento com uma base, num dos seus sais metálicos (por exemplo sais de sódio, sais de potássio, sais de cálcio) ou sais de amónio.

Podem obter-se os sais de amónio quaternários dos



compostos de fórmulas I e II, por exemplo, no caso de amino-açúcares, por tratamento dos referidos compostos com agentes de quaternização, por exemplo, halogenetos de alquilo ou halogenetos de aralquilo, alquilsulfonatos ou aralquilsulfonatos, alquilsulfatos ou aralquilsulfatos, tais como cloreto de metilo, brometo de metilo, iodeto de metilo, p-toluenossulfonato de metilo, sulfato de dimetilo, brometo de etilo, cloreto de benzilo, convenientemente em presença de um dissolvente inerte, por exemplo de um álcool, tal como metanol ou etanol, a temperaturas compreendidas no intervalo entre -10° e $+30^{\circ}$.

Os compostos de fórmulas I, Ia e II de acordo com a invenção e os seus sais fisiologicamente aceitáveis podem ser utilizados na preparação de composições farmacêuticas, quando se transforma numa forma de doseamento adequada, em conjunto com pelo menos um agente veicular ou uma substância auxiliar, e, se assim se desejar, em conjunto com uma ou várias outras substâncias activas. Podem aplicar-se as composições assim obtidas, como medicamentos, na medicina humana e veterinária. Como substâncias veiculares interessam substâncias orgânicas ou inorgânicas, que sejam adequadas para administração por via entérica (por exemplo, oral ou rectal) ou parentérica, ou para uma aplicação sob a forma de pulverização para inalação e não reajam com os novos compostos, como por exemplo, água, óleos vegetais, álcoois benzílicos, polietilenoglicóis, triacetato de glicerina e outros glicéridos de ácidos gordos, gelatina, lecitina de soja, hidratos de carbono, tais como lactose ou amido, estearato de magnésio, talco, celulose. Para a administração por via oral servem, em especial, xaropes, soluções ou gotas; têm um especial interesse os comprimidos lacados e cápsulas com revestimentos ou coberturas resistentes ao suco gástrico. Para a administração por via rectal utilizam-se os supositórios; para a aplicação por via parentéri-

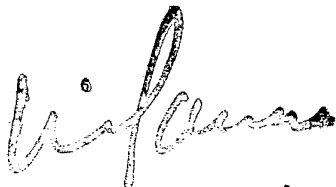


ca empregam-se soluções, de preferência, soluções oleosas ou aquosas, e ainda suspensões, emulsões, ou implantes. Para a aplicação como pulverização para inalação, podem utilizar-se "sprays" que contêm a substância activa, quer dissolvida, quer suspensa, numa mistura de gases propelantes (por exemplo, hidrocarbonetos clorofluorados). Convenientemente emprega-se, neste caso, a substância activa sob a forma micronizada, a que podem adicionar-se um ou vários dissolventes adicionais, fisiologicamente aceitáveis, por exemplo, etanol. As soluções para inalação podem ser administradas por intermédio de inaladores convencionais. Também se podem liofilizar os novos compostos e podem empregar-se os produtos liofilizados assim obtidos, por exemplo, para a preparação de composições para injecções.

As composições mencionadas podem ser esterilizadas e/ou conter substâncias auxiliares, tais como agentes conservantes, agentes de estabilização e/ou agentes molhantes, emulsionantes, sais para modificar a pressão osmótica, substâncias-tampão, agentes corantes e/ou aromatizantes ou conter várias outras substâncias activas, por exemplo, uma ou várias vitaminas.

Prefere-se a aplicação por via parentérica.

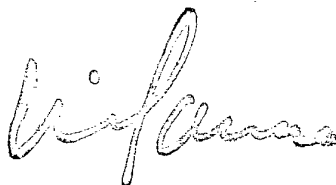
Pode-se medir e determinar in vitro a actividade imunomodulatória de linfócitos T de seres humanos e animais, por exemplo, procedendo da seguinte maneira. O processo baseia-se no facto de as células T serem estimuladas selectivamente para a mitose pela lectina-fito-hemaglutinina (PHA), sem ser necessária uma separação prévia de outros linfócitos, como por exemplo macrófagos ou células B. A intensidade da activação das células T depende, neste caso, da quantidade de PHA empregada. Se se escolher uma activação das células T igual a cerca de metade do valor máximo, pode-se avaliar especialmente bem a imunomodulação. Substâncias com actividade



imunomodulatória, que não adicionadas à mistura a ensaiar, aumentam (imunoestimulação) ou diminuem (imunossupressão) a divisão celular já existente. Substâncias terapêuticamente inadequadas, pelo contrário causam, sem activação prévia, uma divisão celular "não orientada" dos linfócitos T. Esse facto pode originar reacções patológicas do sistema imunológico. Como medida indirecta da divisão celular utiliza-se a formação ou a avaliação da timidina radioactiva no ADN novamente sintetizado nas células.

