

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 99.166

REQUERENTE: PFIZER INC., norte-americana, industrial,
235 East 42nd Street, New York, Estados
Unidos da América do Norte

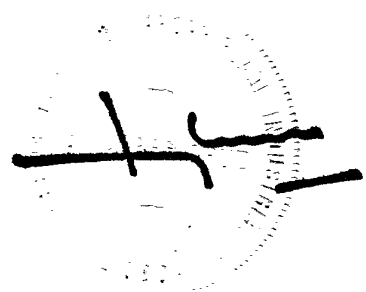
EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE SAIS DE
AMÔNIO QUATERNÁRIO DERIVADOS DE CITOSANO"

INVENTORES: CHARLES EDWARD CHANDLER e WILLIAM JOHN
CURATOLO

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

9 de Outubro de 1990 No.07/595,121, nos Estados Unidos
da América do Norte

99116



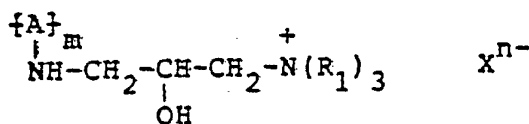
PFIZER INC.
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE SAIS DE AMÔNIO QUATERNÁRIOS
DERIVADOS DE CITOSANO"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de sais de amônio quaternários de citosano que possuem actividade hipocolesterolémica de fórmula (II):

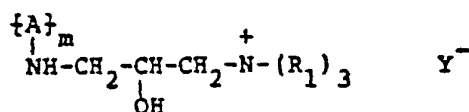


Fórmula II

em que A representa a unidade monomérica de um citosano, m é um número inteiro entre 100 e 1.000, R₁ é alquilo C₁-C₄ linear e Xⁿ⁻ é um polianião solúvel em água, fisiologicamente aceitável, em que n é pelo menos 10 mas não é superior a cerca de 10.000, e

qualquer carga positiva restante é equilibrada pelos aniões não poliméricos.

O referido processo consiste no contacto de um poli-anião solúvel em água, fisiologicamente aceitável, com



Fórmula III

em que Y^- é um contra-íão orgânico monomérico ou inorgânico solúvel em água, fisiologicamente aceitável.

Este invento relaciona-se com sais de amónio quarternários de polissacarídeos, com o método de manufactura, e com o método de utilização dos mesmos, particularmente como agentes hipocolesterolémicos.

Geralmente, produtos conhecidos que possuem actividade hipocolesterolémica são derivados de polímeros sintéticos de ligação cruzada, por exemplo de poliestireno. Estes polímeros são insolúveis em água e por conseguinte tem havido recuos significativos. Por exemplo, resinas à base de ácido de bilis com ligação de poliestireno, insolúveis em água, de ligação cruzada, e.g., colestiramina^R, têm um "sabor na boca" arenoso, e por conseguinte têm um paladar pobre. Em adição, estas contas de resina têm uma baixa eficiência in vivo. Por conseguinte, uma dose hipocolesterolémica destes materiais é excessiva, tipicamente de 18 - 24 gramas de produto formulado por dia.

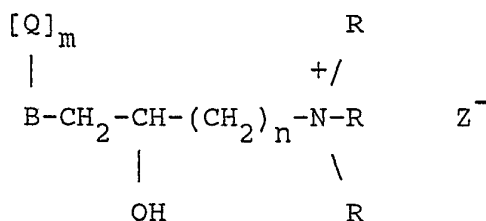
O citosano é um polímero solúvel em água, natural que exhibe actividade hipocolesterolémica quando administrado a um mamífero na forma de um sal (e.g., o sal de hidrocloreto). Contudo, é conhecido no ramo (M. Sugano, T. Fujikawa et al., Am. J. of Clinical Nutrition, 33, April 1980, pp 787, 793), que as cargas positivas nas macromoléculas de polissacarídeo do citosano são obtidas por protonação simples do grupo amino, de modo que nas condições de pH do tubo intestinal (pH aproximadamente de 7,2), o protão é quase completamente removido, porque o pKa do citosano é 6,3. Por esta razão, a capacidade do polímero de interactivar com os sais de bilis é muito baixa.

A Patente dos E.U. No. 4.436.731 ensina que quando uma reacção de quaternização do citosano é conduzida directamente no grupo amino presente no anel de amino-glucosídeo, a carga

- 4 -

positiva permanece presente sob todo o pH e das condições iônicas do tubo gastro-intestinal.

A aplicação Europeia publicada 86108708.8, Publicação No. 0212145, descreve uma variante dos compostos descritos na Patente dos E.U. No. 4.436.731 em que a carga positiva é substituída na estrutura principal do polissacarídeo (em comparação ao descrito em 4.436.731) numa porção que é facilmente disponível para a interação com as moléculas de ácido bilis. Estes sais de amônio quaternários de polissacarídeos têm a fórmula geral seguinte:



Fórmula (I)

em que Q representa uma unidade de monômero de um polissacarídeo natural, m é um número inteiro entre 100 e 1000, n é um número inteiro entre 0 e 4, B é O ou S ou NH ou NR, R é um radical alquilo linear de 1 - 4 átomos de carbono, e Z⁻ é um anião como Cl⁻, Br⁻, I⁻, HSO₄⁻, ou CH₃O-SO₃⁻.

Nos compostos de E.U. 4.436.731 e de EP 0.212.145, o polissacarídeo policationico tem um contra-íão aniônico (e.g., Z⁻ nos compostos de fórmula (I)). Tipicamente, este contra-íão é um radical inorgânico, ou orgânico de baixo peso molecular que tem uma única carga negativa (e.g., Cl⁻ ou CH₃SO₃⁻).

Muitos dos compostos hipocolesterolêmicos de E.U. 4.436.731 e de EP 0.212.145 são solúveis em água. Como tal têm um maior paladar do que os compostos insolúveis em água do tipo colestiramina.

Finalmente a Patente dos E.U.No. 4.436.731 ensina a utilização de goma arábica como um suporte farmacêutico para um polissacarídeo policatiônico. Contudo, não existe menção ou sugestão de formação de sal com estas últimas espécies.

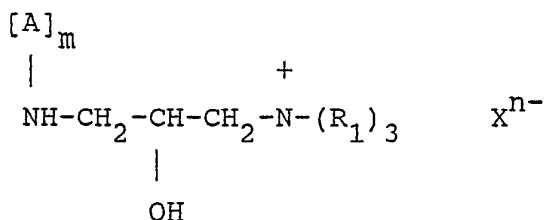
A Patente dos E.U. No. 4.071.478 não ensina a utilização de alginato e de poliacrilato como contra-íões em secrestantes de ácido de bilis policatiônicos não polissacarídeos.

Embora os compostos anteriores tenham uma contribuição significativa, no ramo existe uma continuidade na procura neste campo, para farmacêuticos hipocolesterolêmicos melhorados.

Foi descoberto que os polissacarídeos policatiônicos solúveis em água, anteriores, sofrem de efeitos secundários. Eles mostram citotoxicidade, e eles têm sido observados como causadores de efeitos secundários gastro-intestinais substanciais.

