

(11) *Número de Publicação:* **PT 90464 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C07H019/167 A

A61K031/70 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) *Data de depósito:* **1989.05.04**

(30) *Prioridade:* **1988.05.05 US 190694**

(43) *Data de publicação do pedido:*
1989.11.30

(45) *Data e BPI da concessão:*
06/94 1994.06.08

(73) Titular(es):

**SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION
10666 NORTH TORREY PINES ROAD, LA JOLLA
CALIFÓRNIA 92037-1093 US**

(72) Inventor(es):

**MICHAEL GOODMAN US
ROBERT CHEN US**

(74) Mandatário(s):

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT**

**(54) Epígrafe: PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DA GUANINA IMUNO-ESTIMULANTES E DE
COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS QUE OS CONTÊM**

(57) Resumo:

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 90 464

REQUERENTE: SCRIPPS CLINIC AND RESERARCH FOUNDATION ,
norte-americana (Estado de California) ,
com sede em 10666 North Torrey Pines Road,
La Jolla California 92037, Estados Unidos
da América.

EPÍGRAFE: " PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DA
GUANINA IMUNO-ESTIMULANTES E DE COMPOSI
ÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM "

INVENTORES: Michael Goodman e Robert Chen.

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. com o nº190.694
em 05 de Maio de 1988.

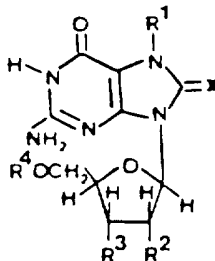
"Processo de preparação de derivados de guanina imuno-estimulantes e de composições farmacêuticas que os contêm"

para que

SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION,
pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se a um processo de preparação de derivados de nucleósido-guanosina 7,8-di-substituído com a fórmula



onde

X é O, S, Se ou NCN;

R¹ é um radical hidrocarbilo substituído por heteroátomo, possuindo um comprimento superior ao de um grupo etilo e inferior ao de um grupo decilo, e que está livre de carga iónica aos valores de pH fisiológicos;

R² e R³ são radicais iguais ou diferentes seleccionados do grupo consistindo em hidrogénio, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior e benzoxilo, ou R² e R³ constituem juntos um radical alquili denodioxilo inferior;

R⁴ é um radical seleccionado do grupo consistindo em hidrogénio, alcanoílo inferior e benzoílo; e dos seus sais de adição de base, não tóxico, farmacêuticamente aceitáveis, caracterizado por compreender os passos de

-2-

a) se reagir 1-amino-8-oxoguanosina com um agente de alquilação que é um composto hidrocarbilo substituído por heteroátomo possuindo um comprimento superior ao de um grupo etilo e inferior ao de um grupo decilo e que está livre de carga iônica a valores de pH fisiológicos para formar um produto 1-amino-7-substituído-8-oxoguanosina;

b) isolar o produto do passo a)

c) dissolver o referido produto isolado do passo b) em HCl concentrado para formar uma solução;

d) misturar a referida solução do passo c) com nitrito de sódio aquoso e mantendo a mistura resultante durante um período de tempo suficiente para desaminar o grupo 1-amino da referida 1-amino-7-substituída-8-oxoguanosina; e

e) isolar o produto 7-substituído-8-oxoguanosina resultante;

ou

a') reagir 8-tioxoguanosina com um agente de alquilação que é um composto hidrocarbilo substituído por um heteroátomo possuindo um comprimento superior ao de um grupo etilo e inferior ao de um grupo decilo e que está livre de carga iônica a valores de pH fisiológicos para formar uma hidrocarbíl-8-tioxoguanosina substituída em 7 por heteroátomo; e

b') se isolar o produto hidrocarbíl-8-tioxoguanosina substituída em 7 por heteroátomo, resultante;

ou

a'') se reagir o produto isolado do passo b') com um agente de S-alquilação para formar um produto S-alquilado;

b'') isolar o referido produto S-alquilado;

c'') reagir o referido produto S-alquilado com seleneto de sódio para formar um produto hidrocarbíl-8-selenoxoguanosina substituído em 7 por heteroátomo; e

d'') se isolar o referido produto do passo c'');

-3-

ou

a''') se reagir o produto isolado do passo b'') com cianamida e com hidreto de sódio para formar um produto hidrocarbíl-8-cianiminoguanosina substituída em 7 por heteroátomo;

e

b''') se isolar o referido produto do passo a''');

ou

a''''') se reagir qualquer dos produtos isolados nos passos e), b'), d'') ou b''') com um composto alquilidenodioxilo inferior, com um composto acilo inferior ou benzoílo para formar um produto no qual R^2 , R^3 e R^4 são como acima definidos; e

b''''') se isolar o produto do passo a''''').

Estes derivados de nucleósido guanosina 7,8-di-substituído são agentes melhoradores da resposta imunitária muito potente, em células humanas e animais.

MEMÓRIA DESCRITIVACampo da invenção

O presente invento refere-se ao processo de preparação de compostos melhoradores da imuno-resposta (imuno-estimulantes) e, mais particularmente, ao processo de preparação de derivados de guanina-nucleósido que estão substituídos nas posições 7 e 8 do anel de guanina, bem como ao processo de preparação de composições contendo esses derivados e a métodos que os utilizam.

Antecedentes da Invenção

Um imuno-sistema animal compreende numerosos elementos que actuam separadamente e/ou em conjunto para contractuar, para eliminar ou para neutralizar, substâncias que são reconhecidas por esse sistema como estranhas ao animal hospedeiro. Geralmente, mas não necessariamente, a substância reconhecida como estranha pelo imuno-sistema tem uma origem que é exógena em relação ao animal hospedeiro. Exemplos destas substâncias exógenas são as bactérias infecciosas e os sub-produtos da sua actividade celular, partículas de vírus e as suas proteínas, proteínas injectadas por picadas de insectos e similares. Em doenças auto-imunes, tais como a artrite reumatóide, o imuno-sistema do hospedeiro reconhece como estranhas as proteínas produzidas no hospedeiro, ou proteínas auto-produzidas.

Os principais intervenientes do imuno-sistema são os leucócitos, que incluem linfócitos de origem tímica (células T), linfócitos produzidos na medula óssea (células B), neutrófilos que, inter alia produzem enzimas que fabricam agentes oxidantes, tais como peróxido de hidrogénio que têm efeitos citotóxicos nas bactérias, e macrofagos que apresentam a substância estranha ou antigénio às células T, bem como produzem uma proteína designada por interleucina-1 que auxilia a transformação das células T em células T auxiliares. O complemento, que é uma mistura complexa de proteínas que actua duma forma orde-

-5-

nada em cascata na substância estranha, desempenha também um papel importante nas imuno-respostas.

As células B podem distinguir-se das células T, inter alia, pela presença de imunoglobulinas nas suas superfícies de membrana. As imunoglobulinas funcionam como anticorpos.

Existem cinco classes conhecidas de imunoglobulinas, identificadas por IgA, IgD, IgE, IgG e IgM com base em cinco proteínas de cadeia pesada, antigenicamente diferentes que, em parte, constituem a molécula de imunoglobulina. As células B compreendem também marcadores de célula que não são imunoglobulinas, que incluem, um receptor de complemento (CR), um receptor para a porção Fc da imunoglobulina (FCR), antígenos associados à região I (Ia), e um conjunto de antígenos de diferenciação (Lyt 1-7) que são identificados por todos os anti-soros e que estão correlacionados com vários aspectos de maturação e activação das células B. Estes marcadores são úteis na identificação fenotípica das células B.

Enquanto que as imunoglobulinas das células B actuam na substância estranha, ou antígeno, crê-se que as células T, e particularmente as células T auxiliares são necessárias para estimular as células B a dividirem-se e a diferenciarem-se em células segregadoras de anticorpos para a imunidade humoral. As células T supressoras contribuem para a regulação da imunidade humoral, enquanto que as células T citotóxicas e os mediadores de células T de hiper-sensibilidade do tipo retardado são os principais intervenientes de imunidade, por células.

As células T incluem antígenos designados por Lyt 1, 2 e 3, bem como por L3T4, que estão relacionados com as funções das células T. Os precursores de células T auxiliares são do fenótipo Lyt 1⁺, 2⁻, 3⁻, L3T4T. São estas células que participam normalmente na activação e na regulação das células B.

É conhecido que as células T auxiliares auxiliam a activação e a diferenciação das células B segregando imunoglobulina após as células B receberem uma primeira mensagem do agente antígeno activante. Contudo, o modo pelo qual as células T for-

-6-

necem a segunda mensagem para a proliferação, activação e diferenciação às células B, é uma matéria controversa.

O monofosfato de guanosina-3',5'-cíclico (cGMP) tem sido implicado com um agente natural que fornece a segunda mensagem requerida para a proliferação de células B. Tem-se verificado que o monofosfato de 8-bromoguanosina-3',5'-cíclico (8-BrcGMP) é um mitogeno de linfócito intracelular sintético fraco.

A imuno-resposta pode ser modificada por supressão artificial (imuno-supressão) ou por melhoria artificial (imuno-potenciação ou imuno-estimulação). A imuno-supressão i.e., uma menor resposta induzida artificialmente, pode ser conseguida por seis métodos gerais:

(1) administração de antigénio, (2) administração de anti-soros ou anticorpos específicos, (3) uso de outros reagentes biológicos tais como anti-soros anti-linfócitos, (4) uso de drogas ou hormonas, (5) radiação e (6) remoção cirúrgica do tecido linfóide. A imuno-potenciação pode incluir a administração de um agente que efectua um aumento na velocidade à qual a imuno-resposta se desenvolve um aumento na intensidade ou no nível da resposta, um prolongamento da resposta, ou o desenvolvimento de uma resposta a uma substância que, de outro modo, seria não-imunogénica.

Os agentes conhecidos que aumentam as imuno-respostas são geralmente designados por adjuvantes e podem ser incluídos em duas categorias gerais: (1) os que conferem uma potenciação geral; i.e., substâncias que aumentam as imuno-respostas tanto celulares como humorais para uma grande variedade de antigénios, e (2) os que conferem uma potenciação específica; i.e., substâncias que aumentam respostas específicas apenas a certos antigénios.

As substâncias que podem actuar como adjuvantes podem ser agrupadas nas categorias seguintes: (1) emulsões de água-em-óleo, p.e., o adjuvante de Freund, (2) polinucleótidos sintéticos, (3) hormonas, drogas e nucleótidos cíclicos, (4) endotoxinas, (5) linfoquinas e monoquinas proteínáceas tais como interleuquinas.

-7-

O factor de transferência, um extracto de leucócitos dialisável (DLE) obtido a partir de leucócitos periféricos humanos é uma substância, capaz de potenciar especificamente a imuno-resposta. Tem sido publicado que o factor de transferência exibe alguma eficácia em pacientes com imunodeficiências e uma possível eficácia em pacientes cancerosos e em pacientes com imuno-deficiências limitadas. Contudo, ainda é preciso aprender muito acerca desta substância particular.

Em algumas doenças e condições fisiológicas tais como a SIDA, agamaglobulinemias X-ligadas, senescência e imuno-supressão induzida por drogas, a activação e a diferenciação de células B estão ausentes e/ou existem apenas a um nível reduzido, diminuindo deste modo a imuno-resposta do hospedeiro. Estas doenças e condições são representativas de estados imuno-suprimidos. Aqui, a activação e diferenciação melhoradas, se se puderem efectuar tendem a minorar beneficemente a manifestação da doença e/ou a melhorar a condição do paciente.

Um estado imuno-potenciado pode ser ilustrado pela condição do organismo após a vacinação. Aqui, a imuno-resposta está já aumentada devido a uma resposta antigénica, mas pode ser beneficamente melhorada ainda mais para se obter um maior grau e/ou uma maior duração da imunidade.

A Patente dos E.U.A. nº. 4 539 205 transmitida, de Goodman e Weigle descreve a modulação de respostas celulares animais com derivados de guanina 8-substituídos ligados 9-1' a uma aldose com 5 ou 6 átomos de carbono na cadeia de aldose (anel). As modulações celulares que se descrevem nessa patente referem-se, na sua maior parte, a imuno-modulação, tal como adjuvantividade na produção de imuno-respostas primárias e secundárias. Descreve-se também a actividade contra certas condições neoplásticas, bem como, a actividade de substituição de células T, uma actividade do tipo IL-1 em timócitos, e a indução da libertação de enzimas lipossómicas de neutrófilos. Nessas moléculas, os substituintes na posição 8 têm efeitos indutores de atracção de electões em relação ao hidrogénio. Assim, descreveram-se como

-8-

úteis substituintes tais como halogéneo, mercapto e o seu tantómero tioxo, acilmercapto, alquilsulfureto, nitro, ciano, ceto, halometilo e metilenoxialquilo e similares enquanto se verificou que substituintes doadores de electrões, tais como um grupo amino, eram inactivos.

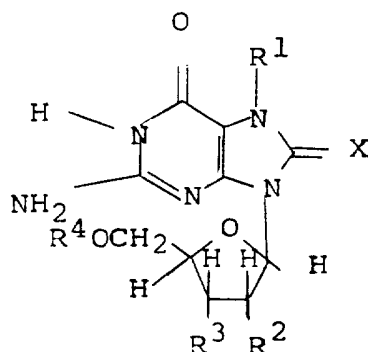
Adicionalmente, a Patente dos E.U.A. nº 4 643 992, transmitida, e o seu pedido de patente Europeia nº. 83306791.1, publicado, correspondente, descrevem ainda o uso de derivados de 8-hidroxiguanina (8-oxoguanina), 7-metil-8-oxoguanina e 7-metil-8-tioxoguanina na modulação de respostas celulares animais. Na Patente dos E.U.A. nº 4 643 992 descrevem-se também outros resultados usando os derivados de guanina que se descrevem na Patente dos E.U.A. nº. 4 539 205, bem como resultados similares usando derivados de guanina que se descrevem pela primeira vez nessa patente.

Têm também sido publicados vários artigos e capítulos de livros por alguns dos presentes inventores e pelos seus colaboradores, relativos ainda a outros aspectos dos compostos que se descrevem e reivindicam na Patente dos E.U.A. nº. 4 643 992. Exemplos desses artigos publicados são Goodman, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 179:479 (1985); Goodman, J. Immunol., 136:3335 (1986); Goodman e Weigle em Purine Metabolism In Man, Part B, Nyhan e Thompson, eds., Plenum Press, New York, pág. 451 e 443 (1986); Goodman e Weigle, J. Immunol., 135:3284 (1985); Goodman e Wolfert, Immunol. Res., 5:71 (1986); Goodman, J. Immunol., 137:3753 (1986); e Goodman e Hennen, Cell. Immunol., 102:395 (1986).

Breve Sumário da Invenção

Os derivados de guanina-nucleósido 7,8-dissubstituídos (derivados de guanina) são utilizados para melhorar uma imuno-resposta em células humanas e animais. Os derivados de guanina-nucleósido substituídos têm uma estrutura que corresponde à fórmula

-9-



onde X é O, S, Se ou NCN; R¹ é um radical hidrocarbilo substituído com heteroátomos, que tem um comprimento superior ao de um grupo etilo e inferior ao de um grupo decilo, e que está isento de carga iónica aos valores de pH fisiológicos; R² e R³ são radicais iguais ou diferentes seleccionadas entre o grupo consistindo de hidrogénio, hidroxilo, alcóxido de cadeia curta, alcenoiloxido de cadeia curta e benzoiloxido, ou R² e R³ constituem juntos um radical alquilidenodioxido de cadeia curta; e R⁴ é seleccionado entre o grupo consistindo de hidrogénio, alcenoiloxido de cadeia curta e benzoiloxido. Os derivados de guanosina preferidos do presente invento são aqueles onde X é O ou S e R¹ tem um comprimento total (incluindo o heteroátomo substituinte superior ao do etilo e inferior aproximadamente ao do heptilo. Derivados de guanosina particularmente preferidos são a 7-(2-cloroetil)-8-oxoguanosina, a 7-carbetoximetil-8-oxoguanocina, a 7-carbamóilmetil-8-oxoguanosina, a 7-metoxietil-8-oxoguanosina, a 7-(4-nitrobenzil)-8-oxoguanosina, a 7-(4-metoxibenzil)-8-oxoguanosina e a 7-(2,3-di-hidroxipropil)-8-oxoguanosina. São também contemplados os sais de adição de base, não tóxicos e farmacêuticamente aceitáveis, destes compostos.

O presente invento contempla também uma composição melhoradora de imuno-resposta que contém uma quantidade diluente de um transportador fisiologicamente tolerável conjuntamente, com uma quantidade eficaz potenciante (ou imuno-estimulante) de um derivado de guanina-nucleósido, substituído com heteroátomos, anteriormente referido como ingrediente activo.