As substâncias activas de acordo com a invenção causam uma estimulação significativa dos linfócitos T dos seres humanos. Assim, em relação ao valor do controlo (sem substância activa), pode-se observar um aumento da actividade das células T compreendido entre 30 e 80%, de preferência, entre 40 e 65%. Os compostos não actuam mitogenicamente sobre os linfócitos.

Os compostos glicosídicos possuem, em geral, uma maior actividade do que os compostos não glicosados. As substâncias são geralmente bem toleradas. Não se puderam constatar efeitos negativos sobre o sistema nervoso central. Administraram-se as substâncias activas de acordo com a invenção, preferencialmente, em dosagens compreendidas entre cerca de 0,1 mg e 10 mg, especialmente, entre 0,5 mg e 2,5 mg por unidade de dosagem. A dosagem diária está, de preferência, compreendida no intervalo entre 0,1 e 1 mg/Kg de peso corporal. No entanto, a dose para cada determinado paciente depende dos mais diversos factores, por exemplo, da actividade do composto especial aplicado, da idade, do peso corporal, do estado geral de saúde, do sexo, da alimentação, da velocidade de eliminação, duma possível combinação de medicamentos, assim como da gravidade da respectiva enfermidade, à qual se aplica a terapia. Os compostos de acordo com a invenção são também excelentemente apropriados para a profilaxia.



Exemplo 1

Isolamento de linfócitos humanos de sangue periférico

Dilui-se sangue heparinizado (10 unidades de heparinato de lítio/ml de sangue) de doadores saudáveis, normais, com o mesmo volume dum meio de cultura adequado para esta finalidade (RPMI 1640, GIBCO, KA). Recobrem-se lentamente 10 ml de um meio de gradiente apropriado, usual no comércio (por exemplo, da marca registada Lymphoprep, da firma Dr. Molter GmbH, Alemanha) dentro dum tubo de ensaio de 50 ml com tampa roscada, com 20 ml de sangue diluído. Centrifuga-se o gradiente em $700 \times g$ durante 20 minutos. Neste caso, resultam 3 fases: a fase superior é separada por sucção e rejeitada. Depois, retira-se a nítida fase intermédia com os linfócitos e monócitos/macrófagos, colocar-se num tubo de ensaio de 15 ml com a tampa roscada e enche-se até perfazer 14 ml com meio de cultura. Centrifuga-se a $400 \times g$ durante 15 minutos e decanta-se a substância sobrenadante. Introduzem-se no tubo de ensaio ainda 15 ml de meio de cultura, suspendem-se as células e centrifuga-se a $275 \times g$ durante 10 minutos. O sobrenadante é decantado, o pelete é solto e retomado em 2 ml de meio de cultura e nele suspendem-se as células. Da suspensão retira-se uma amostra de 100 μ l e dilui-se com uma amostra de 100 μ l e dilui-se com uma solução (a 0,5%) de azul de tripano na proporção de 1 : 10. Determina-se o número de células vivas numa câmara de contagem de Neubauer. Em pelo menos dois quadrantes (opostos) contam-se pelo menos 100 células.

Exemplo 2

Estimulação mitogénica

Colocam-se linfócitos isolados de acordo com o Exemplo 1 num meio de cultura contendo 1×10^6 células/ml de meio



de cultura. Em cada reentrância numa placa de microtitulação de fundo plano introduz-se 0,2 ml da suspensão de células. Adiciona-se fito-hemaglutinina mitogénica (PHA) a cada uma das referidas microculturas, de modo que exista cerca de 0,04 µg PHA/cultura. Escolhe-se esta quantidade para que se deva esperar uma activação de células T que é cerca de metade da activação máxima. A estas composições iniciais juntaram-se diversas concentrações (50-500 ng/cultura) das substâncias activas de acordo com a invenção. Uma composição inicial serve para determinar o valor de controlo.

