

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 96060


REQUERENTE: ROUSSEL-UCLAF, francesa, com sede em 35,
Bd des Invalides, 75007 Paris, França.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM NOVO DERI-
VADO SULFATADO DO GALACTANO EXTRAÍDO DE KLEB-
SIELLA"

INVENTORES: Pierre Smets e René Zalisz

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

França em 4 de Dezembro de 1989, sob o N.º. 89-15972.



A composição em oses neutras é determinada por cromatografia em fase gasosa depois de metanolise de acordo com o método de ZANETTA J. Chromato. (1972) 69, p. 291 ou com o método de KAMERLING (Biochem J. (1975), 151, p. 491).

Esta invenção tem, mais particularmente, por objectivo um processo para preparar um derivado sulfatado do galactano constituído, essencialmente, por oses neutras sulfatadas numa proporção 40 a 80% em hidroxilos.

Entre os produtos preparados segundo o processo da presente invenção, é preferido o derivado sulfatado do galactano constituído essencialmente por oses neutras sulfatadas numa proporção de 50 a 70% em hidroxilos.

O derivado sulfatado do galactano obtido de acordo com o processo desta invenção é constituído por uma cadeia linear de galactose em 1-3 e possui um peso molecular compreendido entre 5000 e 12000 e, de preferência, próximo de 7000.

Estes polissacarídeos estão isentos de lípidos e de proteínas.


A composição em galactose é determinada por cromatografia em fase gasosa depois de redução e metanolise.

Os lípidos são doseados por cromatografia em fase gasosa depois de metanolise.

As proteínas são doseadas pelo método de LOWRY (J.B.C. (1951), 193, p. 265-273).

A sequência de cadeias de galactose é determinada pelos métodos clássicos de metilação, análise por cromatografia em fase gasosa ligada à espectrometria de massa, oxidação periódica, RMN de ^1H e ^{13}C . Os resultados mostram que o galactano é formado por uma cadeia linear de radicais de galactose ligados por ligações alfa (1-3) 50% e beta (1-3) 50%, com um grupo de repetição constituído por 8 radicais galacto-piranoose num radical galacto-furanoose.

O derivado sulfatado do galactano obtido de acordo com os processos desta invenção pode preparar-se a partir de diferentes espécies de Klebsiella. É preferido, em



particular, o derivado sulfatado do galactano proveniente de *Klebsiella pneumoniae* e nomeadamente da espécie depositada no Institut Pasteur em Paris ou Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) sob os números 52145 e 1-163 e na National Culture Type Collection sob o número 5055.

O processo desta invenção é caracterizado por se tratar um acil-glicano extraído de *Klebsiella*, essencialmente constituído por aproximadamente 80% de oses neutras, 20% de lípidos, menos de 2% de proteínas e possuindo um peso molecular de aproximadamente 12500, por hidrólise ácida suave, cromatografia de elevada capacidade sobre permutadores de aniões, recuperar a fracção não retida, se filtrar sobre gel, se recuperar a fracção contendo o galactano de peso molecular compreendido entre 4000 e 10000, processo este caracterizado por se sulfatar a fracção de galactano assim obtida, se purificar por diálise e se isolar o derivado sulfatado do galactano assim obtido.


O acil-glicano extraído de *Klebsiella* de partida pode obter-se a partir de um extracto bacteriano hidrossolúvel de *Klebsiella*, por aquecimento e depois fraccionamento cromatográfico. Tais preparações foram já descritas no pedido de Patente Francês FR 2574429 e no pedido de Patente Alemão DE 3543267.

O extracto bacteriano hidrossolúvel de *Klebsiella* prepara-se de acordo com os processos descritos nas Patentes FR 2490496 e EP 49182.

Para as condições preferidas, o processo desta invenção desenvolve-se como se segue:

- A hidrólise ácida suave do acil-glicano efectua-se numa solução de ácido acético a 1%, por aquecimento a 100°C durante 90 minutos, eliminação do precipitado formado que contém a fracção lipídica, por centrifugação, por exemplo, durante 30 minutos a 2000 R. Recolha do sobrenadante que contém o galactano e que posteriormente pode ser liofilizado.

- O galactano é depois separado do sobrenadante



sentam igualmente uma actividade anti-coagulante.

Estas propriedades são ilustradas adiante na parte experimental.

Estas propriedades justificam a utilização do derivado sulfatado do galactano tal como atrás definido como medicamento.


Estes medicamentos podem, por exemplo, utilizar-se no tratamento ou na prevenção de imuno-depressões, de doenças infecciosas causadas por bactérias ou vírus, e, em particular, pelo vírus da Sida no tratamento de doenças de parasitas, de tóxi-infecções, no tratamento de infecções pós-hospitalares, pós-cirúrgicas e de alergias de qualquer origem. Estes medicamentos podem igualmente utilizar-se, com vantagem, no tratamento de enxertos de medula óssea e de aplasias medulares pós-quimioterápicas.

A dose normal varia de acordo com o produto utilizado, o indivíduo tratado, a afecção em causa, e pode, por exemplo, ser de 0,5 a 5 mg por dia por via oral.

Estes medicamentos podem igualmente utilizar-se por exemplo, em pneumologia, no tratamento de efisema, de pneumononias, bronquites, perturbações causadas pelo tabagismo ou pela poluição atmosférica, em cardiologia no tratamento de artites, assim como, por exemplo, em dermatologia no tratamento de psoríases, de queimaduras, de bolhas e do envelhecimento da pele, em gastroenterologia, no tratamento de pancreatites agudas, e, de uma forma geral, no tratamento de todas as afecções que ponham em causa o mau funcionamento da elastase, assim como, no tratamento de doenças trombo-embólicas. A dose normal, varia de acordo com o produto utilizado, o indivíduo tratado e a afecção em causa, e pode, por exemplo, ser de 1 a 300 mg, por dia, por via intravenosa, no homem.

O derivado sulfatado do galactano extraído de Klebsiella tal como atrás definido pode utilizar-se para preparar composições farmacêuticas que o contêm como ingrediente activo.

Para medicamentos, o derivado sulfatado do galac-



tano extraído de Klebsiella, tal como atrás definido, pode ser incorporado em composições farmacêuticas destinadas a via digestiva, parentérica ou-local.

As composições farmacêuticas correspondentes podem ser, por exemplo, sólidas ou líquidas e apresentarem-se sob as formas farmacêuticas normalmente utilizadas em medicina como, por exemplo, comprimidos, simples ou em drageias, granulados, soluções, xaropes, supositórios, preparações injectáveis liofilizadas ou não, óvulos, cremes, pomadas, locções, gotas, colírios e aerosóis; preparam-se de acordo com os métodos habituais. O ou os ingredientes activos podem ser incorporados em excipientes normalmente utilizados nestas composições farmacêuticas, tais como, talco, goma arábica, lactose, amido, estearato de magnésio, manteiga de cacau, veículos aquosos ou não, gorduras de origem animal ou vegetal, derivados parafínicos, glicóis, diversos agentes espumantes, dispersantes ou emulsionantes, e conservantes.

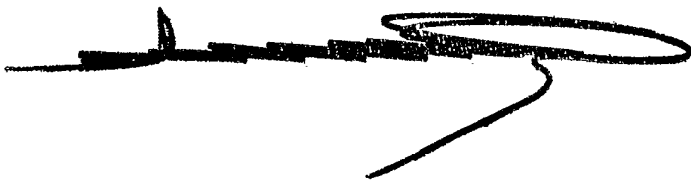
Apresentam-se em seguida, a título não limitativo, exemplos do processo desta invenção.

Exemplo 1: Derivado sulfatado do galactano extraído de Klebsiella.

A piridina arrefecida a 0°C em gelo, adicionou-se um ácido cloro-sulfónico (0,4 cm³). Depois de voltar à temperatura ambiente, adicionou-se o galactano extraído de Klebsiella pneumoniae (25 mg) em suspensão na piridina (24 cm³). Aqueceu-se a mistura durante 3 horas a 80°C, arrefeceu-se à temperatura ambiente, dilui-se com água destilada (30 cm³) e finalmente tratou-se com uma solução 2,5 M de hidróxido de sódio (5 cm³). Concentrou-se, sob vácuo, a solução obtida, fez-se a diálise com água destilada durante 3 dias, congelou-se e liofilizou-se.

Obteve-se o derivado sulfatado de galactano extraído de Klebsiella.

No produto obtido os hidroxilos são sulfatados


numa proporção de 60%. O peso molecular é próximo de 7000.

Preparação do galactano extraído de Klebsiella pneumoniae

Solubilizaram-se 334 mg de acil-glicanos de Klebsiella obtido como indicado no exemplo 1 do pedido de Patente Francês nº 2574429 a partir da espécie depositada no Institut Pasteur sob o nº I-163) em 33,4 cm³ de solução de ácido acético a 1%, e aqueceu-se a 100°C durante 90 minutos. Depois de arrefecimento, separou-se o precipitado que continha a fracção lipídica por centrifugação a 2000 R durante 30 minutos. Liofilizou-se o sobrenadante e isolaram-se 200 mg do resíduo que se redissolveu em 4 cm³ de água. Fez-se a cromatografia, por fracções de 1 cm³, sobre uma coluna de cromatografia de elevada capacidade de permutador de aniões Whatman Magnum 9 SAX (9,4 cm x 50 cm), luida por água durante 30 minutos, com um caudal de 2 cm³/minuto com detecção a 200 nm. Isolou-se a fracção que continha as oses neutras determinadas a 492 nm, depois do ensaio ao fenol-sulfúrico. Isolaram-se por liofilização 55 mg de fracção neutra.