E também contemplado um método de melhorar uma imuno-res

-10-

posta e particularmente uma imuno-resposta específica de anti-génio. Aqui, põem-se os leucócitos em contacto num meio aquoso i.e., em cultura (in vitro) ou in vivo, com uma composição con-tendo uma quantidade imuno-estimulante de um derivado de guani-na-nucleósido anteriormente descrito. Mantém-se o contacto en-tre a composição e os leucócitos por um período de tempo sufi-ciente para que as células postas em contacto manifestem a me-lhoria da sua imuno-resposta. Os leucócitos postos em contacto são preferivelmente linfócitos B.

O presente invento tem vários benefícios e vantagens.

Um benefício saliente do presente invento reside no fa-cto de os seus compostos serem geralmente mais eficazes; i.e., conferem uma resposta similar para uma dose menor ou conferem uma resposta melhorada para uma dada dose, do que os imuno-es-timulantes de guanossina anteriormente conhecidos.

Uma vantagem do presente invento consiste no facto de o uso de uma das suas composições poder fornecer a segunda mensa-gem requerida para a activação e diferenciação dos linfócitos B, em resposta a uma primeira mensagem (antigénica).

Outra vantagem do presente invento consiste no facto de se poder conseguir a imuno-resposta melhorada tanto na presen-ça como na ausência de actividade de células T auxiliares. As-sim, nota-se uma imuno-resposta melhorada em sistemas dependen-tes de células T e em sistemas independentes de células T.

Outra vantagem do presente invento reside no facto de se poderem melhorar e/ou minorar condições, imuno-suprimidas ou imuno-deficientes, e manifestações de doença particulares pelo uso da invenção.

Ainda outros benefícios e vantagens da invenção serão evidentes para os peritos na arte a partir da descrição que se segue.

Usam-se aqui descrições antropomórficas tais como o en-vio e a recepção de mensagens por e para produtos químicos e células, para propósitos descritivos como auxílios para a com-

-11-

preenção dos fenómenos observados.

Descrição Detalhada da Invenção

I. Introdução

O presente invento contempla um agente melhorador da imuno-resposta (imuno-estimulante) que estimula o imuno-sistema do mamífero hospedeiro ao qual é administrado, bem como leucócitos numa cultura de células. A imuno-estimulação particularmente contemplada é predominantemente específica do antigénio para o antigénio imunizante.

Ao estudar os efeitos de alguns derivados de guanosina nitogénicos conhecidos, p.e., o monofosfato de guanosina-3',5'-cíclica e o seu derivado de 8-bromo, verificou-se que uma nova classe de derivados de guanina-nucleósido de baixo peso molecular, quando presentes numa quantidade eficaz como ingrediente activo de uma composição contendo uma quantidade diluente de um transportador fisiologicamente tolerável, tinha efeitos notáveis na modulação de respostas de células de mamíferos. A melhoria das imuno-respostas humorais específicas de antigénio, que resultou numa adjuvantividade potente, a actividade do tipo factor de substituição de células T e a actividade de imuno-reconstituição são exemplos particulares de respostas celulares que se verificou serem moduladas. As Patentes dos E.U.A. nº 4 539 205 e nº 4 643 992 descrevem esses compostos e os seus métodos de utilização.

Tem-se verificado que os compostos do presente invento são surpreendentemente mais activos do que os compostos das duas patentes anteriores. As constatações de uma actividade melhorada foram surpreendentes por um certo número de razões.

O composto mais activo que se descreveu nas patentes dos E.U.A. anteriores foi a 7-metil-8-oxo-guanosina (7m8OGuo), tanto como mitogeno de leucócitos como ^{como} adjuvante específico de antigénio. Tal como aqui a seguir se descreve, a mitogenicidade e a adjuvantividade são fenómenos que não estão necessariamente relacionados.

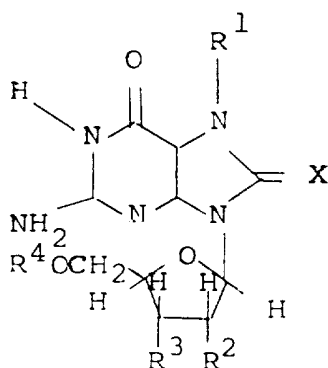
-12-

Em face dos resultados subsequentemente obtidos foi surpreendente que a 7m8oGuo exibisse uma actividade melhorada em relação a compostos tais como a 8-hidroxiguanosina (designada como o seu tautómero, 8-oxoguanosina; 8oGuo), ou a 8-mercaptoguanosina (designada por 8MGuo ou como o seu tautómero 8-tioxoguanosina). Mais especificamente, resultados subsequentes, alguns dos quais são aqui depois apresentados, revelaram que a actividade (tanto a mitogenicidade como a adjuvantividade) de uma série de guanosinas 8-substituídas diminui com o aumento do tamanho do grupo substituintes na posição 8.

Assim, uma vez que o grupo metilo da 7m8oGuo está ligado ao anel de guanosina na posição adjacente à posição 8 onde se verificou a existência de um efeito da dimensão do substituinte, seria de esperar que a adição desse grupo ou de qualquer grupo na posição 7, onde anteriormente não havia qualquer substituinte, provocasse também uma diminuição na actividade, meramente em virtude da molécula em questão ser maior numa posição adjacente à posição do anel sensível à dimensão do substituinte. A adjuvantividade melhorada de compostos do presente invento com substituintes ainda maiores na posição 7 do anel de guanosina em relação a 7m8oGuo foi ainda mais surpreendente.

II. Os Compostos

Os compostos imuno-estimulantes aqui contemplados são derivados de guanina-nucleósido 7,8-di-substituídos (também aqui designados por guanosinas ou por derivados de guanosina). Estes compostos tem estruturas que correspondem à fórmula I que a seguir se apresenta



I

-13-

onde X é O, S, Se ou NCN;

R^1 é um radical hidrocarbilo substituído com heteroátomos, com um comprimento total superior ao de um grupo etilo e inferior ao de um grupo decilo, e isento de uma carga iônica aos valores de pH fisiológico;

R^2 e R^3 são radicais iguais diferentes seleccionados entre o grupo consistindo de hidrogénio, hidroxilo, alcóxido de cadeia curta, alcanoilóxido de cadeia curta e benzóxido, ou R^2 e R^3 formam juntos um radical alquilidenodioxido de cadeia curta; e

R^4 é um radical seleccionado entre o grupo consistindo de hidrogénio, alcanoilo de cadeia curta e benzoilo.

É de notar que o grupo ribosilo na fórmula anterior pretende ser mostrado ligado na posição 1, desse anel estando a ligação na configuração beta. Adicionalmente deve entender-se que está pressuposta a forma D do grupo ribosilo.

Os derivados de guanosina preferidos são aqueles onde X é O ou S, R^1 tem um comprimento superior ao de um grupo etilo e aproximadamente inferior ao de um grupo heptilo, e R^2 e R^3 são diferentes de alquilidenodioxido de cadeia curta. Na prática particularmente preferida, X é O, R^1 é seleccionado entre o grupo consistindo de 2-cloroetilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), carbetoimetilo ($-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$), carbamoilmetilo ($-\text{CH}_2\text{CONH}_2$), metoxietilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 4-nitrobenzilo, 4-metoxibenzilo, e 2,3-di-hidroxipropilo, R^2 e R^3 são hidroxilo, e R^4 é hidrogénio. Muito preferivelmente, X é O, R^1 é 4-nitrobenzilo ou 2-cloroetilo, R^2 e R^3 são hidroxilo e R^4 é hidrogénio.

Tal como anteriormente se referiu, um radical R^1 tem um comprimento superior ao de um grupo etilo, e assim, inclui grupos etilo substituídos com heteroátomos onde é substituinte tem um tamanho superior ao de um átomo de hidrogénio. Um radical R^1 tem também um comprimento que é inferior ao de um grupo decilo. Isto equivale a dizer que R^1 é um radical hidrocarbilo, substituído com heteroátomos com um comprimento da cadeia mais comprida, incluindo o substituinte, que é superior ao de uma cadeia saturada de dois átomos de carbono e inferior ao de uma cadeia saturada de dez áto-

-14-

mos de carbono. Cada comprimento incluindo os átomos de hidrogênio apropriados. Um grupo hidrocarbilo substituído com heteroátomos, designado simplesmente por propilo, butilo, hexilo ou decilo, ou similar, substituído com heteroátomos, deve ser entendido como sendo um radical hidrocarbilo de cadeia linear normal. Os radicais de cadeia ramificada substituídos com heteroátomos são indicados usualmente pelos prefixos numéricos ou abreviados tais como 2-propilo ou isopropilo, respectivamente.

Os comprimentos da cadeia do radical hidrocarbilo substituído com heteroátomos são medidos ao longo da cadeia mais comprida no substituinte. Essa cadeia mais comprida pode ou não incluir o grupo de heteroátomos substituintes. Estes comprimentos podem ser facilmente calculados usando ângulos de ligação, comprimentos de ligação e raios atômicos publicados, como fôr necessário para desenhar e medir comprimentos de formas de cadeias alternadas dos radicais, ou construindo modelos usando conjuntos de construção comercialmente disponíveis cujos ângulos de ligação, comprimentos e raios atômicos estão de acordo com os valores publicados normalmente aceites. Adicionalmente, podem estimar-se comprimentos aproximados do substituinte assumindo que os comprimentos de ligação não saturadas, ângulos de ligação e raios atômicos, bem como os dos heteroátomos substituintes, são idênticos aos dos átomos de carbono saturados, ainda que se prefiram os modos de medição anteriormente referidos.

R^1 é um radical hidrocarbilo substituído com heteroátomos com um comprimento particular, e que está isento de um grupo que confere carga iônica aos valores de pH fisiológicos. Assim o radical substituído com heteroátomos na posição 7 está isento de uma amina ou de uma base carboxílica ou de outros grupos básicos ou acéticos cujos valores de pKa são tais que fariam com que a molécula possuisse carga iônica aos valores de pH fisiológicos.

Os hidrocarbonetos e os radicais hidrocarbilo podem, eles próprios, ser divididos genericamente em radicais alifáticos e aromáticos. Radicais alifáticos úteis incluem (i) alceno saturado (radicais alquilo) e (ii) alcenos mono-insaturados e alcinos (radi

-15-

cais alcenilo e alcinilo, respectivamente). Para cada tipo de radical alifático existem radicais cíclicos de cadeia linear e de cadeia ramificada. Radicais aromáticos úteis incluem radicais aralcano que contêm um anel aromático ligado a um grupo alifático. Num radical R^1 contemplado, cada um desses radicais hidrocarbilo está adicionalmente substituído com um heteroátomo (um átomo sem ser de carbono ou um átomo de hidrogénio).

Os radicais R^1 têm um comprimento superior ao de um grupo etilo e um comprimento inferior ao de um grupo decilo. Quando o radical R^1 é um radical alquilo substituído com heteroátomos esses radicais alquilo podem ser designados por radicais alquilo de cadeia curta substituídos com heteroátomos. Os radicais alquilo C_2-C_8 substituídos com heteroátomos incluem vários membros da classe aqui designada por radicais alquilo "de cadeia curta" que são úteis como radicais alquilo substituídos com heteroátomos tal como aqui depois se discute. Assim, é apropriado discutir nesta altura os radicais alquilo de cadeia curta.

Os grupos e radicais aqui designados por "de cadeia curta" contêm de 1 a cerca de 6 átomos de carbono, e preferivelmente, contêm de 1 a cerca de 3 átomos de carbono. Esta definição aplica-se ao uso da designação "de cadeia curta" tal como é aqui utilizado em todos os grupos R^1 , R^2 , R^3 e R^4 .

Radicais alquilo de cadeia curta incluem, por exemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, 3-metil-2-butilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, neo-pentilo, n-hexilo, 1-metilpentilo, 3-metilpentilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 2-hexilo, 3-hexilo e similares. O grupo de radicais R^1 alquilo C_{2-8} substituídos com heteroátomos inclui radicais metilo apropriadamente substituídos com heteroátomos do grupo dos radicais alquilo de cadeia curta, e inclui também radicais heptilo, octilo e nonilo substituídos com heteroátomos bem como outros radicais, tais como o radical 2-metil-heptilo substituído com heteroátomos, que são radicais alquilo de cadeia curta substituídos com alquilo substituído com heteroátomos. No entanto, como os radicais R^1 mais preferidos têm um comprimento superior ao do etilo e aproximadamente inferior ao do heptilo, os radicais alquilo de

-16-

cadeia curta mais preferidos para R^1 incluem metilo, apropriadamente substituído com heteroátomos bem como propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutil, 2-metilbutilo, e similares, substituídos com heteroátomos.

Radicais alquilo substituídos, R^1 , incluem alquilo C_2-C_8 substituído com halogéneo, hidroxil- e poli-hidroxil- alquilo C_2-C_6 , carboxilato de alquilenil- C_2-C_6 -alquilo de cadeia curta, éter de di-alquilo de cadeia curta (alcoxil de cadeia curta alquilo de cadeia curta), e radicais alcoxil de cadeia curta-alquilo C_{1-7} carbonilo não substituídos, bem como outros radicais mono- e di-alquilo de cadeia curta (alquilo de cadeia curta) carboxamido no qual a porção do grupo carboxamido do radical tem a fórmula $CONR^5R^6$. Estes radicais R^1 são aqui depois discutidos.

Os radicais hidroxil-alquilo C_2-C_6 incluem 2-hidroxietilo, 2-hidroxipropilo, 3-hidroxipropilo, 3-hidroxil-2-butilo, 3-hidroxil-2,2-dimetilpropilo, 6-hidroxil-hexilo e similares.

Outro grupo de radicais R^1 alquilo substituído é um subgrupo de radicais hidroxil-alquilo C_2-C_6 que são radicais C_3-C_6 que contêm um grupo hidroxil, espaçado dois átomos de carbono de um outro substituinte que é seleccionado entre o grupo consistindo de substituintes azido, éter e tioéter onde os grupos éter e tioéter contêm até cerca de três átomos de carbono. Este subgrupo pode ser encarado como o produto da reacção de um epóxido e de um nucleófilo. O grupo hidroxil que se forma a partir do epóxido e do nucleófilo está muito preferivelmente ligado a uma cadeia de três átomos de carbono tal como a que é fornecida pela reacção da epiclora-hidrina ou da epibromo-hidrina com uma guanosina apropriada seguida da reacção do epóxido resultante com o nucleófilo.

Os radicais poli-hidroxialquilo C_3-C_6 incluem 2,3-di-hidroxipropilo, 3,4-di-hidroxibutilo, sorbitilo e similares. Os peritos na arte entenderão que os polióis contemplados contêm não mais do que um grupo hidroxil em cada átomo de carbono do grupo alquilo de cadeia curta.

Os radicais alquilo C_2-C_8 substituídos com halogéneo incluem, preferivelmente, um ou mais átomos de cloro, bromo, flúor ou

-17-

iodo ligados a um radical alquilo C_2-C_8 . Exemplos de radicais substituídos com halogéneo incluem, 2-cloroetilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 2-bromobutilo, 2-cloro-hexilo, 2,3-dicloro-octilo, hidrocarbilo per-halo-substituído e similares.

Os radicais carboxialquilo de cadeia curta incluem os radicais alquilo de cadeia curta anteriormente descritos, que incluem adicionalmente como substituinte um grupo carboxilo ($-CO_2H$). Assim um radical $7-CH_2CO_2H$ é considerado um radical metilo substituído com um carboxilo. Os radicais carboxialquilo de cadeia curta não estão eles próprios contemplados como substituintes R^1 , na medida que conferem carga iónica ao derivado de guanina aos valores de pH fisiológico. Contudo, os derivados éster e amida de radicais carboxialquilo de cadeia curta estão contemplados.

Os radicais alcóxido de cadeia curta-alquilo de cadeia curta-carbonilo podem ser encarados como ésteres de radicais carboxi alquilo de cadeia curta com álcoois de alquilo de cadeia curta, tais como os álcoois de metilo, etilo, isopropilo, ter-butilo e neo-pentilo. Exemplos de radicais carboxialquilo de cadeia curta incluem carboximetilo, 2-carboxietilo, 2-carboxi-hexilo e similares. Exemplos de radicais alcóxido de cadeia curta-alquilo de cadeia curta-carbonilo incluem, carbetoimetilo (também conhecido por carboetoximetilo), 3-isopropoxycarbonilpropilo, 4-hexiloxycarbonilpentilo e similares.