O presente invento é baseado na descoberta de que estas propriedades não pretendidas dos secrestantes do ácido de bilis policatiônico, solúveis em água, podem ser grandemente reduzidas ou eliminadas através da formação de um policação com um contra-íão (X^{n-}) que tem uma série de cargas negativas em cada molécula. Esta descoberta é particularmente aplicável nos compostos de fórmula (I) anteriores, em que Q é um derivado de citosano.

Assim este invento fornece novos sais de amônio quaternários de citosano que possuem actividade hipocolesterolémica de fórmula



Fórmula (II)

em que A representa a unidade monomérica de um citosano, m é um número inteiro entre 100 e 1.000, R₁ é alquilo C₁-C₄ linear e Xⁿ⁻ é um polianião solúvel em água, fisiologicamente aceitável, em que n é pelo menos 10 mas não é superior a cerca de 10.000, e qualquer carga positiva restante é equilibrada pelos aniões não poliméricos.

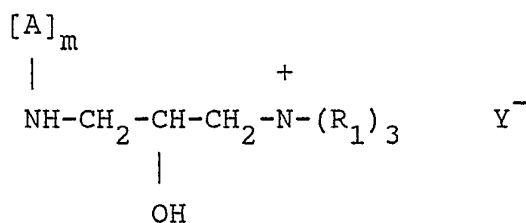
Aniões não poliméricos são aniões que têm menos cargas negativas do que 10, como os aniões inorgânicos ou orgânicos (e.g. cloreto, brometo, iodeto, benzoato, succinato ou glucuronato). O termo polianião, como usado aqui, é definido como um polímero polianiónico.

Sais preferidos do invento são sais de fórmula (II), em que o substituinte aquilo é metilo. Neste grupo preferido, particularmente preferido são aqueles sais em que o polianião é um ploissacarídeo aniónico, um polímero de polivinilo aniónico, poli(amino ácidos) aniónicos, polifosfatos ou polinucleótídeos.

Compostos preferidos neste grupo são carboximetilcelulose, ácido poliacrílico e co-polímeros, polimetafosfato, ácido

algínico, pectina (ácido pectínico), goma arábica (acácia), goma de xantano, goma de gati, goma de tragacanto, goma de alfarroba, goma de welano, poliacrilamida de carboxilo modificado, ácido de polimetacrílico e seus copolímeros, sulfato de polivinilo, zooglano, agarpectina, succinoglicano, carboximetil-hidroxietilcelulose, goma de carboxi-guar, carboximetilamilose, ácido hialurónico, heparina, sulfato de heparina, sulfato de ceratano, sulfato de dermatano, sulfato de condriotina, ácido poli-aspartico, ácido poliglutâmico, polissulfato de pentosano, fucoidina, albumina, outras proteínas aniônicas ou ácidos poli-íósínicos. Compostos preferidos neste grupo são carboximetilcelulose, ácido poliacrílico e co-polímeros, polimetafosfato, ácido algínico, pectina (ácido pectínico), goma arábica (acácia), goma de xantano, goma de gati, goma de tragacanta, goma de alfarroba, ou goma de welano. Compostos especialmente preferidos neste grupo são goma arábica ou carboximetilcelulose.

Um outro aspecto deste invento é um processo para a preparação de sais de amônio quaternários de citosano, que possuem actividade de hipocolesterolémica através do contacto de um polianião solúvel em água fisiologicamente aceitável com



Fórmula (III)

em que A representa a unidade de monómero de um citosano, m é um número inteiro entre 100 e 1.000, R₁ é alquilo C₁-C₄ linear, e Y⁻

é um contra-íão orgânico monomérico ou inorgânico solúvel em água, fisiologicamente aceitável.

O presente invento é também dirigido a composições farmacêuticas para o controle da hipercolesterolemia que compreende um sal da reivindicação 1 num suporte farmacêuticamente aceitável. Ainda uma outra composição farmacêutica que tem actividade hipocolesterolémica compreende um composto de fórmula (III) e um polianião solúvel em água fisiologicamente aceitável.

Um outro aspecto deste invento é um processo para a preparação de uma composição farmacêutica, que compreende a dissolução de um composto de fórmula (III) e um polianião solúvel em água, fisiologicamente aceitável, num solvente prático vulgar, precipitação deste sal de policatión-polianião, recolha do sal de policatión-polianião e adição de sal inorgânico suficiente de tal modo que o referido sal de policatión-polianião seja substancialmente solúvel, depois de mistura numa solução aquosa.

Ainda outro aspecto do invento é dirigido a um método de controle da hepercolesterolemia crónica, que compreende a administração a um mamífero que sofre de hipercolesterolemia crónica, de uma quantidade de controle da hipercolesterolemia crónica de um composto da reivindicação 1.

Outros objectivos e vantagens serão aparentes a partir da especificação e das reivindicações que descrevem um modo de realização deste invento.

Os compostos deste invento podem ser preparados através do contacto de um composto de fórmula (III) e de um polianião solúvel em água, fisiologicamente aceitável. Assim os dois componentes podem ser combinados num solução de modo a formar o

sal. Contudo, os dois polianíons poliméricos podem ser também combinados na forma sólida, como uma mistura e depois solubilizados (e.g., in vivo) para a formação de um composto de fórmula (III). Exemplos de contra-íons orgânicos moniméricos ou inorgânicos fisiologicamente aceitáveis de Fórmula (III) são Br^- , Cl^- , HSO_4^- , lactato $^-$ e benzoato $^-$.

Qualquer solvente (ou combinação de solventes) pode ser usado desde que solubilize o policatión e o polianião de modo que eles formem um composto desejado de fórmula (II). Geralmente qualquer solvente prático realiza a função anterior. Preferencialmente uma solução aquosa é usada porque não é tóxica. Os componentes são convenientemente combinados em condições ambientes. Contudo, os componentes podem também ser por exemplo, combinados a temperaturas de cerca de 0°C a 100°C. Qualquer pressão reduzida à qual o solvente não ebula e pressões elevadas até 10 atm. e superiores podem ser usadas. A formação do sal pode ocorrer instantaneamente, ou pode necessitar de mistura até que ambos os componentes sejam dissolvidos e bem misturados (tipicamente em 2 dias).

Qualquer proporção de polianião em relação ao composto de fórmula (III) pode ser usado que fornece o resultado desejado in vivo (actividade hipocolesterolémica com a ausência de efeitos secundários indesejados). Tipicamente a proporção do policatión de Fórmula (III) em relação ao polianião é desde cerca de 1 a 5 a cerca de 20 a 1, porque abaixo de cerca de 1 a 5 a dose absoluta torna-se muito grande para ser prática para terapia humana e acima de 20 a 1 a protecção conseguida pelo polianião torna-se relativamente insignificante. É preferido que a proporção do composto de fórmula (III) em relação ao polianião seja de cerca de 1 a 2 a cerca de 5 a 1. O complexo resultante (policatión-polianião) tipicamente cai no interior das proporções anteriores.