Exemplo 3

Proliferação dos linfócitos

Deixam-se em cultivo as placas de microtitulação com as culturas de acordo com o Exemplo 2, durante 4 dias, numa incubadora na qual se introduz gás com 10% de CO₂, e se encontra a uma temperatura de 37°C e com 95% de humidade relativa do ar. 18 horas antes da conclusão do ensaio misturaram-se as culturas com 0,5 µCi de ³H-timidina por cada cultura. Em seguida prossegue-se a incubação das culturas. No 4º dia recolhem-se as células por sucção com um aparelho de captação de células através de um filtro de fibras de vidro. A almofada de filtração é colocada sobre uma folha, embebida com 10 ml dum líquido de cintilação usual no comércio e, em seguida, soldam-se as margens. Efectuou-se a medição da radioactividade da ³H-timidina inserida no ADN com um dispositivo de cintilação.

Exemplo 4

Actividade do composto de fórmula Ia

Isolou-se o composto de acordo com o processo indicado por Nair et al. e purificou-se (Phytochemistry (1976) 15

Wifama

1776). No ensaio segundo os Exemplos 1 a 3, o referido composto, com uma concentração compreendida no intervalo entre 100 e 200 mg/cultura, tinha uma actividade estimulante das células T igual a 51% e também não revelava ter nenhuma acção mitogénica sobre os linfócitos. No ensaio sobre o sistema nervoso central "in vivo" (de acordo com Irwin (1968), Psychopharmacologica 13, 222) de ratos, não se pôde constatar, no caso de se administrar 0,5 mg/Kg (i.v.) após 1,4 e 24 horas, nenhuma actividade substancial causada pela substância.

Exemplo 5

Actividade do composto da fórmula Ia, em que o álcool alílico foi substituído por -CHO.

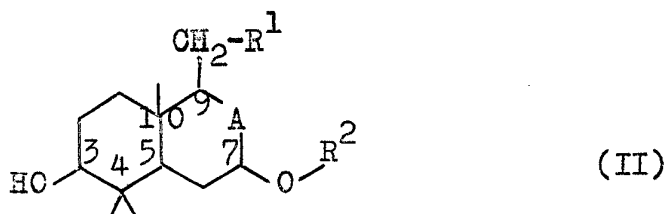
Preparou-se o composto de forma análoga à do Exemplo 4 e procedeu-se ao ensaio da sua actividade estimuladora da imunidade.

Em relação ao valor do controlo, determinou-se um aumento de actividade (células T) igual a 40%.

Wifama

REIVINDICAÇÕES:

1ª. - Processo para a preparação de diterpenos com actividade imunomodulatória de fórmula geral II



na qual

o símbolo R^1 significa $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-R^3$ ou $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-R^3$,

o símbolo R^3 significa $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COOH}$ ou $-\text{COOR}^4$,

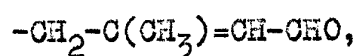
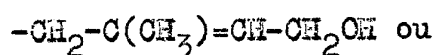
o símbolo R^4 significa alquilo com 1 a 5 átomos de C,

o símbolo A significa $>\text{CH}-\text{CH}_3$ ou $>\text{C}=\text{CH}_2$ e

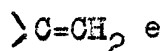
o símbolo R^2 significa H, pentoses, hexoses, dissacáridos, oligossacáridos ou amino-açúcares,

com a condição de que simultaneamente

R^1 não pode significar



A não pode significar

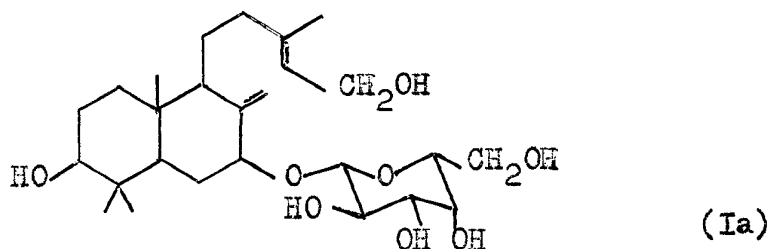


R^2 não pode significar galactose,

caracterizado pelo facto de

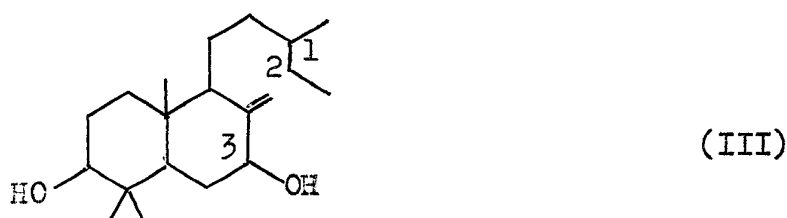
a) se isolar e purificar o composto da fórmula Ia