Os radicais alquilo de cadeia curta-carbonilamino substituído com mono- e di-alquilo de cadeia curta (alquil de cadeia curta-carboxamido onde a porção do grupo carboxamido do radical tem uma fórmula $CONR^5R^6$) podem ser encarados como sendo formados a partir de um grupo carboxialquilo de cadeia curta substituinte, na posição 7 e amónio, bem como uma mono-alquil de cadeia curta- ou alcanol C_2-C_3 -amina ou di-alquil de cadeia curta- ou di-alcanol C_2-C_3 -amina, respectivamente, onde os radicais alquilo de cadeia curta são como anteriormente se descreveu, e onde as porções alcanol C_2-C_3 são 2-hidroxietilo, 3-hidroxipropilo de 2-hidroxipropilo. Exemplos, destas aminas incluem, metilamina, propilamina, sec-butilamina, hexilamina, dimetilamina, metiletilamina, butil-hexilamina, 2-hidroxietilamina (etanolamina), 2-hidroxipropilamina,

DAD ORIGINAL

-18-

(isopropanolamina), dietanolamino, di-isopropanolamina, metil-etanolamina, 3-propanolamina e similares. As amidas de aminas secundárias cíclicas com cinco ou seis átomos no anel podem ser encaradas como sendo formadas a partir de um grupo carboxialquilo de cadeia curta e de uma amina cíclica secundária tal como pirrolidina, morfolina, piperidina, pirrolo ou 4-metilpiperazina.

A porção do grupo carboxamido de um radical carboxamidoalquilo de cadeia curta tal como os anteriores, tem a fórmula CONR^5R^6 onde R^5 e R^6 são iguais ou diferentes e são seleccionados entre o grupo consistindo de hidrogénio, alquilo de cadeia curta e alcanoil $\text{C}_2\text{-C}_3$. Alternativamente, NR^5R^6 podem formar juntos um anel heterocíclico com cinco ou seis átomos no anel. Assim, podem descrever-se estes 7-substituintes como sendo radicais carboxamidoalquilo de cadeia curta cuja porção do grupo carboxamido tem a fórmula CONR^5R^6 .

Um radical de carboxilato de alquilenoc $\text{C}_2\text{-C}_6$ alquilo de cadeia curta pode ser encarado como um éster de um radical substituinte hidroxialquilo $\text{C}_2\text{-C}_6$ ou poli-hidroxialquilo $\text{C}_3\text{-C}_6$ e de um ácido alquil de cadeia curta-carboxílico. Discutiram-se anteriormente exemplos de substituintes hidroxialquilo $\text{C}_2\text{-C}_6$. As porções alcanoilo de cadeia curta (acilo de cadeia curta) de ácidos alquil de cadeia curta-carboxílicos que podem estar presentes nestes ésteres incluem formilo, acetilo, propionilo, 2-metilpropionilo, butirilo, 3-metilvalerilo e similares. Como grupos R^2 e R^3 são contemplados grupos alcanoiloxilo de cadeia curta, formados pela esterificação de um grupo 2'- e/ou 3'-hidroxilo, e de um ácido alquilo de cadeia curta-carboxílico, tais como os anteriores. Como radicais R^4 são contemplados grupos alcanoilo de cadeia curta que se formam similarmente pela esterificação de um grupo 5-hidroxilo.

Um radical alquilenoc $\text{C}_2\text{-C}_6$ alquilo de cadeia curta-carboxamida é também contemplado como sendo um substituinte 7-hidrocarbilo substituído com um heteroátomo. Este radical pode ser encarado como uma amida formada entre um radical alquilo $\text{C}_2\text{-C}_6$ substituído, com um grupo amino primário ou secundário, e um ácido al-

-19-

quil de cadeia curta-carboxílico. Os radicais alquiloC₂-C₆ substituídos com um amino primário ou secundário (bem como aminas terciárias similarmente substituídas) não são também eles próprios aqui contemplados na medida em que os seus grupos amino conferem uma carga iónica ao derivado de guanina aos valores de pH fisiológicos. Ácidos alquil de cadeia curta-carboxílicos úteis, presentes nestas amidas, são os que anteriormente se discutiram. Exemplos de radicais alquiloC₂-C₆ substituídos com amina primária e secundária incluem radicais 2-aminoetilo, 2-amino propilo, 2-(isopropil)aminoetilo (3-aza-4-metilpentilo) e similares.

É de notar que um éster ou uma amida, tal como anteriormente se descreveram nos parágrafos anteriores, pode ter, teoricamente um comprimento superior ao de um grupo decilo. Porém, tal como anteriormente se referiu, um radical R¹ tem um comprimento que é inferior ao de um grupo decilo. Assim, um éster formado a partir de um alquilcarboxilato com seis carbonos e de um álcool de alquilo de cadeia curta com seis carbonos, é excluído pois é mais comprido do que um grupo decilo. É também de notar que os radicais R¹ preferidos têm um comprimento que é inferior, aproximadamente, ao de um grupo heptilo, e essa preferência mantém-se para os ésteres e amidas anteriormente descritas.

Ainda outro grupo de substituintes hidrocarbilo 7-substituídos é constituído pelos radicais éter di-alquilo de cadeia curta, que podem também ser designados por radicais alcóxilo de cadeia curta-alquilo de cadeia curta. Estes éteres de di-alquilo de cadeia curta podem ser considerados como grupos alquilo, nos quais um ou mais grupos metileno(-CH₂-) estão substituídos com um átomo de oxigénio (-O-). Exemplos de radicais éter úteis incluem radicais metoximetilo, metoxietilo, etoxietilo, etoxi-2-propilo e similares.

A discussão anterior referiu-se a 7-substituintes que são radicais alquilo de cadeia linear ou ramificada (alifáticos) substituídos com heteroátomos. Os compostos do presente invento incluem também radicais ciclo-alifáticos substituídos, alifáticos

-20-

etilenicamente não saturados e aralquilo. Cada um desses radicais pode estar substituído com heteroátomos, como anteriormente se discutiu para os radicais alquilo de cadeia linear ou ramificada.

Por exemplo, podem utilizar-se radicais cíclicos alifáticos substituídos com heteroátomos, tais como o ácido ciclopentanocarboxílico ou o ácido ciclobutanocarboxílico, para formar um éster ou uma amida com um álcool de alquilo de cadeia curta ou uma amina γ -substituídos, respectivamente, anteriormente referidos. O mesmo se passa no caso dos ácidos carboxílicos cíclicos etilenicamente não saturados tais como o ácido 2-ciclopenteno-1-acético. Similarmente, podem utilizar um álcool cíclico tal como o ciclo-hexanol ou o 2-ciclo-hexeno-1-ol, o ciclopropilcarbinol ou uma amina cíclica tal como o ciclobutilamina ou a ciclo-hexilamina, para formar um éster ou uma amida, respectivamente, com um radical γ -alquilcarboxilo anteriormente discutido tal como um radical carboximetilo. Podem também usar-se álcoois e ácidos carboxílicos etilenicamente não saturados tal como o 3-butino-1-ol, e o ácido 3,3-dimetilacrílico na preparação de ésteres e de amidas tal como anteriormente se discutiu.

Os radicais aralquilo substituídos são radicais R^1 particularmente contemplados. Exemplos de radicais aralquilo incluem os radicais benzilo e feniletilo, e esses radicais estão substituídos nos seus anéis fenilo com um ou dois, preferivelmente, um substituinte com heteroátomos seleccionados entre o grupo consistindo de nitro, ciano, carboxamido ($-CONR^5R^6$ onde R^5 e R^6 são definidos como anteriormente), halogéneo, alcóxido de cadeia curta, carbonilalcóxido de cadeia curta, hidroxilo e alcanoilóxido de cadeia curta. É reiterado que o requisito do comprimento total R^1 se mantém.

Preferem-se os substituintes num grupo benzilo que são grupos atractores de electrões em relação ao hidrogénio por efeito de ressonância ou indutivo, tal como os que se descrevem em Hine, Physical Organic Chemistry, 2ª ed., McGraw-Hill Book Co., New York, págs. 85-93 (1962) tais como o ciano, nitro e halogéneo.

Um radical 4-nitrobenzilo é um radical particularmente preferido, tal como o é a 7-(4-nitrobenzil)-8-oxoguanosina, um derivado de guanina particularmente preferido da invenção.

Dos radicais hidrocarbilo substituídos com heteroátomos anteriores, preferem-se os radicais alquilo de cadeia linear substituídos e os radicais benzil-hidrocarbilo com um comprimento superior ao do etilo e um comprimento inferior, aproximadamente, ao de um grupo heptilo. Desse grupo preferido, os radicais alquilo substituídos com halogéneo, alcoxi de cadeia curta-alquilo de cadeia curta-carbonilo, alquilo de cadeia curta-carboxamido onde o grupo carboxamido tem a fórmula CONR^5R^6 , alcoxi de cadeia curta-alquilo de cadeia curta, e benzilo cujo anel fenilo está substituído com um grupo atractor de electrões em relação ao hidrogénio, são radicais particularmente preferidos.

Os radicais R^2 e R^3 podem ser iguais ou diferentes e são seleccionados entre o grupo consistindo de hidrogénio, hidroxilo, alcóxido de cadeia curta, alcanoilóxido de cadeia curta e benzilo. R^2 e R^3 podem também formar juntos um radical alquilidenodioxido de cadeia curta 2',3'-cíclico. Discutem-se seguidamente exemplos de radicais R^2 e R^3 .

Os radicais alcóxido de cadeia curta são radicais alquilo de cadeia curta ligados ao anel açúcar (ribose) da guanina através de um átomo de oxigénio do açúcar. Exemplos de radicais alcóxido de cadeia curta incluem metóxido, etóxido, iso-propilo, butóxido, hexilóxido e similares. Os radicais alcanoilóxido são ésteres que se formam entre um grupo hidroxilo do anel de açúcar da guanina e um ácido alquilo de cadeia curta-carboxílico. Exemplos de radicais alcanoilóxido de cadeia curta incluem, formóxido, acetóxido, propionóxido, hexanoilóxido e similares. Os derivados acetá e cetá de alquilo de cadeia curta dos grupos 2'- e 3'-hidroxilo, são designados por alquilidenodioxido de cadeia curta 2',3'-cíclicos ou mais simplesmente, por radicais alquilidenodioxido de cadeia curta. Estes radicais formam-se pela reacção de um aldeído, tal como formaldeído, acetaldeído ou similares, ou de uma cetona, tal como acetona ou metiletilcetona, com os grupos 2'- e

-22-

3'-hidroxilo de um grupo ribosilo da guanosina substituído.

Prefere-se que R^2 e R^3 sejam hidroxilo, alcanoiloxilo de cadeia curta ou benzoxilo, e mais preferivelmente, hidroxilo ou acetoxilo. Quando os radicais R^2 e R^3 são alcanoiloxilo de cadeia curta ou benzoxilo, esses radicais podem perder-se durante, ou logo após o passo de contacto com leucócitos de um método da invenção e, deste modo, podem constituir uma forma "pró-droga" do derivado de guanosina. Muito preferivelmente, R^2 e R^3 são hidroxilo.

R^4 é um radical seleccionado entre o grupo consistindo de hidrogénio, alcanoiolo de cadeia curta e benzoilo. Muito preferivelmente, R^4 é hidrogénio. Quando R^4 é alcanoiolo de cadeia curta ou benzoilo crê-se também que o radical contendo o grupo carboxilo possa ser clivado tal como anteriormente se descreveu, constituindo de novo uma "pró-droga".

Uma guanosina útil está substancialmente isenta de carga iónica aos valores de pH fisiológico; i.e. cerca de pH 7,0 a cerca de pH 7,5 excepto para as cargas iónicas que possam ser fornecidas pelo átomo de azoto do anel na posição 1, relativamente ácido. Assim, uma molécula útil está isenta de grupos contendo ácido e base que não estão presentes na guanosina. Essa ausência de grupos ácidos e básicos estende-se do radical R^1 e ao longo de toda a molécula de guanosina.

As guanosinas são ácidos, e como tal, podem formar sais de adição de base. Estes sais/são úteis para se ter estabilidade no armazenamento e não conferem uma carga iónica adicionada a um derivado de guanina, usado num método da invenção, em virtude do efeito tampão produzido pelos sistemas sanguíneo e linfático do hospedeiro ou pelo tampão de um meio de cultura.

Os sais de adição de base, dos derivados de guanina não tóxicos e farmacêuticamente aceitáveis, são úteis no presente invento e podem ser preparados por tratamento do agente melhorador da imuno-resposta com uma base apropriada, num solvente adequado tal como água ou um álcool de alquilo de cadeia curta, tal como metanol ou etanol. Exemplos de bases inorgânicas incluem, hidró-

-23-

xido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amónio e similares. Exemplos de bases orgânicas incluem tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinaetanossulfónico (HEPES) e bases similares. Inversamente, a forma de sal de adição de base pode ser convertida na forma de guanosina livre por tratamento com ácido.

Os derivados substituídos de guanina-nucleósido úteis no presente invento são facilmente preparados por procedimentos publicados na literatura química, ou por procedimentos análogos. Na Secção de Materiais e Métodos descrevem-se vários exemplos de sínteses.

A síntese dos derivados 7,8-dissubstituídos de guanina-nucleósido começa tipicamente com a ligação 9-1'-beta-aldoglicósido já formada, ainda que a formação inicial dessa ligação não seja requerida.

Em adição aos exemplos de sínteses que aqui depois se descrevem, apresentam-se aqui resumidamente três processos sintéticos gerais. Estes processos são exemplares dos métodos de síntese que se descrevem na literatura e são descritos usando uma 8-tioxoguanosina, substituída na posição 7 com um hidrocarbilo substituído com heteroátomos, da invenção como o composto a ser preparado.

Num primeiro processo faz-se reagir uma 8-tioxoguanosina, substituída na posição 7 com um radical hidrocarbilo substituído com heteroátomos, com derivado de ribose, substituído na posição alfa-1 com um grupo rejeitado, adequado, tal como alfa-1-cloro (ou bromo ou acetoxi)-2,3,5-tribenzoil-D-ribose, num solvente adequado para formar o derivado de beta-ribosilo. Os produtos da reacção são separados por HPLC para se obter o derivado de guanosina desejado.

Num segundo processo, oxida-se a 7-alil-8-tioxoguanosina (22 444; Exemplo 2C) para formar o aldeído correspondente. Condensa-se depois a 7-(2-etanol)-8-tioxoguanosina correspondente, por uma reacção de Wittig, Claisen, Reformatsky ou similar, para formar uma guanosina não saturada substituída na posição 7 com um

-24-

grupo substituído com heteroátomos que é separada dos outros produtos para uso, ou que pode ser reduzida ou halogenada antes de utilizar.

Pode também alquilar-se redutivamente o derivado de 7-(2--etanol) para formar um substituinte alquil de cadeia curta-amino a partir do qual se pode formar um radical alquilenoc₂-C₆-alquil de cadeia curta-carboxamida. O derivado de 7-(2--etanol) po de ainda ser reduzido no derivado de 7-(2--etanol) correspondente, que é, ele próprio, útil e pode também ser esterificado para formar alquilenoc₂-C₆-alquil de cadeia curta-carboxilato.

Num terceiro processo, utiliza-se o fecho do anel por uma reacção de tiofosgénio com uma 2,5,6-triamino-4-hidroxipirimidina apropriadamente substituída. Mais especificamente, faz reagir uma 2-amino-4-hidroxi-6-beta-D-ribosilpirimidina, substituída na posição 5 com um hidrocarbilo substituído com heteroátomos, com tiofosgénio na presença de uma base extractora de ácido por forma a obter-se um derivado de 8-tioxoguanosina substituído na posição 7 com um hidrocarbilo substituído com heteroátomos, que po de ser separado dos outros produtos da reacção para uso.

III. As Composições

Uma composição do presente invento compreende uma quantidade diluente de um transportador fisiologicamente tolerável (também aqui designado por veículo ou diluente) misturada com uma quantidade eficaz imuno-potenciante (melhoradora da imuno-resposta ou imuno-estimulante) de um derivado substituído de guanina-nucleósido, ou de um seu sal, do presente invento anteriormente descrito.

Uma composição para administração in vivo é tipicamente apresentada, para administração oral ou parenteral, na forma usual de uma unidade de dosagem. O termo "unidade de dosagem" e os seus equivalentes gramaticais, tal como são aqui utilizados, referem-se a unidades fisicamente discretas adequadas como doses unitárias para pacientes humanos e para outros mamíferos, cada unidade contendo uma quantidade eficaz predeterminada do ingrediente de guanosina activo calculada para produzir o efeito terapêutico

-25-

desejado em associação com o transportador fisiologicamente tolerável requerido, tal como um diluente ou um veículo. As especificações para as novas formas de unidades de dosagem são ditadas por e estão directamente dependentes: (a) das características únicas do ingrediente activo de derivado de guanosina e do efeito terapêutico particular que se pretende obter, e (b) das limitações inerentes à arte de preparação de composições de um tal ingrediente activo para uso terapêutico in vitro, bem como in vivo em humanos e em outros animais.

Exemplos de formas de unidades de dosagem adequadas de acordo com o presente invento incluem comprimidos, cápsulas, pílulas, pacotes de pó, grânulos, "wafers" e similares, múltiplos individuais de qualquer das formas anteriores, bem como soluções, emulsões e suspensões líquidas. As composições líquidas podem ser administradas pelas formas usuais, por exemplo subcutaneamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, peroralmente ou similares.

A quantidade de ingrediente activo que é administrada in vivo como uma quantidade imuno-estimulante eficaz depende da idade e do peso do paciente, da condição particular a ser tratada, da frequência de administração e da via de administração. A gama de dose diária total pode ser de cerca de 0,01 a cerca de 200 miligramas por quilograma de peso de corpo, mais preferivelmente de cerca de 0,1 a cerca de 25 miligramas por quilograma de peso de corpo e muito preferivelmente de cerca de 1 a cerca de 15 miligramas por quilograma de peso de corpo. A dose para um humano adulto está na gama de cerca de 5 a cerca de 1400 miligramas por dia, que administradas como uma dose simples quer divididas em 3 ou 4 doses. As dosagens veterinárias correspondem às dosagens humanas, estando em proporção com o peso e a velocidade metabólica do animal em comparação com humanos adultos.

Será de notar pelos peritos na arte que as concentrações in vivo úteis podem variar de espécie animal para espécie animal. Os peritos na arte sabem também que as concentrações apropriadas podem ser facilmente determinadas.

BAD ORIGINAL

-26-

As concentrações para o contacto in vitro de células animais estão compreendidas entre cerca de 1×10^{-6} molar a cerca de 3×10^{-4} molar para concentrações de células de cerca de 10^6 - 10^7 células por mililitro. Mais preferivelmente a concentração é de cerca de 1×10^{-5} molar a cerca de 1×10^{-4} molar. Tal como se poderá observar aqui depois na secção dos Resultados a concentração de pico; i.e., a concentração com a qual se obtém a maior adjuvantividade, para uma dada guanosina, pode variar tanto quanto dez ou mais vezes, quando estudadas em sistemas de linfócitos murinos e humanos.

Uma composição pode ser um sólido ou um líquido. Os transportadores fisiologicamente toleráveis são bem conhecidos na arte. Exemplos de transportadores líquidos incluem soluções aquosas estéreis que não contêm quaisquer materiais além do ingrediente activo de derivado de guanosina, ou que contêm um tampão tal como fosfato de sódio ao valor de pH fisiológico, solução salina fisiológica ou ambos, por exemplo, solução salina tamponada com fosfato. Os transportadores aquosos podem conter também mais do que um sal tampão, bem como sais tais como cloretos de sódio e potássio, dextrose e outros solutos. Os últimos transportadores são exemplificados pela Injecção de Ringer, a Injecção de Dextrose e a Injecção de Dextrose e Cloreto de sódio e a Injecção de Ringer lactada.

As composições líquidas podem também conter fases líquidas além de, e com a exclusão de água. Exemplos destas fases adicionais incluem glicerina, óleos vegetais, tais como óleo de semente de algodão, óleo de sésamo ou emulsões de água em óleo.

Exemplos de transportadores sólidos incluem os materiais normalmente usados no fabrico de pílulas, ou comprimidos e incluem amido de milho, lactose, fosfato de di-cálcio, espessantes tais como goma de tragacanto e metilcelulose U.S.P., SiO_2 finamente dividida, polivinilpirrolidona, estearato de magnésio e similares. Adicionalmente, o transportador sólido pode incluir polímeros biodegradáveis e não biodegradáveis, transportadores de polipéptido, transportadores de afinidade tais como o AFFI-GEL 601 (resina de

-27-

boronato de fenilo disponível nos Bio-RAD Laboratories, Richmond, Califórnia, E.U.A.), lipossomas e polímeros sintéticos tal como é conhecido na arte. Nas composições sólidas e líquidas podem estar também presentes antioxidantes tais como metilparabeno e propilparabeno, bem como adocicantes tais como açúcar de cana de beterraba, sacarina de sódio, ciclamato de sódio e o adocicante de éster de metilo do dipéptido ácido aspártico-fenilalanina vendido com o nome comercial NUTRASWEET (aspartam) por G.D. Searle Co.

IV. Método de Imuno-estimulação

É também contemplado um método para melhorar a imuno-resposta de leucócitos. Preferivelmente, a imuno-resposta é uma resposta específica de antigénio. De acordo com este método põem-se em contacto leucócitos, tais como, preparações de linfócitos, células B, células T, neutrófilos e macrófagos, separadamente ou em combinação, num meio aquoso, com uma composição, que anteriormente se descreveu, contendo uma quantidade eficaz imuno-estimulante de um derivado de guanina-nucleósido anteriormente descrito.

O método pode ser praticado in vivo em humanos, animais de laboratório, tais como ratinhos, ratazanas e cobaias, ou em animais domésticos tais como porcos, cavalos, bovinos, cães e gatos. O método pode também ser praticado in vitro em culturas de células tais como uma cultura de hibridoma para a produção de anticorpos monoclonais.

O contacto com os leucócitos realiza-se num meio aquoso, independentemente do facto de a composição de derivado de guanina ser ela própria um sólido ou um líquido ou de o líquido da composição ser ou não aquoso. Para o método in vivo, o meio aquoso é fornecido, pelo menos, em parte pela água do sangue ou da linfa. Para os métodos in vitro o meio aquoso é fornecido, pelo menos, em parte pelo meio de cultura usado.

O contacto entre a composição e os leucócitos é mantido por um período de tempo suficiente para que as células postas em contacto manifestem a melhoria da sua imuno-resposta. A imuno-es-

-28-

timulação pode ela própria manifestar-se na proliferação celular, na secreção aumentada de anticorpos, na actividade aumentada de células T auxiliares, na produção aumentada de citocina de células T e de macrofagos, na secreção de enzima de neutrófilo, etc.

Os resultados específicos que aqui depois se discutem ilustram respostas mitogénicas não específicas de células de baço murinas, bem como as respostas específicas de antigénio preferidas de células B murinas e de linfócitos de sangue periférico desprovidas de células T supressoras.

Outras imuno-melhorias, específicas de antigénio, ilustrativas que podem ser conseguidas usando um método da invenção incluem, a proliferação de células T, a reconstituição in vitro da imuno-resposta primária em células B murinas imunodeficientes, a actividade de substituição de células T em células B murinas, e o aumento in vivo da produção de anticorpos murinos.

Para utilização in vivo o contacto entre os leucócitos e uma composição é mantido tipicamente por um período de tempo suficiente para que o animal elimine o derivado de guanósina do seu organismo, pelo metabolismo, por secreção ou por ambos os processos. Esse período de tempo pode ser mais prolongado do que o requerido para que a imuno-estimulação se manifeste. O contacto com uma dose unitária individual é mantido tipicamente por um período de tempo de horas até cerca de uma semana ou mais, dependendo, para um dado composto, do transportador ou veículo utilizado. O contacto contínuo pode ser vantajoso para um animal hospedeiro imuno-deficiente.

O contacto in vitro pode ser mantido por um período de tempo suficiente para que uma das imuno-estimulações anteriormente descritas se manifeste tal como pode ser determinado por técnicas de ensaio convencionais. Estes tempos de contacto têm tipicamente uma duração de um a cerca de sete dias, e mais usualmente de cerca de 2 a cerca de 6 dias.

V. Resultados

Obtiveram-se resultados específicos utilizando os compos-

tos, as composições e os métodos do presente invento e compararam-se muitas vezes esses resultados com resultados similares obtidos usando os compostos, as composições e os métodos que se descrevem na Patente dos E.U.A. nº. 4 643 992. Utilizaram-se aqui alguns dos compostos usados na Patente dos E.U.A. nº. 4 643 992 com propósitos comparativos. Esses compostos são a 8-mercaptoguanosina, a 7-metil-8-oxoguanosina e a 8-bromoguanosina, e são aqui designados abreviadamente por 8MGuo, 7m8oGuo e 8BrGuo, respectivamente.

Os resultados que aqui depois se discutem foram obtidos usando um ou mais compostos da invenção, a não ser onde indicado de outro modo, na forma de uma composição da invenção que é usada num método da invenção. Para resumir e para facilidade de descrição, apenas os compostos serão aqui depois referidos, estando pressuposto que esses compostos são utilizados em composições e em métodos da invenção.

A cada um dos novos compostos, cuja actividade é aqui discutida ou comparada, foi também atribuído um número de identificação de cinco dígitos. Esses números são indicados no título do exemplo que descreve a preparação do composto. O número de cinco dígitos e/ou o número do Exemplo são utilizados nas tabelas e na discussão que se segue para identificar esses compostos.

A. Actividades de guanosinas 8-substituídas

Tal como anteriormente se referiu examinou-se a adjuvantidade e a mitogenicidade de uma série de guanosinas 8-substituídas, que não são compostos da invenção, com tioéteres de vários comprimentos. Os resultados desses estudos são apresentados nas tabelas 1 e 2 seguintes onde as linhas horizontais ao longo de toda a tabela servem para separar os estudos uns dos outros.

-30-

Tabela 1Adjuvantividade específica de antígeno de 8-tioéter-guanosinas

<u>Composto</u> ²	<u>Concentração</u> ³	<u>PFC directo anti-SRBC/Cultura</u> ⁴	
		<u>CBA/CaJ</u>	<u>C57BL/6J</u>
22359 (8)	10 ⁻⁴	123 [±] 21	-
	3x10 ⁻⁴	157 [±] 7	2620 [±] 100
	10 ⁻³	653 [±] 52	3110 [±] 350
22435 (7)	10 ⁻⁴	247 [±] 38	-
	3x10 ⁻⁴	582 [±] 52	913 [±] 1110
	10 ⁻³	607 [±] 57	12,080 [±] 470
8MGuo	10 ⁻⁴	813 [±] 129	-
	3x10 ⁻⁴	527 [±] 25	11,000 [±] 140
Controlo	Sem nucleósido	75 [±] 10	486 [±] 70
	Antígeno presente		
22300 (6)	10 ⁻⁴	420 [±] 105	-
	3x10 ⁻⁴	870 [±] 70	-
	10 ⁻³	490 [±] 133	-
8MGuo	10 ⁻⁴	813 [±] 129	-
	3x10 ⁻⁴	782 [±] 123	-
Controlo	Sem nucleósido	8 [±] 4	-
	Sem antígeno		
Controlo	Sem nucleósido	307 [±] 61	-
	Antígeno presente		

¹ Mediram-se as adjuvantividades contra glóbulos vermelhos de ovelha (SRBC) em culturas de formação de placas directa por

-31-

cultura de células de linfócitos das estirpes de ratinhos apresentadas. Na secção Materiais e Métodos apresentam-se pormenores do procedimento. Os erros padrão dos valores médios indicados são apresentados pelo " $\pm$ número".

²Os nucleósidos são identificados pelos seus números de cinco dígitos e o número do Exemplo no qual se apresenta a sua preparação está entre parentesis.

³Concentração do nucleósido em moles por litro no meio aquoso onde se realizou o contacto com os leucócitos.

⁴Usaram-se linfócitos de linhagens de ratinhos consaguíneos CBA/CaJ ou C57BL6/J.

Tabela 2

Mitogenicidade de 8-tioeterguanossinas

<u>Composto</u> ²	<u>Concentração</u> ³	Incorporação de $\angle^3\text{H}\text{]TdR}$ (cpm/cultura)
22359	10^{-4}	1600 ± 90
(8)	3×10^{-4}	1300 ± 80
	10^{-3}	1700 ± 280
22435	10^{-4}	4500 ± 120
(7)	3×10^{-4}	8800 ± 200
	10^{-3}	$11,200 \pm 202$
8MGuo	10^{-3}	$41,100 \pm 390$
Controlo	Sem nucleósido	2100 ± 60
22300	10^{-4}	2700 ± 130
(6)	3×10^{-4}	4100 ± 70
	10^{-3}	$16,400 \pm 1130$
8MGuo	10^{-3}	25200 ± 950

-32-

Tabela 2 (Cont.)

<u>Composto</u> ²	<u>Concentração</u> ³	Incorporação de $\angle^3\text{H}\angle\text{TdR}$ (cpm/cultura)
Controlo	Sem nucleósido	2400 ⁺ 90

¹A mitogenicidade foi medida pela incorporação de $\angle^3\text{H}\angle\text{TdR}$ (desoxirribonucleótido de timidina marcado com trítio), usando as condições que se discutem na secção Materiais e Métodos, tal como é determinado pela medição das contagens por minuto (cpm) por cultura de células. Os desvios padrão são apresentados como na Tabela 1.

^{2,3}Ver notas 2 e 3 da Tabela 1.

Os resultados anteriores ilustram que, à medida que o comprimento do substituinte aumenta, a actividade do derivado de guanosina 8-substituído diminui em relação à 8MGuo cujo átomo de enxofre na posição 8 está ligado a um átomo de hidrogénio. Assim, a adjuvantividade específica de antigénio do derivado de 8-(2-butenil) (22435) era maior do que a do derivado de 8-cinamilo (22359) mais comprido, mas inferior à do composto de 8-mercaptop (8MGuo). O derivado de 8-alilo (22300) tinha uma adjuvantividade aproximadamente igual à da 8MGuo para as concentrações apresentadas. Os resultados de mitogenicidade para os mesmos compostos mostraram uma tendência ainda mais pronunciada nas actividades obtendo-se com 8-substituintes cada vez mais compridos resultados cada vez mais pobres.

B. A adjuvantividade e a mitogenicidade não estão necessariamente relacionadas

Os compostos, as composições e os métodos do presente invento são úteis na melhoria das respostas mitogénicas e policlonais, e da adjuvantividade, tal como os compostos cujas actividades se ilustram nas Tabelas 1 e 2. Pensa-se que as propriedades mitogénicas e de adjuvante dos presentes compostos resulta pelo menos de dois percursos diferentes nos quais a mitogénese e uma

-33-

resposta policlonal são muitas vezes resultados coincidentes, enquanto que os resultados de adjuvantividade diferem frequentemente. Vêr por exemplo, Goodman et al., J. Exp. Med., 147:800 (1978) e McIntire et al., J. Immunol., 117:674 (1976). Na Patente dos E.U.A. nº 4 643 992 discutem-se algumas diferenças similares.

Este não acoplamento de actividades é também exibido por alguns dos compostos do presente invento tal como se pode observar dos resultados das Tabelas 3 e 4 seguintes.

Tabela 3

Adjuvantividade específica de antígeno de algumas 8-oxoguanosinas, substituídas na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos no sistema humano¹

<u>Composto</u> ²	<u>Concentração</u> ³	<u>PFC/Cultura</u>
22935	3×10^{-5}	175 [±] 33
(2)	10^{-4}	3613 [±] 717
	3×10^{-4}	13,013 [±] 2613
22943	3×10^{-5}	83 [±] 12
(4)	10^{-4}	58 [±] 4
	3×10^{-4}	222 [±] 54
Controlo	Sem nucleósido	0 [±] 1
	Sem antígeno	
Controlo	Sem nucleósido	150 [±] 15
	Antígeno presente	

¹Os estudos foram realizados de um modo similar aos apresentados na Tabela 1 com a excepção de se ter usado uma preparação de linfócitos humanos.

^{2,3}Vêr notas 2 e 3 da Tabela 1.

Tabela 4

Mitogenicidade de algumas 8-oxoguanosinas substituídas na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos, no sistema humano.¹

<u>Composto</u> ²	<u>Concentração</u>	<u>Incorporação de $\angle^3\text{H}\angle\text{TdR}$</u> <u>(cpm/cultura)</u>
22935	3×10^{-5}	5,975 [±] 449
(2)	10^{-4}	38,505 [±] 655
	3×10^{-4}	60,217 [±] 272
	10^{-3}	70,944 [±] 453
22943	3×10^{-5}	1,077 [±] 40
(4)	10^{-4}	1,814 [±] 71
	3×10^{-4}	15,714 [±] 856
	10^{-3}	77,100 [±] 799
Controlo	Sem nucleósido	1508 [±] 125

^{1,2,3}vêr notas 1, 2 e 3 da Tabela 2.

Os resultados anteriores mostram que a 7-(3-dimetilamino)propil-8-oxoguanosina (22943) foi mitogénica num sistema murino (Tabela 4) quando comparada com a 7-carbetoximetil-8-oxoguanosina (22935). Contudo, o composto contendo amina (22943) exibiu uma actividade aproximadamente igual à exibida por um dos controlos (sem nucleósido + antigénio) quando se examinaram esses mesmos compostos para determinar a adjuvantividade usando linfócitos humanos (Tabela 3).