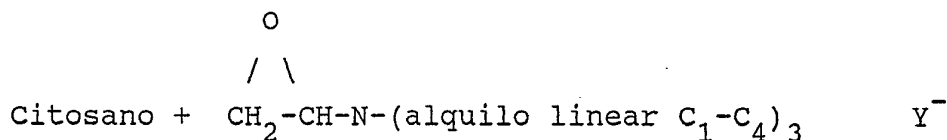
Uma forma desejada do sal é um pó solúvel em água. Isto pode ser produzido por combinação de um composto de fórmula (III) e o polianião desejado num solvente prático comum, de modo a formar um sal de policatição-polianião que é depois precipitado. A ordem de adição de uma solução de composto de fórmula (III) e de uma solução de polímero aniônico não é crítica (Ver exemplo 7). A precipitação pode ser realizada através de uma série de procedimentos como secagem por pulverização, redução por força iônica, variação no pH, adição de um não solvente e de secagem por congelamento. A força iônica pode ser variada por redução da concentração dos componentes (Ver exemplos 8, 12, 13). O precipitado é recolhido e sais fisiologicamente aceitáveis suficientemente solúveis em água são adicionados à mistura para assegurar a solubilidade depois de redissolução (Ver exemplos 9, 11 e 12). Sais inorgânicos típicos como cloreto de sódio, fosfato de sódio, e cloreto de potássio podem ser usados, contudo, sais orgânicos como benzoato, ascorbato, citrato, ou acetato de sódio ou de potássio podem ser também usados.

Surpreendentemente uma solução de sal de policatição-polianião pode ser precipitada por, por exemplo, ainda diluição do sal. Depois de adição de sais solúveis em água adicionais, o precipitado pode ser redissolvido. Assim, isto fornece um método simples para a recuperação do sal de policatição-polianião e para a produção de um produto solúvel em água a partir do precipitado por adição de quantidades suficientes de um sal adequado.

Qualquer polianião solúvel em água fisiologicamente aceitável pode ser usado que em combinação com o composto de fórmula (III) produz um sal que tem o efeito hipocolesterolémico desejado. Por solúvel em água é simbolizado solúvel em água ou num fluido fisiológico. Solúvel refere-se a uma solubilidade maior do que cerca de 0,1 mg/ml. Compostos de polianião

preferidos são os listados acima na Secção Sumário. Preferencialmente o polianião tem um peso molecular suficientemente elevado de tal modo que o polianião não seja absorvido através da parede gastro intestinal. É preferido que o peso molecular do polianião esteja entre cerca de 1.000 e 1.000.000 porque abaixo de 1.000 a absorção pode ocorrer e acima de 1.000.000 as soluções podem tornar-se viscosas. É especialmente preferido que o peso molecular do polianião esteja entre cerca de 10.000 e cerca de 700.000.

O composto de fórmula (III) pode ser produzido por reacção do citosano (tipicamente pré-tratado como descrito abaixo) com um sal que tem a fórmula (IV) num meio reaccional de uma mistura de solventes como descrito a seguir.



Fórmula (IV)

Os sais de amónio quaternário resultantes de citosano preferencialmente têm um grau de substituição de entre 0,5 e 2. O termo "grau de substituição" significa a razão do número de moles da cadeia lateral que contém o grupo de amónio quaternário, do número de unidades de monómero do citosano.

O citosano a ser reagido com o composto de fórmula (IV) pode ser sujeito a pré-tratamento com um ácido, com uma base ou com um solvente, de modo a ajustar o seu peso molecular na gama desejada e a aumentar a sua reactividade. O citosano solúvel em água é ou pré-tratado por hidrólise ácida para obter polímeros com um peso molecular adequado de entre 10.000 e 300.000 ou é dissolvido em solventes adequados (por exemplo ácido fórmico) e é

depois precipitado num ambiente aquoso a pH 10 - 12 para a obtenção de um polímero quase amorfo capaz também de reagir na fase heterogénica.

A reacção entre o citosano e o composto de fórmula (IV) é conduzida num solvente, sob agitação, a uma temperatura entre 40°C e 100°C durante um tempo entre 4 e 16 horas, com uma razão molar do citosano em relação ao composto epoxi entre 1:1 e 1:6 e uma razão de peso do citosano em relação ao meio reaccional de entre 1:5 e 1:35.

Os compostos deste invento são também rapidamente adaptados para utilização terapêutica como agentes hipocolesterolémicos. Eles são administrados oralmente em dosagens na gama desde 60 a 1000 mg/kg de peso corporal por dia numa dose simples ou em doses divididas. Naturalmente, em situações particulares, na prescrição do médico atendedor, doses fora desta gama serão usadas.

Os compostos deste invento podem ser administrados numa larga gama de formas de dosagem diferentes, i.e., eles podem ser combinados com suportes inertes farmacêuticamente aceitáveis, variados na forma de comprimidos, cápsulas, pastilhas expectorantes, trociscos, bolos duros e macios, pós, elixires, ou xaropes e semelhante. Estes suportes incluem diluentes ou agentes de enchimento sólidos, solventes orgânicos não tóxicos variados e meios aquosos.

Para fins de administração oral, comprimidos que contêm vários excipientes podem ser empregues. Por exemplo citrato de sódio, carbonato de cálcio e fosfato de cálcio podem ser empregues com vários agentes de desintegração como amido e preferencialmente amido de batata ou de tapioca, ácido algínico e alguns

complexos de silicatos, em conjunto com agentes de ligação como polivinil-pirrolidona, sacarose, gelatina e acácia. Adicionalmente, agentes de lubrificação como estearato de magnésio, lauril-sulfato de sódio e talco são normalmente muito úteis para fins de compressão. Composições sólidas do tipo idêntico são também empregues como agentes de compressão em cápsulas de gelatina macias ou duras; materiais preferidos em sua relação também incluem lactose ou açúcar do leite, assim como glicos de poli-etileno de elevado peso molecular. Quando suspensões aquosas e/ou elixires são desejados para administração oral, o ingrediente activo essencial aí pode ser combinado com vários agentes adoçantes, agentes de gosto, agentes de cor, agentes de emulsão e/ou agentes de suspensão, assim como diluentes como água, etanol, propileno-glicol, glicerina e suas combinações semelhantes variadas.

Numa composição farmacêutica que compreende um composto de fórmula (II), a razão molecular do suporte em relação ao ingrediente activo normalmente estará na gama desde 1 a 19 a 9 a 1. Contudo, em qualquer dos casos, a razão escolhida depende dos factores como a solubilidade do componente activo, da dosagem contemplada e da via precisa de administração.

Os compostos deste invento são úteis para o controle de hipercolesterolemia. A actividade pode ser determinada por, por exemplo, a dosagem (por sondagem oral) que reduz o colesterol do soro do sangue em hamsters Golden Syrian machos. Os hamsters recebem doses de policatião-polianião uma vez por dia, durante 5 dias e aproximadamente uma hora depois da dosagem de composto no dia 5, os hamsters são sacrificados e as amostras de soro tomadas. Soluções de composto de fórmula (III) em 1 % e 2 % de goma arábica reduzem os níveis de colesterol e protegem o tubo gastro-intestinal dos animais das lesões observadas quando a goma

arábica foi usada em concentrações inferiores. Os detalhes e os resultados destas experiências estão detalhados nos Exemplos 1 e 2 seguintes.