Wifama



a partir de plantas do género Acanthospermum (acantospermo) e se realizar pelo menos uma das seguintes operações de síntese:

- hidrogenação da dupla ligação trissubstituída,
 - hidrogenação da dupla ligação exocíclica,
 - oxidação do grupo -CH₂OH da parte de diterpeno para obtenção de aldeído ou de ácido carboxílico ou de éster de ácido carboxílico,
 - substituição do éster de galactose por outro açúcar; ou
- b) se isolar e purificar o composto da fórmula III

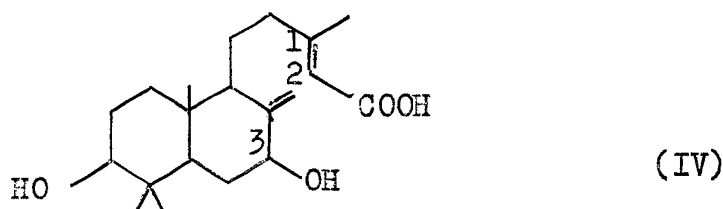


a partir de plantas dos géneros Brickellia (brichélia) ou Halimium (halímio) e se realizar pelo menos uma das seguintes operações de síntese:

- desidrogenação da ligação entre os átomos de C₁-C₂ da fórmula III,
- hidrogenação da dupla ligação exocíclica,

Wifana

- oxidação do grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ com obtenção de aldeído ou de ácido carboxílico ou de éster de ácido carboxílico,
- glicosidação do grupo hidroxilo no átomo de C_3 ; ou
- c) se isolar e purificar o composto da fórmula IV

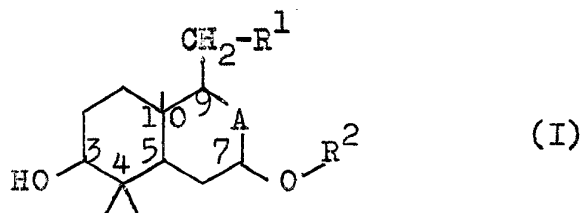


a partir de plantas do género Ayapana (aiapana) e se realizar pelo menos uma das seguintes operações:

- hidrogenação da dupla ligação trissubstituída,
- hidrogenação da dupla ligação exocíclica,
- redução do ácido carboxílico ou do éster de ácido carboxílico para obtenção de aldeído ou de álcool,
- glicosidação do grupo carboxílico no átomo de C_3 .

2a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se glicosidar o composto de fórmula IIa assim obtido.

3a. - Processo para a preparação de composições farmacêuticas com acção imunomodulatória, com acção de estímulo de células T ou de estímulo das defesas do organismo, caracterizado pelo facto de se misturar pelo menos um composto de fórmula I



Virfama

na qual

R^1 significa $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-R^3$ ou $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-R^3$,

R^3 significa $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COOH}$ ou $-\text{COOR}^4$,

R^4 significa alquilo com 1 a 5 átomos de C,

A significa $>\text{CH}-\text{CH}_3$ ou $>\text{C}=\text{CH}_2$ e

R^2 significa H, pentoses, hexoses, dissacáridos, oligossacáridos ou aminoaçúcares, ou um dos seus sais de adição de ácido fisiologicamente aceitáveis com as substâncias veiculares e/ou diluentes e/ou auxiliares sólidas, líquidas ou semilíquidas farmacologicamente aceitáveis.

4a. - Processo para estimular o sistema imune em seres humanos e animais, especialmente estimulando os respectivos linfócitos T, caracterizado pelo facto de se administrar aos pacientes que precisam desse tratamento uma dose diária de, pelo menos, um composto de fórmula I de acordo com as reivindicações anteriores ou de um dos seus sais fisiologicamente aceitáveis de preferência compreendida entre cerca de 0,1 e 1 mg/Kg de peso corporal.

Lisboa,

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

A. de L. / Lemos

Director do Instituto
Agente Oficial da Propriedade Industrial
R. Castilho, 234-3. 2.º 1000 LISBOA
Telefs. 65 1339-65 46 13