Os resultados anteriores confirmam também que a mitogenicidade e a adjuvantividade não estão necessariamente ligadas e podem ocorrer por percursos diferentes. Esses resultados mostram também que a ausência de adjuvantividade exibida por compostos contendo elementos estruturais úteis noutras funções, p.e., o anel de guanosina, um grupo 8-oxo e um radical hidrocarbilo subs

-35-

tituído com heteroátomos na posição 7, mais comprido do que o etilo mas mais curta do que o decilo mas que comporta uma carga iónica aos valores de pH fisiológico, aqui devida ao grupo dimetilamino.

É de notar ainda que, se bem que a mitogenicidade e a adjuvantividade possam ser observadas in vitro no sistema murino, apenas a adjuvantividade foi observada in vitro no sistema humano usando qualquer dos compostos aqui discutido.

C. Estudos de adjuvantividade

Realizou-se um certo número de estudos comparativos de adjuvantividade em relação ao SRBC usando linfócitos humanos e murinos como fonte de leucócitos, usando compostos do presente invento, bem como novos compostos não incluídos no presente invento. Infelizmente, devido a diferenças nas respostas de linfócitos mesmo de ratinhos consaguíneos, deixando de parte a população humana não consaguínea, estes resultados são muito difíceis de comparar, com exactidão, uns com os outros. Preferivelmente podem ser melhor comparados, dentro de um dado estudo, os obtidos com os compostos usados no estudo e os dos controlos para um dado estudo. Nas Tabelas 5 e 6 seguintes apresentam-se resultados destes estudos, os quais se referem apenas à actividade para a concentração de pico, de cada composto. Cada estudo está separado dos outros por uma linha horizontal na tabela.

-36-

Tabela 5

Estudos de adjuvantividade no sistema murino

<u>Compostos</u> ²	<u>Concentração</u> ³	<u>PFC anti-SRBC directo/cultura</u>
22935 (2)	10^{-4}	2371^{+179}
22943 (4)	3×10^{-4}	2283^{+104}
23090 (5)	10^{-5}	40^{+3}
Controlo	Sem nucleósido Sem antigénio	33^{+9}
Controlo	Sem nucleósido Antigénio presente	20^{+3}
24599 (18)	3×10^{-5}	2521^{+191}
8BrGuo	10^{-3}	2450^{+325}
Controlo	Sem nucleósido Sem antigénio	12^{+2}
Controlo	Sem nucleósido Antigénio presente	45^{+10}
7m8oGuo	3×10^{-5}	1809^{+39}
24670 (12)	10^{-4}	1945^{+191}
Controlo	Sem nucleósido Sem antigénio	53^{+3}

69 197

EPG:11 - SCRF 124.08

-37-

Controlo	Sem nucleósido	282 [±] 46
	Antigénio presente	

24455 (14)	10 ⁻⁴	230 [±] 76
---------------	------------------	---------------------

Controlo	Sem nucleósido	20 [±] 5
	Sem antigénio	

Controlo	Sem nucleósido	203 [±] 25
	Antigénio presente	

24331 (10)	3x10 ⁻⁴	215 [±] 5
---------------	--------------------	--------------------

24364 (11)	3x10 ⁻⁵	50 [±] 13
---------------	--------------------	--------------------

Controlo	Sem nucleósido	8 [±] 3
	Sem antigénio	

Controlo	Sem nucleósido	55 [±] 8
	Antigénio presente	

24292 (13)	10 ⁻⁴	2491
---------------	------------------	------

Controlo	Sem nucleósido	50
	Sem antigénio	

Controlo	Sem nucleósido	161
	Antigénio presente	

-38-

23880	10^{-4}	735 ± 56^a
(15)	10^{-4}	6408 ± 464^b
Controlo	Sem nucleósido	17 ± 7^a
	Sem antígeno	458 ± 13^b
Controlo	Sem nucleósido	357 ± 12^a
	Antígeno presente	1960 ± 120^b
23756	10^{-4}	2376 ± 212
(16)		
Controlo	Sem nucleósido	165 ± 40
	Sem antígeno	
Controlo	Sem nucleósido	305 ± 65
	Antígeno presente	
23642	3×10^{-4}	1103 ± 123
(3)		
Controlo	Sem nucleósido	72 ± 12
	Sem antígeno	
Controlo	Sem nucleósido	293 ± 22
	Antígeno presente	

^{1,2}Ver notas 1 e 2 da tabela 1.

³O valor apresentado é o da concentração com a qual se obtém o maior número de placas por cultura num dado estudo.

^{a,b}Realizaram-se dois estudos ("a" e "b") sendo os resultados dos estudos "a" e "b" assim marcados.

Os resultados da Tabela anterior ilustram vários pontos. Em primeiro lugar, os compostos do presente invento são geralmen

-39-

te mais activos do que os compostos que se descrevem na Patente dos E.U.A. nº. 4 643 992. Essa melhoria na actividade manifestou-se, quer numa concentração para a qual a adjuvantividade de pico foi observada (concentração de pico) que foi de cerca de 0,5 a 1 unidade log (potência de dez) mais baixa, quer numa adjuvantividade para uma dada concentração de pico que foi significativamente superior, usualmente pelo menos aproximadamente 100 por cento superior, do que a exibida por um composto dessa patente. Pode observar-se uma adjuvantividade melhorada, por exemplo, quando se comparou a 8BrGuo com a 7-(2-cloroetil)-8-oxoguanosina (24599) tendo-se observado que ambos os compostos tinham números de placas, por cultura, similares embora o derivado de 2-cloroetilo exibisse esse valor para uma concentração 1,5 unidades log (cerca de 30 vezes) inferior em concentração.

Os resultados anteriores para a 7m8oGuo e para o derivado de 7-(2-hidroxi-3-azido)propilo (24670) parecem conter pelo menos duas anomalias. A concentração de pico para a 7m8oGuo apareceu para uma concentração invulgarmente baixa e o valor de PFC/cultura parece algo elevado em relação aos valores usualmente observados. O valor de PFC/cultura para o composto 24670 parece também um pouco baixo.

Os resultados na Tabela 5 ilustram também os resultados inaceitáveis obtidos com compostos de outro modo novos e não óbvios que não se incluem no presente invento. Exemplos de compostos excluídos incluem a 7-[2-(1-piperidino)etil]-8-oxoguanosina (23090), a 7-[3-(3,4-dimetoxifenilamino)-2-hidroxi]propil-8-oxoguanosina (24364), a 7-[3-(dimetilamino)propil]-8-oxoguanosina (22943) e a 7-carboximetil-8-oxoguanosina (23642) que conferem uma carga iónica à molécula aos valores de pH fisiológico.

É de notar que com os dois últimos compostos (22943 e 23642) obtiveram-se números de placas aparentemente elevados no sistema murino. Contudo esses números relativamente elevados de placas foram obtidas para concentrações (3×10^{-4} molar) que são relativamente muito elevadas para serem úteis, e são presumivelmente devidos a porções não ionizadas dessas moléculas também presen

Deve também prestar-se atenção aos resultados obtidos para a 7-[3-(4-fluorofenil)piperazinil-2-hidroxipropil]-8-oxoguanosina (24455) bem como para o composto 24364 anteriormente discutido. Verificou-se que cada um desses dois compostos era substancialmente inativo nas concentrações usadas nos estudos. Cada um contém também um radical substituinte, na posição 7, hidrocarbilo substituído com heteroátomos, que é mais comprido do que um grupo decilo. Esses dois compostos contêm também grupos amino que lhes conferem uma carga iônica aos valores de pH fisiológico. A 7-[2-hidroxi-3-(feniltio)propil]-8-oxoguanosina (24331), cujo substituinte na posição 7, hidrocarbilo substituído com heteroátomos é ligeiramente mais comprido do que o octilo exibiu uma quantidade de actividade relativamente pequena.

Tabela 6		
<u>Estudos de adjuvantividade no sistema humano¹</u>		
<u>Composto²</u>	<u>Concentração de pico</u>	<u>PFC anti-SRBC directo/ /cultura</u>
22935 (2)	3×10^{-4}	$13,013^{\pm} 2613$
22943 (4)	3×10^{-4}	$222^{\pm} 54$
Controlo	Sem nucleósido Sem antígeno	$0^{\pm} 0$
Controlo	Sem nucleósido Antígeno presente	$150^{\pm} 15$

Tabela 6

Estudos de adjuvanticidade no sistema humano¹

<u>Composto</u> ²	<u>Concentração de pico</u>	<u>PFC anti-SRBC directo/</u> <u>/cultura</u>
22935 (2)	3×10^{-4}	$13,013^{+2613}$
22943 (4)	3×10^{-4}	222^{+54}
Controlo	Sem nucleósido Sem antígeno	0^{+0}
Controlo	Sem nucleósido Antígeno presente	150^{+15}

-41-

23756	10^{-4}	$25,083^{+546}$
(16)		

23890	10^{-4}	$15,583^{+435}$
(17)		

Controlo	Sem nucleósido	2^{+2}
	Sem antígeno	

Controlo	Sem nucleósido	398^{+52}
	Antígeno presente	

7m8oGuo	3×10^{-4}	$5775^{+214}{}^a$
	10^{-3}	$830^{+67}{}^b$
	10^{-3}	$1225^{+175}{}^c$

Controlo	Sem nucleósido	$12^{+4}{}^a$
	Sem antígeno	$-^b$
		$-^c$

Controlo	Sem nucleósido	$652^{+86}{}^a$
	Antígeno presente	$82^{+9}{}^b$
		$143^{+175}{}^c$

^{1,2,3}Vêr notas 1, 2 e 3 da Tabela 5.

^{a,b,c}Exemplos de resultados de três estudos usando 7m8oGuo com preparações de linfócitos de três pessoas designadas por a, b e c. As comparações entre os compostos são, deste modo, feitas dentro de uma dada preparação de linfócitos. Os resultados marcados com "a" devem ser comparados com eles próprios, o mesmo acontecendo com os resultados marcados com "b" e com "c".

Os resultados da Tabela 6 mostram de novo a eficácia melhorada dos compostos do presente invento quando comparados indirectamente com a 7-metil-8-oxoguanosina no sistema humano. Esses resultados mostram de novo que um composto com uma carga iónica

-42-

aos valores de pH fisiológico, p.e., a 7-(3-dimetilamino)propil-8-oxoguanosina (22943), é substancialmente inactivo quando comparado com outros compostos da invenção.

O aumento indirecto, mas grande, da adjuvantividade dos compostos da invenção [22935, 23756 e 23890] em relação à 7m8oGuo no sistema humano, tanto na magnitude da resposta, como na menor dose requerida para produzir essa resposta, ilustra também a eficácia de utilizar substituintes hidrocarbilo, substituídos com heteroátomos, na posição 7, cujo comprimento é superior ao do etilo mas inferior ao do decilo.

Ainda uma outra propriedade inesperada dos compostos mais preferidos; i.e., onde R^1 é mais comprido do que o etilo e mais curto do que o decilo e onde o grupo ribosilo não está substituído, reside no facto de a curva dose-resposta seja mais larga próximo da concentração do pico do que uma curva similar obtida para a 7m8oGuo. Esta resposta alargada não é observada nas Tabelas de valores discritos anteriores.

Pode obter-se uma medida de largura relativa somando o número médio de placas (PFC/cultura) encontrado para uma concentração a meia unidade log da concentração que produziu o valor de pico, com o PFC/cultura à concentração de pico. A soma assim obtida é depois dividida por dois (o número de valores somados) por forma a obter-se o valor de placa de $1/2$ log médio.

Mais especificamente, seleccionam-se valores de placa médios individuais e subtrai-se a cada valor, o valor residual quando o SRBC sózinho estava presente, antes deste ser somado, por forma a obterem-se valores "líquidos". Cada valor líquido é dividido pelo número de micromoles de nucleósido presente em 1 ml de cultura (concentração molar/ 10^{-3}) por forma a obter-se o PFC/cultura/micromole. Seleccionam-se os dois maiores valores assim obtidos que incluem o valor à concentração de pico e um valor adjacente de $1/2$ unidade log, somam-se e divide-se por dois por forma a obter-se o valor médio de $1/2$ log por micromole.

Quando se realizam cálculos como os anteriores para estudos não seleccionados da Tabela 6, verifica-se que os valores mé

-43-

dios de placa de 1/2 log por micromole para os compostos da invenção são muito superiores ao valor para a 7m8oGuo. Na Tabela 7 seguinte mostram-se os valores assim calculados. No sistema murino obtêm-se resultados similares.

Tabela 7

Valores de placa médios de 1/2 log no sistema humano

<u>Composto</u> ²	<u>Valor</u>
7m8oGuo	21,604 ^a 787 ^b 1300 ^c
23756 (16)	158,108
23890 (17)	85,818
22935 (2)	38,753

¹Os valores foram obtidos tal como anteriormente se descreveu usando valores que traduzem os resultados apresentados na Tabela 6.

²Vêr nota 2 da Tabela 1.

a,b,c Vêr Tabela 6.

Ainda que os resultados apresentados na Tabela 7 não possam ser directamente comparados, uma vez que foram obtidos em estudos separados, as diferenças nos valores calculados são tão grandes que se crê serem estes valores significativos.

Uma curva de dose-resposta pode ser estreita demais, não permitindo, assim, a dosagem apropriada de um recipiente particu-

-44-

lar. Por exemplo, os resultados para o sistema humano apresenta dos na Tabela 6 ilustram diferenças tão grandes quanto um factor de três a dez (meia unidade log a uma unidade log) na concentração de pico dos compostos estudados, quando se compararam preparações de linfócitos de indivíduos diferentes. Se as curvas de dose resposta fossem muito estreitas, uma dosagem seleccionada usual para recipientes poderia geralmente ser muito elevada ou muito baixa para um recipiente particular. Assim, as curvas dose-resposta alargadas para os compostos preferidos oferecem uma vantagem adicional, em comparação com a 7m8oGuo.

D. Actividade de substituição de células T

Pode usar-se uma composição do presente invento para substituir as células T na resposta de anticorpos a um antigénio T-dependente. Aqui, cultivam-se células B murinas, geradas in vitro por tratamento com anti-thy 1.2 monoclonal mais complemento, com ou sem SRBC como antigénio, na presença de composições contendo concentrações incrementais de um derivado de guanossina substituído na posição 7 com um hidrocarbilo substituído com heteroátomos.

Sob estas condições, as culturas de células B isoladas respondem fracamente ao antigénio a não ser que suplementadas com um derivado de guanossina da invenção. A resposta modulada pela guanossina é dependente da dose, bem como do antigénio. Assim, o contacto de células B in vitro com uma composição do presente invento fornece a essas células um sinal do tipo^{do} da célula T.

E. Reconstituição in vitro da imuno-resposta humoral primária

Os ratinhos CBA/N possuem uma imuno-deficiência de células B primárias ligada ao cromossoma X (X-ligada) e deste modo podem constituir um modelo murino da imuno-deficiência ligada ao sexo. Pensa-se que a estirpe CBA/N é deficiente na actividade funcional de uma subpopulação de linfócitos B maduros compreendendo antigénios Lyb 3/5/7. Ver Huber et al., J. Exp. Med., 145:1 (1977); Ahmed et al., J. Exp. Med., 145:101 (1977); e Subbaro, J. Immunol., 122:2279 (1979).

Preparam-se culturas de células de baço de ratinhos CBA/N

-45-

machos e fêmeas homozigóticos e de ratinhos machos heterozigóticos em relação ao gene CBA/N, designado por gene xid (os ratinhos macho contêm o cromossoma X) tal como se descreve na secção Materiais e Métodos. Adicionam-se às culturas 0,1 mililitro de uma suspensão de 0,1 por cento (v/v) de SRBC sózinho ou de uma suspensão de SRBC com quantidades incrementais de uma guanosina da invenção, usando 5×10^6 células/ml. Determinaram-se o número de culturas formando placas anti-SRBC directas por cultura, após 4 dias de cultura.

Usando uma preparação similar de células de baço de ratinhos CBA/CaJ imuno-competentes verifica-se que para o nível zero de concentração de derivado de guanosina, não existe substancialmente qualquer resposta para as células CBA/N, quando comparada com uma resposta positiva de PFC/cultura para as células CBA/CaJ imuno-competentes.

Para concentrações de derivado de guanosina de cerca de 10^{-4} - 10^{-5} molar, ambas as células CBA/CaJ imuno-competentes e CBA/N, originalmente imuno-incompetentes, foram capazes de produzir números significativos de PFC/cultura. Assim, o contacto de células de baço, com uma imuno-deficiência X-ligada, com uma composição do presente invento, pode reconstituir a imuno-resposta humoral, primária ao SRBC dessas células que, de outro modo, seria imuno-deficientes.

A imuno-deficiência em ratinhos bem como em outros mamíferos pode ser devida à idade avançada ou senescência, bem como a um defeito genético tal como anteriormente se discutiu. Assim, animais que eram imuno-competentes quando jovens ou adultos podem tornar-se imuno-deficientes à medida que atingem uma idade avançada. Este é o caso da estirpe de ratinhos CBA/CaJ consanguíneos.