A actividade pode também ser determinada por exemplo pela quantidade de polianião que reduz os efeitos citotóxicos/citostáticos associados com os compostos de fórmula (III) em células de línfoma de ratos ou em células de mastocitoma de ratos.

Células de línfoma de ratos que crescem em cultura de suspensão foram tratadas com policatiação-polianião durante 3 horas e o crescimento das células subsequente foi medido durante umas 45 horas adicionais. Efeitos citostáticos em células de línfomas de ratos associados com concentrações de 5 micro-g/ml - 320 micro-g/ml de compostos de fórmula (III), foram reduzidos através da inclusão de carboximetilcelulose no meio de cultura em concentrações aproximadamente iguais a ou superiores do que a concentração do composto de fórmula (III) testado. Os detalhes e os resultados destas experiências estão mais detalhadas no Exemplo 3 seguinte.

Células de mastocitoma de ratos que crescem em cultura de suspensão foram tratadas com o policatiação-polianião durante 3 horas e a citotoxidade resultante foi ensaiada através da libertação de ⁵¹CR radiomarcado incorporado previamente no meio de cultura. Efeitos citotóxicos dos compostos de fórmula (III) em células de mastocitoma de ratos foram reduzidos através da inclusão de carboximetil-celulose, ácido poliacrílico, carbopol, ou goma arábica. Os detalhes e os resultados destas experiências estão mais detalhados no Exemplo 4 seguinte.

A actividade pode também ser determinada por, por exemplo, a quantidade de polianião que reduz um abaixamento na adesão das células inicial associada com os efeitos do composto de fórmula (III) no clone HLLC18 das células HEP-G2. As células HLLC18 foram tratadas durante 3 horas, com policação-polianião durante a fase de ligação inicial do crescimento das células que foram enzimaticamente removidas dos frascos de cultura de tecidos. O composto de fórmula (III) foi associado a uma diminuição da eficiência de formação de prato inicial do clone HLLC18 das células HEP-G2, que foi evitado pela inclusão de 50 micro-g/ml de carboximetilcelulose. Os detalhes e os resultados desta experiência estão mais detalhados no Exemplo 5 seguinte.

EXEMPLO 1

Abaixamento do colesterol no soro em hamsters Golden Syrian alimentados com comida para animais dosados por sondagem oral com 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) (aqui definido como composto de Fórmula (III) em que Y^- é Cl^- e R_1 é metilo) (1 g/kg) dissolvido em soluções de 0,25 % (v/v) de goma arábica (25 mg/kg), 0,5 % (p/v) de goma arábica (50 mg/kg), 1,0 % (p/v) de goma arábica (100 mg/kg), ou 2,0 % (p/v) de goma arábica (200 mg/kg).

Seis grupos de 5 a 6 hamsters Golden Syrian macho foram aclimatados a comida para roedores de roedores Agway RMH e a ciclos de luz invertidoa (luz desde 3 p.m. a 3 a.m.) durante aproximadamente uma semana antes da iniciação da experiência seguinte. O peso corporal médio dos hamsters, no início da experiência, foi aproximadamente de 144 g. Nos dias 1, 2, 3, 4, e 5 compostos teste foram apresentados aos animais por sondagem oral de 1 ml de solução teste por 100 g de peso corporal entre as 9 a.m. e 10 a.m.. O grupo 1 recebeu água. O grupo 2 recebeu 2 %

(p/v) de goma arábica (200 mg/kg). O grupo 3 recebeu 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) (1 g/kg) dissolvido em 0,25 % (p/v) de goma arábica (25 mg/kg). O grupo 4 recebeu 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) (1 g/kg) dissolvido em 0,50 % (p/v) de goma arábica (50 mg/kg). O grupo 5 recebeu 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) (1 g/kg) dissolvido em 1 % (p/v) de goma arábica (100 mg/kg). O grupo 6 recebeu 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) (1 g/kg) dissolvido em 2 % (p/v) de goma arábica (200 mg/kg). Todas estas soluções eram límpidas de material precipitado. Os hamsters foram deixados de livre acesso a comida para roedores em peletes e de água durante toda a experiência. Aproximadamente 1 hora depois da dose de composto no dia 5, os hamsters foram sacrificados sob anestesia de pentobarbital e o sangue foi recolhido via punctura cardíaca. O soro obtido da amostra de sangue foi analisado para o colesterol total.

Resultados: Grupo 1 - 142 ± 10 mg/dl; Grupo 2 - 133 ± 17 mg/dl; Grupo 3 - 120 ± 39 mg/dl; Grupo 4 - 129 ± 27 mg/dl; Grupo 5 - 117 ± 17 mg/dl; Grupo 6 - 110 ± 8 mg/dl. Os vestígios de GI em animais nos Grupos 1, 2, 5, e 6 pareceram normais. Nos Grupos 3, 4, de 5 os hamsters desenvolveram diarreia, e depois de inspecção no sacrifício, um tinha vesículas seminais alargadas, todos tinham âmpolas de bilis pequenas e fígados pequenos. No Grupo 4, 3, de 5 os hamsters desenvolveram diarreia, e depois de inspecção no sacrifício dois tinham cecumes com sangue, um tinha adesões de órgão interno.

EXEMPLO 2

Abaixamento de colesterol no soro em hamsters Golden Syrian alimentados com comida para animais dosados por sondagem oral com 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) (1 g/kg)

dissolvido numa solução de 10 % (p/v) de goma arábica (1 g/kg) ou com 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) (1 g/kg) dissolvido numa solução de 2 % (p/v) de goma arábica (200 mg/kg).

Quatro grupos de 5 hamsters Golden Syrian machos (ou 3 no Grupo 4) foram aclimatizados a comida para roedores Agway RMH e a ciclos de luz invertidos (luz desde 3 p.m. a 3 a.m.) durante aproximadamente uma semana, antes da iniciação da experiência seguinte. O peso corporal médio dos hamsters no início da experiência foi aproximadamente de 136 g. Nos dias 1, 2, e 3 os compostos teste foram apresentados aos animais por sondagem oral de 1 ml de solução teste por 100 g de peso corporal entre 9 a.m. e 10 a.m.. O Grupo 1 recebeu água; o Grupo 2 10 % (p/v) de goma arábica (1 g/kg); o Grupo 3 recebeu 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) (1 g/kg) dissolvido em 10 % de goma arábica (1 g/kg). O Grupo 4 recebeu 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) (1 g/kg) dissolvido em 2 % de goma arábica (200 mg/kg). Todas estas soluções eram límpidas e livres de material precipitado. Os hamsters foram deixados de livre acesso a comida para roedores em peletes e a água durante toda a experiência. Aproximadamente 1 hora depois da dose de composto no dia 3, os hamsters foram sacrificados sob anestesia de pentobarbital e o sangue foi recolhido via punctura cardíaca. O soro obtido da amostra de sangue foi analisado para o colesterol total.

Resultados: Grupo 1 - 108 ± 8 mg/dl; Grupo 2 - 109 ± 11 mg/dl; Grupo 3 - 88 ± 12 mg/dl ; Grupo 4 90 ± 17 mg/dl. Os vestígios de GI do animais em todos os grupos pareceram normais.

