

(11) *Número de Publicação:* **PT 87481 B**

(51) *Classificação Internacional: (Ed. 5)*  
**C07H019/167 A A61K031/70 B**

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) *Data de depósito:* **1988.05.13**

(30) *Prioridade:* **1987.05.15 US 050818**  
**1987.05.26 US 054376**

(43) *Data de publicação do pedido:*  
**1989.05.31**

(45) *Data e BPI da concessão:*  
**08/94 1994.08.03**

(73) *Titular(es):*

**PAUL GORDON**  
**1220 EAST 48TH STR. CHICAGO, ILLINOIS 60610**  
**US**

(72) *Inventor(es):*

(74) *Mandatário(s):*

**ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO**  
**RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT**

(54) *Epígrafe:* **PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE FORMAS POLIMÓRFICAS DE XANTOSINA E DE COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS QUE AS CONTÊM**

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO  
DA  
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 87.481

REQUERENTE: Dr. PAUL GORDON, norte-americano, residente em 1220 East 48th Street, Chicago, Illinois 60610, Estados Unidos da América,

EPÍGRAFE: "Processo para a preparação de formas polimórficas de xantosina e de composições farmacêuticas que as contêm"

INVENTORES:

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

U.S.A., 15 de Maio de 1987, sob o Nº.: 07/050,818  
U.S.A., 26 de Maio de 1987, sob o Nº.: 07/054,376

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE FORMAS POLIMÓRFICAS  
DE XANTOSINA E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE AS CONTEM"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A ocorrência de várias formas cristalinas do mesmo composto é designada por polimorfismo do cristal. Os polimorfos do cristal são quimicamente idênticos mas diferem na sua estrutura cristalina e propriedades físico-químicas.

Os polimorfos do cristal de xantosina são conhecidos. Um destes polimorfos do cristal é o desidrato proveniente da xantosina. O processo de cristalização final utilizado na preparação desta forma de xantosina envolve o aquecimento de uma suspensão a dois por cento de xantosina em água até a solução da inosina ocorrer a cerca de 100°C. Isto é seguido por precipitação e colheita da xantosina. Os cristais resultantes são prismas longos que se decompõem e têm um parâmetro de fusão não bem definido. A "xantosina padrão" é aqui definida como sendo o desidrato de xantosina que é preparado utilizando este processo de cristalização como a fase

final.

Além da forma desidratada de xantosina, é conhecido um segundo polimorfo de cristal de xantosina que é uma forma anidra. Esta forma de xantosina cristaliza a partir de álcool para formar agregados feltrados (coberto de asperesas). A mesma decompõem-se por aquecimento e não tem um parâmetro de fusão distinto.

O polimorfismo no estado de solução é de há muito tido como não permissível por razões energéticas. Considera-se geralmente que as moléculas num dissolvente serão inconscientes da sua origem e que todos os polimorfos de cristal de um composto darão origem a soluções que têm propriedades idênticas. A presunção fundamental sobre a qual esta conclusão é baseada consiste no facto de todas as ligações no estado sólido intermolecular do cristal serem inicialmente efectuadas para libertar a energia potencial necessária para criar o estado de solução. A eventualidade da solução básica pode mesmo ser seguida pela agregação do soluto, mas foi considerado que há uma ausência de barreiras de energia entre as formas de agregação do soluto. Na verdade, a tendência dos nucleosidos, tais como a xantosina, para se agregarem em solução aquosa é conhecida de há muitos anos. Esta associação foi relatada para ocorrer essencialmente, de maneira exclusiva, por empilhamento de base vertical. Contudo, considerou-se que as barreiras não existem entre as formas agregadas de moléculas de nucleosido em solução e que os monómeros são a forma de nucleosido mais frequentemente encontrada em solução.

Além disso, embora os nucleosídeos de purina monoméricos possam potencialmente assumir 20 a 26 conformações diferentes no espaço como um resultado da rotação de ligação espontânea, presumiu-se que em solução aquosa estas formas são instantaneamente interconvertíveis. A barreira de energia entre as conformações na proximidade seguinte é mantida até ser trivial uma vez que se crê que para derivar de uma ligação de hidrogénio entre soluto e dissolvente, e não a partir da associação soluto-soluto em vez do empilhamento de base acima mencionado e a ligação-hidrogénio ter sido antecipada para nucleosídeos de purina.

Agafonov, Leonidov e Kobzareva, Zhurnal Obshchei Khimii, 50, 166 (1980) (em seguida designados por Agafonov), ensinam que duas formas conhecidas de prednisolona que são produzidas por recristalização a partir de dois dissolventes orgânicos diferentes são polimorfos de cristal que têm diferentes propriedades físico-químicas, incluindo diferentes velocidades de dissolução e diferentes solubilidades. Agafonov ensina ainda que as soluções destes dois polimorfos de cristal de prednisolona em etanol exibem diferentes espectros de dispersão rotativa óptica (ORD). Embora os autores afirmem que a diferença nos espectros ORD dos dois polimorfos não podem servir como um critério na análise conformacional devido às elevadas leituras de fundo, os mesmos especulam que as diferentes conformações das formas de soluto dos dois polimorfos de cristal e que estas diferenças em conformação podem dar lugar a diferenças na acessibilidade biológica (velocidade de passagem em fluídos biológicos de um animal) na activi-

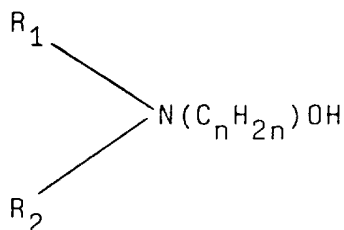
dade das duas formas polimórficas de prednisolona.

Leonidov, Russian Journal of Physical Chemistry, 59, 760 (1985) (em seguida designado por Leonidov) ensina que os polimorfos de cristal de certos compostos orgânicos (ácido 5,5-dietilbarbitúrico, p-aminobenzenosulfanilamida, prednisolona, cafeína e L-cânfora) exibem diferentes índices de refração e volumes de indicador óptico quando são postos em solução em determinados dissolventes orgânicos (clorofórmio, etanol e dimetilformamida). As diferenças nestas duas propriedades ópticas mencionadas em Leonidov são extremamente pequenas (cerca de 0,01-0,07% de variação para o índice de refração e 0,04-0,21% de variação para o volume indicador). Leonidov sugere que o princípio de que as modificações de um composto diferem na estrutura de cristal mas são idênticas quando as mesmas são postas em solução não podem ser aplicadas depois a substâncias orgânicas e que as diferenças referidas na actividade biológica de alguns produtos farmacêuticos podem ser explanadas pela persistência das diferentes modificações polimórficas de cristais dos compostos no estado de solução.

Todavia, todas as alterações nas propriedades ópticas relativas em Leonidov e Agafonov foram observadas apenas em dissolventes orgânicos. Nenhuma destas duas publicações refere quaisquer mudança nas propriedades ópticas de polimorfos em soluções aquosas. A água, o dissolvente biologicamente significativo, tem propriedades fundamentalmente diferentes das dos outros lí-

quidos. É totalmente imprevisível a partir dos resultados referidos em Leonidov e Agafonov se o soluto de polimorfismo seria obtido utilizando água como dissolvente. Além disso é meramente especulativo em Leonidov e Agafonov que os polimorfos do mesmo composto possam ter diferentes actividades. Não foram apresentados dados para suportar esta teoria.

Embora as mesmas não estejam relacionadas com o polimorfismo, as Patentes norte-americanas N<sup>o</sup>s. 3.646.007, 3.728.450, 3.857.940 e 4.512.981 revelam complexos de inosina e aminoálcoois de alquilo da fórmula:



na qual  $R_1$  e  $R_2$  são alquilo inferior e  $n$  é um número inteiro de 2 a 4. Os complexos são preparados misturando a inosina e o aminoálcool de alquilo numa proporção de 1:1 a 10:1 à temperatura ambiente. Os complexos podem também ser preparados misturando, nestas mesmas proporções e à temperatura ambiente, inosina e um sal do aminoálcool de alquilo que tinha sido formado pela reacção do aminoálcool de alquilo com um ácido farmacologicamente aceitável. Não é utilizado aquecimento, e nenhuma neutralização ou outra reacção química tem lugar durante a formação do

complexo nem é necessária durante a formação do complexo. Os complexos têm actividade farmacológica, incluindo as actividades antiviral, anti-inflamatória e imunorreguladora e a capacidade para restaurar o comportamento deteriorado da aprendizagem e da memória.

#### BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

De acordo com um aspecto da invenção, proporciona-se um processo para a preparação de formas polimórficas/cristalinas de um sal de xantosina, caracterizado pelo facto:

- de se escolher um dissolvente;
- de se adicionar a esse dissolvente uma quantidade de xantosina;
- de se adicionar a esta xantosina uma quantidade equimolar de uma base forte;
- de se aquecer o dissolvente, a base e a xantosina a uma velocidade pré-determinada até uma temperatura suficiente para dissolver a xantosina e superar as barreiras energéticas que impedem a conversão da xantosina em uma ou outra configuração polimórfica;
- de se precipitar o sal de xantosina;
- de se arrefecer o sal citado antes a uma velocidade pré-determinada durante um intervalo de tempo previamente esta-

belecido; e

- de se liofilizar completamente o sal resultante para se obter as formas polimórficas cristalinas do sal de xantosina.

A invenção compreende também um processo para sintetizar formas polimórficas cristalinas de xantosina idêntico ao processo que acaba de ser descrito, excepto no facto de não ser aplicado aquecimento estranho, e o aquecimento gerado pela reacção de neutralização isoladamente fazer com que a temperatura se eleve até uma temperatura suficiente para ultrapassar as barreiras energéticas que evitam a conversão da xantosina noutra configuração polimérica. Sob algumas condições de síntese em ambos estes processos, os sais de xantosina precipitam espontaneamente, embora sob outras condições, passos adicionais possam ser dados para precipitar os mesmos. Bases especialmente preferidas são os hidróxidos de metais alcalinos e aminoálcoois alquílicos tais como colina e dimetilaminoisopropanol.

Fazem também parte da invenção as formas polimórficas cristalinas produzidas por estes processos.

De acordo com outro aspecto da invenção, são proporcionadas formas polimórficas de soluto dos sais de xantosina. Estas formas polimórficas apresentam diferentes propriedades físico-químicas, em comparação umas com as outras e a forma de soluto do xantosinato padrão, que reflecte as suas diferentes configurações. As

formas polimórficas de soluto da invenção apresentam também dramaticamente diferentes actividades biológicas comparadas com o xantosinato padrão.

É também proporcionado um processo para a preparação de uma forma polimórfica de soluto de um sal de xantosina caracterizado pelo facto de:

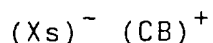
- se escolher um dissolvente;
- se adicionar a esse dissolvente uma quantidade de xantosina;
- se adicionar à xantosina uma quantidade equimolar de uma base forte;
- se aquecer o dissolvente, a base e a xantosina a uma velocidade pré-determinada até uma temperatura suficiente para dissolver a xantosina e superar as barreiras energéticas que impedem a conversão da xantosina em uma outra configuração polimórfica; e
- se arrefecer a solução a uma velocidade pré-determinada durante um intervalo de tempo pré-determinado.

A invenção compreende também um processo para a preparação de uma forma polimórfica dissolvida de xantosina idêntico ao processo acabado de descrever, excepto pelo facto de não ser aplicado calor estranho, e o calor gerado pela reacção de neutralização fazer com que a temperatura se eleve até um nível suficiente para

ultrapassar as barreiras energéticas que impedem a conversão da xantosina noutra configuração polimórfica. Formas polimórficas dissolvidas de sais de xantosina podem ainda ser preparadas dissolvendo as formas polimórficas cristalinas de xantosina da invenção, acima descritas, num dissolvente.

De acordo com outro aspecto da invenção, são proporcionadas formas polimórficas cristalinas e soluções de xantosina.

De acordo ainda com outro aspecto da invenção, são proporcionados novos sais de xantosina que têm a fórmula:



na qual Xs é o ião xantosinato e CB representa o catião de uma base forte.

Finalmente, são proporcionados: (1) um processo para modular a resposta imune de um animal que compreende administrar ao animal uma composição que contém um dissolvente ou veículo farmacologicamente aceitável e uma quantidade eficaz de uma forma polimórfica cristalina ou em solução de xantosina ou de uma forma polimórfica cristalina ou em solução de um sal de xantosina; e (2) composições para utilização neste processo.

## DEFINIÇÕES

Tal como aqui utilizado, o termo "conformação" refere-se às diferenças na estrutura da xantosina ou unidades monoméricas de sal de xantosina, tal como a conversão do anel ribose a partir da cadeia para a forma em barça. O termo "configuração" será aqui utilizado para designar diferenças em conformação combinadas com diferentes padrões de associação entre a xantosina ou unidades monoméricas de sal de xantosina.

O termo "Xantosina" será aqui utilizado para designar todas as formas de xantosina, incluindo as formas polimórficas cristalinas conhecidas de xantosina e as formas polimórficas novas, cristalinas e em solução, da presente invenção. Todavia, o requerente não pretende que as formas polimórficas cristalinas de xantosina constituam uma parte da invenção, e os mesmos são especificamente não reivindicados.

"Xantosinato" ou "sal de xantosina" serão termos aqui utilizados para designar todos os sais de xantosina formados por neutralização de xantosina com uma base forte.

O "xantosinato padrão" é aqui definido para significar a xantosina padrão que foi neutralizada em solução aquosa a uma baixa concentração (1 mg/ml) pela adição de um equivalente molar de hidróxido de sódio durante um período de cerca de três horas, com agitação, mas sem aquecimento e sem produção de calor.

## BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIGURA 1 é um gráfico de barras que mostra o aumento de pH para vários sais quando a concentração dos sais é alterada de  $2,7 \times 10^{-4}M$  para  $0,4M$ .

FIGURA 2 é um gráfico de concentração contra o coeficiente de extinção relativo para o xantosinato padrão e para três formas polimórficas de xantosinato em solução que mostra o desvio a partir da lei de Beer produzido por estes compostos.

FIGURA 3 é o padrão de difracção de pó em raios-X para a xantosina padrão.

FIGURA 4 é o padrão de difracção de pó em raios-X para formas polimórficas cristalinas de xantosinato NaXs-I.

FIGURA 5 é o padrão de difracção de pó em raios-X para formas poliméricas cristalinas de xantosinato NaXs-II.

FIGURA 6 é o padrão de difracção de pó em raios-X para formas poliméricas cristalinas de xantosinato ChXs-I.

FIGURA 7 é o padrão de difracção de pó em raios-X para formas poliméricas cristalinas de xantosinato ChXs-II.

FIGURA 8 mostra o aspecto de dispersão óptica rotativa de

soluções aquosas de formas polimórficas de xantosina ChXs-I, ChXs-II, NaXs-I e DMAIPXs.

FIGURA 9 é um gráfico de mortalidade em relação ao tempo depois de irradiação letal para ratos tratados com várias formas poliméricas de soluto de xantosinato.