Realiza-se um outro estudo da reconstituição de uma resposta de anticorpos humoral primária ao SRBC, usando células de baço de ratinhos CBA/CaJ senescentes, com 156 semanas de idade, que se tornam imuno-deficientes com a idade. Comparam-se as respostas in vitro dessas células de baço ao SRBC, num ensaio de formação de placas, com as respostas similares de outro grupo de ratinhos

-46-

CBA/CaJ adultos, com 8 semanas de idade, saudáveis. Esta comparação realiza-se como anteriormente se descreveu, usando de novo uma composição contendo uma guanósina da invenção para pôr em contacto com as células, de baço.

O PFC/cultura para os controlos de ratinhos adultos saudáveis, contendo SRBC, mas não contendo derivado de guanósina é várias vezes o número formado na ausência tanto do SRBC como da guanósina. O valor de PFC/cultura, para os controlos de ratinhos senescentes, é aproximadamente igual para ambos os controlos, e elevado, quando comparado com o de adultos saudáveis. Pensa-se que essas respostas relativamente elevadas e similares sejam devidas à formação de clones auto-produtores de anticorpos.

Observa-se uma resposta ao SRBC relacionada com a dose de derivado de guanósina. Essa resposta é observada tanto para as células de baço de adultos saudáveis imuno-competentes, como para as células de baço de senescentes, anteriormente imuno-deficientes, mas agora com a resposta humoral primária reconstituída. Estes resultados ilustram, pois, que o contacto de células de baço senescentes imuno-deficientes com uma composição do presente invento, pode reconstituir esta imuno-resposta deficiente.

F. Respostas de anticorpos in vivo

Imunizaram-se ratinhos CBA/CaJ intraperitonealmente (i.p.) usando um conjugado (TNP-BSA), preparado por reacção de ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfónico (TNBS) com albumina de soro bovino (BSA), num tampão de cacodilato 0,28 molar, a pH 6,9. Cada animal recebe uma injeção intraperitoneal (i.p.) contendo 50 micrograma (μ g) do conjugado imunizante. Um grupo de ratinhos recebe depois (cerca de 30 minutos depois) outra injeção i.p., que contém um derivado de guanósina da invenção, quer em óleo de semente de sésamo a 100%, quer numa composição aquosa contendo 2 por cento em volume de óleo de sésamo sonificado com solução salina. Cada animal recebe 0,2 ml do derivado de guanósina a partir das composições cuja concentração em derivado de guanósina é de 5 mg/ml. Um terceiro grupo de ratinhos recebe a imunização, mas não recebe

-47-

composição do presente invento e serve como controlo. Determina-se depois a secreção de anticorpos anti-TNP-BSA durante um período de cerca de 30 dias usando técnicas convencionais de ensaio de imuno-sorvente ligado a enzima (ELISA) usando o TNP-BSA como antigénio.

Os resultados de um tal estudo indicam que os animais que receberam um derivado de guanosina da invenção exibiram títulos melhorados de anticorpos anti-TNP-BSA quando comparados com os títulos dos animais que não receberam o derivado de guanosina.

Tendo descrito genericamente a invenção pode ter-se uma compreensão adicional da mesma por referência às sínteses e aos procedimentos que aqui a seguir se apresentam com a função de ilustrar o presente invento.

VIII. Materiais e Métodos

A. Sínteses

Exemplo 1: Procedimento geral para a preparação de 8-oxo-guanosinas substituídas na posição 7 com um hidrocarbilo substituído com heteroátomos.

Utilizou-se a 1-amino-8-oxoguanosina (aqui depois Composto A) como material de partida para várias sínteses usando um procedimento a dois passos. Esse material foi preparado essencialmente pelo método descrito em Rizkalla et al., Biochim. Biophys. Acta., 195:285-293 (1969).

Passo 1:

A uma solução do composto A $\angle$ 9,5 gramas (g), 30 milimole (mmole) $\angle$ em dimetilformamida (DMF) adicionou-se metóxido de sódio (33 mmole) em 250 mililitros (ml) de DMF. Agitou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente (cerca de 18-22°C) durante 30 minutos. Adicionou-se uma solução de DMF (10 ml), contendo o agente alquilante, usado para formar o substituinte na posição 7, num ligeiro excesso molar em relação ao Composto A (p.e., 33 mmole vs. 30 mmole), e agitou-se a mistura reaccional alquilante, resultante, durante cerca de 16 horas a uma temperatura de cerca

-48-

de 20 a cerca de 40 graus C.

Removeu-se depois o solvente in vácuo e tratou-se o resí-
duo com água destilada, ou desionizada, (150 ml) e com diclorome-
tano (150 ml). Filtrou-se o sólido obtido e recristalizou-se a
partir de um solvente apropriado obtendo-se uma 1-amino-8-oxogua-
nosina 7-substituída, completando-se o "passo 1" do procedimento
de síntese a dois passos normalmente usado.

Passo 2:

Dissolveu-se depois o produto do Passo 1 em HCl concentra-
do (p.e., 4,65 mmole em 15 ml de HCl) ao qual se adicionou nitrí-
to de sódio aquoso (p.e. 4,19 mmole em 5 ml de água) a zero gra-
us C seguindo-se agitação durante cerca de uma hora. O produto
desaminado resultante foi depois obtido por técnicas de cristali-
zação convencionais, a não ser onde se indique ter sido de outro
modo.

Descreve - se, seguidamente, a preparação de exemplos de com-
postos específicos usando o método a dois passos anterior e ou-
tros métodos, bem como outras sínteses.

Exemplo 2: 7-carbetoximetil-8-oxoguanosina (22935)

Preparou-se o composto do título seguindo o procedimento
a dois passos do Exemplo 1, usando bromoacetato de etilo como
agente alquilante do passo 1, e foi obtido com um rendimento de
10 por cento, a partir do composto de 1-amino correspondente, na
forma de um pó branco, ponto de fusão 167-172°C. RMN (DMSO-d):
10,9 (bs, 1H); 6,5 (bs, 2H); 5,6 (d, J=5Hz, 1H). IV (KBr): 1680,
1620, e 1420 cm^{-1} .

Análise calculada para o $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_8 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$:

C, 42,64; H, 5,11; N, 17,76.

Encontrado: C, 42,44; H, 4,71; N, 17,73.

Substituindo o bromoacetato de etilo por 2-cloroacetamida
ou por 2-cloroacetamida substituída por um N-hidrocarbilo ou por
um N-alcanol, na reacção anterior obtém-se a 7-carboxamidometil-

-49-

-8-oxoguanosina correspondente (ou a amida substituída correspondente, cujo grupo carboxamido tem a fórmula CONR^5R^6 , onde R^5 e R^6 são definidos como anteriormente).

Similarmente, substituindo o bromoacetato de etilo por um halo-éter adequado, tal como 2-bromoetilmetiléter ou 2-bromoetilfeniléter (beta-bromofenetole) obtêm-se, respectivamente, os derivados de 7-metoximetilo e de fenoxietilo correspondentes.

Exemplo 3: 7-carboximetil-8-oxoguanosina (23642)

Agitou-se uma mistura de 7-carboximetil-8-oxoguanosina (1 g, 2,3 mmole; Exemplo 2), metanol (5 ml) e NaOH LV (5 ml), à temperatura ambiente sob N_2 durante 4 horas. Removeu-se a maior parte do metanol in vácuo, e aqueceu-se o resíduo com água (50 ml). Acidificou-se a solução com HCl 1N, a zero graus C, até pH 5. Purificou-se o produto da reacção por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa de fase inversa, numa coluna C-18 (HPLC) obtendo-se o composto do título na forma de um pó branco, com um rendimento de 31 por cento; ponto de fusão superior a 230°C . RMN (DMSO-d_6): δ 10,9 (bs, 1H); 6,5 (bs, 2H) 5,6 (d, $J=5\text{Hz}$, 1H) 4,4 (bs, 2H). IV (KBr): 1640, 1600 e 1460 cm^{-1} .

Análise encontrada para o $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_8$:

C, 40,34; H, 4,23; N, 19,60

Encontrado: C, 35,71; H, 3,52; N, 17,37.

Exemplo 4: Di-hidrato do mono-hidrocloreto de 7- β -(dimetilamino)propil-8-oxo-guanosina (22943)

Seguindo o procedimento a dois passos do Exemplo 1, usando hidrocloreto de cloreto de 3-N,N-dimetilaminopropilo, como agente alquilante, e carbonato de potássio, como base, tratou-se o produto desaminado com um equivalente de HCl em 2-propanol. Recuperou-se o composto do título com um rendimento de 40 por cento, a partir do composto de 1-amino na forma de um pó branco; ponto de fusão 180°C (decompõe-se). RMN (DMSO-d_6): δ 2,7 (s, 6H); 5,57 (d, $J=5\text{Hz}$, 1H); 6,91 (bs, 2H); 10,70 (bs, 1H); 11,31 (bs, 1H). IV (KBr): 1670, 1625 e 1590 cm^{-1} .

-50-

Análise calculada para o $C_{15}H_{24}N_6O_6 \cdot HCl \cdot 2H_2O$:

C, 39,43; H, 6,40; N, 18,40

Encontrado: C, 39,31; H, 6,15; N, 18,07.

Exemplo 5: Mono-hidrato de mono-hidrocloreto de 7-[2-(piperidino)etil]-8-oxoguanosina (23090)

Seguindo o procedimento do Exemplo 4 mas usando cloreto de 2-piperidinoetilo como agente alquilante, obteve-se o composto do título, com um rendimento de 34 por cento, a partir do composto de 1-amino na forma de um pó amarelo claro; ponto de fusão 157°C (decompõe-se). RMN (DMSO- d_6): δ 6,65 (bs, 2H); 9,97 (br, 1H); 11,22 (bs, 1H). IV (KBr): 1700, 1670 e 1590 cm^{-1} .

Análise calculada para o $C_{17}H_{26}N_6O_6 \cdot HCl \cdot H_2O$:

C, 43,92; H, 6,29; N, 18,08

Encontrado: C, 43,99; H, 6,39; N, 17,93.

Exemplo 6: 8-(2-propenilmercapro)guanosina (22300)

Adicionou-se brometo de alilo (8 g, 63,5 mmole) a uma mistura de 8-tioxoguanosina (8MGUO; 20 g, 63,5 mmole) e de carbonato de potássio (10 g, 72 mmole) em dimetilformamida (DMF) (300 ml), e aqueceu-se a mistura resultante com agitação, a uma temperatura de 45°C, durante 90 minutos.

Arrefeceu-se depois a mistura, até à temperatura ambiente, e adicionou-se a uma solução de éter etílico (1,4 l) e ácido acético (5 ml). Filtrou-se o sólido resultante e lavou-se, com água (250 ml), acetona (200 ml) e depois com éter etílico, e secou-se depois numa estufa a 60°C, obtendo-se o tioéter do título (14,7 g, 67 por cento de rendimento) na forma de um pó branco; ponto de fusão 225°C (decompõe-se). RMN (DMSO- d_6): δ 5,70-5,91 (m, 2H); 6,38 (bs, 2H). IV (KBr): 1700, 1640 e 1610 cm^{-1} .

Análise calculada para o $C_{13}H_{17}N_5O_5S$:

C, 43,93; H, 4,82; N, 19,71

Encontrada: C, 44,10; H, 4,82; N, 19,69.

-51-

Exemplo 7: 8-(2-butenilmercapto)guanosina (22435)

Seguindo o procedimento anterior para a preparação da 8-(2-propenilmercapto)guanosina (Exemplo 6), mas substituindo o brometo de alilo por cloreto de 2-butenilo, obteve-se o composto do título, com um rendimento de 48 por cento, na forma de um pó branco; ponto de fusão 210°C (decompõe-se). RMN (DMSO-d₆): δ 6,3 (bs, 2H); 5,6 (d, J=5Hz, 1H); 1,6 (d, J=6Hz, 3H); IV (KBr): 1690, 1630, 1600, 1510 e 1365 cm⁻¹.

Análise calculada para o C₁₄H₁₉N₅O₅S:

C, 45,52; H, 5,18; N, 18,96

Encontrado: C, 45,38; H, 5,32; N, 18,79.

Exemplo 8: 8-(Cinamilmercapto)guanosina (22359)

Seguindo o procedimento para a preparação da 8-(2-propenilmercapto)guanosina (Exemplo 6), mas substituindo o brometo de alilo por brometo de cinamilo, obteve-se o composto do título, com um rendimento de 33 por cento, na forma de um pó esbranquiçado; ponto de fusão 172°C (decompõe-se). RMN (DMSO-d₆): δ 7,25 (br, 5H); 6,7-6,2 (m, 4H); 5,7 (d, J=5Hz, 1H). IV (KBr): 1690, 1640 e 1600 cm⁻¹.

Análise calculada para o C₁₉H₂₁N₅O₅S:

C, 52,89; H, 2,91; N, 16,23

Encontrado: C, 53,26; H, 4,90; N, 16,08.

Exemplo 9: 1-Amino-7-(2,3-epoxipropil)-8-oxoguanosina

Seguindo o procedimento geral do passo 1 do Exemplo 1, usando epibromo-hidrina como agente alquilante, obteve-se o composto do título na forma de um produto em bruto. Não se tentou qualquer purificação.

Exemplo 10: Hemi-hidrato de 7-[2-hidroxi-3-(feniltio)-propil]-8-oxoguanosina (24331)

Aqueceu-se uma mistura do produto em bruto do Exemplo 9 (3 g, 5,4 mmole) e de tiofenol (5 g, 45,4 mmole) em DMF (150 ml) a uma temperatura de banho de 80°C durante 4 horas. Após arrefeci

mento, remoção in vácuo da maior parte do solvente, dissolução do resíduo em água e purificação por HPLC preparativa de fase inversa (C-18), obteve-se o derivado de 1-amino do composto do título na forma de um pó esbranquiçado, com um rendimento de 52 por cento; ponto de fusão 135-137°C. RMN (DMSO-d₆): δ 7,3 (m, 5H); 7,15 (bs, 2H); 5,6 (d, J=5Hz, 1H); 5,35 (s, 2H). IV (KBr) 1700 e 1580 cm⁻¹.

Seguindo o procedimento de desaminação do passo 2 do Exemplo 1, usando o derivado de 1-amino anteriormente preparado, obteve-se o composto do título, com um rendimento de 45 por cento, na forma de um sólido castanho, ponto de fusão 180-182°C. RMN (DMSO-d₆): δ 7,3 (bs, 5H); 5,6 (bs, 2H); 5,7 (d, J=5Hz, 1H). IV (KBr): 1690, 1635, 1600 e 1100 cm⁻¹.

Análise calculada para o C₁₉H₂₃N₅O₇S-1/2H₂O:

C, 48,09; H, 5,10; N, 14,76

Encontrado: C, 48,16; H, 5,11; N, 15,04.

Exemplo 11: Mono-hidrato do mono-hidrocloreto de 7- $\square$ 3-(3,4-dimetoxifenetilamino)-2-hidroxi $\square$ propil-8-oxoguanosina (24364)

A 1-amino-7- $\square$ 3-(3,4-dimetoxifenetilamino)-2-hidroxipropil $\square$ -8-oxoguanosina (24330) foi preparada de um modo análogo ao derivado de 1-amino do Exemplo 10, substituindo o tiofenol por 3,4-dimetoxifenetilamina. Este derivado de 1-amino foi preparado com um rendimento de 40 por cento na forma de um pó esbranquiçado; ponto de fusão 156-158°C. RMN (DMSO-d₆): δ 7,0 (bs, 3H); 6,9-6,4 (m, 3H); 5,3 (s, 2H); 3,7 (s, 6H). IV (KBr): 1670, 1615 e 1580 cm⁻¹.

Seguindo o procedimento de desaminação do passo 2 do Exemplo 1 (e do Exemplo 10), usando o derivado de 1-amino anteriormente preparado, obteve-se o composto do título na forma de um pó castanho claro com um rendimento de 55 por cento, ponto de fusão 163-170°C (decompõe-se). RMN (DMSO-d₆): δ 8,9 (br, 1H); 6,8 (m, 5H); 5,6 (d, J=5Hz, 1H); 5,59 e 5,62 (ambos s, 3H cada). IV (KBr): 1680, 1640, 1600 e 1030 cm⁻¹.

-53-

Análise calculada para o $C_{23}H_{32}N_6O_9 \cdot HCl \cdot H_2O$:

C, 46,74; H, 5,97; N, 14,22

Encontrado: C, 46,85; H, 6,01; N, 14,25.