EXEMPLO 3

Citotoxicidade em células causadas por um composto de Fórmula (III-A) pode ser evitada por carboximetilcelulose.

Uma solução de estoque de um composto de Fórmula (III-A) foi feita em água desionizada esterelizada a 64 mg/ml por dissolução de 115,9 mg em 1,81 ml.. Esta foi diluída serialmente em água desionizada esterelizada para originar soluções de estoque adicionais de 16 mg/ml, 4 mg/ml, e 1 mg/ml. Uma solução de estoque de carboximetilcelulose foi feita a 10 mg/ml em água desionizada esterelizada por dissolução de 23,92 mg de carboximetilcelulose em 2,39 ml. Esta foi ainda diluída em água desionizada esterelizada a outra solução de estoque de 2 mg/ml. Quinze tubos foram preparados de tal modo que o #1 - #5 receberam 100 micro-l de água desionizada esterelizada, #6-#10 receberam 100 micro-l de 2 mg/ml de solução de estoque de carboximetilcelulose, e #11-#15 receberam 100 micro-l de solução de estoque de 10 mg/ml de carboximetilcelulose. Ainda os tubos #1, #6, e #11 receberam 100 micro-l de água desionizada esterelizada; os tubos #2, #7, e #12 receberam 100 micro-l de solução de estoque de 1 mg/ml de composto de Fórmula (III-A); os tubos #3, #8, e #13 receberam 100 micro-l de solução de estoque de 4 mg/ml de um composto de Fórmula (III-A); os tubos #4, #9, e #13 receberam 100 micro-l de solução de estoque de 16 mg/ml de um composto de Fórmula (III-A); e os tubos #5, #10, e #15 receberam 100 micro-l de uma solução de estoque de 64 mg/ml de um composto de Fórmula (III-A). Estas misturas originaram três séries de 5 tubos que continham 0, 500, 2000, 8000, e 32.000 micro-l/ml de um composto de Fórmula (III-A) em água, em 1000 micro-g/ml de carboximetilcelulose, ou em 5000 micro-g/ml de carboximetilcelulose. Nas séries feitas com 1000 micro-g/ml de carboximetilcelulose, todos os tubos continham um composto de Fórmula (III-A) mostraram turvez. Nas séries feitas com 5000 micro-g/ml de carboximetilcelulose, as soluções continham 0 micro-g/ml e 500 micro-g/ml permaneceram transparentes e o resto mostrou turvez.

Células de línfoma de ratos (L5178Y 3.7.2C/TK±) cresceram em meio de cultura de tecidos RPMI 1640 que continham 10 % (v/v) de soro de bovino fetal. 10 ml de suspensão de células (6×10^5 /ml) foi adicionado a cada um dos 15 tubos de 50 ml, de polipropileno, de cultura, esterelizados, que foram numerados desde #1 a #15. 100 micro-l das soluções correspondentemente numeradas acima foram adicionadas a cada uma destas suspensões de células. Isto diluiu as concentrações de ambos o composto de Fórmula (III-A) e a carboximetilcelulose por um factor de 100. Os tubos tapados que continham as suspensões de células foram colocados em tambores de rotação num incubador a 37°C, durante 3 horas. Os tubos foram removidos do incubador e foram feitos em pelete por centrifugação. O meio foi decantado e substituído por 10 ml de meio de crescimento fresco. Depois de outra centrifugação, este passo foi repetido uma vez. O pelete de células final foi depois suspenso em 20 ml de meio de crescimento de tal modo que a concentração de células foi de 3×10^5 células/ml. Os tubos voltaram para o incubador.

Dezoito horas depois, 1 ml de suspensão de células de cada tubo foi adicionado a 9 ml de solução de contagem (Isoton II [TM]; Coulter, Inc.). A concentração de células foi depois determinada usando um contador de células Coulter. A partir dos dados obtidos no ponto de tempo 24 horas, a concentração de células em cada tubo foi diluída com meio de crescimento fresco a uma concentração de células final de 2×10^5 células/ml, antes de os tubos serem colocados novamente no incubador para umas 24 horas adicionais. Neste tempo, as concentrações de células foram determinadas como se descreve agora.

Resultados: Os tubos #1 - #5 (nenhuma carboximetilcelulose; 0, 5, 20, 80, 320 micro-g/ml de um composto de Fórmula (III-A) tinham concentrações de células calculadas finais

(determinadas pelo produto de diluição às 24 horas e a concentração de células final atingui as 48 horas) de 36,8; 15,91; 2,94; 5,52; e $2,22 \times 10^5$ células/ml respectivamente. Os tubos #6 - #10 (10 micro-g/ml de carboximetilcelulose; 0, 5, 20, 80, 320 micro-g/ml de um composto de Fórmula (III-A)) tinham uma concentração de células final de 47,23; 46,40; 19,35; 3,30; e $2,55 \times 10^5$ células/ml, respectivamente. Os tubos #6-#10 (50 micro-g/ml de carboximetilcelulose; 0, 5, 20, 80, 320 micro-g/ml de um composto de Formula (III-A) tinham uma concentração de células final calculada de 39,19; 47,5; 48,79; 4,38; e $1,42 \times 10^5$ células/ml, respectivamente.

EXEMPLO 4

Carboximetilcelulose, ácido poliacrílico (2000 M_r), carbopol (co-polímero de ácido poliacrílico com polialquil-sacarose) e goma arábica protegem células de mastocitoma de ratos com citotoxicidade induzida policationicamente.

Células de mastocitoma de ratos (P815) cresceram numa cultura de suspensão em meio RPMI 1620 mais 10 % de soro de bovino fetal (FBS) usando técnicas de cultura de tecidos padrão. No dia do ensaio, 5×10^6 células foram suspensas em 100 micro-l de solução de sal HanK equilibrada (HBSS) mais 10 % de FBS. 50 micro-l de ^{51}Cr foi adicionado às células e elas foram incubadas num banho de água agitado a 37°C , durante 30 minutos, durante o qual elas absorveram o ^{51}Cr . As células foram depois lavadas 4 vezes em 15 ml de HBSS mais 10 % de FBS. Elas foram re-suspensas em meio RPMI 1640 mais 10 % de FBS a aproximadamente $2,5 \times 10^5/\text{ml}$.

Para começar o ensaio de citotoxicidade, 100 micro-l de solução efector (e.g., agente teste mais polímero polianiónico;

ver abaixo) a 1,2 x concentração final foi adicionado a pratos de microtítero com fundo quadruplos em V. Para ser ensaiado, 20 micro-l de células de mastocitoma de ratos carregadas com ^{51}Cr foram adicionadas a cada fundo resultando aproximadamente 5000 células por fundo. O prato foi depois incubado aos 37°C num incubador de cultura de tecidos. A solução efector restante foi agitada com vórtice e 150 micro-l cada foi pipetado para 3 fundos de cada prato microtítero de fundo plano e a densidade óptica a 610 nm foi lida com um leitor de prato como uma medida da turvez da solução.