Isolamento do galactano

Dissolveu-se o liofilizado anterior num tampão de água-ácido acético-piridina (973-7-20), e depois submeteu-se a uma filtração sobre gel por cromatografia em coluna de Biogel A.1.5M (2 cm x 1.5m), equilibrada com o mesmo tampão. Recolheu-se a fracção detectada pelo ensaio de fenol-sulfúrico. Esterilizou-se por filtração sobre membrana de 0,22 micra, e depois liofilizou-se e obtiveram-se 22 mg do galactano pretendido.

Exemplo 2: Derivado sulfatado do galactano extraído de Klebsiella

A piridina arrefecida a 0°C em gelo, adicionou-se ácido cloro-sulfónico (4 cm³). Depois de voltar à temperatura ambiente, adicionou-se o galactano extraído de Klebsiella pneumoniae (preparado como indicado na preparação dada no exemplo 1) (85 mg), em suspensão na piridina (24 cm³). Aqueceu-se a mistura durante 2 horas a 80°C, arrefeceu-se à temperatura ambiente e diluiu-se com água destilada (30 cm³)

relação é fraca.

B) Actividade protectora do derivado sulfatado de galactano extraído de Klebsiella

1. Inibição de Sincitia

Efectua-se uma co-cultura de células H 9 III (infectadas de forma crónica, 10^5 células/cm³) com as células SUP T1 (não infectadas: 2×10^5 células/cm³).

Formam-se sincitia que se contam ao microscópio.

Cada tipo de células é ou não pré-incubado com o produto estudado, durante uma noite a 37°C.

Quando não há pré-incubação, o produto estudado adiciona-se às células no momento em que se efectua a cultura.

Sempre que haja uma inibição da formação de sincitia nãs células tratadas relativamente às células de controlo, o produto estudado é protector.

Os resultados obtidos apresentam-se adiante:

QUADRO 1

co-cultura com o produto estudado sem incubação prévia

Produto Exemplo 1 em microgra- mas/cm ³	de inibição	
	Percentagem ensaio N ^o 1	ensaio N ^o 2
1	0	10
10	42	17
100	100	100

QUADRO 2

• pré-incubação com o produto estudado durante 1 noite a 37°C
• antes da co-cultura

Produto Exemplo 1 em microgramas/cm ³	Percentagem célula H 9 III	de inibição célula Sup Ti
1	17	23
10	23	27
100	100	100

2. Ensaio MT4/MTT

Utilizaram-se células MT4 a 10^6 células/cm³. Diluíram-se a metade com ou sem produto estudado, em concentrações diferentes. Introduziram-se sobre uma placa de micro-titulação 100 microlitros de vírus HIV em diferentes diluições e 100 microlitros de suspensão celular pré-tratada.

Incubaram-se a 37°C durante 7 dias, adicionou-se o MTT e efectuou-se uma leitura no espectrofotómetro.

Determinou-se a percentagem de inibição da infecção das células MT4.

Os resultados obtidos apresentam-se adiante:

QUADRO 3

Produto Exemplo 1 em microgramas/cm ³	Percentagem de inibição
1	74
10	99
100	84

3- Ensaio H9

Utilizaram-se células H9 que se trataram com polibreno, lavaram-se e recuperaram-se em 100 microlitros do meio, com ou sem o produto estudado a diferentes concentrações. Incubaram-se durante 2 horas a 37°C, adicionaram-se 100 microlitros de vírus HIV a 1/10, mantiveram-se 1 hora a 37°C e lavaram-se.

Recuperaram-se as células em 1 cm³ do meio com ou sem o produto estudado, dividiram-se em 2 tubos, 500 microlitros por tubo e 2x10⁵ células por tubo.

Em J + 4 adicionaram-se 500 microlitros de meio de cultura com ou sem o produto estudado.

Em J + 8, substituiu-se a porção do sobrenadante por meio novo.

Em J + 11, efectuou-se uma dosagem de transcriptase inversa sobre o sobrenadante e uma determinação de imuno-fluorescência sobre as células.

Os resultados obtidos apresentam-se adiante:

QUADRO 4

	Transcriptase Inversa		Imuno-fluorescência	
	cpm/cm ³ X 10 ⁴	% de inibição	% de células fluorescentes	% de inibição
Células não infectadas	1,68		0	
Células infectadas	291		51	
Produto exemplo 1 (concentração em microgramas/cm ³)				

1	6,42	76	3	94
10	1,16	100	0	100
100	1,12	100	0	100

Os resultados obtidos nos diferentes ensaios mostram que o produto estudado inibe de forma muito importante a formação de sincítia e que protege a célula estudada da infecção causada pelo vírus HIV.

Estudo da actividade anti-élastase.

Determinou-se a actividade anti-élastase por dosagem espectrofotométrica relativa a élastase leucocitária humana (por uma técnica análoga à descrita por Boudier et al. Clin. Chim. Acta. 132, 309-315 (1983)).


Produto do exemplo	Elastase leucocitária humana
1	Ki : $1 \times 10^{-8}M$

REIVINDICAÇÕES

- 12 -

Processo para preparar um novo derivado sulfatado do galactano extraído de Klebsiella, que é essencialmente constituído por oses neutras sulfatadas numa proporção de 20 a 90% dos hidroxilos, caracterizado por se tratar um acil-glicano extraído de Klebsiella, essencialmente constituído por cerca de 80% de oses neutras, 20% de lípidos, menos de 2% de proteínas e possuindo um peso molecular de cerca de 12500, por hidrólise ácida suave, cromatografia de elevado rendimento sobre um permutador de aniões, por se

- 13 -



recuperar a fracção não retida, se submeter a uma filtração sobre gel, por se recuperar a fracção contendo o galactano de peso molecular compreendido entre 4000 e 10000, por se sulfatar a fracção de galactano assim obtido, se purificar por diálise e se isolar o derivado sulfatado do galactano assim obtido.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sulfatação da fracção de galactano ser efectuada por meio de um ácido sulfónico tal como o ácido cloro-sulfónico no seio de uma amina como a piridina ou por meio de um sulfonato como o N-sulfonato de piperidina efectuando o aquecimento do meio de reacção e a por se efectuar a diálise contra água destilada.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por se sulfatar 40 a 80% dos hidroxilos.

- 4ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado por se sulfatar 50 a 70% dos hidroxilos.

- 5ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 4, caracterizado por se sulfatar um galactano escolhido de tal maneira que se obtém um derivado sulfatado do galactano constituído por uma cadeia linear de galactano de 1 a 3 e um peso molecular entre 5000 e 12000.

- 6ª -

- 14 -

- 6ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 5, caracterizado por se utilizar como composto de partida um acil-glicano extraído de *Klebsiella pneumoniae*.

- 7ª -

Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por se utilizar como composto de partida um acil-glicano proveniente da estirpe depositada no Instituto Pasteur em Paris ou na Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) sob os números 52145 e 1-163 e na National Culture Type Collection sob o nº 5055.

- 8ª -

Processo para a preparação de composições farmacêuticas, caracterizado por se incorporar como ingrediente activo pelo menos um dos derivados sulfatados do galactano tal como definido na reivindicação 1 sob a forma destinada a essa utilização.

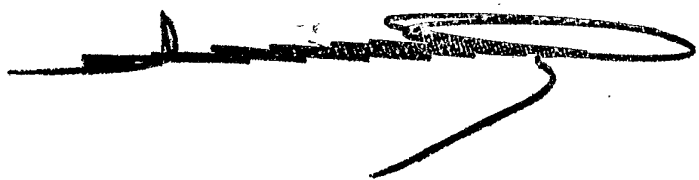
A requerente reivindica a prioridade do pedido francês apresentado em 4 de Dezembro de 1989, sob o nº. 89-15972.

Lisboa, 31 de Dezembro de 1990

ALCANTARA, S. A. - REPRESENTAÇÃO INDUSTRIAL



- 15 -



RESUMO

A invenção refere-se a um processo para preparar um novo derivado sulfatado do galactano extraído de Klebsiella, que é essencialmente constituído por oses neutras sulfatadas numa proporção de 20 a 90% dos hidroxilos, que compreende tratar um acil-glicano extraído de Klebsiella, essencialmente constituído por cerca de 80% de oses neutras, 20% de lípidos, menos de 2% de proteínas e possuindo um peso molecular de cerca de 12500, por hidrólise suave, cromatografia de elevado rendimento sobre um permutador de aniões, recuperar-se a fracção não retida, submeter-se a uma filtração sobre gel, recuperar-se a fracção contendo o galactano de peso molecular compreendido entre 4000 e 10000 sulfatar-se a fracção de galactano assim obtido, purificar-se por diálise e isolar-se o derivado do sulfatado do galactano assim obtido.