Exemplo 12: Mono-hidrato de 7-(3-azido-2-hidroxipropil)-8-oxoguanosina (24670)

Seguindo o procedimento dos Exemplos 10 e 11, preparou-se a 1-amino-7-(3-azido-2-hidroxipropil)-8-oxoguanosina (24332) fazendo reagir o epóxido em bruto do Exemplo 9 com azida de sódio. Esse derivado de 1-amino foi preparado, com um rendimento de 35 por cento, na forma de cristais brancos; ponto de fusão 180-182°C (decompõe-se). RMN ($DMSO-d_6$): δ 7,1 (bs, 2H); 5,6 (d, J=5Hz, 1H). IV (KBr): 2140, 1690 e 1550 cm^{-1} .

Obteve-se o composto do título, após os procedimentos da reação de desaminação do passo 2 do Exemplo 1 (e dos Exemplos 10 e 11), usando o derivado de 1-amino que se descreveu imediatamente antes (24332). O composto do título era um pó esbranquiçado, obtido com um rendimento de 30%, ponto de fusão 138-141°C (decompõe-se). ($DMSO-d_6$): δ 6,4 (bs, 2H); 5,6 (d, J=5Hz, 1H). IV (KBr): 3600-3000, 2110, 1690 e 1660 cm^{-1} .

Análise calculada para o $C_{13}H_{18}N_8O_7 \cdot H_2O$:

C, 37,50; H, 4,84; N, 26,91

Encontrado: C, 38,06; H, 4,79; N, 26,67.

Exemplo 13: Mono-hidrato de 7-(2,3-di-hidroxipropil)-8-oxoguanosina (24292)

Seguindo os procedimentos dos Exemplos 10-12, preparou-se a 1-amino-7-(2,3-di-hidroxipropil)-8-oxoguanosina (24457), fazendo reagir o epóxido em bruto do Exemplo 9 com água. Esse derivado de 1-amino foi obtido na forma de um pó esbranquiçado com um rendimento de 55 por cento, ponto de fusão 210-212°C (decompõe-se). RMN ($DMSO-d_6$): δ 6,9 (bs, 2H); 5,55 (d, J=4,5Hz, 1H). 5,3 (bs, 2H). IV (KBr): 1700, 1670 e 1600 cm^{-1} .

O composto do título foi obtido, após os procedimentos da reação de desaminação do passo 2 do Exemplo 1 (e dos Exemplo 10-

-54-

-12), usando o derivado de 1-amino que se descreveu imediatamente antes (24457). O composto do título foi obtido na forma de um pó branco com um rendimento global de 35 por cento, ponto de fusão 195-196°C. RMN (DMSO- d_6): δ 10,7 (bs, 1H); 6,5 (bs, 2H); 5,6 (d, J=5Hz, 1H). IV (KBr): 1680, 1640 e 1660 cm^{-1} .

Análise calculada para o $C_{13}H_{19}N_5O_8 \cdot H_2O$:

C, 39,90; H, 5,41; N, 17,90

Encontrado: C, 39,67; H, 5,32; N, 17,52.

Exemplo 14: Hemi-hidrato de 7-[3-[4-(4-fluorofenil)piperazinil]-2-hidroxipropil]-8-oxoguanosina (24455)

O composto do título foi preparado seguindo os procedimentos dos Exemplos 10-13 fazendo reagir a 4-(4-fluorofenil)piperazina com o epóxido em bruto do Exemplo 9, seguido de desaminação do derivado de 1-amino substituído na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomo, resultante, tal como se discute nos Exemplos 10-13. O composto do título foi obtido na forma de um pó branco com um rendimento global de 25 por cento, ponto de fusão 178-181°C. RMN (DMSO- d_6): δ 6,8-7,1 (m, 4H); 6,3 (bs, 2H); 5,2 (d, J=5Hz, 1H). IV (KBr): 1690, 1600 e 1390 cm^{-1} .

Análise calculada para o $C_{23}H_{30}FN_7O_7 \cdot 1/2H_2O$:

C, 50,73; H, 5,74; N, 18,00

Encontrada: C, 50,94; H, 5,76; N, 17,74.

Exemplo 15: 7-[2-(4-clorofenil)-2-oxoetil]-8-oxoguanosina (23880)

Seguindo o procedimento a dois passos do Exemplo 1, usando 2-bromo-4'-cloroacetofenona, como agente alquilante, obteve-se o composto do título, com um rendimento global de 35 por cento, na forma de um pó castanho claro, ponto de fusão superior a 230°C. RMN (DMSO- d_6): δ 10,7 (bs, 1H), 8,1 (d, J=10Hz, 2H), 7,7 (d, J=10Hz, 2H), 6,5 (bs, 2H), 5,6 (d, J=5Hz, 1H), 5,3 (s, 2H). IV (KBr): 1700, 1680 e 1630 cm^{-1} .

Análise calculada para o $C_{18}H_{18}Cl N_5O_7$:

C, 47,85; H, 4,02; N, 15,50

Encontrada: C, 47,32; H, 3,98; N, 15,40.

Exemplo 16: 7-(4-nitrobenzil)-8-oxoguanosina (23756)

Seguindo o procedimento a dois passos do Exemplo 1, usando brometo de 4-nitrobenzilo, como agente alquilante, obteve-se o composto do título, com um rendimento global de 10%, na forma de um pó amarelo, ponto de fusão superior a 230°C. RMN ($DMSO-d_2$): δ 10,8 (bs, 1H); 8,3 (d, J=10Hz, 2H), 7,6 (d, J=10Hz, 2H), 6,5 (bs, 2H), 5,6 (d, J=5Hz, 1H). IV (KBr): 1680, 1640, 1600 e 1520 cm^{-1} .

Análise calculada para o $C_{17}H_{18}N_6O_8-1/2H_2O$:

C, 46,11; H, 4,32; N, 18,98

Encontrado: C, 46,48; H, 4,04; N, 18,72.

Exemplo 17: 7-(4-Metoxibenzil)-8-oxoguanosina (23756)

Seguindo o procedimento a dois passos do Exemplo 1 usando cloreto de 4-metoxibenzilo, como agente alquilante, obteve-se o composto do título, com um rendimento global de 7%, na forma de um pó castanho claro, ponto de fusão superior a 230°C. RMN ($DMSO-d_6$): δ 10,8 (bs, 1H), 7,2 (d, J=10Hz, 2H), 6,8 (d, J=10Hz, 2H), 6,4 (bs, 2H), 5,5 (d, J=5Hz, 1H), 3,7 (s, 3H). IV (KBr): 1670, 1600, 1510, 1450 e 1250 cm^{-1} .

Análise calculada para o $C_{18}H_{27}N_3O_7-1/2 H_2O$:

C, 50,47; H, 5,18; N, 16,35

Encontrado: C, 50,85; H, 5,12; N, 16,20.

Exemplo 18: 7-(2-Cloroetil)-8-oxoguanosina (24599)

O composto do título foi obtido seguindo o procedimento geral a dois passos do Exemplo 1, usando brometo de cloroetilo, como agente alquilante, com um rendimento de 27 por cento, na forma de um pó esbranquiçado, ponto de fusão 192°C (decompõe-se). RMN ($DMSO-d_6$): δ 9,8 (br, 1H); 6,9 (bs, 2H); 5,8 (d, J=5Hz, 1H).

IV (KBr): 1680 e 1640.

Análise calculada para o $C_{12}H_{16}ClN_5O_6 \cdot 3/2H_2O$:

C, 37,07; H, 4,93; N, 18,02

Encontrado: C, 36,65; H, 4,67; N, 18,18.

Exemplo 19: Derivados de 8-selenoguanosina substituídos na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos

Os derivados de 8-selenoguanosina, substituídos na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos, são preparados a partir dos derivados de 8-tioxo, substituídos na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos, correspondentes, adequadamente protegidos, cujas preparações se descreveram anteriormente. Assim, faz-se reagir a 8-tioxoguanosina, substituída na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos, com um agente S-alquilante, tal como iodeto de metilo, num solvente, tal como DMSO. Faz-se depois reagir o produto S-alquilado, assim obtido, com seleneto de sódio para formar o derivado de 8-selenoxo substituído na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos. O produto desejado pode depois ser obtido a partir da mistura reaccional por HPLC de fase inversa.

Exemplo 20: 7-(2-Alil)-8-tioxoguanosina (22444)

O composto do título foi preparado a partir da 8-(2-propenilmercapto)guanosina (22300; Exemplo 6) usando um procedimento de rearranjo.

Adicionou-se bistrimetilsililacetamida (72 g, 354,7 mM) a uma suspensão de 8-(2-propenilmercapto)guanosina (20 g, 56,3 mM), como material de partida, em clorofórmio (500 ml) e aqueceu-se a mistura resultante ao refluxo durante 16 horas sob N_2 . Após arrefecimento, a maior parte do solvente foi removido in vácuo, e aqueceu-se o resíduo a 40°C sob vácuo durante 6 horas.

Misturou-se o resíduo oleoso com tetra-hidrofurano (500 ml), $PdCl_2$ (10,3g, 58,3 mM) e benzonitrilo (12,1 g, 117 mM) e aqueceu-se a mistura resultante ao refluxo sob N_2 durante 3 horas.

-57-

Arrefeceu-se depois essa mistura até à temperatura ambiente, misturou-se também com piridina (25 ml) e agitou-se de um dia para o outro (cerca de 16 horas). Filtrou-se a mistura através de sílica gel e lavou-se com diclorometano (2x300 ml). Concentrou-se o filtrado combinado in vacuo, e misturou-se o resíduo com uma mistura de água, metanol e ácido acético (500 ml; 10:10:1) e agitou-se durante um período adicional de cerca de 16 horas.

Removeu-se, in vácuo, a maior parte dos solventes adicionais, dissolveu-se o resíduo em DMF (1 litro), e depois tratou-se com carvão activado. Filtrou-se a suspensão obtida, através de um leito de celite, e concentrou-se o filtrado in vácuo. Tratou-se o resíduo com metanol e filtrou-se o sólido resultante, lavou-se com acetona, e secou-se numa estufa a 60°C obtendo-se a 7-alil-8-tioxoguanosina (8,5 g, 42,5 por cento de rendimento) na forma de um pó esbranquiçado, ponto de fusão superior a 230°C. RMN (DMSO-d₆): δ 5,90 (m, 1H); 6,32 (d, J=5Hz, 1H); 6,56 (bs, 2H); 10,60 (bs, 1H). IV (KBr): 1700, 1635, 1605 e 1450 cm⁻¹.

Análise calculada para o C₁₃H₁₇N₅O₅S:

C, 43,93; H, 4,82; N, 19,71

Encontrado: C, 43,96; H, 4,87; N, 19,62.

Exemplo 21: Derivados de 8-ciano-imino-guanosina substituídos na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos

Para estes derivados usam-se, como materiais de partida os derivados de 8-tioxoguanosina, substituídos na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos, correspondentes. Numa preparação típica, adiciona-se iodeto de metilo (42 mmole) a 28 mmole da tioxoguanosina de partida, dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO). A adição realiza-se à temperatura ambiente, sob azoto. Agita-se a mistura resultante, durante cerca de três horas, e depois arrefece-se até cerca de zero graus C. Adiciona-se cianamida (cerca de 57 mmole), e depois hidreto de sódio (dispersão de óleo a 60%; 5 mmole). Deixa-se a mistura reaccional aquecer até à temperatura ambiente e agita-se durante cerca de uma hora. Adiciona-se depois a mistura reaccional a cerca de 1,5 litros de

-58-

éter etílico e agita-se durante cerca de 10 minutos. Decanta-se a fase de éter, extracta-se o resíduo com mais 1,5 litros de éter etílico contendo adicionalmente cerca de 50 ml de ácido acético. Decanta-se de novo a fase de éter e dissolve-se o resíduo em água (cerca de 500 ml). A partir da fase aquosa, purifica-se o resíduo por HPLC de fase inversa (C-18).

Exemplo 22: Derivados de alquilidenodioxilo de cadeia curta

Como exemplo da síntese de um derivado de alquilidenodioxilo de cadeia curta de um dos compostos anteriormente descritos, usa-se a síntese seguinte de um derivado de isopropilideno.

Agita-se uma mistura de 8-oxoguanosina, substituída na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos (17 mmole), 2,2-dimetoxipropano (41 mmole), acetona (200 ml) e ácido sulfúrico concentrado (10 gotas), sob N₂, à temperatura ambiente, durante um período de 52 horas. Arrefece-se a mistura até zero graus C e trata-se com hidróxido de amónio concentrado (5 ml). Remove-se a maior parte do líquido in vácuo, e filtra-se o sólido resultante. Lava-se o sólido filtrado com água, acetona e depois com éter etílico, seguindo-se uma secagem numa estufa de vácuo a 60 graus C por forma a obter-se o derivado desejado. Para os derivados 8-tioxo, 8-selenoxo e 8-ciano-imino, seguem-se procedimentos similares.

Exemplo 23: 8-oxo-2',3'-O-isopropilideno-5'-benzoilguanosina substituída na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos

Agita-se uma mistura contendo um derivado de isopropilideno, como se descreveu no Exemplo 22 (3 mmole), trietilamina (3 ml), cloreto de benzoilo (3 mmole) e diclorometano (100 ml), à temperatura ambiente durante um período de 16 horas. Adiciona-se depois a mistura a água, separa-se a fase de diclorometano, e extracta-se a fase aquosa com mais diclorometano (2x150 ml).

Combinam-se as fases de diclorometano, secam-se com NaSO₄, e remove-se o solvente in vácuo. Purifica-se o resíduo por cromatografia

tografia em coluna de sílica gel.

Os derivados de 5'-acetilo são preparados substituindo o cloreto de benzoilo por anidrido acético. Os derivados de 8-tioxo, 8-selenoxo e 8-cianimino são preparados de um modo similar.

Exemplo 24: 8-tioxo-2',3',5'-triacetilguanosina substituída na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos

Esta preparação é um exemplo dos procedimentos de acilação para o anel de ribosilo.

Adiciona-se 4-N,N-dimetilaminopiridina (10 mg) a uma mistura de 8-tioxoguanosina, substituída na posição 7 com hidrocarbilo substituído com heteroátomos, (3 mmole), trietilamina (2 ml), anidrido acético (15 mmole; alternativamente podem usar-se cloretos de acilo de cadeia curta ou cloreto de benzoilo) e diclorometano (50 ml). Agita-se a mistura reaccional resultante sob N_2 durante 16 horas à temperatura ambiente.

Adiciona-se depois mais diclorometano (50 ml) e lava-se a solução com HCl 1N, com salmoura e, depois, com água. Depois seca-se a solução com Na_2SO_4 . Remove-se o solvente in vácuo e purifica-se o resíduo, por cromatografia em coluna de sílica gel.

Para preparar os derivados de 8-oxo, 8-selenoxo e 8-cianimino utilizam-se procedimentos similares.

B. Exemplos de Composições para administração

Descrevem-se seguidamente exemplos de composições sólidas e líquidas, adequadas para administrar os compostos do presente invento, usando, como exemplos de ingredientes activos, cinco dos derivados de guanina-nucleósido mais preferidos.

Comprimidos

Os comprimidos são preparados a partir dos ingredientes seguintes:

-60-

	Partes em peso
7-(2-cloroetil)-8-oxoguanosina	2,5
Lactose em pó	36,4
Amido de milho, anidro	34,5
SiO ₂ finamente dividida	5,6
Polivinilpirrolidona	0,6
Estearato de magnésio	0,4
	80,0

Mistura-se exaustivamente o derivado de guanosina com a lactose, 25,0 partes em peso do amido de milho e 4,0 partes de SiO₂. A mistura resultante é depois humidificada uniformemente com uma solução etanólica a 5% de polivinilpirrolidona. Faz-se depois passar a mistura molhada através de um peneiro com malha de um milímetro, para produzir um granulado. Seca-se o granulado, durante cerca de 24 horas, a 60°C, numa câmara de secagem. Faz-se passar o granulado seco de novo através de um peneiro com malha de 1 milímetro. Misturam-se 700 partes do granulado assim obtido, num misturador adequado, com uma mistura consistindo na restante SiO₂, no restante amido de milho e no total de estearato de magnésio, mistura esta que tinha sido passada, previamente, através de um peneiro com malha de um milímetro. Prensa-se então a mistura assim obtida, na forma de comprimidos pesando, cada um, 800 miligramas e contendo 25 miligramas da guanosina.

Cápsulas de amido

O conteúdo das cápsulas é preparado a partir dos ingredientes seguintes:

	<u>Partes em peso</u>
7-(carbetoximetil)-8-oxoguanosina	10,0
Lactose	450,0
Amido de milho	540,0
	1000,0

-61-

Mistura-se, gradualmente, o derivado de guanosina com a lactose. Quando já se misturou toda a lactose mistura-se a mistura obtida com amido de milho. Usa-se depois a mistura resultante para encher cápsulas contendo 10 gramas da mistura. Cada cápsula contém 1,0 miligrama do derivado de guanosina.