Depois de 3 horas de incubação, os pratos de microtítero foram centrifugados para a formação de um pelete, qualquer célula suspensa e amostras de 50 micro-l de meio de cada fundo foram contadas para radioactividade. A radioactividade libertada das células foram incubadas com 0,1 % de Triton X-100 (um detergente) foi usado como o controle a 100 %. O meio das células incubado sem efector substancial foi usado para medição de libertação de ^{51}Cr espontânea.

$\% \text{ de } ^{51}\text{Cr} \text{ libertado} = (\text{amostra dpm} - \text{espontanea dpm}) / (\text{TX- 100 dpm} - \text{espontanea dpm}).$

Soluções de estoque de um composto de Fórmula (III-A), carboximetilcelulose-LF, carbopol, goma arábica, e ácido poliacrílico foram todos feitas em água esterelizada a 3 % (p/v; 30.000 micro-g/ml). Um composto de Fórmula (III-A) foi diluído a 303,03 micro-g/ml e a 612,24 micro-g/ml com RPMI 1640 mais 10 % de FBS. Para uma série (concentração final de um composto de Fórmula (III-A) = 250 micro-g/ml) 990 micro-l de solução de estoque de 303,03 micro-g/ml foi misturado com 10 micro-l de solução de estoque de polianião (ver abaixo) e de 100 micro-l deste foi adicionado a cada fundo quadruplo. Para as outras séries

(concentração final de um composto de Fórmula (III-A) = 500 micro-g/ml) 980 micro-l de 612,24 micro-g/ml de solução de estoque foi misturado com 20 micro-l de solução de estoque de polianião (ver abaixo) e 100 micro-l foi adicionado a cada fundo quadriplo.

Esta experiência foi designada para testar duas concentrações de um composto de Fórmula (III-A) (250 micro-g/ml e 500 micro-g/ml; concentração final) e para titular os vários compostos polianiónicos de modo que eles compreendem desde 0 % a 50 % dos compostos poliméricos totais no ensaio. Assim, polímero aniônico a 50 % é uma mistura 1:1 de um composto de Fórmula (III-A) e do polímero teste aniônico. Estas misturas foram conseguidas por diluição de cada uma das soluções de estoque de polímero polianiónico (3 % p/v; 30.000 micro-g/ml) com água esterelizada para a formação de soluções de 2,45 %; 2 %; 1,61 %; 1,29 %; 1 5; 0,75 %; 0,53 %; 0,33 %; e 0,16 % (p/v) de modo que por mistura de 10 micro-l (para um composto de Fórmula (III-A) as séries de 250 micro-g/ml) ou de 20 micro-l (para um composto de Fórmula (III-A) a séries de 500 micro-g/ml) obtem-se misturas em intervalos de 5 % desde 0 % de polianião a 50 % de polianião. Por exemplo, 20 micro-l de 0,53 % de polianião misturado com 980 micro-l de 612,24 micro-g/ml um composto de Fórmula (III-A) origina uma solução que tem 106 micro-g/ml de polianião e 600 micro-g/ml de um composto de Fórmula (III-A). O polianião torna 15 % do polímero total em solução deste exemplo.

Resultados: Carboximetilcelulose: Um composto de Fórmula (III-A) a 0 % de CMC causou ≈ 35 % e ≈ 40 % de libertação de ^{51}Cr das células a 250 micro-g/ml e de 500 mg/ml, respectivamente. Esta diminuição repete-se em ambas as séries por 35 % de CMC. Concomitantemente, o meio de turvez aumentou à medida que polímero em percentagem aumentou em ambas as séries.

Carbapol: Um composto de fórmula (III-A) a 0 % de Carbapol causou ≈ 32 % e ≈ 58 % de libertação de ^{51}Cr das células a 250 mg/ml respectivamente. Isto diminuiu perto do nulo em ambas as séries em 40 % de Carbapol. Concomitantemente, a turvez do meio aumentou à medida que a percentagem do polímero aumentou em ambas as séries.

Ácido poliacrílico: Um composto de Fórmula (III-A) a 0 % de ácido acrílico causou ≈ 30 % e ≈ 60 % de libertação de ^{51}Cr das células a 250 mg/ml e 500 mg/ml, respectivamente. Isto diminuiu a perto do nulo em ambas as séries em 30 % de ácido poliacrílico. Concomitantemente, a turvez do meio aumentou à medida que a percentagem de polímero aumentou em ambas as séries.

Goma arábica: Um composto de Fórmula (III-A) a 0 % de goma arábica causou ≈ 34 % e ≈ 42 % de libertação de ^{51}Cr das células a 250 mg/ml e 500 mg/ml, respectivamente. Isto diminuiu em ambas as séries com o aumento da percentagem de goma arábica. Concomitantemente, a turvez do meio aumentou ligeiramente à medida que a percentagem de polímero aumentou em ambas as séries.

EXEMPLO 5

Um composto de Fórmula (III-A) causou uma diminuição na adesão das células inicial à cultura de tecidos plástica que pode ser evitada por inclusão de carboximetilcelulose.

Células HEP-G2 (clone HLLC18) cresceram em frascos de cultura de tecidos, de 175 cm^2 usando técnicas padrão. As células foram metabolicamente marcadas com 60 micro-Ci ^3H -glicina durante 20 horas. A camada de células foi lavada 3 vezes com meio fresco para a remoção da radiomarca não incorporada. As células foram

enzimaticamente removidas dos frascos e suspensas a 2×10^5 células/ml num meio completo.

Uma solução de estoque de 100 micro-g/ml de um composto de fórmula (III-A) foi feita em meio de cultura de tecido através de dissolução de 5 mg de composto de Fórmula (III-A) em 5 ml de meio de cultura de tecidos. Esta solução de estoque foi ainda diluída em meio de cultura de tecidos para originar 2 ml de soluções de estoque de trabalho de um composto de Fórmula (III-A) a 400, 300, 200, 100, 40, e 20 micro-g/ml. Uma solução de 2000 micro-g/ml de estoque de carboximetilcelulose foi feita em meio de cultura de tecidos por dissolução de 20 mg de carboximetilcelulose em 10 ml de meio. Esta foi diluída por um factor de 10 em meio de cultura de tecidos, para originar uma solução de estoque de trabalho de 200 micro-g/ml.

A cada fundo de 24 pratos de cultura de tecidos, 250 micro-l de meio ou 250 micro-l de solução de estoque de trabalho, 200 micro-g/ml de carboximetilcelulose foram adicionados. Depois, a cada fundo, 250 microlitros de cada meio ou 250 microlitros das várias soluções de estoque de um composto de Fórmula (II-A) foi adicionado. Finalmente, a cada fundo, 500 micro-l da suspensão de células anterior foi adicionado, o prato foi lentamente rodopiado e colocado num incubador de cultura de tecidos humidificado que continha 95 % de ar/5 % de CO_2 aos 37°C durante 3 horas. No final da incubação, os pratos foram rodopiados 10 vezes, inclinados a um ângulo de 45° , e o meio foi aspirado. Células presas foram dissolvidas por adição de 1 ml de NaOH 0,1 N. 800 micro-l deste foi transferido para um frasco de cintilação, 200 micro-l de HCl 4N foi adicionado e os frascos sofreram contagem para a radioactividade. Esta radioactividade foi comparada à obtida a partir de 80 % de um número de células que foram inicialmente colocadas nos pratos. Assim as condições testadas consistiram em duas séries:

uma em que os efeitos de 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100, e 250 micro-g/ml de um composto de Fórmula (III-A) foram examinadas; e a segunda em que os efeitos das mesmas concentrações de um composto de Fórmula (III-A) mais 50 micro-g/ml de carboximetilcelulose foram examinadas.