FIGURA 10 mostra a supressão do edema da base do pé pelas formas polimórficas de soluto de xantosinato ChXs-I e ChXs-II e uma mistura de cloreto de colina e xantosina padrão a várias doses de tratamento.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO  
PRESENTEMENTE PREFERIDAS

A invenção compreende novas soluções de xantosina e formas polimórficas e novas soluções de xantosinato e formas polimórficas cristalinas. Cada forma polimórfica tem propriedades físicas, químicas e biológicas diferentes. No que respeita aos monómeros de xantosina individuais que compõem as formas polimórficas, as alterações produzidas nos mesmos pelos processos da invenção podem apenas ser estereoquímicas, isto é, alterações na posição em espaço relativa dos grupos funcionais e outros grupos químicos que contribuem para os sistemas isomérico, tautomérico e rotomérico de xantosina.

A interrelação entre estas conformações estereoquímicas e as energéticas da sua interconversão têm sido estudadas por Ludemann e colaboradores em amónia líquida (Eur. J. Biochem, 49, 143 (1974)). A xantosina é suficientemente solúvel neste dissolvente para efectuar uma solução 0,6 M sem implicar complexação, como seria o caso em água. Em amónia, a barreira energética entre as várias formas estereoquímicas de xantosina é muito baixa, na proximidade da energia de uma simples ligação de hidrogénio. Assim, o tempo necessário para atingir o equilíbrio é muito menor que um segundo.

Se os diferentes processos de preparação da invenção conduzirem apenas a uma distribuição diferente entre possíveis formas-no-espaco dos monómeros de xantosina, então quando tais monómeros fossem colocados em solução, todas as diferenças em distribuição seriam extintas em menos de um segundo independentemente da distribuição à partida. Todavia, este não é o caso. A xantosina e as formas poliméricas de xantosinato da presente invenção mantêm a sua identidade física e química em solução durante vários dias. A persistência de diferenças na configuração polimórfica entre soluções de formas polimórficas pode apenas ser explicada pela interacção monómeros (isto é, agregação). Isto aumentaria a barreira energética de um termo de agregação.

### Síntese de Formas Polimórficas de Sal de Xantosina

As variantes seguintes são importantes na síntese das novas formas polimórficas de sais de xantosina (ambas formas polimórficas de cristal e soluto) da invenção:

1. Dissolvente. A xantosina é virtualmente insolúvel em dissolventes polares. Assim, os dissolventes polares podem ser utilizados. Dissolventes polares adequados incluem a água, dimetilformamida, amónia e álcoois alquílicos inferiores tais como etanol, metanol, propanol e butanol.

Os tipos de ligação que o dissolvente forma com a xantosina antes da formação do cristal e das formas polimórficas de xantosinato da invenção é um factor importante na formação da forma polimórfica. A utilização de um dissolvente polar contra outro conduz à formação de configurações poliméricas diferentes de sais de xantosina que dependem da intensidade da cessão de protão e aceitação dos vários dissolventes polares.

2. Temperatura. A elevação da temperatura é necessária para a formação das formas polimórficas de sal de xantosina. A temperatura deve ser elevada até um nível suficientemente alto de modo a que a xantosina entre em solução e assim que as barreiras energéticas impedem a conversão de uma configuração polimórfica de xantosina para outra sejam ultrapassadas. O calor gerado pela neutralização da xantosina com a base forte é suficiente para

superar estas barreiras energéticas. Todavia, aquecendo a xantosina e a base forte até uma temperatura elevada aplicando calor estranho aumenta ainda mais a formação polimórfica e influencia a natureza do polimórfio final. Ainda não se sabe que tipo de forças criam estas barreiras energéticas, mas a sua existência é conhecida pelo facto de que a utilização de temperaturas elevadas é necessária para obter a formação das formas polimórficas de cristal e soluto da invenção. Além disso, a variação de temperatura com o tempo, tanto no ciclo de aquecimento como no ciclo de arrefecimento afecta o desenvolvimento das formas polimórficas de sal de xantosina e a natureza da forma polimórfica final que é formada.

3. Concentração. A concentração da xantosina utilizada é também crítica para a formação das novas formas polimórficas de sal de xantosina da invenção. Além disso, à medida que se formam os sais de xantosina, concentrações mais elevadas de xantosina entram em solução visto que os sais resultantes são altamente solúveis nos dissolventes polares, aumentando assim a formação de formas polimórficas.

A concentração é importante visto que o contacto entre as moléculas de soluto é necessário para a agregação das moléculas. Como um princípio primário, à medida que a concentração aumenta, o contacto e a agregação tornam-se mais prováveis. Isto não é necessariamente verdade, contudo, se as moléculas em questão possuem domínios que se atraíam umas às outras e possuírem cargas

que se repelem naturalmente. O grupo funcional aniónico de xantosinato depois da neutralização coloca o xantosinato nesta classe de moléculas. Todavia, os agregados devem formar-se entre iões de sinal igual. A capacidade de interacção entre a atracção e a repulsão, especialmente na presença de iões opostos (por exemplo, colina<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>) torna o resultado associativo entre os iões da xantosinato imprevisível.

4. Liofilização. Embora a liofilização não seja necessária para a formação da forma polimórfica, a utilização da liofilização em vez de outros processos de isolamento de cristais, tais como a filtração por sucção e secagem do ar, contrubui para a natureza da forma polimórfica cristalina final e da forma poimórfica do soluto que se forma quando o polimórfio cristalino é dissolvido num dissolvente.

5. Base. A base forte utilizada para neutralizar a xantosina afecta também a natureza final do polimórfio formado.

#### Exemplo 1

A um frasco de liofilização VirTis de 600 ml foi adicionado 0,4 mole de xantosina padrão (desidrato de xantosina da Pharma Waldhf) e 0,4 mole de colina em metanol (110 ml de uma solução contendo 45% de colina em peso/volume). O frasco e o seu conteúdo foram então aquecidos com agitação de modo a que a temperatura se elevou da temperatura ambiente até 80°C em 20 minutos.

A xantosina dissolveu durante o decurso do aquecimento, mas quando a temperatura estava entre  $75^{\circ}$  e  $80^{\circ}\text{C}$ , ocorreu uma precipitação abrupta. O material precipitado tornou-se semelhante a um pudim e aderiu a si próprio e às paredes de vidro do frasco até um grau tal que o frasco podia ser virado com a parte superior para baixo sem haver derramamento.

O frasco foi em seguida removido do aquecedor-agitador e deixado arrefecer até à temperatura ambiente durante 30 minutos. Depois do arrefecimento, os conteúdos do frasco foram transformados em pasta utilizando uma haste de agitação em vidro. Depois o frasco foi colocado num liofilizador VirTis (modelo Freezemobile 12), e o material foi liofilizado durante 48 horas, tempo ao fim do qual a liofilização estava completa. O frasco foi removido do liofilizador, e o material liofilizado foi recolhido e pulverizado até um pó fino. O pó obtido foi um pó de um branco ligeiramente salino. Este provou não ter a higroscopicidade dos sais de colina comuns, tal como o cloreto de colina. O pó deve ainda, contudo, ser de modo rotineiro armazenado num dissecador sob vácuo. Este sal de xantosina será referido daqui em diante como CHXs-I.

### Exemplo 2

A um frasco de liofilização VirTis de 600 ml foram adicionados 0,4 moles de xantosina padrão (desidrato de xantosina da Pharma Walldhof) e 0,4 moles de colina em metanol) 110 ml de uma

solução de colina a 45% peso/volume). Os conteúdos do frasco foram agitados activamente durante 45 minutos à temperatura ambiente sem qualquer aquecimento.

Depois de cerca de 40 minutos de agitação apareceu um precipitado fino, mas a mistura de reacção permaneceu fluída e decantável. Passados 45 minutos, a agitação foi interrompida e a mistura foi deixada assentar até à temperatura ambiente durante mais 20 a 30 minutos.

O frasco foi em seguida colocado num liofilizador VirTis durante 48 horas, tempo ao fim do qual a liofilização estava completa. O material liofilizado resultante foi recolhido e pulverizado até um pó fino que era de um branco ligeiramente salino na cor e que, tal como o material produzido na Exemplo 1, não tinha a higroscopicidade dos sais de colina comum. Este sal de xantosina será referido aqui como ChXs-II.

### Exemplo 3

A um frasco de liofilização VirTis de 600 ml foram adicionados 0,4 moles de xantosina padrão (desidrato de xantosina, da Pharma Walldhof), 0,4 moles de dimetilamino isopropanol redestilado e 51 ml de metanol. Os conteúdos do frasco foram agitados e aquecidos progressivamente a partir da temperatura ambiente até 80°C durante um período de 20 minutos. Ocorrências significativas em relação à solubilização, precipitação e aparência geral

do precipitado foram as mesmas que as indicadas no Exemplo 1. O restante processamento foi também como indicado no Exemplo 1, e o pó resultante era de uma cor branco-salina e apresentava uma falta de higroscopicidade. Este sal de xantosina será referido em seguida como DMAIPXs.

#### Exemplo 4

A um frasco de liofilização VirTis de 600 ml foram adicionados 0,4 mole de xantosina padrão (desidrato de xantosina, da Pharma Walldhof), 0,4 mole de hidróxido de sódio na forma de grãos e 160 ml de água. Os conteúdos do frasco foram agitados e aquecidos progressivamente a partir da temperatura ambiente até 80°C durante um período de 30 minutos. Não se desenvolveu qualquer precipitado.

Em seguida adicionaram-se 200 ml de metanol ao frasco, enquanto continuou o aquecimento e a agitação. Desenvolveu-se então uma grande precipitação semelhante em natureza à observada no Exemplo 1. O frasco foi então removido do aquecimento e deixado repousar à temperatura ambiente durante mais 45 minutos. O material contido no frasco foi então liofilizado durante 48 horas, tempo ao fim do qual a liofilização estava completa. O material liofilizado resultante foi um pó branco não higroscópico. Este sal de xantosina será aqui em seguida referido como NaXs I.

#### Exemplo 5

Outro sal de xantosina foi preparado utilizando o processo descrito no Exemplo 4, excepto em que os ingredientes não foram aquecidos. Os mesmos foram simplesmente agitados durante 30 minutos antes da adição do metanol. O material liofilizado resultante foi um pó branco, não higroscópico. Este sal de xantosina será em seguida aqui referido como NaXs-II.

#### Exemplo 6

Outro sal de xantosina foi preparado de acordo com o processo do Exemplo 4, excepto em que 160 ml, em vez de 200 ml de metanol foram utilizados. Como consequência da utilização de uma quantidade menor de metanol, foi formado um precipitado fibroso, mas este precipitado redissolveu-se subsequentemente. Assim, o frasco colocado sobre o liofilizador contendo uma solução em vez de um sólido, e o sólido submerso durante a fase de liofilização.

A solução no frasco foi liofilizada durante 48 horas, período de tempo este ao fim do qual a liofilização estava completa. Depois, o frasco foi retirado do liofilizador e o material liofilizado foi pulverizado até ficar em pó. O pó branco resultante não era higroscópico. Este sal de xantosina será em seguida referido como NaXs-III.

#### Exemplo 7

Outro sal de xantosina foi fabricado de acordo com o processo do Exemplo 5, excepto em que apenas 160 ml de metanol foram adicionados. Como consequência, desenvolveu-se um precipitado, mas este precipitado não persistiu. O material colocado sobre o liofilizador foi uma solução, e o precipitado desenvolveu-se durante a liofilização. O produto obtido a seguir à liofilização foi um pó branco não higroscópico. Este sal de xantosina será referido em seguida como NaXs-IV.

#### Exemplo 8

Outro sal de xantosina foi fabricado de acordo com o processo do Exemplo 6, excepto em que antes da adição de 160 ml de metanol, a mistura de reacção foi arrefecida até 20°C colocado a mesma num banho de gelo. Assim, o período de aquecimento foi seguido por arrefecimento antes da adição do álcool. Como no Exemplo 6, formou-se depois da adição do metanol. O precipitado redissolveu-se subsequentemente, e foi colocada uma solução sobre o liofilizador. O produto final obtido depois da liofilização foi um pó branco não higroscópico, e este material será referido daqui em diante como NaXs-V.

#### Exemplo 9

Outro sal de xantosina foi fabricado de acordo com o pro-

cesso indicado no Exemplo 4, excepto em que apenas 100 ml de água foram adicionados. A agitação e aquecimento subsequentes produziram uma precipitação activa e permanente. Isto ocorreu aproximadamente 20 minutos depois do início do aquecimento quando a temperatura da mistura de reacção era de cerca de 70°C. Este precipitado foi liofilizado. O produto obtido a seguir à liofilização foi um pó branco não higroscópico. Este sal de xantosina será aqui referido em seguida como NaXs-VI.

#### Síntese de Formas Polimórficas de Xantosina

As mesmas variáveis descritas acima para a formação das formas polimórficas de xantosinato são também importantes na síntese das novas formas polimórficas de cristal e soluto, da invenção. No que se refere à concentração, a xantosina não é ionizada e assim o factor de forças repulsivas entre iões não entram em consideração.

#### Propriedades Físicas e Químicas

A existência de configurações poliméricas das formas polimórficas de sal de xantosina é demonstrada pelo facto de estas formas polimórficas terem:

(1) graus diferentes de hidrólise a concentração elevada, e assim diferentes pHs de soluções aquosas concentradas;

(2) solubilidades diferentes em butanol, um dissolvente relativamente hidrofóbico, e em água dura, um dissolvente de elevada força de ligação a hidrogénio;

(3) saídas únicas a partir da lei de Beer;

(4) diferentes padrões de difracção de pó aos raios-X; e

(5) diferentes espectros de dispersão rotativa óptica (ORD).

### 1. Hidrólise

O nucleósido de xantosina é um ácido orgânico, fraco no sentido formal, cujo  $pK_a$  (pH de meia ionização) é identificado de modo variado na literatura, como 5,5 ou 5,7. Os sais de xantosina podem ser formados fazendo reagir a xantosina com bases fortes. Esta neutralização de xantosina processa-se como segue:  $(\text{xantosina}) + \text{OH}^- + (\text{catião de bases forte})^+ \rightarrow (\text{xantosinato})^- + \text{H}_2\text{O} + (\text{catião de base forte})^+$ . O sal xantosinato e a água submetem-se subsequentemente a hidrólise que eleva o pH da solução. Esta interacção é típica dos sais formados a partir dos ácidos fracos e bases fortes e ocorre devido ao facto do anião destes sais ter uma tendência muito maior para se associar com iões de hidrogénio em água que o catião tem para se associar com iões hidróxido. Os iões de hidrogénio e hidróxido, evidentemente, são proporcionados pela própria água, de acordo com a sua dissociação constante:  $\text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{OH}^-$ ,  $K = 10^{-10}$ . A hidrólise prossegue como segue:  $(\text{Xantosinato})^- + \text{H}^+ = (\text{xantosina})$ ,  $K = 10^{5,6}$ ,

e é controlada na sua intensidade pela "fraquesa", ou  $pK_a$  da xantosina, e pela concentração do anião do xantosinato.

A hidrólise de um sal de um ácido fraco e uma base forte torna a solução alcalina. Esta transformação alcalina reflete a extensão da reacção de hidrólise e depende do anião de soluto  $pK_a$  e da concentração do anião do soluto. Através da mesma gama de concentração, os sais incompatíveis do tipo base fraca-ácido forte, na ausência de associação ou agregação, apresentarão rapidamente aumentos de pH relativos idênticos devido à hidrólise.

Como está representado na Figura 1, quando a concentração de cloridrato de dimetilamino isopropanol, fosfato dibásico de sódio ionosina, os quais foram neutralizados à temperatura ambiente com hidróxido de sódio ou xantosinato padrão foi aumentada de 0,0027 M para 0,4 M, o aumento no pH devido à hidrólise destes sais foi de entre 1,50 e 1,75 unidades de pH. Por outro lado, o aumento análogo em pH para os xantosinatos de sódio ficou entre 2,3 e 3,40 unidades de pH (ver Figura 1). Os sais de xantosina da invenção apresentam todos maior hidrólise que os outros sais de ácido fraco-base forte, incluindo o xantosinato padrão. Dado que o pH é uma escala logarítmica, a diferença média em termos de alteração relativa em concentração de ião hidróxido é 10-100 vezes maior. Para os sais de xantosina da invenção, as diferenças de pH estão ausentes em grande escala a baixa concentração.

A elevação em pH produzida durante a hidrólise é função da dissociação constante de água, da concentração de anião de soluto e do  $pK_a$  do anião soluto. A relação entre estas variáveis é expressa na equação de Glasstone:  $pH = 1/2 pK_w + 1/2 pK_a + 1/2 \log (\text{concentração})$ . Visto que a constante de dissociação de água é uma constante e a concentração é a mesma para todos os sais de xantosina, a única variável que permanece é o  $pK_a$ , o pH de ionização a 50% do grupo acídico.

Os  $pK_a$ 's dos xantosinatos da invenção torna-se unicamente alcalinos com o aumento da concentração. Em geral, o  $pK_a$  de um composto acídico reflete a carga aniônica em densidade do grupo ionizado, e quanto mais elevado (mais alcalino) for o  $pK_a$ , mais carga electronegativa estaria na sua polarização. Assim, os grupos de ionização nas formas polimórficas de sal de xantosina reivindicadas alteram-se em natureza, cada uma unicamente, à medida que a concentração de xantosinato aumenta. Esta alteração deve reflectir a agregação entre os xantosinatos à medida que a sua concentração aumenta. Visto que o número de locais ionizáveis é constante, a diferença nos  $pK_a$ 's dos sais de xantosina da invenção devem reflectir uma organização diferente daqueles locais, e o aumento em  $pK_a$  deve reflectir diferenças na configuração dos sais de xantosina da invenção.

A utilização da colina de base forte altera radicalmente as propriedades físicas e químicas dos sais xantosinato formados em comparação com os xantosinatos de metal alcalino. O xantosi-

nato de colina apresentou um grau muito pequeno de hidrólise em solução aquosa nas concentrações em consideração. Também duas linhas separadas de investigação estabeleceram que, em solução aquosa, a colina permanece ligada ao xantosinato até um grau considerável. Visto que este par de iões elimina a característica aniônica do xantosinato, ele pode explicar o grau reduzido de hidrólise dos xantosinatos de colina. Como consequência, o pH da solução concentrada de sais de colina (e álcoois de alquilamino relacionados) de xantosina não se elevam na gama alcalina (8,5 - 10,5) mas permanece proximamente neutro (7,5). Esta é uma importante característica dos sais de álcool de alquilamino de xantosina, uma vez que permite aos mesmos serem utilizados in vivo em concentração elevada sem produzir dano.

## 2. Solubilidade

A colina e os sais de aminoálcoois alquílicos de xantosina apresentam outras características físico-químicas. Assim, enquanto os sais de metal alcalino têm solubilidade em n-butanol que são muito menores que a xantosina não ionizada, sendo reduzidas de 95,0 a 99,5% de acordo com as espécies, os sais de colina têm solubilidade em n-butanol que estão muito próximas das da xantosina não ionizada. Estes resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1

| <u>Composto</u>  | Solubilidade Relativa<br>em n-butanol comparada<br><u>com a xantosina padrão</u> |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Xantosina Padrão | 1,00                                                                             |
| ChXs-I           | 0,93                                                                             |
| ChXs-II          | 0,67                                                                             |
| DMAIP-Xs         | 0,20                                                                             |
| NaXs-I           | 0,047                                                                            |
| NaXs-II          | 0,013                                                                            |
| NaXs-III         | 0,004                                                                            |
| NaXs-IV          | 0,015                                                                            |
| NaXs-V           | 0,045                                                                            |
| NaXs-VI          | 0,005                                                                            |

A elevada solubilidade dos sais de aminoálcoois alquílicos de xantosina em solução aquosa é do mesmo modo anômala. Enquanto os sais de metal alcalino de xantosina se dissolvem em água até cerca de 0,45 M, os sais de aminoálcoois alquílicos começam a precipitar a cerca de 0,015 M. Todavia, ao contrário dos sais de metal alcalino e de muitos solutos, a solubilidade dos sais de aminoálcoois alquílicos não pode ser descrita por uma simples relação de solubilidade.

Normalmente, quando as mesmas espécies moleculares se situam na forma sólida e em solução, o soluto dissolve até a sua concentração de saturação ser excedida; adicionando mais soluto isso não aumenta a quantidade que entra em solução. Existe um equilíbrio entre as moléculas sólidas e as moléculas em solução.

Todavia, embora os xantosinatos de aminoálcoois alquílicos comecem a precipitar até uma baixa concentração de 0,015 M, ou cerca de 6 mg/ml, a adição de mais soluto não aumenta a quantidade que entra em solução. Com outra adição, pode efectivamente fazer uma solução de 250 mg/ml, embora 20-25% de todo o soluto acima de 6 mg/ml não se dissolva.

Para isto ocorrer, as leis da solubilidade exigem que existam múltiplas espécies de soluto em equilíbrio umas com as outras e que uma destas espécies de soluto seja idêntica e esteja em equilíbrio com as mesmas espécies no estado sólido. Este estado de ocorrência seria facilitada pela tendência de os catiões de aminoálcoois alquílicos entrarem na formação do par de iões com os aniões de xantosinato.

### 3. Lei de Beer

Os espectros ultravioleta prestam contribuições muito importantes para a identificação de configurações polimórficas a baixa concentração de soluto. Alterações nos picos de capacidade de absorção e nos ombros revelam novos estados electrónicos.

A capacidade de absorção de raios ultravioletas das soluções pode também revelar afastamentos da lei de Beer à medida que as interacções de desenvolvem. A lei de Beer indica que a capacidade de absorção da luz monocromática por molécula de soluto é uma constante na solução. Duplamente a concentração de um soluto em solução aquosa na ausência de interacção soluto-soluto duplica a quantidade da energia irradiante, etc.

Todavia, como resultado da interacção entre as moléculas de soluto em solução, tal como por agregação, a relação da capacidade de absorção de luz para a concentração de soluto pode partir da lei de Beer. Assim, a capacidade de absorção por molécula pode diminuir à medida que a concentração aumenta. Este é um exemplo de hipocromicidade. A hipocromicidade é característica da capacidade de absorção de DNA e RNA altamente organizada que reflete uma complexação entre nucleótidos adjacentes.

Com outros compostos, a capacidade de absorção de luz por molécula aumenta à medida que aumenta a concentração, o que é um exemplo de hipercromicidade. Embora isto possa ocorrer quando as associações estão degradadas, por exemplo quando a hipocromicidade está sendo invertida, o mesmo pode também ocorrer como resultado de uma interacção aumentada de um composto com água. Isto significa que, se com o aumento em concentração um componente da molécula de soluto cujos electrões são responsáveis pela capacidade de absorção de protões relevantes se tornar mais acessível, circundada pela água, a capacidade de absorção de fraca energia

monocromática por molécula pode aumentar. Estes eventos podem ocorrer como uma consequência de uma alteração na estrutura no espaço iniciado pela agregação. Do mesmo modo, a hipercromicidade pode ocorrer como uma consequência da agregação que é seguida pela transferência de carga. Este é o único modo de partilhar um electrão móvel que pode desenvolver-se com um agregado.

Utilizando um espectrofotómetro de registo de feiche de raios duplo da marca Hitachi, o espectro ultravioleta do aminoalcoól alquílico e os sais xantosinato de metal alcalino foram examinados sobre uma gama de concentrações e sob condições de pH que geraram os estados não ionizados como ionizados. Os únicos ombros e picos do espectro ultravioleta foram gerados pelo processo de ionização. Além disso, os desvios da lei de Beer que são únicos para cada sal foram encontrados. Todos os sais se tornaram mais hipocrómicos que o xantosinato padrão à medida que a concentração aumentou, um resultado que é reflectivo de um maior grau de agregação.

Os coeficientes de extinção relativa do xantosinato padrão, NaXs-I, NaXs-II e ChXs-I são apresentados na Tabela 2. Do mesmo modo, a Figura 2 é um gráfico de concentração contra o coeficiente de extinção relativa para estes compostos. A Tabela 2 e a Figura 2 mostram que os polimórfos de xantosinato da invenção apresentam desvios da lei de Beer. As formas polimórficas dão também desvios diferentes da lei de Beer em comparação umas com as outras e com o xantosinato padrão, mostrando que as formas polimór-

ficas da invenção têm diferentes padrões de agregação, i.e., têm diferentes configurações polimórficas, em comparação umas com as outras e com o xantosinato padrão.

Tabela 2

Coeficientes de Extinção Relativos

| <u>Concentração</u>    | <u>Lei de Beer</u> | <u>Xantosinato padrão</u> | <u>NaXs-I</u> | <u>NaXs-II</u> | <u>ChXs-I</u> |
|------------------------|--------------------|---------------------------|---------------|----------------|---------------|
| $3,0 \times 10^{-6}M$  | 1,00               | 1,00                      | 1,00          | 1,00           | 1,00          |
| $6,0 \times 10^{-6}M$  | 1,00               | 1,09                      | 0,87          | 1,06           | 1,04          |
| $12,0 \times 10^{-6}M$ | 1,00               | 1,17                      | 0,79          | 0,97           | 0,82          |
| $30,0 \times 10^{-6}M$ | 1,00               | 1,23                      | 0,76          | 0,96           | 1,06          |
| $60,0 \times 10^{-6}M$ | 1,00               | 1,26                      | 0,75          | 0,95           | 0,83          |

4. Difracção de Pó no Raio-X

Os padrões de difracção de pó no Raio-X foram determinados para várias formas polimórficas cristalinas de xantosinato utilizando um difractómetro Enraf-Nonius CAD4 de cristal simples em associação com um computador VAX 11/730. Os resultados estão representados nas Figuras 3-7. Como ali se pode ver, os espectros de xantosina padrão, NaXs-I e NaXs-II são grandemente amorfor (Figuras 3, 4 e 5). Os xantosinatos de colina, contudo, revelam um grau de cristalinidade que não foi observado com xantosina

padrão, NaXs-I ou NaXs-II (Figura 6 e 7). Além disso, o espectro do ChXs-I é diferente daquele que apresenta o ChXs-II (comparar a Figura 6 com a Figura 7),

### 5. Espectros ORD

Os espectros ORD de soluções aquosas de ChXs-I, ChXs-II, NaXs-II e DMAIPXs foram determinadas utilizando um "Cary Spectropolarimeter". Os resultados estão representados na Figura 8. Estes traçados representam a média de operações em triplicado, e o erro padrão nos traçados é virtualmente zero. Como pode ver-se na Figura 8, cada forma polimórfica dá um espectro ORD diferente o que é a evidência de diferentes conformações, as quais por sua vez evidenciam o polimorfismo do soluto.

### Ensaio Biológicos

Um outro factor de evidência que mostra que os xantosina-tos da invenção são polimórficos é o facto de os mesmos apresentarem actividades biológicas diferentes não esperadas e notáveis. A xantosina não é conhecida como tendo qualquer actividade biológica, mas as formas polimórficas de sal de xantosina da invenção são imunomodeladores. Num sistema de hipersensitividade padrão de contacto com o rato, os mesmos podem modificar a intensidade da resposta imune celular se for dada somente durante o tempo de imunização ou seguido o desafio do antigene.

Além disso, as formas polimórficas de sal de xantosina podem funcionar para aumentar a resposta de imunidade quando a resposta é espontaneamente baixada e pode regular para baixo a resposta está muito activa. Esta capacidade de tamponar a resposta imune não é, contudo, compartilhada por todas as formas polimórficas de sal de xantosina como se mostra nos exemplos seguintes.

#### Exemplo 10

Adjuvante de artrite foi induzido em ratazanas macho com 120 g, da espécie Sprague-Dawley, adquiridas na Harlan, Sprague Dawley, Indiana, por meio de injeção de adjuvante de Freund completo dentro da base do pé das ratazanas anestesiadas. Estes animais foram também injectados com  $1,25 \times 10^{10}$  organismos H. pertusis mortos pelo calor na base das patas para estimular mais a resposta inflamatória. A inflamação primária nas patas injectadas desenvolveu-se ao quarto dia depois das injeções e persistiu até ao trigésimo quinto dia depois das injeções. Inflamação secundária (autoimune) apareceu noutras extremidades ao décimo dia depois das injeções, e persistiu durante trinta e cinco dias depois das injeções. As ratazanas apresentavam perda de peso, inchaço nas articulações e imobilização nas articulações.

Três grupos com nove ratazanas cada, tratados como se acabava de descrever, foram injectados todos os dias interperitonalmente com qualquer base salina, 0,079 mg/Kg NaXs-I ou 0,079 mg/Kg

de NaXs-II começando no décimo dia depois das injeções na base da pata. O inchaço secundário na articulação da pata posterior foi quantificado diariamente pelo sistema de contagem padrão descrito em Pearson and Wood, Arthritis and Rheumatism, 2, 440 (1959), que é aqui incorporado como referência. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3

| <u>Tratamento</u> | <u>Índice de Inflamação Secundária</u> |
|-------------------|----------------------------------------|
| Controle (Salina) | 4,00 $\pm$ 0,28                        |
| NaXs-I            | 2,06 $\pm$ 0,70                        |
| NaXs-II           | 4,17 $\pm$ 0,39                        |

Como se pode ver na Tabela 3, o NaXs-I reduziu significativamente o índice de inflamação secundária (P menos que 0,02). O índice de inflamação secundária para animais tratados com NaXs-I foi também significativamente menor que o para animais tratados com NaXs-II (P menor que 0,01). Os resultados mostram que o NaXs-I é anti-inflamatório enquanto que o NaXs-II não actua neste modelo de doença. Na verdade, o NaXs-II aumentou ligeiramente a inflamação secundária. Estes resultados são significativos porque o modelo de doença inflamatória descrito neste exemplo é um que é afirmativo da actividade anti-artrítica nos seres humanos.

Exemplo 11

Foi produzida miocartide nos ratos Bald/c (machos, com 4-5 semanas de idade) por injeção de um vírus coxsackie humano não adaptado (estirpe B<sub>3</sub> Nancy). Foram utilizadas diluições entre 1:50 e 1:1400 de uma reserva contendo  $1,75 \times 10^8$  unidades de placa/ml. A reserva de vírus foi mantida gelada a  $-70^{\circ}\text{C}$ , e o novo desenvolvimento e ensaio de titulação até à desejada resistência da reserva foram realizados num sistema de célula Hep-2.

A doença produzida nos ratos por esta infecção resulta na morte que começa sete dias depois de os mesmos serem injectados, tempo ao fim do qual o vírus não é mais demonstrável no coração, embora progreda a inflamação cardíaca. Esta inflamação foi identificada como autoimune na sua natureza.

O tratamento com ChXs-I foi iniciado sete dias depois de os ratos terem sido injectados com o vírus. O ChXs-I foi adicionado à água de bebida dos ratos a 0,2 mg/ml ou 0,4 mg/ml.

Vinte e oito dias depois de os ratos terem sido injectados com o vírus, animais representativos do controle e grupos de tratamento foram sacrificados para histopatologia. Os seguintes índices de doença foram avaliados: a velocidade de morte; a intensidade de exsudação celular inflamatória miocardial; e a intensidade de necrose miocardial, determinada por exame microscópico mediante duas determinações independentes, sendo cada uma tornada

insensível e sendo os parâmetros de necrose e o produto da exsudação entalhados separadamente numa base de +1 a +4. Os corações dos animais mortos dentro de 24 horas foram também processados para a histopatologia. a Tabela 4 mostra os resultados deste estudo.

Tabela 4

|                        | Taxa de mortalidade até ao fim do dia 28 | Média relativa do infiltrado celular cardíaco | Necrose cardíaca relativa |
|------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|
| Controlo (apenas água) | 13/21                                    | 1,40 $\pm$ 0,13                               | 2,0 $\pm$ 0,2             |
| ChXs-I, 0,2 mg/ml      | 0/21 <sup>***</sup>                      | 1,21 $\pm$ 0,11                               | 0,8** $\pm$ 0,1           |
| ChXs-I, 0,4 mg/ml      | 0/21 <sup>***</sup>                      | 1,21 $\pm$ 0,13                               | 0,9** $\pm$ 0,2           |

---

\* Todas as mortes ocorridas entre os 8 e 27 dias.

\*\* Significativo pelo teste t de student, P menor que 0,01.

\*\*\* Significativo pela análise quadrada de Chi, P menor que 0,001.

Exemplo 12

A exposição aos estímulos fagocíticos provoca neutrofils para induzir a danificação da célula, morte e insensibilidade, eventos que são iniciados por meio da acção do seperóxido libertado, peróxido e radical hidróxido livre. Nos locais de inflamação,

tais como espaços de articulação artríticos, tais eventos presumem-se como contribuindo para o curto espaço de tempo de trabalho da neutrofilia, para exacerbar a destruição do tecido através da libertação de enzimas a partir da desintegração de neutrofils e para perpetuar as respostas inflamatórias por geração e construção de quimiotácticos peroxizados e fragmentos celulares de outro modo modificado.

Leucócitos de sangue periféricos (contendo 70-90% de neutrofils) foram recolhidos de seres humanos voluntários e foram incubados durante 22 horas com  $3,5 \times 10^7$  Eschericia coli, de acordo com o processo de Salin & McCord, "Radicais livres em metabolismo e inflamação de leucócitos", em Superoxide and Superoxide Dismutases 257-270 (Michelson e Fridovick, eds. 1977) que é aqui incorporada como referência. O E. Colli é um estimulador de macrofages.

Uma parte alíquota dos leucócitos foi exposta ao secante azul tripano e examinada microscopicamente na câmara de contagem hemocitométrica no momento zero para células totais (geralmente até  $5 \times 10^6$  de neutrofils/ml) e viabilidade. As células viáveis excluem azul tripano. As amostras de leucócito mostraram ser 90% viáveis.

Os leucócitos foram incubados numa Solução de Sal Equilibrada de Hank (HBSS) (1 ml de volume de incubação total) com soro homólogo adicionado, com o E. coli e com quantidades variáveis

de ChXs-I, xantosibato padrão, cloreto de cilina (ChCl) ou dismutase de superóxido (SOD).

Vinte e duas horas depois da incubação ter começado, foi realizada uma determinação de vida, morte total e ausência das células. Os dados foram então transformados de modo que todos os grupos de tratamento foram expressos como percentagem de controle. A média destes dados convertidos para três estudos neutrofílicos e os resultados para um estudo linfocítico estão apresentados na Tabela 5. A supressão da morte da célula e ausência por ChXs-I e pelo depurador de oxigénio activo SOD foi observada, mas a supressão pelo xantosinato padrão ou ChCl por si sós não foi observada.

Tabela 5

| <u>Tratamento</u>      | <u>Neutrofils</u>  |                  | <u>Linfócitos</u>  |
|------------------------|--------------------|------------------|--------------------|
|                        | <u>Morte total</u> | <u>Infecados</u> | <u>Morte total</u> |
| Controle               | _____              | _____            | _____              |
| ChXs-I, 25 ug/ml       | 106                | 95               | 76                 |
| 2,5 ug/ml              | 82                 | 69               | 51                 |
| 0,25 ug/ml             | 57                 | 43               | 76                 |
| 0,025 ug/ml            | 55                 | 55               | 63                 |
| 0,0025 ug/ml           | 81                 | 81               | 78                 |
| Xantosinato            |                    |                  |                    |
| Padrão, /66 0,20 ug/ml | 110                | 102              | 106                |
| CHCl, 0,07 ug/ml       | 100                | 98               | 104                |
| SOD, 100 ug/ml         | 59                 | 64               | ND                 |

Exemplo 13

Uma gota de dinitrofluorobenzeno (DNFB) a 5% em acetona-azeite foi aspergida sobre os abdômens de ratos machos CD-1 para imunizar os mesmos. Os machos foram provocados quatro ou cinco dias mais tarde em ambas as orelhas com DNFB a 0,2% sob anestesia com éter. Imediatamente depois a orelha reage e no dia seguinte à reacção da orelha, foram aplicados aos ratos 0,079 mg/Kg de NaXs-I e NaXs-IV interperitonalmente.

A medição da espessura da orelha com um compasso micrométrico sob a anestesia com éter foi efectuada antes da reacção e 24 horas depois da reacção. Esta medição reflecte a intensidade da resposta imune celular local.

Dos 16 animais em cada grupo, os 8 com respostas mais baixas foram seleccionados para análise, de modo a que as respostas mais fracas à imunidade pudessem ser estudadas. Os dados na Tabela 6 mostram que o NaXs-I aumenta esta resposta celular mínima à imunidade, o que não se verificou com o NaXs-IV. Este aumento é estatisticamente significativo.

Tabela 6

| <u>Tratamento</u> | <u>Espessura da orelha (Unidades de 0,1 mm)</u> |   |      |  |
|-------------------|-------------------------------------------------|---|------|--|
| Controle          | 2,30                                            | ± | 0,45 |  |
| NaXs-I            | 5,03                                            | ± | 0,39 |  |
| NaXs-IV           | 1,40                                            | ± | 0,31 |  |

Exemplo 14

Foi feita uma comparação entre os efeitos de concanavalina A, Isoprinosina, ChXs-I e ChXs-II sobre células supressoras no rato na reacção de linfocito misturado (MLR). Ratos fêmea BALB/c(H-2<sup>d</sup>) foram utilizados como fonte das populações de resposta

e supressão. Ratos macho C57BL/6 (CH-2<sup>b</sup>) foram utilizados como fonte das populações estimuladoras. O meio de cultura utilizado de princípio ao fim foi RPMI-1460 suplementado com 5% de soro de vitelo fetal inactivado aquecido (FCS), penicilina (100 U/ml), e fungisoma.

A activação in vitro das células supressoras foi obtida por cultura de  $1 \times 10^7$  esplenocitos Balb/c durante três dias na presença de soluções filtradas estéreis de Con A (3,0 ug/ml, Sigma), Isoprinosina (1,0 ug/ml), ChXs-I ou ChXs-II a várias concentrações. Depois de 3 dias de cultura, nas células foram recolhidas com uma pipeta pasteur. As células tratadas com Con A foram então lavadas numa solução de metilmanosido estéril 0,3 M (Sigma), tratadas com 50 ug/ml de mitocina C (Sigma) durante 30 minutos a 37°C, lavadas mais duas vezes com metilmanosido e uma vez no meio de cultura. Outras populações de células supressoras foram lavadas depois da colheita com HBSS estéril, mitomicina C tratada como se descreveu anteriormente, lavadas mais duas vezes com HBSS e uma vez com o meio de cultura.

As reacções de linfócitos foram realizadas utilizando  $1 \times 10^6$  esplenocitos BALB/c de resposta,  $1 \times 10^6$  esplenocitos estimuladores C57BL/6 tratados com mitomicina C e  $2 \times 10^5$  quer de Con A, Isoprinosina, ChXs-I quer de células tratadas de ChXs-II. O volume de cada cultura foi de 0,2 ml. Os MLR foram pulsados com timidina tritiada 1 uCi (actividade específica de 6,7 Ci/mmole) 56 horas depois de a cultura ter começado e foram recolhidos

72 horas depois de a cultura ter começado. Cada experiência foi realizada em quintuplicado.

A Tabela 7 indica dados a partir desta experiência expressa como contagem média por minuto (cpm)  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.). A adição de células singénicas-Con A-activadas e mitomicina-C-tratadas resultou numa supressão de 69% de fixação de timidina tritiada no sistema MLR em comparação com a célula supressora cuja actividade ocorre espontaneamente em linfócitos BALB/c cultivados durante três dias na ausência de qualquer mitogénio. O ChXs-I na dose óptima é tão eficaz como o Con A para induzir a actividade da célula supressora acima daquela espontaneamente evocada em linfócitos BALB/c cultivados durante três dias na ausência de mitogene. A intensificação de ChXs-I da actividade da célula supressora aumentou progressivamente com a dose para além dos parâmetros de dose estudados. O aumento de isoprinosina da actividade da célula supressora foi também evidente, embora o mesmo fosse significativamente menor que o efeito de ChXS-I com uma dose única que permite a comparação.

Tabela 7

| <u>Célula Re-<br/>plicadora</u> | <u>Célula Esti-<br/>muladora</u> | <u>Célula Su-<br/>pressora</u> | <u>Incorporação de<br/><sup>3</sup>H-timidina</u> | <u>Percentagem de<br/>efeito supressor</u> |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| BALB                            | B6 <sub>m</sub> <sup>*</sup>     | - -                            | 83454 ± 1494                                      |                                            |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                  | BALB <sub>m</sub>              | 67994 ± 2517                                      |                                            |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                  | BALB <sub>m</sub> Con A+       | 20765 ± 14                                        | -69                                        |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                  | BALB <sub>m</sub> Iso 1,0++    | 49546 ± 1775                                      | -27                                        |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                  | BALB <sub>m</sub> CHXs-I 0,01  | 59577 ± 2991                                      | -12                                        |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                  | BALB <sub>m</sub> ChXs-I 0,03  | 28552 ± 2245                                      | -58                                        |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                  | BALB <sub>m</sub> ChXs-I 1,00  | 25900 ± 906                                       | -62                                        |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                  | BALB <sub>m</sub> ChXs-I 3,00  | 19915 ± 784                                       | -71                                        |

BALB = ratos BALB/c; B6 = a ratos C57BL/6.

\* O índice m designa culturas tratadas com mitomicina C.

+ Con A, 3 ug/ml, adicionados a culturas de linfócitos hipocon-  
dríacos

++ Isoprinosina, 1,0 ug/ml, adicionada a culturas de linfócitos  
hipocontríacos

Δ ChXs-I adicionado a 0,01, 0,03, 1,00 ou 3,00 ug/ml a culturas  
de linfócitos hipocondríacos como foi indicado

§ c.p.m. ± erro padrão do meio para 5 culturas por grupo recolhido  
72 horas depois de um período de marcação de 16 horas

Efeitos supressores altamente significativos, efeitos supressores relativos ao controle P inferior a 0,01

A Tabela 8 compara Isoprinosina, ChXs-I e ChXs-II em relação ao seu efeito sobre a indução de linfócitos supressora esplenéticos. Tanto o ChXs-I como o ChXs-II são mais potentes que a Isoprinosina na indução de linfócitos supressores. A curva de resposta de dose de ChXs-I é linear enquanto que a do ChXs-II é em forma de sino. Assim, ChXs-I e ChXs-II estimulam ambos a actividade da célula supressora de linfócitos no rato.

Tabela 8

| <u>Composto</u> | <u>Dose</u><br><u>ug/ml</u> | <u>Incorporação de</u><br><u><sup>3</sup>H-timidina</u> | <u>% de supressão</u> |
|-----------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------|
| Nenhum          | 0,00                        | 67,994 ± 2,517                                          |                       |
| ChXs-I          | 0,01                        | 59,577 ± 2,911                                          | -12                   |
| ChXs-I          | 0,03                        | 28,552 ± 2,245                                          | -58                   |
| ChXs-I          | 1,00                        | 25,900 ± 906                                            | -62                   |
| ChXs-I          | 3,00                        | 19,915 ± 784                                            | -71                   |
| ChXs-II         | 0,01                        | 45,110 ± 1,495                                          | -33                   |
| ChXs-II         | 0,03                        | 52,246 ± 2,551                                          | -23                   |
| ChXs-II         | 1,00                        | 12,382 ± 321                                            | -82                   |
| ChXs-II         | 3,00                        | 43,796 ± 4,195                                          | -35                   |
| Isoprinosina    | 1,00                        | 49,546 ± 1,775                                          | -24                   |

Contagem por minuto  $\pm$  erro padrão do meio para 3 - 5 culturas por grupo recolhido 72 horas depois de um período de marcação de 16 horas.

Os efeitos supressores são altamente significativos em relação ao controle e um em relação ao outro quando comparados com a dose equivalente,  $P$  menor que 0,02.

#### Exemplo 15

No exemplo anterior mostrou-se que o ChXs-I pode aumentar de maneira impressionante a actividade da célula supressora de linfócito no rato MLR. Neste exemplo, os efeitos de ChXs-I e DMAIPXs foram examinados quanto à sua capacidade para induzir células supressoras.

Os métodos utilizados foram os mesmos que os empregados no Exemplo 14. Os compostos examinados para efeitos sobre populações de células supressoras foram Con A (3 ug/ml), Isoprinosina (ISO) (1,0 ug/ml), ChXs-I (0,01 - 1,00 ug/ml) e DMAIPXs (0,01-1,00 ug/ml).

Os resultados são apresentados na Tabela 9. Paradoxalmente, o Con A exerceu um efeito facilitador, em vez de induzir as células supressoras, nesta experiência. A Isoprinosina a 1,0 ug/ml provocou um ligeiro mas não significativo aumento na actividade da célula supressora. Como no Exemplo 14, o ChXs-I aumentou a

actividade da célula supressora em todas as doses utilizadas. O efeito foi estatisticamente significativo a doses de 0,03 e 1,0 ug/ml. O DMAIPXs exerceu um efeito facilitador significativo a 0,1 ug/ml, mas não aumentou significativamente a actividade da célula supressora com as outras doses testadas.

Assim, o ChXs-I estimulou a actividade da célula supressora em células hipocondríacas do rato numa experiência em que o Con A exerceu um efeito facilitador em vez de um efeito supressor aumentado. O DMAIPXs não aumentou significativamente a supressão mas actuou como um facilitador.

Tabela 9

| <u>Célula Re-<br/>plicadora</u> | <u>Célula Es-<br/>muladora</u> | <u>Célula Su-<br/>pressora</u> | <u>Incorporação de<br/><sup>3</sup>H-timidina</u> | <u>Alteração<br/>em %</u> |
|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------|
| BALB                            | B6*                            | -                              | 17873 ± 3342                                      |                           |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                | BALB <sub>m</sub>              | 9505 ± 1317                                       | -                         |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                | BALB <sub>m</sub> Con A        | 39725 ± 4989                                      | +318%                     |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                | BALB <sub>m</sub> ISO 1,0      | 8116 ± 663                                        | -15%                      |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                | BALB <sub>m</sub> ChXs-I 0,01  | 7712 ± 1250                                       | -19%                      |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                | BALB <sub>m</sub> CHXs-I 0,03  | 4081 ± 290                                        | -57%                      |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                | BALB <sub>m</sub> ChXs-I 1,00  | 5243 ± 652                                        | -45%                      |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                | BALB <sub>m</sub> DMAIPXs 0,01 | 7034 ± 1770                                       | -26%                      |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                | BALB <sub>m</sub> DMAIPXs 0,03 | 11654 ± 1714                                      | +23%                      |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                | BALB <sub>m</sub> DMAIPXs 0,10 | 13475 ± 1896                                      | +42%                      |
| BALB                            | B6 <sub>m</sub>                | BALB <sub>m</sub> DMAIPXs 1,00 | 7875 ± 682                                        | -17%                      |

Exemplo 16

Em pacientes, a irradiação total do corpo pode ser adminis-  
trado em certos câncros dissimulados assim como antes da trans-  
plantação do osso com tutano. Uma morbidade resulta muitas vezes  
a partir deste processo que está associado com imperfeições nos

orgãos de formação de sangue, que geram glóbulos vermelhos, fagócitos e linfócitos. Isto resulta em pancitopenia. Efeitos secundários semelhantes resultam do tratamento com agentes citotóxicos.

Como foi descrito nos Exemplos anteriores, o ChXs-I aumenta as respostas imuno-celulares de depressão e promove a fagocitose. Visto que deficiências múltiplas nos sistemas de defesa do hospedeiro ocorrem a seguir à irradiação letal, foi decidido determinar se o ChXs-I poderia afectar o curso do período de pós radiação.

A vinte e uma ratazanas da estirpe Fischer (180-200 g) foram dados 750R de irradiação a partir de uma fonte de cobalto. Esta dose de irradiação produz normalmente 100% de mortalidade nesta estirpe de ratazanas em cinco semanas.

Todos os animais foram injectados com 2 mg/Kg do antibiótico Gentamicin diariamente durante o estudo, partindo um dia depois da irradiação. Os animais também receberam dois antibióticos na sua água de beber. Estes antibióticos foram neomicina a 0,56 ug/ml, bactrim a 44 ug/ml de componente trimethprim, e 222 ug/ml de componente sulfonamida.

Começando um dia depois da irradiação, oito dos vinte e um animais irradiados foram injectados intraperitonealmente com 28 mg/Kg de ChXs-I uma vez por dia durante catorze dias. No décimo quinto dia, a dose de ChXs-I foi reduzida para 0,1 mg/Kg. O tra-

tamento e as observações foram continuados até 35 dias.

Foram retiradas amostras de sangue para determinações de hematócito e as células brancas do sangue (WBC) contadas nos dias 4, 7, 10, 14 e 21. Os valores de WBC e hematócito foram atribuídos aos animais mortos, e estes números foram incluídos nas circulações para proporcionarem um índice de morbidade total. Os valores atribuídos nesta situação foram 7,0% para o hematócrito e  $1,0 \times 10^3/\text{mm}^3$  para o WBC. Estes valores são um pequeno aumento, inferior ao valor mais baixo tipicamente encontrado em sobreviventes. As WBC normais para ratazanas estão entre 7,0 e  $11,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ . Os hematócritos normais para ratazanas desta estirpe estão entre 48 e 55%.

Tabela 10

| <u>Tratamento</u> |      | <u>Contagem de WBC Seguindo Irradiação</u> |              |               |               |               |
|-------------------|------|--------------------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
|                   |      | <u>Dia 4</u>                               | <u>Dia 7</u> | <u>Dia 10</u> | <u>Dia 14</u> | <u>Dia 21</u> |
| Controle          | Avg. | 0,90                                       | 0,88         | 1,16          | 2,38          | 3,12          |
|                   | SE   | 0,06                                       | 0,06         | 0,15          | 0,22          | 0,93          |
| ChXs-I            | Avg. | 0,71                                       | 1,04         | 1,80          | 3,36*         | 10,33**       |
|                   | SE   | 0,08                                       | 0,10         | 0,58          | 0,38          | 2,11          |

\* Significativamente diferente do controle irradiado (P inferior a 0,05)

\*\* Significativamente diferente do controle irradiado (P inferior a 0,02).

Tabela 11

| <u>Tratamento</u> |      | <u>Hematócitos Seguindo Irradiação</u> |              |               |               |               |
|-------------------|------|----------------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
|                   |      | <u>Dia 4</u>                           | <u>Dia 7</u> | <u>Dia 10</u> | <u>Dia 14</u> | <u>Dia 21</u> |
| Controle          | Avg. | 58,60                                  | 51,26        | 36,24         | 21,60         | 18,86         |
|                   | SE   | 0,58                                   | 1,87         | 2,41          | 2,29          | 3,67          |
| ChXs-I            | Avg. | 56,90                                  | 47,83        | 27,21         | 17,66         | 29,71*        |
|                   | SE   | 0,65                                   | 1,82         | 2,24          | 1,63          | 2,58          |

\* Significativamente diferente do controle irradiado (P inferior a 0,05).

A mortalidade final no trigésimo-quinto dia a seguir a uma dose de irradiação conhecida para produzir uma mortalidade de 100% foi:

| <u>Tratamento</u> | <u>Mortes</u> |
|-------------------|---------------|
| Controle:         | 5/5 mortes    |
| ChXs-II           | 5/8 mortes    |

Assim, o tratamento de pós irradiação com ChXs-I tende a suprimir a mortalidade e promove significativamente a recuperação

das séries de células de sangue brancas e vermelhas.

### Exemplo 17

Um segundo estudo de irradiação foi realizado como descrito no Exemplo 16, excepto em que as ratazanas apenas receberam 650R de irradiação. Do mesmo modo, um grupo de ratazanas que não recebeu irradiação foi incluído para fins de comparação.

Os resultados são apresentados nas Tabelas 12, 13 e 14. Uma vez mais o ChXs-I suprimiu a mortalidade e promoveu a recuperação das células brancas e vermelhas a seguir à irradiação.

### Tabela 12

#### Contagem de Brancas Seguindo Irradiação

| <u>Tratamento:</u> |      | <u>Dia 7</u> | <u>Dia 14</u> | <u>Dia 21</u> | <u>Dia 28</u> | <u>Dia 35</u> | <u>Dia 42</u> |
|--------------------|------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Normal             | Avg. | 6,44         | 9,16          | 7,74          | 8,00          | 9,56          | 12,32         |
|                    | SE   | 0,74         | 0,65          | 0,81          | 0,68          | 0,40          | 1,14          |
| Controle           | Avg. | 2,27         | 2,15          | 2,39          | 1,83          | 4,34          | 6,83          |
|                    | SE   | 0,15         | 0,16          | 0,31          | 0,45          | 1,55          | 2,68          |
| ChXs-I             | Avg. | 2,04         | 3,72          | 5,33**        | 4,13          | 21,45**       | 15,31*        |
|                    | SE   | 0,26         | 0,26          | 0,45          | 1,47          | 6,03          | 3,00          |

\* Significativamente diferente do controle (P inferior a 0,05)

- \* \* Significativamente diferente do controle (P inferior a 0,02)
- \* \* \* Significativamente diferente do controle (P inferior a 0,001)

Tabela 13

Hematócritos Seguindo Irradiação

| <u>Tratamento:</u> |      | <u>Dia 7</u> | <u>Dia 14</u> | <u>Dia 21</u> | <u>Dia 28</u> | <u>Dia 35</u> | <u>Dia 42</u> |
|--------------------|------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Normal             | Avg. | 56,00        | 53,40         | 51,00         | 50,20         | 52,40         | 52,80         |
|                    | SE   | 2,74         | 0,51          | 0,45          | 0,97          | 0,87          | 0,58          |
| Controle           | Avg. | 51,70        | 40,30         | 38,60         | 16,20         | 16,10         | 23,60         |
|                    | SE   | 1,45         | 1,17          | 2,18          | 4,33          | 4,70          | 7,26          |
| ChXs-I             | Avg. | 50,67        | 41,60         | 43,80*        | 32,60**       | 32,30*        | 42,80*        |
|                    | SE   | 1,67         | 1,53          | 0,92          | 4,07          | 5,37          | 5,28          |

- \* Significativamente diferente do controle (P inferior a 0,05)
- \* \* Significativamente diferente do controle (P inferior a 0,02)

Tabela 14

| <u>Tratamento</u> | <u>Mortalidade ao 42º Dia</u> |
|-------------------|-------------------------------|
| Controle          | 6/10 morte                    |
| ChXs-I            | 1/10 morte**                  |

\* \* Significativamente diferente do controle (P inferior a 0,02)

#### Exemplo 18

Um estudo da terceira irradiação foi realizado como descrito no Exemplo 16, excepto em que foram utilizados ratos C57BL/6 de ratazanas. As substâncias testadas foram: ChXs-I, DMAIPXs e uma mistura de cloreto de colina com uma quantidade equimolar de xantosina padrão. Os ratos receberam 0,1 mg/Kg destas substâncias. O xantosinato padrão foi também testado isoladamente (a 0,07 mg/Kg). Os resultados são mostrados na Figura 8. Como se pode ver na referida Figura, o ChXs deu a mortalidade mais baixa de todos os compostos testados em todos os momentos pós irradiação. Do mesmo modo, todos os compostos proporcionaram alguma protecção dos efeitos de irradiação em comparação com o controle.

#### Exemplo 19

A dez grupos de oito ratos CD-1 cada, com a idade de 5-6 semanas, comprados na Charles River, foi administrado 0,1 ml das seguintes substâncias por via oral:

#### Tratamento

|            |                                                                                        |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Grupo 1    | Salina normal                                                                          |
| Grupos 2-4 | Uma solução de uma mistura de quantidades equimolares de cloreto de colina e xantosina |

na em salina normal. Foram utilizadas três soluções separadas a concentrações escolhidas de modo que ao Grupo 2 foram dados 25 mg/Kg, ao Grupo 3 foi dado 1 mg/Kg e ao Grupo 4 foi dado 0,25 mg/Kg em 0,1 ml.

Grupos 5-7 Uma solução de ChXs em salina normal. Foram utilizadas três soluções separadas a concentrações escolhidas de modo que ao Grupo 5 foram dados 25 mg/Kg, ao grupo 6 foi dado 1 mg/Kg e ao Grupo 4 foi dado 0,25 mg/Kg em 0,1 ml.

Grupos 8-10 Uma solução de ChXs em salina normal. Foram utilizadas três soluções separadas a concentrações escolhidas de modo que ao Grupo 8 foram dados 25 mg/Kg, ao Grupo 9 foi dado 1 mg/Kg e ao Grupo 10 foi dado 0,25 mg/Kg em 0,1 ml.

Uma hora depois do tratamento por via oral, 6,6 ug de tripsina em 0,05 ml de salina foram injectados em cada uma das bases das patas dorsoventrais de cada um dos ratos de cada grupo. As injeções foram aplicadas sob anestesia com éter.

Precisamente antes e 2 horas depois da injeção de tripsina, os diâmetros da base da pata dorsoventral de cada rato em cada grupo foram medidos até à aproximação de 0,1 mm utilizando um

compasso Schnelltaster. Também, o aumento de diâmetro na base da pata dorsoventral produzido pela injeção do dissolvente isoladamente foi determinado por medição dos diâmetros da base da pata dorsoventral de um grupo de ratos antes e passadas 2 horas da aplicação da injeção do dissolvente. Este inchaço não específico (o efeito passivo do dissolvente) foi subtraído do aumento médio de inchaço evocado pela injeção de tripsina para proporcionar uma medição do inchaço específico desenvolvido como parte da resposta inflamatória da própria tripsina.

Os resultados desta experiência são apresentados na Figura 10. Como aí se mostra, o ChXs deu uma supressão significativa do inchaço da base da pata induzido por tripsina ao fim de 2 horas com 0,25 mg/Kg e 1 mg/Kg. O ChXs-II e a mistura equimolar de cloreto de colina e xantosina aumentam efectivamente o edema tripsina com doses mais elevadas.

## R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo para a preparação de formas polimórficas cristalinas de um sal de xantosina, caracterizado pelo facto:

- de se escolher um dissolvente;
- de se adicionar a esse dissolvente uma quantidade de xantosina;
- de se adicionar a esta xantosina uma quantidade equimolar de uma base forte;
- de se aquecer o dissolvente, a base e a xantosina a uma velocidade pré-determinada até uma temperatura suficiente para dissolver a xantosina e superar as barreiras energéticas que impedem a conversão da xantosina em uma outra configuração polimórfica;
- de se precipitar o sal de xantosina;
- de se arrefecer o sal citado antes a uma velocidade pré-determinada durante um intervalo de tempo previamente es-

estabelecido; e

- de se liofilizar completamente o sal resultante para se obter as formas polimórficas cristalinas do sal de xantosina.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar como dissolvente a água.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar como dissolvente o metanol.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar como xantosina a "xantosina padrão".

5.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se provocar a precipitação do sal de xantosina mediante a adição de metanol.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se observar a precipitação espontânea do sal de xantosina.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se escolher a base entre aminoálcoois alquílicos e hidróxidos metálicos alcalinos.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se utilizar como base a colina.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se utilizar como base o dimetilaminoisopropanol.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se utilizar como base o hidróxido de sódio.

11.- Processo para a preparação de formas polimórficas cristalinas de um sal de xantosina, caracterizado pelo facto:

- de se escolher um dissolvente;
- de se adicionar a esse dissolvente uma quantidade de xantosina;
- de se adicionar a esta xantosina uma quantidade equimolar de uma base forte para neutralizar a xantosina, gerando a reacção de neutralização uma quantidade de calor suficiente para fazer subir a temperatura até um valor suficiente para que a xantosina supere as barreiras energéticas que impedem a sua conversão em uma outra configuração polimórfica;
- de se precipitar o sal de xantosina resultante;
- de se arrefecer o sal citado antes a uma velocidade pré-determinada durante um intervalo de tempo previamente estabelecido; e

- de se liofilizar completamente o sal para se obter a forma polimórfica cristalina do sal de xantosina.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de se utilizar como dissolvente a água.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de se utilizar como dissolvente o metanol.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de se utilizar como xantosina a xantosina padrão.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de se provocar a precipitação do sal de xantosina mediante a adição de metanol.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de se observar a precipitação espontânea do sal de xantosina.

17.- Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de se escolher a base entre aminoálcoois alquílicos e hidróxidos metálicos alcalinos.

18.- Processo de acordo com a reivindicação 17, caracte-

rizado pelo facto de se utilizar como base a colina.

19.- Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo facto de se utilizar como base o dimetilaminoisopropanol.

20.- Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo facto de se utilizar como base o hidróxido de sódio.

21.- Processo para a preparação de formas polimórficas dissolvidas de um sal de xantosina, caracterizado pelo facto de se dissolver as formas polimórficas cristalinas de um sal de xantosina, preparados pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 20, em um dissolvente.

22.- Processo de acordo com a reivindicação 21, para a preparação de formas polimórficas dissolvidas de um xantosinato, caracterizado pelo facto de se partir dos compostos iniciais apropriados.

23.- Processo de acordo com a reivindicação 21, para a preparação de formas polimórficas dissolvidas do xantosinato de colina, caracterizado pelo facto de se partir dos compostos iniciais apropriados.

24.-

24.- Processo de acordo com a reivindicação 21, para a preparação de formas polimórficas dissolvidas do xantosinato de sódio, caracterizado pelo facto de se partir dos compostos iniciais apropriados.

25.- Processo de acordo com a reivindicação 21, para a preparação de formas polimórficas dissolvidas de um xantosinato de dimetilaminoisopropanol, caracterizado pelo facto de se partir dos compostos iniciais apropriados.

26.- Processo para a preparação de formas polimórficas dissolvidas de um sal de xantosina, caracterizado pelo facto:

- de se escolher um dissolvente;
- de se adicionar ao dissolvente uma quantidade de xantosina;
- de se adicionar a esta xantosina uma quantidade equimolar de uma base forte;
- de se aquecer o dissolvente, a base e a xantosina a uma velocidade pré-determinada até uma temperatura suficiente para dissolver a xantosina e superar as barreiras energéticas que impedem a conversão da xantosina em uma outra configuração polimórfica; e
- de se arrefecer a solução a uma velocidade pré-determinada durante um intervalo de tempo previamente estabelecido.

27.-

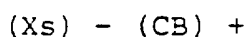
27.- Processo para a preparação de formas polimórficas dissolvidas de um sal de xantosina, caracterizado pelo facto:

- de se escolher um dissolvente;
- de se adicionar ao dissolvente uma quantidade de xantosina;
- de se adicionar a esta xantosina uma quantidade equimolar de uma base forte para neutralizar a primeira mediante uma reacção de neutralização capaz de libertar o calor suficiente para aumentar a temperatura de tal modo que a xantosina supere as barreiras energéticas que impedem a sua conversão em uma outra configuração polimórfica; e
- de se arrefecer a solução resultante a uma velocidade pré-determinada durante um intervalo de tempo previamente estabelecido.

28.- Processo de acordo com as reivindicações 26 ou 27, caracterizado pelo facto de se utilizar como xantosina a xantosina padrão.

29.- Processo de acordo com as reivindicações 26 ou 27, caracterizado pelo facto de se utilizar como dissolvente a água e como base o hidróxido de sódio.

30.- Processo para a preparação de novos sais de xantosina de fórmula geral



na qual

Xs representa o ião xantosinato e

CB representa o catião de uma base forte,  
caracterizado pelo facto

- (1) de se utilizar um dissolvente polar apropriado;
- (2) de se adicionar a esse dissolvente uma quantidade de xantosina apropriada;
- (3)
  - (3.1.) de se utilizar uma temperatura suficientemente elevada para dissolver a xantosina e para superar as barreiras energéticas que impedem a conversão de uma configuração polimórfica de xantosina em uma outra; ou
  - (3.2.) de se adicionar à xantosina dissolvida uma quantidade equimolar de uma base forte para neutralizar a primeira mediante uma reacção de neutralização capaz de libertar o calor suficiente para a xantosina superar as barreiras energéticas que impedem a sua conversão em uma outra configuração polimórfica;
- (4) de se arrefecer a solução a uma velocidade pré-determinada durante um intervalo de tempo previamente estabelecido;  
e
- (5) de se liofilizar completamente o sal resultante.

31.- Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo facto de se escolher a base entre aminoálcoois alquí-

licos e hidróxidos metálicos alcalinos.

32.- Processo de acordo com a reivindicação 30, para a preparação de xantosinato de colina, caracterizado pelo facto de se partir dos compostos iniciais apropriados.

33.- Processo de acordo com a reivindicação 30, para a preparação de xantosinato de sódio, caracterizado pelo facto de se partir dos compostos iniciais apropriados.

34.- Processo de acordo com a reivindicação 30, para a preparação de xantosinato de dimetilaminoisopropanol, caracterizado pelo facto de se partir dos compostos iniciais apropriados.

35.- Processo para a preparação de formas polimórficas cristalinas de xantosina, caracterizado pelo facto:

- de se escolher um dissolvente,
- de se adicionar a esse dissolvente uma quantidade apropriada de xantosina; e
- de se adicionar a esta xantosina uma quantidade equimolar de uma base forte para neutralizar a primeira mediante uma reacção de neutralização capaz de libertar o calor suficiente para a xantosina superar as barreiras energéticas que impedem a sua conversão em uma outra configuração polimórfica.

36.- Processo para a preparação de formas polimórficas dissolvidas de xantosina, caracterizado pelo facto:

- de se escolher um dissolvente;
- de se adicionar ao dissolvente uma quantidade de xantosina apropriada;
- de se adicionar a esta xantosina uma quantidade equimolar de uma base forte para neutralizar a primeira mediante uma reacção de neutralização capaz de libertar o calor suficiente para aumentar a temperatura de tal modo que a xantosina supere as barreiras energéticas que impedem a sua conversão em uma outra configuração polimórfica.

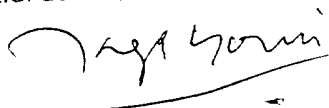
37.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas apropriadas para regular a resposta imunitária de um animal, caracterizado pelo facto de se misturar uma quantidade eficaz de uma forma polimórfica cristalina ou de uma forma polimórfica dissolvida de xantosina, preparada pelo processo de acordo com as reivindicações 35 ou 36, respectivamente, com um dissolvente aceitável em farmácia.

38.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas apropriadas para regular a resposta imunitária de um animal, caracterizado pelo facto de se misturar uma quantidade eficaz de uma forma polimórfica cristalina de um xantosinato, preparada pelo

processo de acordo com a reivindicação 21, com um veículo aceitável em farmácia.

39.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas apropriadas para regular a resposta imunitária de um animal, caracterizado pelo facto de se misturar uma quantidade eficaz de uma forma polimórfica dissolvida de um xantosinato, preparada pelo processo de acordo com a reivindicação 22, com um dissolvente aceitável em farmácia,

Lisboa, 13 de Maio de 1988  
O Agente Oficial da Propriedade Industrial



## R e s u m o

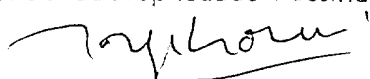
"Processo para a preparação de formas polimórficas de xantosina e de composições farmacêuticas que as contêm"

Descreve-se um processo para a preparação de formas polimórficas cristalinas de um xantosinato que consiste em escolher um dissolvente; em adicionar ao dissolvente citado antes uma quantidade determinada de xantosina e uma quantidade equimolar de uma base forte; em aquecer o dissolvente, a base e a xantosina a uma velocidade pré-determinada e a uma temperatura suficiente para dissolver esta última e para superar as barreiras energéticas que impedem a conversão da xantosina em uma outra configuração polimórfica; em precipitar o sal de xantosina resultante; em arrefecer o sal citado antes a uma velocidade pré-determinada durante um intervalo de tempo previamente estabelecido; e em liofilizar completamente o sal resultante. Descreve-se um outro método para a preparação de formas polimórficas cristalinas de um sal de xantosina que é similar ao citado antes, excepto que o calor libertado pela reacção de neutralização é a única fonte de aquecimento. Descreve-se também um método para a preparação de formas polimórficas dissolvidas de um xantosinato que consiste em dissolver uma forma polimórfica cristalina de um xantosinato em um dissolvente e de formas polimórficas dissolvidas de um xantosinato que são similares aos dois métodos citados antes para a preparação

de formas polimórficas cristalinas, excepto que as fases de liofilização e de precipitação são eliminadas. Descrevem-se ainda métodos para a preparação de novos sais de xantosina e de formas polimórficas cristalinas e dissolvidas de xantosina.

Também se descrevem processos para a preparação de composições farmacêuticas apropriadas para regular a resposta de imunização de um animal.

Lisboa, 13 de Maio de 1988  
O Agente Oficial da Propriedade Industrial



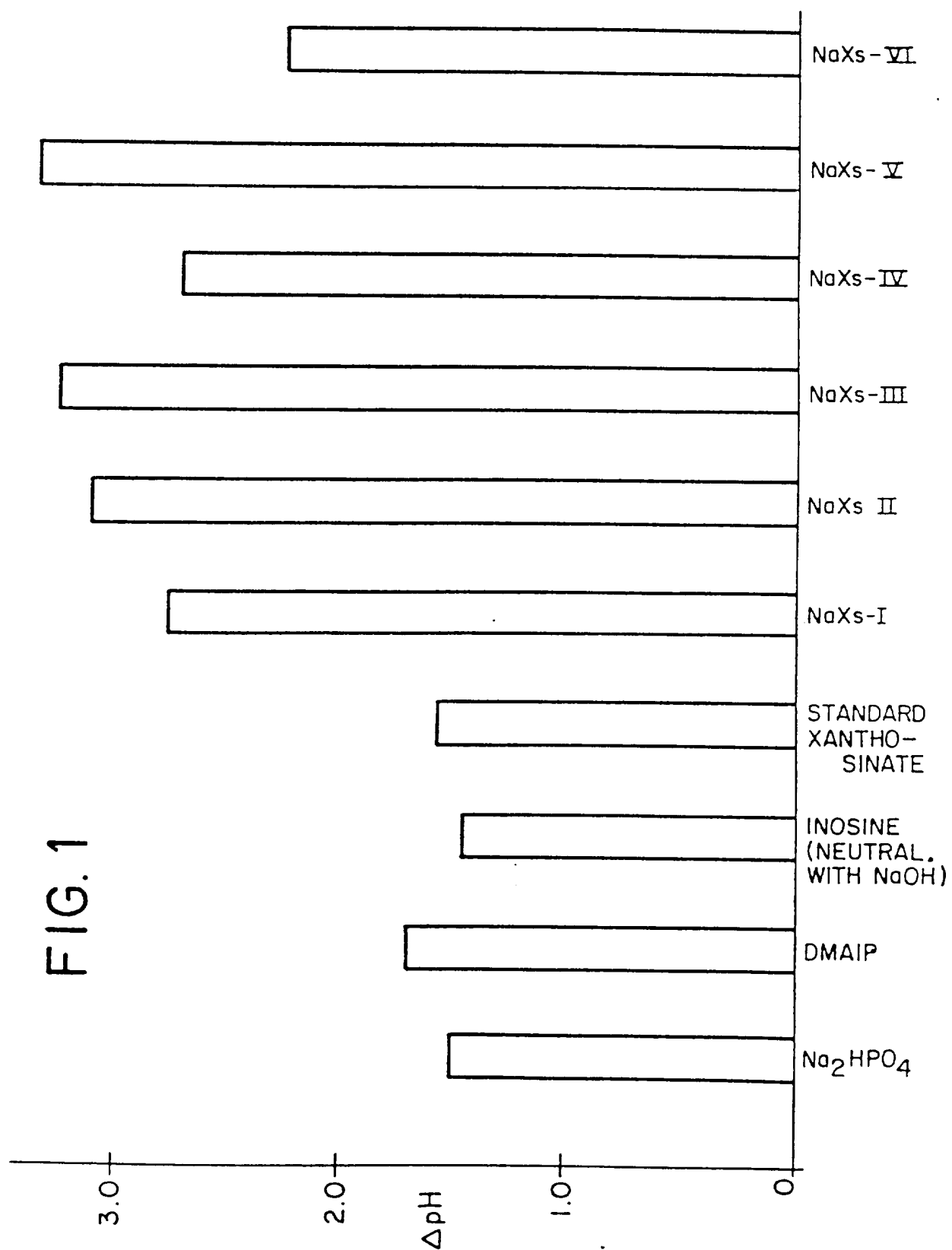


FIG. 2

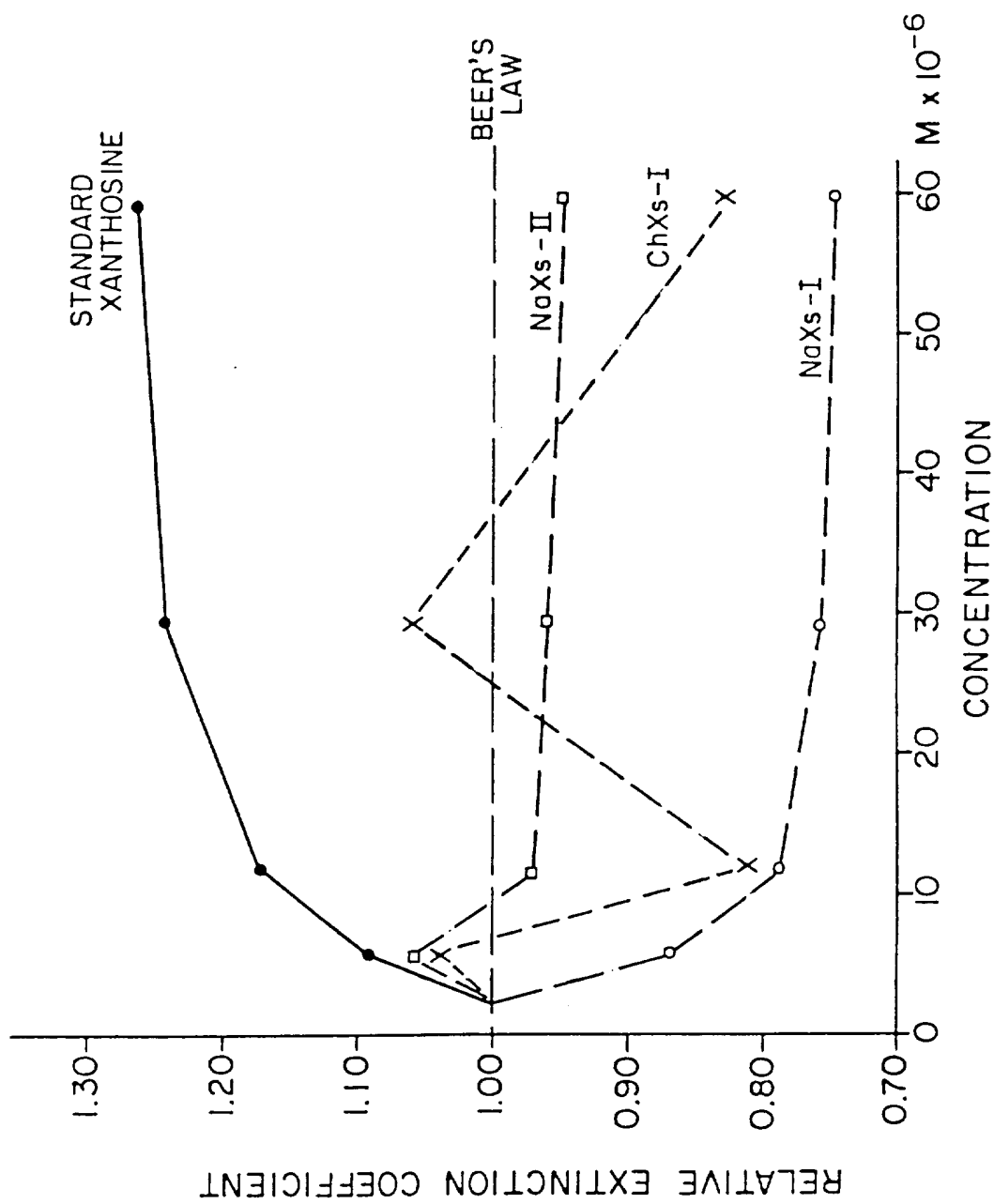


FIG. 3

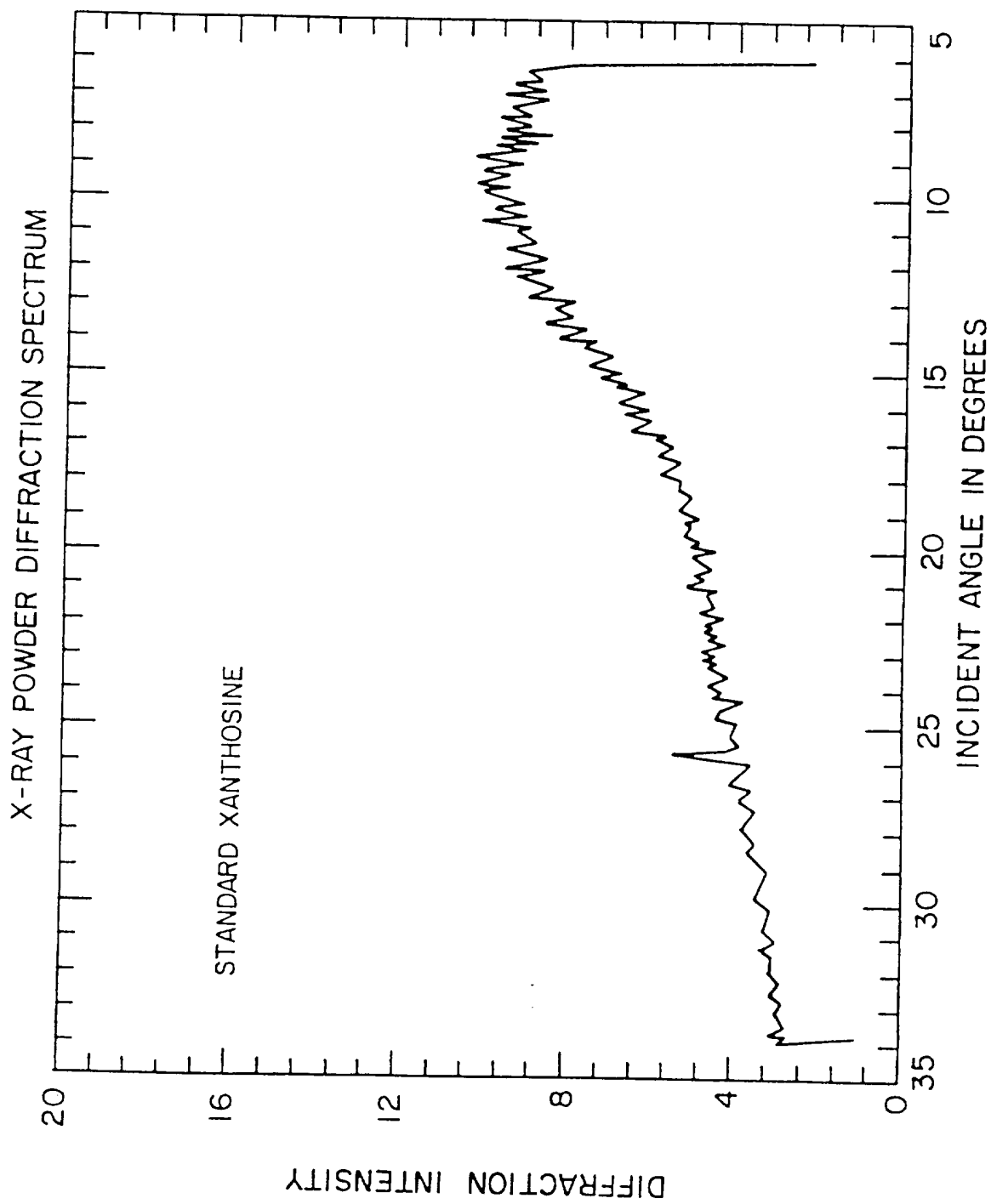


FIG. 4

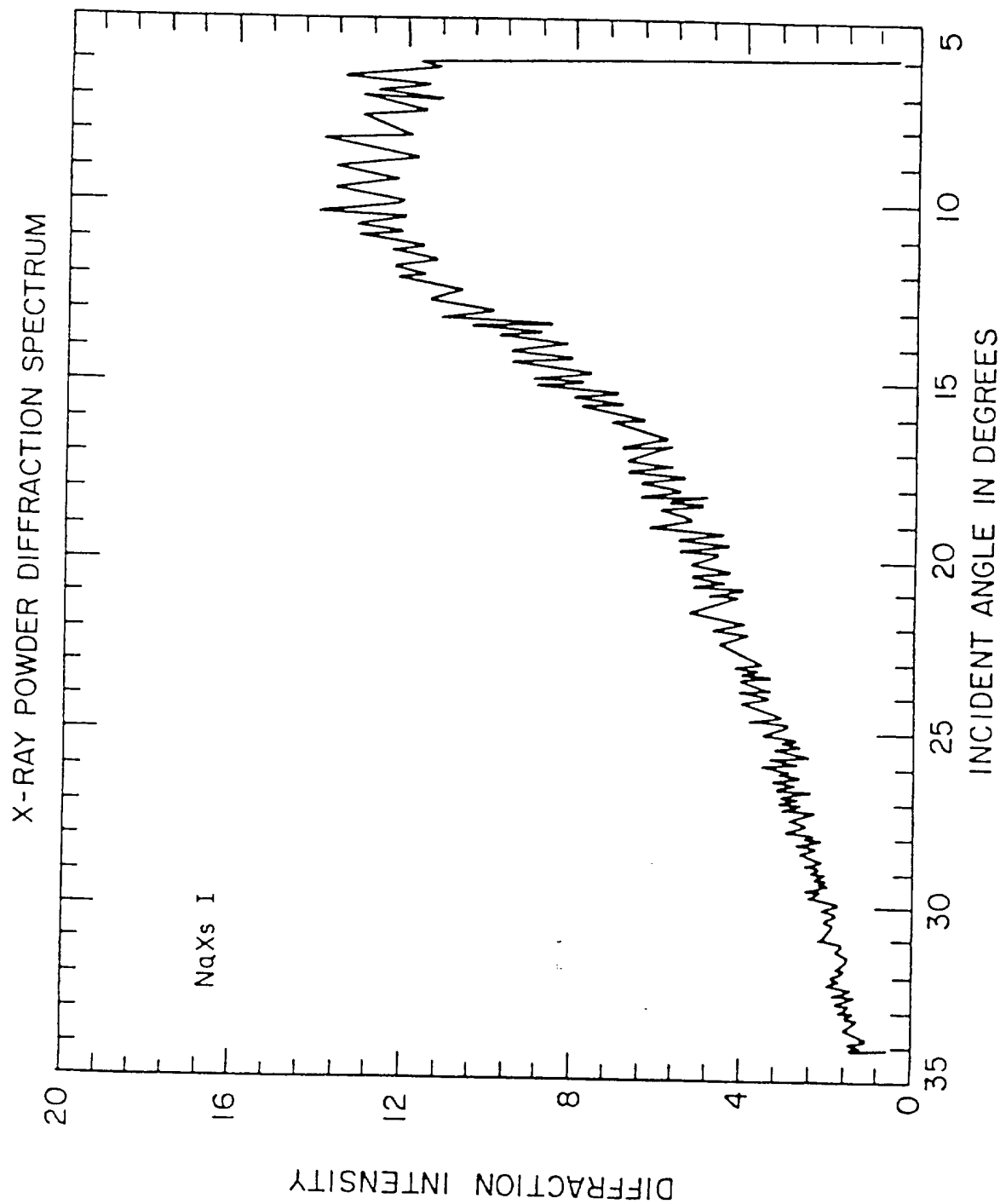


FIG. 5

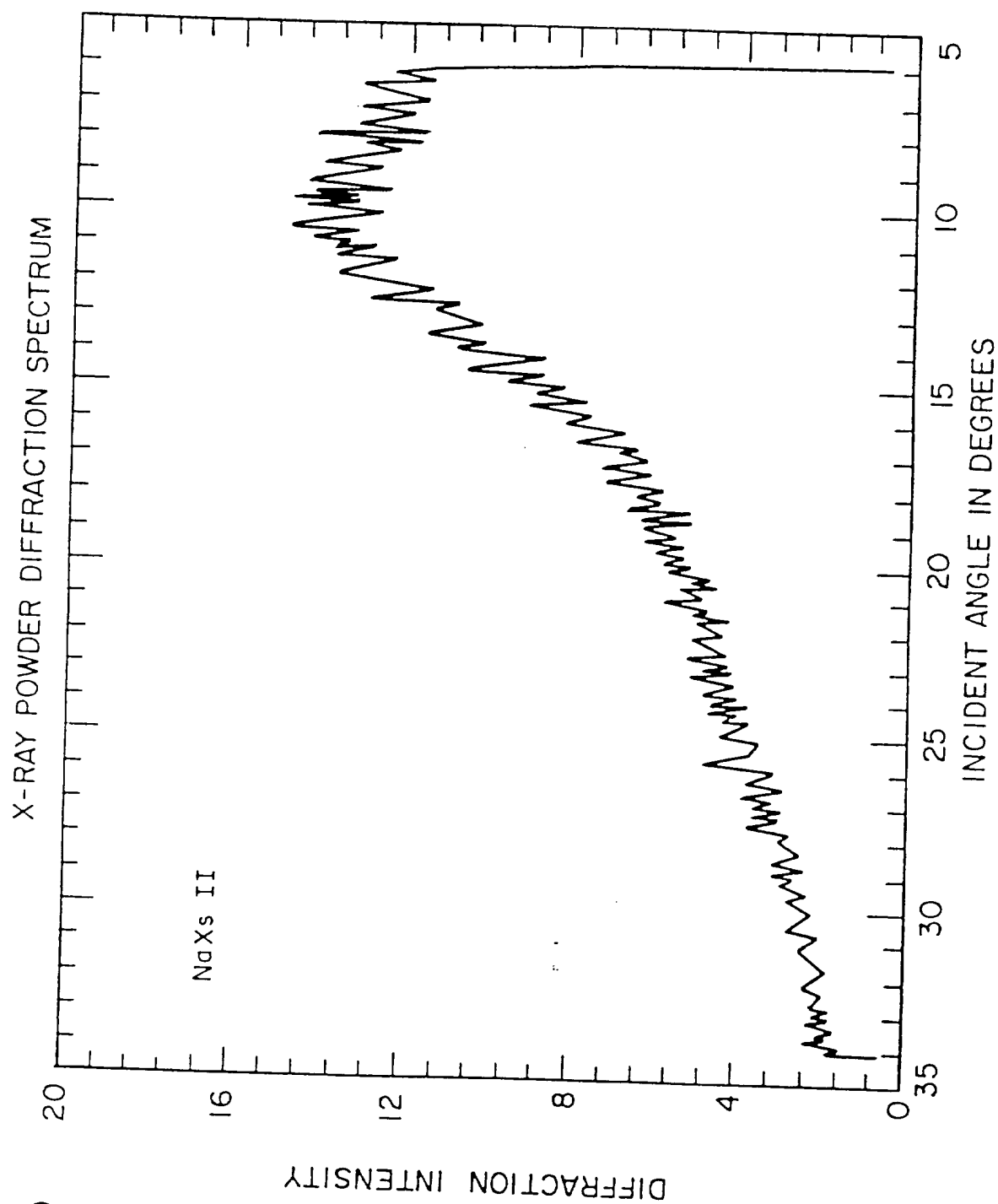


FIG. 6

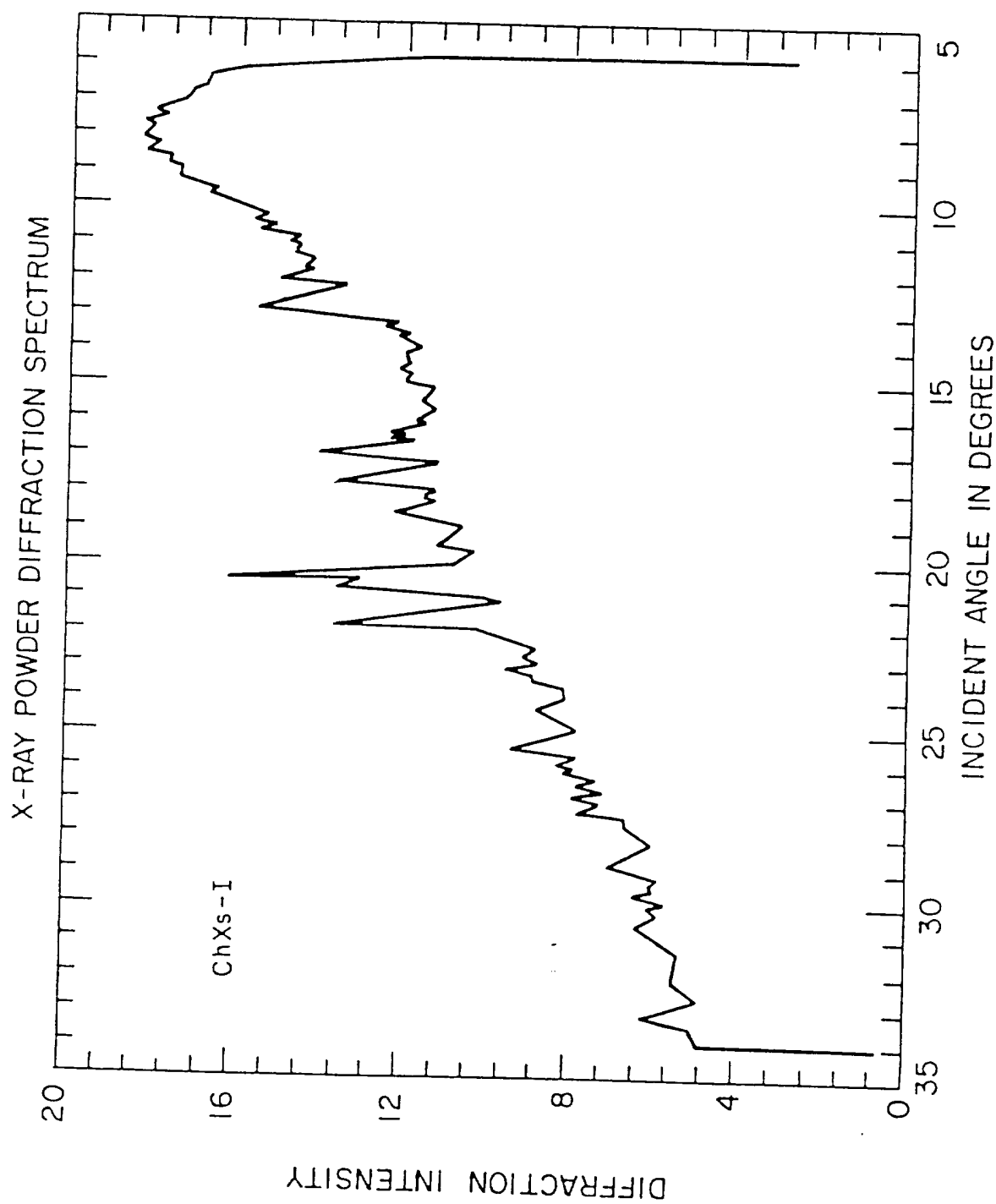
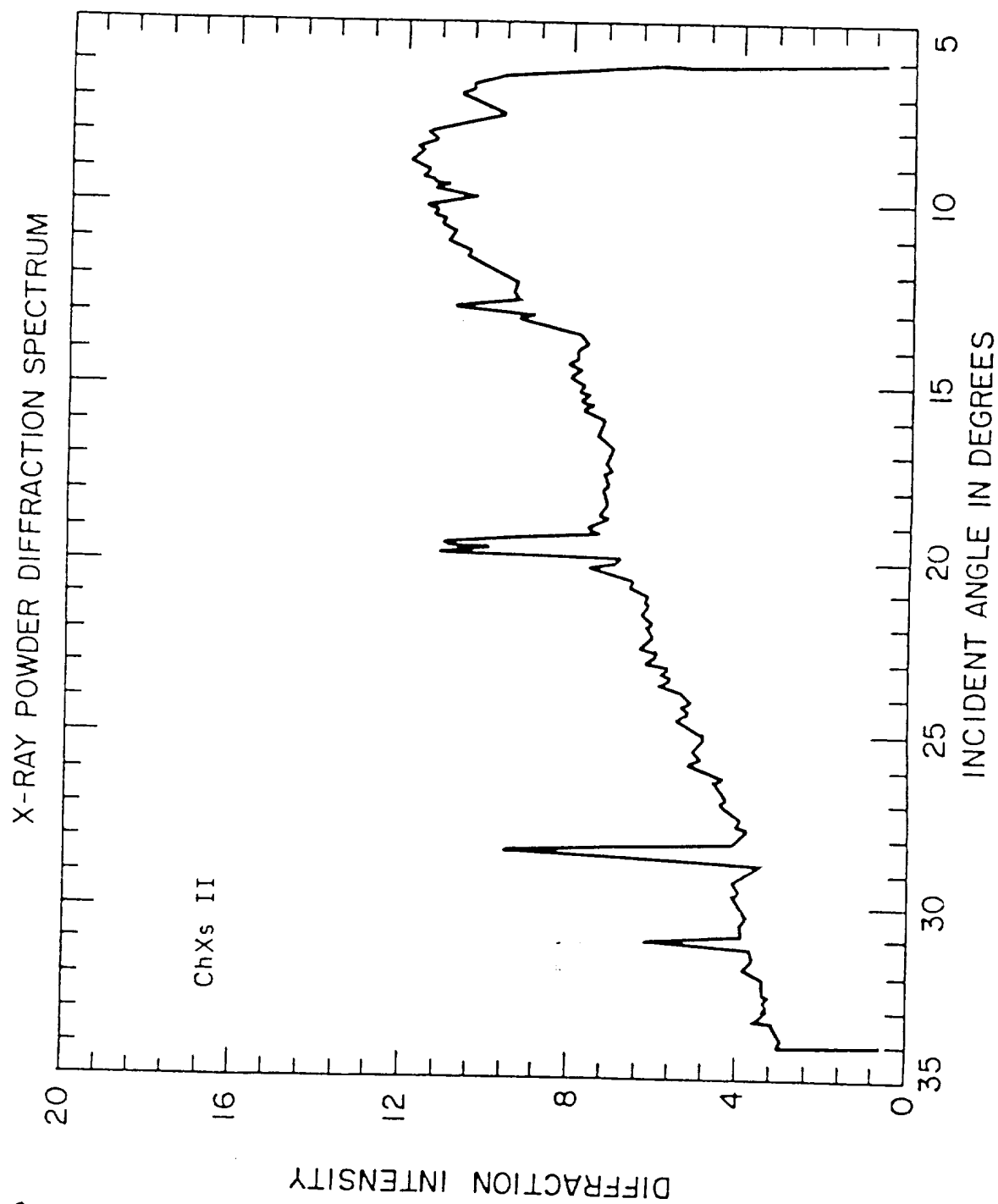


FIG. 7



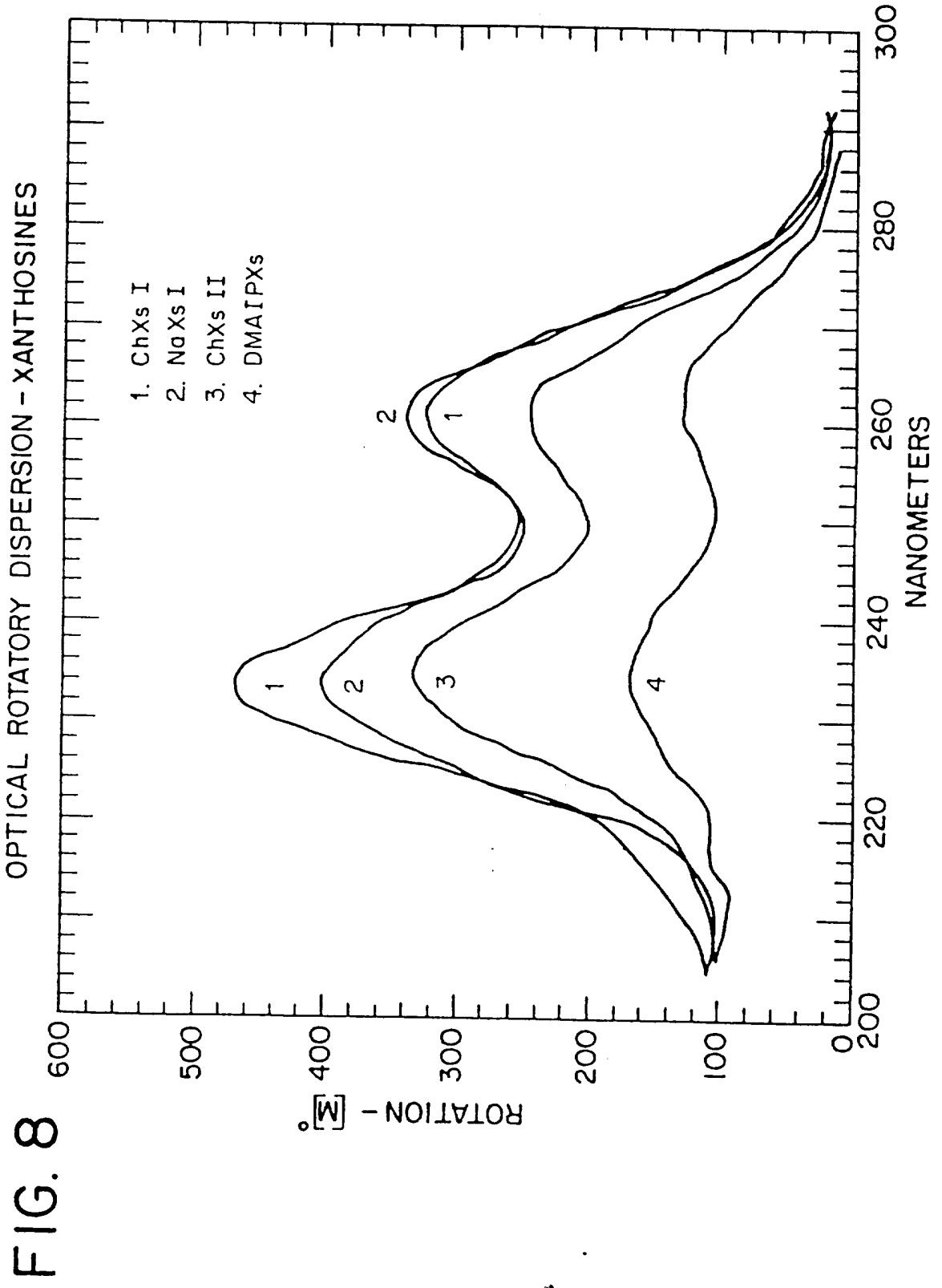
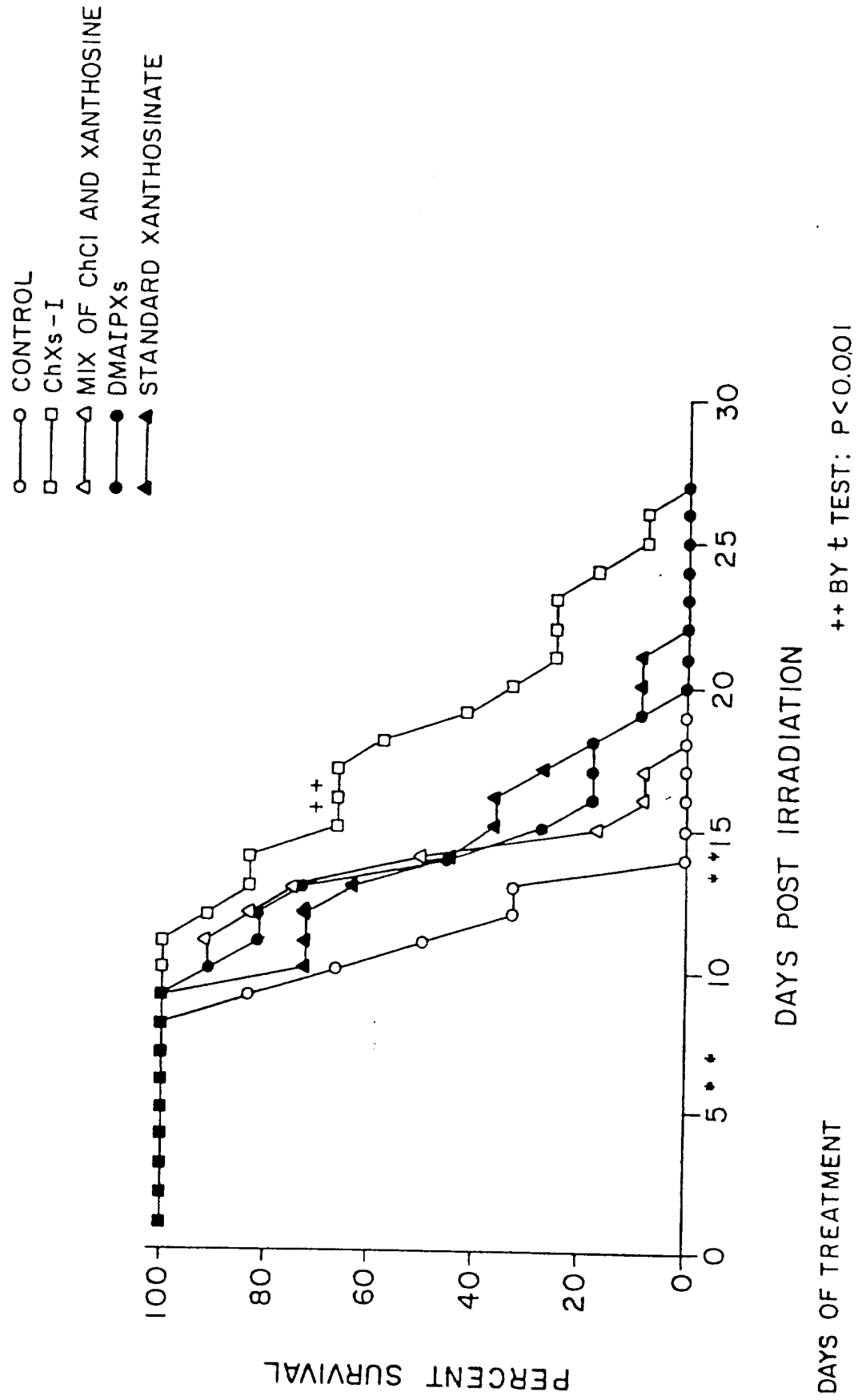


FIG. 9



# SUPPRESSION OF TRYPSIN FOOT-PAD EDEMA BY CHOLINE XANTHOSINATE POLYMORPHS

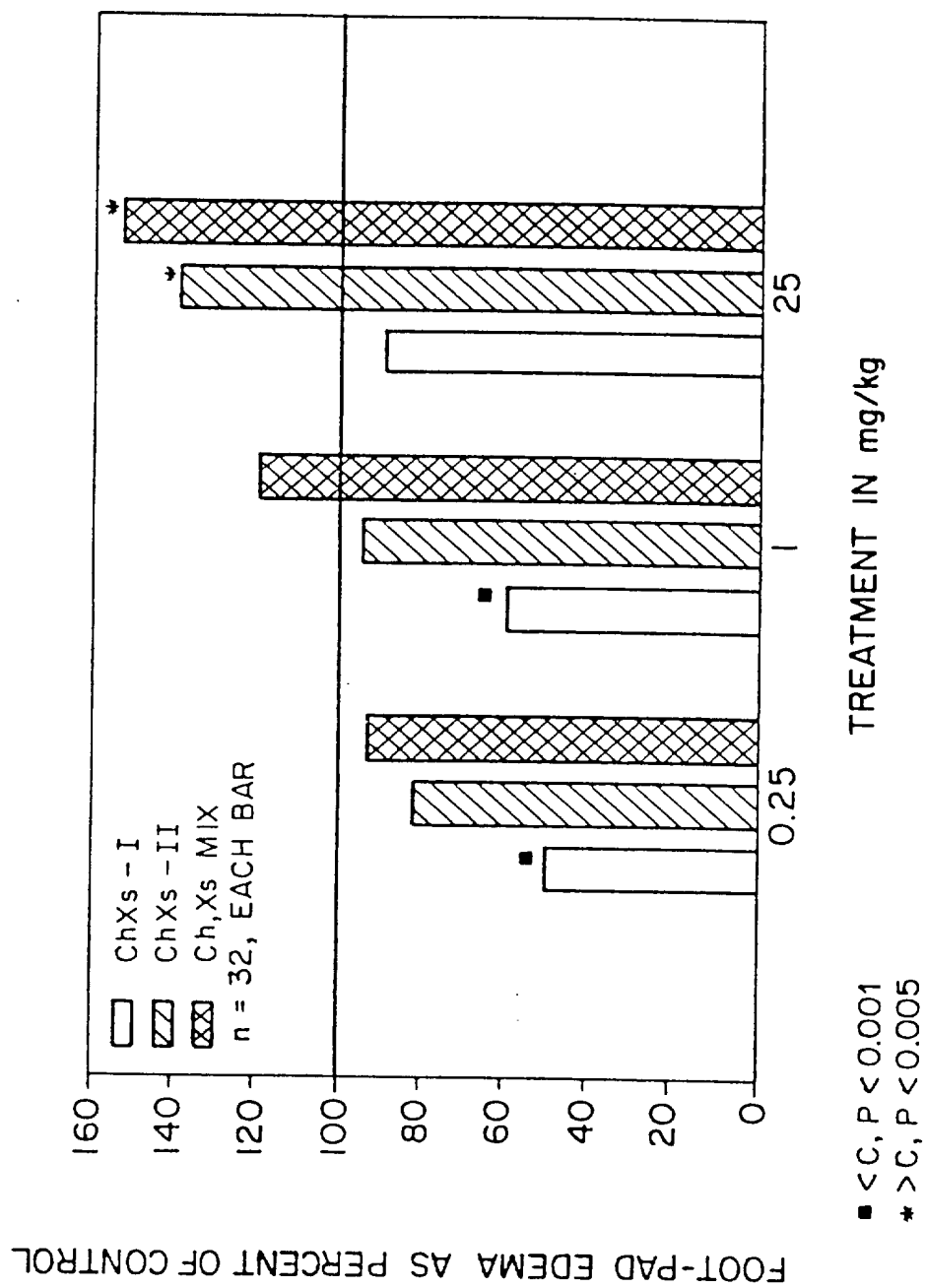


FIG. 10