Comprimidos

Prepara-se um lote de 10.000 comprimidos, contendo, cada um, 50 miligramas de 7-(4-nitrobenzil)-8-oxoguanosina, a partir dos tipos e quantidades de ingredientes seguintes:

7-(4-nitrobenzil)-8-oxoguanosina	500 gramas
Fosfato de dicálcio	1000 gramas
Metilcelulose, U.S.P. (15 cps)	75 gramas
Talco	150 gramas
Amido de milho	250 gramas
Estearato de magnésio	<u>25 gramas</u>
	2000 gramas

Misturam-se bem o derivado de guanosina e o fosfato de dicálcio, granulam-se com uma solução a 7,5 de metilcelulose em água, faz-se passar através de um peneiro nº 8 (U.S. Standard Sieve Series) e seca-se cuidadosamente. Fazem-se passar os grânulos secos através de um peneiro nº. 12 (U.S. Std. Sieve Series), misturam-se com o talco, o amido e o estearato de magnésio e prensa-se em comprimidos.

Composição injectável

Prepara-se uma composição estéril, adequada para injeção subcutânea ou intracavitária e contendo 50 miligramas de 7-carboxamidometil-8-oxoguanosina em cada mililitro de ingredientes, a partir dos tipos e quantidades de ingredientes seguintes:

7-Carboxamidometil-8-oxoguanosina	5 gramas
Solução salina fisiológica	98 mililitros
Óleo de sésamo	2 mililitros

BAD ORIGINAL

-62-

Misturam-se o derivado de guanosina e a solução salina e sonica-se a mistura durante um período de tempo suficiente para se obter uma suspensão substancialmente homogênea. Mistura-se depois o óleo de sésamo e homogeneiza-se similarmente a nova mistura por forma a obter-se uma emulsão. Após a emulsificação, injectam-se cinco a quinze por cento do volume final desta preparação estéril, subcutânea ou intraperitonealmente, uma vez por semana, para melhorar a imunidade humoral.

Composição aquosa para uso oral

Prepara-se uma composição aquosa para uso oral contendo cada 5 mililitros (1 colher de chá), 25 miligramas de 7-(4-metoxibenzil)-8-oxoguanosina, a partir dos ingredientes seguintes:

7-(4-metoxibenzil)-8-oxoguanosina	5,0 gramas
Metilparabeno, U.S.P.	0,75 gramas
Propilparabeno, U.S.P.	0,25 gramas
Sacarina de sódio	1,25 gramas
Ciclamato de sódio	0,25 gramas
Glicerina	300 mililitros
Pó de tragacanto	1,0 gramas
Sabor de óleo de laranja	1,0 gramas
Corante de laranja F.P. e C.	0,75 gramas
Água desionizada, q.s. para	1000 mililitros

C. Métodos

Culturas de linfócitos

Prepara-se o meio de cultura contendo soro, para conter em 100 mililitros o seguinte: 91,9 mililitros de RPMI1640 (Flow Laboratories, Inc., Rockville, MD, E.U.A.), 0,1 mililitros de 100xglutamina, 1,0 mililitro de 100xpiruvato de sódio, 1,0 mililitro de 50xaminoácidos não essenciais, 1,0 mililitro de água contendo 10^4 unidades de penicilina G e 10^4 microgramas de estreptomina e 5,0 mililitros de um lote suportante ou de soro fetal

BAD ORIGINAL

-63-

de vitelo (FCS). Misturam-se estes ingredientes até se ter uma homogeneidade aparente. Preparam-se suspensões de células de baço e populações enriquecidas com células B esplênicas tal como se descreve em Goodman et al., J. Immunol., 121:1905 (1978).

Para avaliar a imuno-resposta humoral primária aos eritrocitos de ovino (SRBC), cultivam-se 5×10^6 a 10^7 células de baço murinos em 10 mililitro de meio contendo 5% de FCS durante 4 ou 5 dias na presença do imunogénio. Incubam-se as células em placas de cultura (Costar, Cambridge, MA, E.U.A.) a 37°C, numa atmosfera humidificada de 10% de CO₂ em ar, usando caixas de cultura de tecidos (CBS Scientific, Del Mar, CA) que são agitadas a uma frequência de 7 ciclos por minuto. Os SRBC em fase líquida estão disponíveis na Colorado Serum Co., Denver Co., E.U.A.

Preparam-se linfócitos de sangue humano periférico (PBL) a partir de sangue venoso heparinizado, por centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll-diatrizoato. Os PBL são desprovidos de células T supressoras contendo o receptor de histamina do tipo 2, fazendo-os aderir às superfícies de caixas de petri, de plástico, revestidas com albumina de soro de coelho-histamina (Cell ect nº2 Kit; Seragen, Boston, MA, E.U.A.) e recuperando as células não aderentes por lavagem tal como se descreve em Wysocki e Sato, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2844 (1978) e tal como foi modificado por Cavagnaro e Osband, Biotechniques, Janeiro/Fevereiro:30 (1983).

O meio de cultura de tecidos utilizado nestes estudos é preparado como se segue: cem mililitros (ml) contêm 87,9 ml de RPMI 1640 (Elow Laboratories, Rockville, MD, E.U.A.), 0,1 ml de 100 x glutamina, 1,0 ml de Tampão HEPES 1,0 M (Microbiological Associates, Betheseda, MD, E.U.A.), 1,0 ml de água contendo 10^4 U de penicilina G e 10^4 microgramas de estreptomicina, e 10 ml de plasma desactivado por calor, autólogo, fresco. Para avaliação da imuno-resposta humoral primária ao SRBC, cultivam-se células linfóides com uma densidade de 2×10^6 /ml num volume de 1,0 ml contendo 5×10^6 SRBC como antigénio (Colorado Serum Co., Denver, Co., E.U.A.) conjuntamente com IL-2 (uma preparação parcialmente puri-

BAD ORIGINAL

-64-

ficada de IL-2 humana, que está isenta de actividade de interferão-gama, que foi obtida na Electro-Nucleonics, Inc., Silver Spring, MD, E.U.A.) e com o derivado de guanina-nucleósido.

Teste de células formando placas (PFC)

Determinaram-se as PFC segregando anticorpos contra o SRBC, após 4 ou 5 dias de cultura, usando uma modificação do ensaio de placa hemolítica de Jerne e Nordin, Science 140:405 (1963). Cultivam-se as células em meio completo antes da formação das placas; estas são colocadas em placas de agarose padrão de baixo Mr (Bio-Rad Laboratories, Richmond CA, E.U.A.), incubam-se em complemento de coxaia absorvido - SRBC durante uma hora, após 1,5 horas de incubação sem complemento.

Actividade de substituição de células T

Cultivam-se 5×10^6 células B viáveis de ratinho CBA/CaJ. Estas células são geradas tratando sequencialmente células de baço, primeiro, com complemento que fixa os anticorpos monoclonais dirigidos contra os antigénios thy 1.2 das células T, e, em segundo lugar, com complemento para lisar quaisquer células T presentes (New England Nuclear, Boston, MA, E.U.A.). Cultivam-se depois as células assim tratadas, com ou sem 0,1 ml de SRBC a 0,1 por cento (v/v) como imunogénio, em meio contendo soro e contendo também quantidades incrementais de um derivado de guanosina numa quantidade compreendida entre 0 e 10^{-4} molar. Os PFC directos contra o SRBC são determinados 4 dias depois.

Ratinhos Os ratinhos CBA/CaJ, 8-16 semanas de idade, são adquiridos no Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, E.U.A. Um núcleo de criação de ratinhos CBA/N é fornecido pela Animal Production Section, National Institutes of Health, Bethesda, MD, E.U.A. Todos os ratinhos são mantidos com pelotas Wayne Lab Blox F6 (Allied Mills, Inc., Chicago, IL, E.U.A.) e com água clorada, acidificada com HCl a um valor de pH de 3,0.

Preparações de células As suspensões de células de baço e do timo são preparadas como se descreve em Goodman et al., J. Immunol., 121:1905 (1978). As populações, enriquecidas com células

-65-

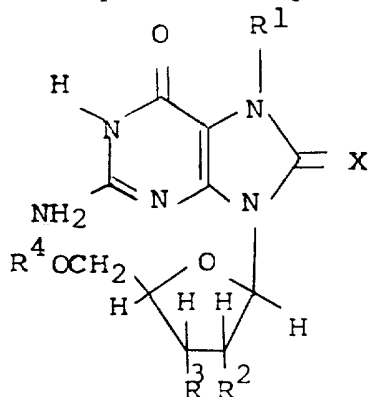
B, são preparadas tratando 10^8 células de baço com uma diluição 1:1000 de anticorpo monoclonal anti-thy 1.2 (New England Nuclear, Boston, MA, E.U.A.) durante 30 minutos a 4°C. Centrifugam-se as células tratadas a 280 xg, durante 10 minutos, removem-se os anticorpos e ressuspendem-se as células numa diluição 1:6 de complemento de cobaia absorvido - RBC de CBA, a 37°C durante 45 minutos. Lavam-se então as células e cultivam-se como anteriormente se descreveu.

Injecções Os ratinhos são injectados i.p., com uma solução contendo 50 g de TNP-BSA. Nos cerca de 30 minutos seguintes à injeção de imunização, dois grupos de seis ratinhos, cada um, recebem também injeções de 0,2 ml i.p. de uma guanosina da invenção em óleo de sésamo a 100 por cento, ou em 2 por cento (v/v) de óleo de sésamo sonificado em solução salina normal, estando a guanosina presente numa concentração de 5 mg/ml. Um terceiro grupo de seis ratinhos recebeu a imunização mas não recebeu derivado de guanosina. Os títulos de anticorpos anti-TNP-BSA são depois determinados usando técnicas padrão.

O presente invento foi descrito em relação às suas concretizações preferidas. Será evidente para os peritos na arte que se podem fazer modificações e/ou variações da matéria que se descreveu sem se alterar o espírito da invenção aqui definido.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de preparação de um derivado de guanina-nucleósido substituído que corresponde à fórmula:



onde

X é O, S, Se ou NCN;

R¹ é um radical hidrocarbilo substituído por heteroátomo, possuindo um comprimento superior ao de um grupo etilo e inferior ao de um grupo decilo, e que está livre de carga iônica aos valores de pH fisiológicos;

R² e R³ são radicais iguais ou diferentes seleccionados do grupo consistindo em hidrogénio, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior e benzoxilo, ou R² e R³ constituem juntos um radical alquili deno-dioxilo inferior;

R⁴ é um radical seleccionado do grupo consistindo em hidrogénio, alcanóilo inferior e benzoílo; e dos seus sais de adição de base, não tóxicos, farmacêuticamente aceitáveis, caracterizado por compreender os passos de

a) se reagir 1-amino-8-oxoguanosina com um agente de alquilação que é um composto hidrocarbilo substituído por heteroátomo possuindo um comprimento superior ao de um grupo etilo e inferior ao de um grupo decilo e que está livre de carga iônica a valores de pH fisiológicos para formar um produto 1-amino-7-substituído-8-oxoguanosina;

b) isolar o produto do passo a)

c) dissolver o referido produto isolado do passo b) em HCl

-67-

concentrado para formar uma solução;

d) misturar a referida solução do passo c) com nitrito de sódio aquoso e mantendo a mistura resultante durante um período de tempo suficiente para desaminar o grupo 1-amino da referida 1-amino-7-substituída-8-oxoguanosina; e

e) isolar o produto 7-substituído-8-oxoguanosina resultante;

ou

a') reagir 8-tioxoguanosina com um agente de alquilação que é um composto hidrocarbilo substituído por um heteroátomo possuindo um comprimento superior ao de um grupo etilo e inferior ao de um grupo decilo e que está livre de carga iônica a valores de pH fisiológicos para formar uma hidrocarbíl-8-tioxoguanosina substituída em 7 por heteroátomo; e

b') se isolar o produto hidrocarbíl-8-tioxoguanosina substituída em 7 por heteroátomo, resultante;

ou

a'') se reagir o produto isolado do passo b') com um agente de S-alquilação para formar um produto S-alquilado;

b'') isolar o referido produto S-alquilado;

c'') reagir o referido produto S-alquilado com seleneto de sódio para formar um produto hidrocarbíl-8-selenoxoguanosina substituído em 7 por heteroátomo; e

d'') se isolar o referido produto do passo c'');

ou

a''') se reagir o produto isolado do passo b'') com cianamida e com hidreto de sódio para formar um produto hidrocarbíl-8-cianiminoguanosina substituída em 7 por heteroátomo;

e

b''') se isolar o referido produto do passo a''');

ou

-68-

a''''') se reagir qualquer dos produtos isolados nos passos e), b'), d') ou b''''') com um composto alquilidenodioxilo inferior, com um composto acilo inferior ou benzoílo para formar um produto no qual R^2 , R^3 e R^4 são como acima definidos; e

b''''') se isolar o produto do passo a''''').

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o agente de alquilação do passo a) ser epibromo-hidrina, o referido produto, isolado no passo b) ser 1-amino-7-(2,3-epoxi propil)-8-oxoguanosina e antes do passo c), o referido produto isolado ser:

i) reagido com um reagente seleccionado do grupo consistindo em tiofenol, 3,4-dimetoxifenetilamina, azida de sódio, água e 4-(4-fluorofenil)piperazina para formar um produto;

ii) isolar o referido produto do passo i); e

iii) e por o produto isolado do passo ii) ser o produto isolado utilizado no passo c).

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o agente de alquilação do passo a) ser seleccionado do grupo consistindo em bromoacetato de etilo, 2-cloroacetamida, uma 2-cloroacetamida substituída por N-hidrocarbilo ou N-alcanol, cujo grupo carboxamido tem a fórmula $CONR^5R^6$ onde R^5 e R^6 são iguais ou diferentes e são seleccionados do grupo consistindo em hidrogénio, alquilo inferior ou alcanol C_2-C_3 , ou NR^5R^6 em conjunto formam um anel heterocíclico com cinco ou seis átomos no anel, um haloéter, cloreto de 3-N,N-dimetilaminopropil, cloreto de 2-piperidinoetilo, 2-bromo-4-cloroacetofenona, brometo de 4-nitrobenzilo, cloreto de 4-metoxibenzilo e brometo de 2-cloroetil.

4 - Processo de preparação de uma composição farmacéutica caracterizado por compreender a mistura de uma quantidade diluente de um transportador fisiologicamente tolerável e de uma quantidade imunopotenciante eficaz de um derivado de guanina-nucleósido substituído, melhorador da resposta imunitária preparado de acordo com a reivindicação 1.

5 - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracteri-

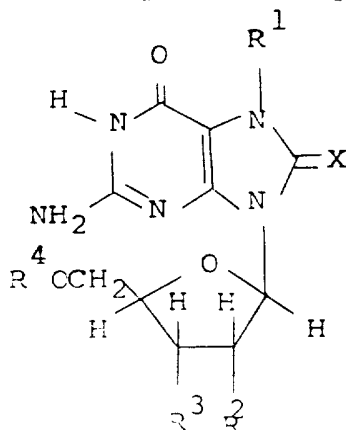
BAD ORIGINAL

-69-

zado por no composto de fórmula I X ser O ou S.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por no composto de fórmula I R^2 e R^3 serem hidroxilo e por R^4 ser hidrogénio.

7 - Processo para melhorar uma resposta imunitária, caracterizado por compreender o contacto de leucócitos, num meio aquoso, com uma composição contendo uma quantidade diluente de um transportador fisiologicamente tolerável com uma quantidade imunopotenciante eficaz de um derivado de guanina-nucleósido substituído, tendo o referido derivado de guanina-nucleósido substituído uma estrutura que corresponde à fórmula



onde

X é O, S, Se ou NCN;

R^1 é um radical hidrocarbilo substituído no heteroátomo, com um comprimento superior ao de um grupo etilo e inferior ao de um grupo decilo e que está isento de carga iónica aos valores fisiológicos de pH;

R^2 e R^3 são radicais iguais ou diferentes seleccionados entre os do grupo consistindo de hidrogénio, hidroxilo, alcóxido inferior, alcanóilóxido inferior, e benzóxido, ou R^2 e R^3 constituem juntos um radical alquilidenodioxido inferior;

R^4 é um radical seleccionado entre os do grupo consistindo de hidrogénio, alcanóilo inferior e benzóilo; e os seus sais de adição de base, não tóxicos, farmacêuticamente aceitáveis.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracteriza

DA ORIGINAL

-70-

do por os referidos leucócitos serem postos em contacto in vi-
tro, num meio de cultura.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterii
zado por os referidos leucócitos incluírem células B.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracte-
rizado por a referida resposta imunitária ser uma resposta es-
pecífica para antigénio.

11 - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterii
zado por os referidos leucócitos serem seleccionados entre os
do grupo consistindo de células B, células T e neutrófilos, hu-
manos.

Lisboa,

-4. MAI 1969

Por SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION

- O AGENTE OFICIAL -

C. JUNIO