Resultados: Um composto de Fórmula (III-A) diminuiu a eficiência da deposição inicial numa dose de uma maneira dependente, como se segue (0 micro-g/ml a 250 micro-g/ml como descrito acima): 86 %, 82 %, 86 %, 86 %, 83 %, 74 %, 76 %, 67 %. A diminuição foi significativa em concentrações de composto de Fórmula (III-A) iguais a e superiores do que 75 micro-g/ml. Na presença de 50 micro-g/ml de carboximetilcelulose e das mesmas concentrações do composto de Fórmula (III-A) anterior, as eficiências da deposição foram: 85 %, 84 %, 85 %, 85 %, 75 %, 80 %, 82 %, e 83 %.

Exemplo 6

Características físicas das soluções de Polímeros Catiônicos de composto de Fórmula (III) quando misturadas com Soluções de Goma Arábica.

Um solução de estoque de um composto de Fórmula (III-A) foi feita em água a 50 mg/ml (5 % p/v) por dissolução de 190 mg de um composto de fórmula (III-A) em 3,8 ml de água desionizada. A solução era transparente. Uma solução de estoque de goma arábica (um exemplo de um polímero aniônico) foi feita em água em 50 mg/ml (5 % p/v) por dissolução de goma arábica em 8,27 ml em água desionizada. Esta solução era transparente. 50 micro-l de água foi pipetada para 6 pequenos frascos de vidro e 50 micro-l de um composto de fórmula (III-A) foi pipetado para 6 frascos adicionais. Isto originou 2 séries de frascos que continham água

e composto de fórmula (III-A). O frasco 1 de cada série depois recebeu 150 micro-l de água, o frasco 2 133,3 micro-l de água, o frasco 3 125 micro-l de água, o frasco 4 100 micro-l de água, o frasco 5 50 micro-l de água, e o frasco 6 nenhuma adição. Depois, nenhuma adição foi feita ao frasco 1, 16,67 micro-l de goma arábica foi adicionado ao frasco 2, 25 micro-l de goma arábica ao frasco 3, 50 micro-l de goma arábica ao frasco 4, 100 micro-l de goma arábica ao frasco 5, e 150 micro-l de goma arábica ao frasco 6. Um frasco adicional recebeu unicamente 200 micro-l de goma arábica. Esta duas séries de 6 frascos foram obtidas contendo desde 0 a 37,5 mg/ml de goma arábica sozinha ou desde 0 a 37,5 mg/ml de goma arábica + 12,5 mg/ml de um composto de Fórmula (III-A). O último frasco continha unicamente 50 mg/ml de goma arábica. Todos os frascos foram totalmente misturados com vórtice e foram depois observados.

Resultados: Todos os frascos que continham goma arábica sozinha permaneceram transparentes. Os frascos com nenhuma goma arábica e 4,17 mg/ml de goma arábica (um composto de Fórmula (III-A):GA 2:1) permaneceram transparentes. O frasco que continha goma arábica a 6,25 mg/ml (um composto de Fórmula (III-A): GA 2:1) estava ligeiramente nublado, o frasco que continha goma arábica a 12,5 mg/ml (um composto de Fórmula (III-A):GA 1:1) estava nublado, e os frascos que continham 25 mg/ml e 37,5 mg/ml de goma arábica (um composto de Fórmula (III-A):GA 1:2 e 1:3) demonstraram franca precipitação.

EXEMPLO 7

A ordem de adição da solução de polímero catiónico ou da solução de polímero aniónico não é importante para a formação do precipitado.

As soluções de estoque foram as mesmas das usadas no Exemplo 6. 100 micro-l de goma arábica foi adicionado ao frasco 1 e 100 micro-l de um composto de Fórmula (III-A) foi adicionado ao frasco 2. 100 micro-l de um composto de Fórmula (III-A) foi depois adicionado ao frasco 1 e 100 micro-l de goma arábica foi adicionado ao frasco 2. Os frascos foram misturados e depois observados.

Resultados: Ambos os frascos tornaram-se nublados.

EXEMPLO 8

A solubilidade de misturas 1:1 de um composto de Fórmula (III-A) e de goma arábica em água são dependentes da concentração do polímero.

Uma solução a 10 % (p/v) de goma arábica foi feita em água por dissolução de 10 g de goma arábica num volume final de 100 ml de água desionizada. Uma solução a 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) foi feita numa solução a 10 % (p/v) de goma arábica por dissolução de 5 g de um composto de Fórmula (III-A) a um volume final de 50 ml. A solução resultante era transparente. 200 micro-l desta solução foi misturada com 200 micro-l de água desionizada e a solução resultante (5 % p/v de cada polímero) era transparente. A adição de 50 micro-l mais de água desionizada (4,44 % p/v de cada polímero) começou a tornar-se nublada. 50 micro-l adicionais de água desionizada (4,0 % p/v de cada polímero) foi adicionado e a solução tornou-se nublada.

EXEMPLO 9

Solubilidade de misturas 1:1 de um composto de Fórmula

(III-A) e de goma arábica em água é dependente da concentração e da força isotônica.

Uma solução a 10 % (p/v) de goma arábica foi feita em água por dissolução de 10 g de goma arábica num volume final de 100 ml de água desionizada. Uma solução de 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) foi feita numa solução a 10 % (p/v) de goma arábica por dissolução de 5 g de um composto de Fórmula (III-A) num volume final de 50 ml. A solução resultante era transparente. 200 micro-l desta solução foi misturada com 200 micro-l de NaCl 154 mM e a solução resultante (5 % p/v de cada polímero; NaCl 77 mM) eram transparente. A solução depois de adição de 200 micro-l mais NaCl 154 mM (3,33 % p/v de cada polímero; NaCl 103 mM) permaneceu transparente. 200 micro-l adicionais de NaCl 154 mM (2,5 % p/v de cada polímero; NaCl 116 mM) tornou a solução ligeiramente nublada. 200 micro-l adicionais de NaCl 154 mM (2,0 % p/v de cada polímero; NaCl 123 mM) também originou uma solução ligeiramente nublada. NaCl 154 mM adicional (200 micro-l e 400 micro-l levou cada polímero a 1,67 % e 1,43 % p/v e o NaCl a 128 mM e 132 mM respectivamente) originou soluções que eram turvas.

EXEMPLO 10

Diminuição de pH leva o composto precipitado de Fórmula (III-A) e o precipitado de goma arábica novamente para a solução.

Uma solução a 10 % (p/v) de goma arábica foi feita em água por dissolução de 10 g de goma arábica num volume final de 100 ml de água desionizada. Uma solução a 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) foi feita numa solução a 10 % (p/v) de goma arábica por dissolução de 5 g de um composto de Fórmula (III-A) num volume final de 50 ml. A solução resultante era

transparente. Um ml da solução anterior foi misturada com 3 ml de água desionizada e a solução tornou-se turva. Três aliquotas de 1 ml de solução turva foram misturadas com 10 micro-l de NaOH 1N, HCl 1N, ou NaCl 1 M (resultando numa concentração final de 10 mM para a base, ácido, ou sal). Unicamente a amostra misturada com HCl voltou atrás a uma solução transparente. O pH desta solução foi aproximadamente de 3 (foi medido por tiras teste de pH).

EXEMPLO 11

Misturas 1:1 de um composto de Fórmula (III-A) e de goma arábica permanece solúvel em soluções de forças iônicas aumentadas.

Uma solução a 10 % (p/v) de goma arábica foi feita em água por dissolução de 10 g de goma arábica num volume final de 100 ml de água desionizada. Uma solução a 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) foi feito em solução a 10 % (p/v) de goma arábica por dissolução de 5 g de um composto de Fórmula (III-A) num volume final de 50 ml. A solução resultante era transparente. Tampão de fosfato de Na 500 mM, pH 7,1 foi preparado por mistura de soluções 500 mM de fosfato de sódio dibásicas (4 ml) e monobásicas (1 ml) em conjunto. Esta solução de fosfato de Na foi ainda diluída com água para originar concentrações de 400 mM, 300 mM, 200 mM, 100 mM, 80 mM, 60 mM, 40 mM, e 20 mM. 750 micro-l de cada uma destas foi misturada com 250 micro-l de um composto a 10 % (p/v) de Fórmula (III-A) em goma arábica a 10 % (p/v) de modo que as soluções resultantes foram 2,5 % (p/v) de cada polímero e 375 mM, 300 mM, 225 mM, 150 mM, 75 mM, 60 mM, 45 mM, 30 mM, e 15 mM em fosfato de Na.

Resultados: Com as concentrações de fosfato de Na superiores do que 75 mM, as soluções resultantes eram

transparentes. Com concentrações de fosfato de Na de 75 mM e de 60 mM as soluções eram ligeiramente nubladas, e com todas as concentrações de fosfato de Na inferiores, as soluções eram muito nubladas.

EXEMPLO 12

A força iônica aumentada permite misturas 1:1 de um composto de Fórmula (III-A) e de carboximetilcelulose que permanecem solúveis depois de diluição.

Soluções de estoque de um composto de Fórmula (III-A) e de carboximetilcelulose foram feitas em água a 50 mg/ml (5 % p/v) por dissolução de 190 mg de um composto de Fórmula (III-A) em 3,8 ml de água desionizada ou 353 mg de carboximetilcelulose em 7,06 ml de água desionizada. Estas soluções eram transparentes. Cada uma destas soluções de estoque foi ainda diluída a uma concentração final de 2,5 % (p/v) por mistura de 500 micro-l do estoque com ou 500 micro-l de água desionizada ou 500 micro-l de tampão de fosfato de Na 500 mM, pH 7,1. Disto resultou 2 soluções de cada polímero (2,5 % p/v) ou em água desionizada ou em fosfato de Na 250 mM. 100 micro-l de cada solução de um composto de Fórmula (III-A) foi misturada com 100 micro-l de ou carboximetilcelulose feita em água desionizada ou de tampão de fosfato de Na. Todas as quatro misturas continham 1,25 % (p/v) de cada polímero, e ou 0 mM, 125 mM (dois tubos), ou 250 mM de fosfato de Na.

Resultados: O tubo com fosfato de Na 0 mM originou um precipitado, os tubos com fosfato de Na 125 mM estavam nublados, enquanto que o tubo com fosfato de Na 250 mM estava muito ligeiramente nublado.

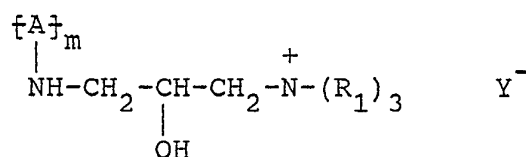
EXEMPLO 13

Soluções de estoque de um composto de Fórmula (III-A) e de goma arábica foram feitas a 100 mg/ml (10 % p/v) em água, por dissolução de 5 g de cada num volume final de 50 ml de água desionizada. 10 ml de cada uma delas foram misturadas em conjunto com uma solução límpida resultante (5 % p/v de cada polímero). Depois de adição de 30 ml de água desionizada, um precipitado foi formado (2 % p/v de cada polímero). Este tubo foi centrifugado a 15.000 x g durante 15 minutos e aproximadamente 2 ml de precipitado formou um pelete. Noutra experiência, 10 ml de 10 % (p/v) de um composto de Fórmula (III-A) e de 20 ml de 10 % (p/v) de goma arábica foram misturados em conjunto e uma solução turva resultou (3,33 % p/v de um composto de Fórmula (III-A) e 6,66 % p/v de goma arábica). 20 ml de água desionizada foi adicionado e a solução permaneceu turva (2 % p/v de um composto de Fórmula (III-A) e 4 % de goma arábica). Este tubo foi centrifugado a 15.000 x g durante 15 minutos e aproximadamente 7,5 ml de precipitado foi tornado em pelete.

Deve ser entendido que este invento não está limitado aos modos de realização particulares aqui descritos, mas várias variações e modificações podem ser feitas sem sair do espírito ou do âmbito deste conceito como definido pelas reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1ª. - Processo para a preparação de sais de amónio quaternário de citosano que possuem actividade hipocolesterolémica, caracterizado por compreender o contacto de um polianião solúvel em água, fisiologicamente aceitável, com

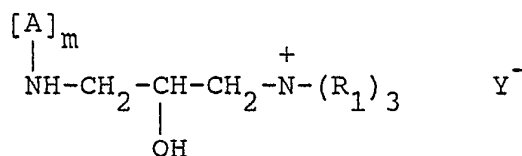


Fórmula (III)

em que A representa a unidade monomérica de um citosano, m é um número inteiro entre 100 e 1.000, R₁ é alquilo C₁-C₄ linear, e Y⁻ é um contra-íão orgânico monomérico ou inorgânico solúvel em água, fisiologicamente aceitável.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o referido contacto ocorrer numa solução aquosa.

3ª. - Método para a obtenção de uma composição farmacêutica, caracterizado por compreender a dissolução de



Fórmula (III)

em que A representa a unidade monomérica de um citosano, m é um número inteiro entre 100 e 1.000, R_1 é alquilo C_1-C_4 linear e Y^- é um contra-íão orgânico monomérico ou inorgânico solúvel em água, fisiologicamente aceitável, e de um polianião solúvel em água fisiologicamente aceitável, num solvente prótico comum;

a precipitação deste sal de policatião-polianião formado;

a recuperação do referido sal de policatião-polianião;
e

a adição de sal inorgânico suficiente de modo que o referido sal de policatião-polianião seja substancialmente solúvel depois de mistura num solvente aquoso.

4ª. - Método para a obtenção de uma composição de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a referida precipitação ocorrer por redução da força iónica da solução.

5ª. - Método para a obtenção de uma composição de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a referida força iónica ser reduzida por diluição da referida solução.

Lisboa, 7 de Outubro de 1991



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA