



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0611745-7 A2**

(22) Data de Depósito: 23/06/2006
(43) Data da Publicação: 28/09/2010
(RPI 2073)



* B R P I 0 6 1 1 7 4 5 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/505
A61K 38/16

(54) Título: **COMPOSTOS SUPRAVALENTES**

(30) Prioridade Unionista: 23/06/2005 EP 05 013594.6,
14/09/2005 EP 05 020035.1, 24/12/2005 EP 05 028310.0, 09/03/2006
EP 06 004833.7, 17/05/2006 EP 06 010174.8, 17/05/2006 US
60/747,515, 09/03/2006 US 60/780,568, 10/11/2005 EP
PCT/EP2005/012075, 23/06/2005 EP 05 013594.6, 24/12/2005 EP 05
028310.0, 09/03/2006 EP 06 004833.7, 17/05/2006 EP 06 010174.8,
09/03/2006 US 60/780,568

(73) Titular(es): Aplagen GMBH

(72) Inventor(es): Hans-Georg Frank, Udo Haberl

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006006097 de 23/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/136450 de 28/12/2006

(57) Resumo: COMPOSTOS SUPRAVALENTES. A presente invenção refere-se a compostos peptídicos supravaleentes apresentando uma eficácia intensificada. Compostos supravaleentes compreendem pelo menos várias unidades peptídicas bivalentes que se ligam a um receptor-alvo e são conectadas a uma grande unidade veículo polimérica.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSTOS SUPRAVALENTES**".

A presente invenção refere-se a compostos peptídicos.

Com o desenvolvimento de pesquisa sobre proteínas, um grande número de peptídeos tendo várias atividades biológicas e farmacêuticas foi encontrado. Vários desses peptídeos executam suas ações via a ligação à moléculas-alvo como, por exemplo, moléculas receptoras (tais como receptores de citocina).

Foi provado que fatores de crescimento hematopoiético (HGFs) são produtos terapêuticos de sucesso clínico; contudo, seu tamanho (15-70 kDa), instabilidade conformacional, suscetibilidade à degradação proteolítica, pobre penetração na membrana, antigenicidade, alto custo de produção e farmacocinética desfavorável pode tornar os mesmos candidatos a fármacos menos do que ideais. Além disso, a pobre disponibilidade das proteínas nativas requer que elas sejam administradas parenteralmente. É vantajoso, portanto, desenvolver agonistas (e antagonistas) de pequena molécula de receptores de HGF que são equípotentes à suas contrapartes polipeptídicas, mas que carecem de algumas das deficiências inerentes das grandes proteínas. A identificação e exame de peptídeos menores que se ligam a e ativam receptores de citocina também proporciona uma melhor compreensão de interações ligante-receptor. Essa informação é usada para projetar miméticos de citocina de pequena molécula oralmente disponíveis de modo racional. Ativação de receptores transmembrana por fatores de crescimento e citocinas ocorre quando um ligante se liga a um domínio específico sobre o receptor, desse modo, induzindo a uma alteração conformacional e disparando dimerização ou oligomerização de cadeias de receptor. Quando de ligação ao ligante, vários membros de receptores de citocina da classe I formam homodímeros, incluindo o receptor de eritropoietina (EPOR), o receptor de trombopoietina (TPOR), receptor do fator de estimulação de colônia de granulócito (G-CSFR), receptor do hormônio de crescimento (GHR) e receptor de prolactina (PrP). Vários estudos foram reportados que são dirigidos à descoberta de detalhes precisos das interfaces de dimerização e o grau ao

qual os receptores não ligados existem como dímeros. Os resultados desses estudos têm mostrado similaridades estruturais e funcionais entre os receptores de citocina da classe I. Estudos também têm mostrado que dimerização do receptor apenas, embora necessária para sinalização intracelular, não é suficiente para produzir transdução de sinal. Receptores recentes mostraram que pequenas moléculas e peptídeos podem se ligar a e ativar receptores de citocina homodiméricos através de atuação como agonistas e imitando os efeitos das proteínas naturais (veja Laber, E. G. (2004). Small-Molecule and Peptide Agonists: A Literature Review. Hematopoietic Growth Factors in Oncology - Basic Science and Clinical Therapeutics. G. Morstyn, M. Foote e G. J. Lieschke: 65-80). Contudo, sua atividade biológica é, frequentemente, inferior às moléculas naturais. Conseqüentemente, tentativas são feitas para melhorar a atividade biológica das moléculas miméticas.

Exemplos com sucesso de tais peptídeos incluem peptídeos de ligação ao receptor de eritropoietina e que imitam a função da eritropoietina e peptídeos de ligação ao receptor de trombopoietina e que imitam a função da trombopoietina.

O hormônio eritropoietina (EPO) é uma glicoproteína constituída por 165 aminoácidos e tendo quatro sítios de glicosilação. Ela estimula a divisão mitótica e a diferenciação de células precursoras de eritrócitos e, assim, assegura a produção de eritrócitos. Uma vez que o uso de EPO ou EPO recombinante tem várias desvantagens, incluindo reações imunogênicas, peptídeos sintéticos são usados, os quais não compartilham qualquer homologia de seqüência ou relação estrutural com EPO mas, de qualquer modo, se ligam e interagem como o EPO-R (veja, por exemplo, Wrighton e outros, 1996). Peptídeos sintéticos que imitam a atividade da EPO ("peptídeos miméticos de EPO") são, por enquanto, bem-conhecidos no estado da técnica (veja, por exemplo, WO 96/40772; WO 96/40749; WO 01/38342; WO 01/091780; WO 2004/101611; WO 2004/100997; WO 2004/101600; WO 2004/101606).

EPO e peptídeos miméticos de EPO ativam o receptor de EPO através de ligação dos domínios extracelulares do receptor e presumível di-

merização de dois monômeros do receptor a um complexo de receptor, desse modo, iniciando a transdução de sinal (Johnson e outros, 1997). A estrutura de cristal do receptor de EPO ligado ao EMP1 (um peptídeo mimético de EPO bem-conhecido) revelou a formação de um complexo de receptor-peptídeo consistindo em dois peptídeos ligados a dois monômeros de receptor. Assim, não foi realmente uma surpresa que a combinação de exatamente dois desses domínios de ligação em uma única molécula intensificasse a atividade consideravelmente, levando ao resultado de que peptídeos com um único domínio de ligação mostrou o mesmo padrão qualitativo de atividade, enquanto que dois dos domínios de ligação unidos juntos mostra uma ED50 muito menor (Dose para Efeito de 50%, uma medida de atividade).

Métodos de preparo para os respectivos dímeros peptídicos, por exemplo, de peptídeos miméticos de EPO ou TPO são também bem-conhecidos no estado da técnica e oscilam, por exemplo, de dimerização via PEGuilação, pontes de dissulfeto ou cadeias laterais de lisina (veja, por exemplo, WO 96/40772; WO 96/40749; WO 01/38342; WO 01/091780; WO 2004/101611; WO 2004/100997; WO 2004/101600; WO 2004/101606, Wrighton e outros, 1997; Johnson e outros, 1997; WO 98/25965). Todos esses métodos combinam peptídeos monoméricos via uma estrutura ligante de forma a obter as moléculas diméricas ou mesmo multiméricas desejadas, as quais intensificam a formação do complexo de receptor dimérico ou mesmo multimérico ativo.

Um conceito similar para combinação de unidades monoméricas é também conhecido para outras moléculas de ligação (veja, por exemplo, WO 2004/014951). De forma a gerar uma molécula que seja capaz de interagir com o respectivo complexo de receptor di- ou multimérico, esse pedido de patente ensina usar uma pequena estrutura de suporte de forma a conectar os domínios de ligação do receptor monomérico em uma relação espacial que permite a interação com os respectivos complexos de receptor (e, por exemplo, induzir à di- ou trimerização do receptor).

Contudo, mesmo embora a dimerização (ou mesmo multimerização em caso de um receptor multimérico) das unidades peptídicas mono-

méricas usualmente melhora a atividade comparado com os respectivos peptídeos monoméricos, é desejável ainda intensificar a atividade. Por exemplo, mesmo os peptídeos miméticos de EPO diméricos ainda são muito menos potentes do que a molécula de EPO com relação à ativação dos mecanismos celulares.

Também se sabe no estado da técnica acoplar uma ou mais unidades veículo hidrofílicas (tais como, por exemplo, PEG) a um peptídeo. Descobriu-se que, quando peptídeos são derivatizados com um polímero hidrofílico, sua solubilidade e meia-vida em circulação são aumentadas e sua imunogenicidade é diminuída (veja, por exemplo, WO 98/25965). Contudo, também foi reportado que a fixação de tal veículo hidrofílico pode diminuir a atividade biológica. Um aumento de atividade biológica não foi reportado.

Várias abordagens foram feitas de forma a aumentar a atividade dos peptídeos, por exemplo, através de variação da seqüência de aminoácido de forma a identificar candidatos mais potentes. Contudo, até agora nenhuma solução apropriada para intensificação da atividade de peptídeos, especialmente de peptídeos miméticos de EPO ou TPO, é conhecida no estado da técnica.

Assim, é um objetivo da presente invenção proporcionar compostos peptídicos que se ligam a um alvo receptor e tendo uma atividade aumentada.

O objetivo é resolvido por um composto que se liga à moléculas-alvo e compreende:

i) pelo menos duas unidades peptídicas, em que cada unidade peptídica compreende pelo menos dois domínios com uma capacidade de ligação ao alvo (e, conseqüentemente, pelo menos duas unidades de ligação monoméricas);

ii) pelo menos uma unidade veículo polimérica; em que cada uma das referidas unidades peptídicas está ligada à referida unidade veículo polimérica.

Surpreendentemente, descobriu-se que a combinação de dois ou mais peptídeos bi- ou multivalentes sobre um suporte polimérico aumenta

grandemente a eficácia dos peptídeos bivalentes (ou mesmo multivalentes) de se ligar ao respectivo alvo, o qual usualmente é uma molécula receptora não apenas aditivamente, mas mesmo super-aditivamente. Assim, um efeito sinérgico sobre a eficácia de ligação é observado.

5 O termo "bivalente", conforme usado para fins da presente invenção, é definido como um peptídeo compreendendo dois domínios com uma capacidade de ligação a um alvo, o qual é usualmente um receptor (esse termo, assim, será usado aqui depois). O termo "bivalente" é usado permutavelmente com o termo "dimérico". Conseqüentemente, um peptídeo
10 "multivalente" ou "multimérico" tem vários domínios de ligação respectivos e, assim, unidades de ligação monoméricas. É auto-evidente que os termos "peptídeo" e "unidade peptídica" não incorporam quaisquer restrições com relação ao tamanho e incorporam oligo- e polipeptídeos, bem como proteínas. Contudo, é preferido que as unidades peptídicas acopladas à unidade
15 veículo tenham um comprimento de cerca de 200 aminoácidos ou menos ou de cerca de 150 aminoácidos ou menos, mais preferivelmente cerca de 100 aminoácidos ou mesmo 50 aminoácidos e menos.

Compostos compreendendo duas ou mais unidades peptídicas bi- ou multivalentes presas a uma unidade veículo polimérica são denomina-
20 dos "supraválentes" no contexto da presente invenção. Essas moléculas supraválentes diferem grandemente das moléculas diméricas ou multiméricas conhecidas no estado da técnica. O estado da técnica combina várias unidades peptídicas meramente monoméricas de forma a criar um dímero ou multímero. Em contraste, as moléculas supraválentes são geradas através
25 de conexão de unidades peptídicas já bivalentes (pelo menos) a uma unidade veículo polimérica, desse modo, criando uma molécula supraválente trazendo várias unidades peptídicas di- ou multiméricas (exemplos ilustrados desse conceito são fornecidos nas figuras 13 a 15). Desse modo, a atividade e eficácia globais dos peptídeos di- ou multiméricos são grandemente intensificadas, assim, diminuindo a dose ED50.
30

Até o momento, as razões para a maior potência das moléculas supraválentes comparado com as moléculas bi- ou multiméricas conhecidas

no estado da técnica não são totalmente compreendidas. Poderia ser em virtude do fato de que as moléculas diméricas conhecidas no estado da técnica (por exemplo, peptídeos miméticos de EPO diméricos) proporcionam meramente um alvo, respectivamente, uma unidade de ligação a receptor
5 ativa por molécula de composto. Assim, apenas um complexo de receptor (dimérico) é gerado quando de ligação do composto dimérico, desse modo, induzindo apenas a um processo de transdução de sinal na célula. Por exemplo, dois peptídeos miméticos de EPO monoméricos são conectados via PEG para formar um dímero peptídico, desse modo, facilitando a dimeriza-
10 ção dos monômeros de receptor necessários para transdução de sinal (Johnson e outros, 1997).

Em contraste, os compostos supraválentes de acordo com a invenção compreendem várias unidades de ligação a receptor já di- ou multi-
méricas. Compostos supraválentes de acordo com a presente invenção, as-
15 sim, trazem várias unidades de ligação a receptor (bi- ou multivalentes). Cada unidade peptídica di- ou multimérica acoplada ao veículo representa uma unidade de ligação a receptor. Isso poderia permitir a geração de vários complexos de receptor sobre a superfície celular por molécula de composto, desse modo, induzindo (ou bloqueando, no caso de um antagonista) várias
20 transduções de sinal e, desse modo, potencializando a atividade das unidades peptídicas super-aditivamente. Ligação dos compostos supraválentes poderia resultar em um agrupamento de complexos de receptor sobre a superfície celular.

As unidades peptídicas de acordo com a invenção são homo- ou
25 heterogênicas, significando que unidades peptídicas idênticas ou diferentes são acopladas ao veículo polimérico. O mesmo se aplica aos domínios de ligação das unidades peptídicas as quais podem ser homo- ou heterogênicas. Domínios de ligação homogênicos (monômeros) são preferidos no caso de um receptor-alvo estar ligado, o qual é composto de subunidades de pro-
30 teína idênticas (tal como, por exemplo, o receptor de EPO homodimérico). Contudo, a seqüência de aminoácido dos domínios de ligação homogênicos pode ainda variar mesmo embora eles se liguem ao mesmo alvo receptor (e,

assim, são funcionalmente homogênicos). Domínios de ligação heterogênicos (monômeros) são preferidos no caso de um receptor-alvo estar ligado, o qual é composto de diferentes subunidades de proteína (tais como, por exemplo, receptores de interleucina heterodiméricos). De preferência, as unidades peptídicas bi- ou multivalentes ligadas à unidade veículo se ligam ao mesmo alvo receptor. Contudo, elas podem, naturalmente, ainda diferir quanto à sua seqüência de aminoácido. As unidades de ligação monoméricas das unidades peptídicas bi- ou multivalentes podem ser lineares ou cíclicas. Uma molécula cíclica pode ser, por exemplo, criada através da formação de pontes de cisteína intramoleculares.

A unidade veículo polimérica compreende pelo menos um polímero-ramificado, linear ou dendrítico natural ou sintético. A unidade veículo polimérica é, de preferência, solúvel em água e fluidos corporais e, de preferência, é um polímero farmacologicamente aceitável. Porções poliméricas solúveis em água incluem, mas não estão limitadas a, por exemplo, polialquileno glicol derivados do mesmo, incluindo PEG, homopolímeros de PEG, mPEG, homopolímeros de homopolímeros de polipropilenoglicol, copolímeros de etileno glicol com propileno glicol, em que os referidos homopolímeros e copolímeros são não-substituídos ou substituídos em uma extremidade, por exemplo, por um grupo acila; poliglicerinas ou ácido polisiálico; carboidratos, polissacarídeos, celulose e derivados de celulose, incluindo metilcelulose e carboximetil celulose; amidos (por exemplo, hidroxialquil amido (HAS), especialmente hidroxietil amido (HES) e dextrinas, derivados dos mesmos; dextrano e derivados de dextrano, incluindo sulfato de dextrano, dextrina reticulada e carboximetil dextrina; quitosana (um polissacarídeo linear), heparina e fragmentos de heparina; álcool polivinílico e polivinil etil éteres; polivinilpirrolidona; alfa,beta-poli[(2-hidroxietil)-DL-aspartamida; e polióis polioxiethylados. Um exemplo de uma unidade veículo é um polímero homobifuncional, por exemplo, de polietileno glicol (bis-maleimida, bis-carbóxi, bis-amino, etc.).

A unidade veículo polimérica a qual está acoplada às unidades peptídicas de acordo com a presente invenção podem ter uma ampla faixa

de peso molecular em virtude da diferente natureza dos diferentes polímeros que são adequados em conjunto com a presente invenção. Assim, não existem restrições quanto ao tamanho. Contudo, é preferido que o peso molecular seja de pelo menos 3 kD, de preferência pelo menos 10 kD e aproximadamente em torno de 20 a 500 kD e, mais preferivelmente, em torno de 30 a 150 ou em torno de 60 ou 80 kD. O tamanho da unidade veículo depende do polímero escolhido e, assim, pode variar. Por exemplo, especialmente quando amidos, tal como hidroxietil amido, são usados, o peso molecular poderia ser consideravelmente maior. O peso molecular médio poderia, então, estar distribuído em torno de 100 a 4.000 kD ou mesmo ser maior. Contudo, é preferido que o peso molecular da molécula de HES seja cerca de 100 a 300 kD, de preferência em torno de 200 kD. O tamanho da unidade veículo é, de preferência, escolhida de modo que cada unidade peptídica, respectivamente, possa estar otimamente distribuído para ligação de suas respectivas moléculas receptoras.

De forma a facilitar isso, uma modalidade da presente invenção usa uma unidade veículo compreendendo uma unidade de ramificação. De acordo com essa modalidade, os polímeros, como por exemplo, PEG, são presos a uma unidade de ramificação, assim, resultando em uma grande molécula veículo permitindo a incorporação de numerosas unidades peptídicas. Exemplos de unidades de ramificação apropriadas são glicerol ou poli-glicerol. Também, unidades de ramificação dendríticas podem ser usadas, por exemplo, conforme ensinado por Haag 2000, aqui incorporado por referência. Também, o veículo de HES pode ser usado em uma forma ramificada. Isso, por exemplo, se ele é obtido em uma alta proporção a partir de amilopectina.

De preferência, após as unidades peptídicas serem criadas através de combinação de unidades de ligação monoméricas (quer cabeça a cabeça, cabeça a cauda ou cauda a cauda) às unidades peptídicas da unidade veículo polimérica é conectada/acoplada às unidades peptídicas. A unidade veículo polimérica é conectada às unidades peptídicas via uma ligação covalente ou não-covalente (por exemplo, uma coordenativa). Contudo,

o uso de uma ligação covalente é preferido.

A fixação pode ocorrer, por exemplo, via um aminoácido reativo das unidades peptídicas, por exemplo, lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina, tirosina ou um grupo amino N-terminal e o ácido carboxílico C-terminal. No caso do peptídeo não trazer um respectivo aminoácido reativo, tal aminoácido pode ser introduzido na seqüência de aminoácido. O acoplamento deverá ser escolhido de modo que a ligação ao alvo não seja ou seja pelo menos tão pouco quanto possível impedida. Dependendo da conformação da unidade peptídica, o aminoácido reativo está no início, no final ou dentro da seqüência peptídica.

No caso da unidade veículo polimérica não possuir um grupo de acoplamento apropriado, várias substâncias de acoplamento/ligantes podem ser usados de forma a modificar apropriadamente o polímero de forma que ele possa reagir com pelo menos um grupo reativo sobre a unidade peptídica para formar o composto supravaleante. Grupos químicos adequados que podem ser usados para modificar o polímero são, por exemplo, como segue:

Grupos de acilação os quais reagem com os grupos amino da proteína, por exemplo, grupos anidrido ácido, grupos de N-acilimidazol, grupos azida, grupos N-carbóxi anidrido, grupos diceteno, grupos pirocarbonato de dialquila, grupos imidoéster e grupos carboxila carbodiimida-ativados. Todos os grupos acima são conhecidos por reagir com grupos amino sobre proteínas/peptídeos para formar ligações covalentes, envolvendo ligações de acila ou similares;

grupos de alquilação os quais reagem com grupos sulfidríla (mercapto), tiometila, imidazo ou amido sobre a unidade peptídica, tais como grupos halo-carboxila, grupos maleimida, grupos vinila ativados, grupos etilenoimina, grupos haleto de arila, grupos brometo de 2-hidróxi-5-benzila; e grupos aldeído alifático e cetona junto com agentes de redução, que reagem como o grupo amino do peptídeo;

grupos de formação de éster e amida os quais reagem com um grupo carboxila do peptídeo, tais como grupos diazocarboxilato e grupos carbodiimida e amina juntos;

5 grupos de formação de dissulfeto os quais reagem com os grupos sulfidril sobre a proteína, tais como grupos 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato), dissulfetos de orto-piridila e grupos alquilmercaptano (os quais reagem com os grupos sulfidril do peptídeo na presença de agentes de oxidação, tal como iodo);

grupos dicarbonila, tais como grupos ciclohexandiona e outros grupos 1,2-dicetona os quais reagem com as porções guanidina da proteína;

grupos diazo, os quais reagem com grupos fenólicos sobre o peptídeo;

10 grupos reativos a partir da reação de brometo de cianogênicos com o polissacarídeo, os quais reagem com grupos amino sobre a proteína.

Assim, em resumo, o composto de acordo com a invenção, pode ser feito - opcionalmente - primeiro através de modificação do veículo polimérico quimicamente para produzir um veículo polimérico tendo pelo menos um grupo químico sobre o mesmo o qual é capaz de reagir com um grupo químico disponível ou introduzido sobre a unidade peptídica e, então, reação junto do polímero - opcionalmente - modificado e da unidade peptídica para formar um complexo covalentemente ligado do mesmo utilizando o grupo químico do polímero modificado - se necessário.

20 No caso de acoplamento ocorrer via um grupo SH livre do peptídeo, o uso de um grupo maleimida no polímero é preferido.

De forma a gerar uma molécula definida, é preferido usar uma abordagem objetivada para fixação das unidades peptídicas à unidade veículo polimérica. No caso de nenhum aminoácido apropriado estar presente no sítio de fixação desejado, aminoácidos apropriados deverão ser incorporados na unidade peptídica. Para fixação de polímero sítio-específica, um único grupo reativo, por exemplo, um aminoácido específico no final da unidade peptídica é preferido, de forma a evitar reações de acoplamento descontroladas através do peptídeo, levando a uma mistura heterogênea compreendendo uma população de várias moléculas poliméricas diferentes.

30 O acoplamento das unidades peptídicas à unidade veículo polimérica, por exemplo, PEG ou HES, é realizada usando reações principal-

mente conhecidas por aqueles versados na técnica. Por exemplo, há uma série de métodos de fixação de PEG e HES disponíveis por aqueles versados na técnica (veja, por exemplo, WO 2004/100997 que proporciona outras referencias, Roberts e outros, 2002; US 4.064.118; EP 1 398 322; EP 1 398 327; EP 1 398 328; WO 2004/024761; todos incorporados aqui por referência).

É importante compreender que o conceito de supervalência descrito aqui é diferente do conceito conhecido de PEGuilação ou HESilação. No estado de técnica, por exemplo, PEGuilação é usado apenas de forma a produzir dímeros peptídicos ou de forma a melhorar parâmetros farmacocinéticos através de fixação de uma ou mais unidades de PEG a um peptídeo. Contudo, conforme esboçado acima, a fixação de duas ou mais unidades peptídicas pelo menos bivalentes, por exemplo, a HES como uma unidade veículo polimérica, também intensifica grandemente a eficácia (assim, diminuindo a dose EC50). O conceito da presente invenção, assim, tem fortes efeitos sobre os parâmetros farmacodinâmicos e não apenas sobre os parâmetros farmacocinéticos, conforme é o caso com os conceitos de PEGuilação ou HESilação conhecidos no estado da técnica. Contudo, naturalmente, a incorporação, por exemplo, de PEG ou HES como unidade veículo polimérica também tem as vantagens conhecidas com relação à farmacocinética.

PEGuilação é usualmente compreendida como melhorando as propriedades biofarmacêuticas dos peptídeos. As alterações mais relevantes da molécula de proteína após conjugação a PEG são ampliação do tamanho, superfície de proteína e disfarce da função de glicosilação, modificação de carga e proteção de epítipo. Em particular, ampliação de tamanho diminui a ultrafiltração renal e promove o acúmulo em tecidos permeáveis através de intensificação do mecanismo de permeação e retenção passivo. Proteção de proteína reduz a proteólise e reconhecimento pelo sistema imune, os quais são vias importantes de eliminação. O efeito específico de PEGuilação sobre as propriedades físico-químicas e biológicas da proteína são rigorosamente determinados pelas propriedades da proteína e polímero,

bem como a estratégia de PEGuilação adotada.

Contudo, o uso de PEG ou outros polímeros não biodegradáveis poderia levar a novos problemas.

5 Durante aplicações *in vivo*, intervalos de dosagem em um ambiente clínico são disparados pela perda de efeito do fármaco. Dosagens de rotina e intervalos de dosagem são adaptados de modo que o efeito não é perdido durante os intervalos de dosagem. Em virtude do fato de que os peptídeos presos a uma grande unidade polimérica não biodegradável (por exemplo, uma porção PEG) podem ser degradados mais rápido do que a

10 molécula de suporte pode ser eliminada do corpo, um risco de acúmulo da unidade veículo pode surgir. Tal risco de acúmulo sempre ocorre, uma vez que o tempo-de-meia-vida para efeito é menor do que o tempo-de-meia-vida para eliminação do fármaco em si ou seus componentes/metabólitos. Assim, acúmulo da molécula veículo deverá ser evitado, especialmente em trata-

15 mentos a longo prazo, porque os peptídeos são usualmente PEGuilados com porções PEG muito grandes (~20-40kD) as quais, assim, mostram uma lenta eliminação renal. A porção peptídica em si sofre degradação enzimática e mesmo clivagem parcial poderia ser suficiente para desativar o peptídeo.

20 De forma a encontrar uma solução para esse problema potencial, uma modalidade da presente invenção ensina o uso de uma unidade veículo polimérica que é composta de pelo menos duas subunidades. As subunidades poliméricas são conectadas via estruturas ligantes covalentes biodegradáveis. De acordo com essa modalidade, o peso molecular da grande

25 molécula veículo (por exemplo, 40 kD) é criado por várias subunidades pequenas ou de tamanho intermediário (por exemplo, cada subunidade tendo um peso molecular de 5 a 10 kD), que são conectadas via ligantes biodegradáveis. Os pesos moleculares das subunidades modulares adicionados dessa forma geram o peso molecular desejado da molécula veículo. Contudo,

30 as estruturas ligantes biodegradáveis podem ser rompidas no corpo, desse modo, liberando as subunidades veículo menores (por exemplo, 5 a 10 kD). As pequenas subunidades veículo mostram uma eliminação renal melhor do

que uma molécula polimérica tendo um peso molecular global (por exemplo, 40 kD). Um exemplo ilustrativo é fornecido na figura 6.

As estruturas ligantes são selecionadas de acordo com propriedades de degradação conhecidas e escalas de tempo de degradação em fluidos corporais. As estruturas passíveis de ruptura podem, por exemplo, conter grupos cliváveis tais como derivados de ácido carboxílico, como ligações de amida/peptídeo ou ésteres os quais podem ser clivados através de hidrólise (veja, por exemplo, Roberts, 2002, aqui incorporado por referência). PEG succinimidil ésteres também podem ser sintetizados com várias ligações de éster na parte principal de PEG para controlar a taxa de degradação em pH fisiológico (Zhao, 1997, aqui incorporado por referência). Outras estruturas passíveis de ruptura, tais como dissulfetos de benzil-uretanos, podem ser clivadas sob ambientes de redução suave, tais como em compartimentos endossômicos de uma célula (Zalipsky, 1999) e são, assim, também adequadas. Outros critérios para seleção de ligantes apropriados são a seleção de degradação rápida (freqüentemente enzimática) ou degradação lenta (freqüentemente decomposição não enzimática). Combinação desses dois mecanismos em fluidos corporais também é possível. Está claro que esse conceito altamente vantajoso não está limitado às unidades peptídicas específicas descritas ou mencionadas aqui, mas também se aplica à outras moléculas farmacêuticas que são presas à unidades poliméricas maiores, tais como moléculas de PEG, em que os mesmos problemas de acúmulo surgem.

De acordo com uma modalidade, hidroxialquil amido e, de preferência HES, é usado como unidade veículo polimérica. HES tem diversas vantagens importantes. Primeiro de tudo, o HES é biodegradável. Além disso, a biodegradabilidade do HES pode ser controlada via a proporção de grupos hidroxietila e, assim, pode ser influenciada. Um grau molar de substituição de 0,4-0,8 (em média 40-80% das unidades de glicose contêm um grupo hidroxietila) é bem adequado para fins da presente invenção. Em virtude da biodegradabilidade, problemas de acúmulo descritos acima em conjunto com PEG usualmente não ocorrem. Além disso, o HES tem sido usado

durante muito tempo em tratamento médico, por exemplo, na forma de um expansor plasmático. Seu caráter inócuo é, assim, aprovado.

Além disso, derivados de produtos da hidrólise de HES são detectáveis através de cromatografia gasosa. Conjugados de HES-peptídeo
5 podem ser hidrolisados sob condições sob as quais as unidades peptídicas ainda são estáveis. Isso permite a quantificação e monitoramento dos produtos da degradação e permite avaliações e padronizações dos peptídeos ativos.

De acordo com uma outra modalidade, um primeiro tipo de unidade veículo polimérica é usado e carregado com unidades peptídicas. Esse
10 primeiro veículo é, de preferência, facilmente biodegradável assim como, por exemplo, HES. Contudo, nem todos os pontos de fixação do primeiro veículo são ocupados com unidades peptídicas, mas apenas, por exemplo, em torno de 20 a 50%. Dependendo do tamanho do polímero usado, várias centenas
15 de unidades peptídicas podem ser acoplados à molécula veículo. Contudo, dependendo do peptídeo usado, usualmente menos unidades peptídicas (2 a 50, 2 a 20, 2 a 10 ou 3 a 5) são acopladas. O resto (ou pelo menos alguns) dos pontos de fixação restantes são ocupados com um veículo diferente, por exemplo, pequenas unidades de PEG tendo um peso molecular menor do
20 que o primeiro veículo. Essa modalidade tem a vantagem de que uma composição supravalente é criada em virtude do primeiro veículo o qual é, contudo, muito durável em virtude da presença do segundo veículo, o qual é constituído, de preferência, de unidades de PEG de 3 a 5 ou 10 kD. Contudo, a entidade toda é muito bem degradável, uma vez que o primeiro veículo
25 (por exemplo, HES) e as unidades peptídicas são biodegradáveis e o segundo veículo, por exemplo, PEG, é pequeno o bastante para ser facilmente eliminado do corpo.

Os monômeros que constituem os domínios de ligação das unidades peptídicas reconhecem um sítio de ligação de um alvo. O termo domínio de ligação se refere à parte de ligação do peptídeo monomérico que
30 está envolvido na ligação ao alvo. Dependendo do peptídeo, o domínio de ligação pode ser composto de diferentes motivos estruturais do peptídeo

(por exemplo, beta-folhas, alfa-hélices, beta giros) que definem o domínio de ligação na conformação tridimensional do peptídeo.

De acordo com uma modalidade, a unidade peptídica se liga a um receptor transmembrana. Ativação de receptores transmembrana por fatores de crescimento e citocinas geralmente ocorre quando um ligante se liga a um domínio específico sobre o receptor, desse modo, induzindo a uma alteração conformacional e/ou disparando a dimerização ou oligomerização de cadeias de receptor. Quando de ligação ao ligante, vários membros de receptores de citocina da classe I formam homodímeros, incluindo o receptor de eritropoietina (EPOR), o receptor de trombopoietina (TPOR), receptor de fator de estimulação de colônia de granulócito (G-CSFR), receptor de hormônio de crescimento (GHR) e receptor de prolactina (PrR). Esses receptores de citocina da classe I mostram similaridades estruturais e funcionais uns com os outros. De acordo com uma modalidade, as unidades peptídicas são escolhidas de modo que elas se ligam a esses receptores de citocina da classe I.

Conforme esboçado, um receptor homodimérico é qualquer proteína-alvo biológica sendo composta de duas subunidades de proteína idênticas não covalentemente associadas. Tais receptores usualmente são apenas funcionais se ambas as subunidades estão associadas na forma homodimérica. A última propriedade de ser um receptor homodimérico diferencia o receptor de EPO e, por exemplo, o receptor de TPO relacionado de muitos outros receptores de citocina. Na maioria dos casos de receptores de citocina, o receptor é um heterodímero (muitos receptores de interleucina) ou mesmo um heterotrímero (por exemplo, IL-2).

As unidades peptídicas de acordo com a invenção, compreendendo pelo menos dois domínios de ligação monoméricos se ligam a seu alvo e, de preferência, são capazes de dimerizar respectivamente o alvo e/ou estabilizá-lo, conseqüentemente, desse modo, criando uma transdução de sinal que induz ao complexo. As unidades peptídicas têm, de preferência, uma molécula-alvo heterodimérica a qual é, de preferência, um receptor de citocina (veja acima).

Conforme esboçado acima, as unidades peptídicas para criação das moléculas supraválentes se ligam ao receptor-alvo. De acordo com uma modalidade, as unidades peptídicas atuam como agonistas de receptor. O termo agonista se refere a um peptídeo biologicamente ativo o qual se liga a seu receptor biologicamente ativo complementar (alvo) e ativa o último para causar uma resposta biológica no receptor ou intensificar a atividade biológica pré-existente do receptor (alvo). De acordo com uma modalidade diferente, a unidade peptídica atua como um antagonista de receptor. Um antagonista também se liga a seu receptor biologicamente ativo complementar (alvo). Contudo, um antagonista não induz ou intensifica a atividade biológica do receptor (alvo).

Vários métodos são conhecidos no estado da técnica para dimerização ou multimerização de unidades peptídicas monoméricas. Esses métodos podem ser usados para criação das unidades peptídicas de acordo com a invenção. As soluções que prevalecem seguindo a abordagem de dimerização são caracterizadas por:

a) o fato de que os domínios de ligação são primeiro sintetizados separadamente como peptídeos monovalentes ou monoméricos, os quais podem ser modificados, por exemplo, através de fixação de grupos reativos no preparo para a etapa b,

b) em uma segunda etapa de reação, dois - na maioria dos casos idênticos - domínios de ligação são unidos juntos em uma reação de dimerização distinta, a qual também pode incluir moléculas ligantes usualmente sendo interpostas entre os dois domínios dimerizados.

Tais dímeros são exemplos de peptídeos bivalentes (diméricos) e exibem essencialmente as mesmas funções biológicas que os monômeros, mas mostram atividade biológica intensificada em virtude de uma melhor interação com o receptor.

Várias técnicas são conhecidas por aqueles versados na técnica para dimerizar ou oligomerizar os monômeros os quais podem também ser aplicados de acordo com os ensinamentos da presente invenção. Monômeros podem ser dimerizados, por exemplo, através de fixação covalente a um

ligante. Um ligante é uma molécula de união que cria uma ligação covalente entre as unidades polipeptídicas da presente invenção. As unidades polipeptídicas podem ser combinadas via um ligante de uma forma tal que a ligação do receptor de EPO é aperfeiçoada (Johnson e outros. 1997; Wrighton e outros. 1997). Além disso, é mencionada a multimerização de peptídeos biotinilados monoméricos através de interação não covalente com uma molécula veículo de proteína descrita por Wrighton e outros (Wrighton, 1997). Também é possível usar um sistema de biotina/estreptavidina, isto é, biotinilação do C-término dos peptídeos e uma subsequente incubação dos peptídeos biotinilados com estreptavidina. Alternativamente, é sabido obter dimerização através de formação de uma estrutura de dicetopiperazina. Esse método conhecido por aqueles versados na técnica é descrito em detalhes, por exemplo, em Cavellier e outros (em: Peptides: The wave of the Future; Michal Lebl and Richard A. Houghten (eds); American Peptide Society, 2001). A descrição desses documentos com relação à dimerização e uma multimerização não covalente é incorporada aqui por referência. Outra forma alternativa de obter dímeros peptídicos conhecida da técnica anterior é usar derivados de ácido dicarboxílico ativados bifuncionais como precursores reativos das últimas porções ligantes, os quais reagem com grupos amino N-terminais, desse modo, formando o peptídeo dimérico final (Johnson e outros, 1997). Monômeros também podem ser dimerizados através de fixação covalente a um ligante. De preferência, o ligante compreende NH-R-NH, em que R é um alquileno inferior substituído por um grupo funcional, tal como um grupo carboxila ou grupo amino que permite ligação à outra porção molecular. O ligante poderia conter um resíduo de lisina ou amida de lisina. Também, PEG pode ser usada como um ligante. O ligante pode ser uma molécula contendo dois ácidos carboxílicos e opcionalmente substituído em um ou mais átomos por um grupo funcional, tal como uma amida, capaz de ser ligado a uma ou mais moléculas de PEG. Uma descrição detalhada de possíveis etapas para oligomerização e dimerização de peptídeos com uma porção de ligação é também fornecida no WO 2004/101606.

Embora sejam suficientemente funcionais e, assim, utilizáveis de

acordo com os ensinamentos da presente invenção, as abordagens da técnica anterior de síntese de moléculas diméricas poderiam ter algumas desvantagens para alguns peptídeos.

5 Uma deficiência potencial poderia ser percebida pelo fato de que os monômeros a serem conectados têm primeiro de ser sintetizados separadamente. Em virtude do emparelhamento estocástico de peptídeos monoméricos durante a reação de dimerização é, em particular, difícil obter (seletiva e intencionalmente) peptídeos bivalentes heterodiméricos com essa abordagem. Pelo menos, isso levaria a maiores perdas no rendimento de um heterodímero especial desejado. Peptídeos bivalentes abrigando dois ou mais domínios de ligação monoméricos ligeiramente diferentes são muito desejáveis, uma vez que, em virtude de sua natureza heterodimérica, interações especiais entre os dois domínios, os quais são capazes de estabilizar sua interação no peptídeo bivalente final, podem ser introduzidas enquanto se mantém ou mesmo aumenta a ligação ao receptor homodimérico. Contudo, em virtude das altas perdas no rendimento associadas às "reações de dimerização estocástica" da técnica anterior, usualmente essa não é uma abordagem economicamente atraente.

20 Aplicação das abordagens da técnica anterior para dimerização - mesmo embora tecnicamente adequadas - assim, tem algumas desvantagens econômicas para proporcionar esses peptídeos com domínios de ligação heterogêneos, conforme descrito. Assim, de preferência, uma estratégia mais eficiente é usar para obter unidades peptídicas bivalentes altamente ativas, as quais poderiam mesmo conter domínios de ligação heterogêneos.

25 O conceito central desse método de dimerização é abster-se de sintetizar os peptídeos monoméricos que formam parte do peptídeo bivalente em reações distintas antes de dimerização ou multimerização, mas sintetizar a unidade peptídica final tendo pelo menos dois domínios de ligação em uma etapa como um único peptídeo; por exemplo, em uma única reação em fase sólida. Assim, uma etapa de dimerização ou multimerização distinta, conforme ensinado pelo estado da técnica, não é mais necessária. Esse aspecto proporciona uma grande vantagem, isto é, o controle completo e inde-

30

pendente de cada posição de seqüência na unidade peptídica final. O método permite abrigo facilmente pelo menos dois domínios de ligação receptor-específicos diferentes em uma unidade peptídica em virtude de controle independente sobre cada posição de seqüência.

5 De acordo com essa modalidade, a seqüência do peptídeo final entre os domínios de ligação (o qual é a "região ligante") é composta de aminoácidos apenas, assim, levando a uma única unidade peptídica contínua. Em uma modalidade preferida da invenção, o ligante é composto de aminoácidos naturais ou não-naturais os quais permitem uma alta flexibilidade con-

10 formacional. A esse respeito, pode ser vantajoso usar resíduos de glicina como aminoácidos de ligação, os quais são conhecidos por sua alta flexibilidade em termos de torções. Contudo, também outros aminoácidos, tais como alanina ou beta-alanina, ou uma mistura dos mesmos, podem ser usados. O número e escolha dos aminoácidos usados dependem dos respecti-

15 vos fatores estéricos. Essa modalidade permite o design padronizado de um ligante apropriado através de modelamento molecular de forma a evitar distorções da conformação bioativa e, assim, permite combinação perfeita com as unidades do receptor. Um ligante composto de 3 a 5 aminoácidos é especialmente preferido.

20 É notável que o ligante entre os domínios de ligação funcionais (também referidos como unidades monoméricas) das unidades peptídicas possa ser uma parte distinta do peptídeo ou possa ser composto - totalmente ou em parte - de aminoácidos os quais são parte dos domínios de ligação monoméricos. Assim, o termo "ligante" é antes funcional do que estrutural-

25 mente definido, uma vez que um aminoácido poderia formar parte da unidade ligante, bem como das subunidades de ligação monoméricas.

Uma vez que - conforme mencionado acima - durante a síntese do peptídeo bivalente cada posição de seqüência dentro do peptídeo final está sob o controle e, assim, pode ser precisamente determinada, é possível

30 padronizar ou fazer configurações nas unidades peptídicas ou regiões específicas ou domínios das mesmas, incluindo o ligante. Isso é de vantagem específica, uma vez que permite a criação de sítios de fixação específicos

para o polímero e evita a distorção da conformação bioativa de unidades peptídicas em virtude de interações intramoleculares desfavoráveis. O risco de distorções pode ser avaliado antes de síntese através de modelamento molecular. Isso se aplica especialmente ao design do ligante entre os domínios monoméricos.

Os peptídeos bivalentes/multivalentes contínuos de acordo com a invenção mostram atividade muito maior do que os peptídeos monoméricos correspondentes e, assim, confirmam a observação conhecida de outros peptídeos diméricos de que um aumento de eficácia está associado aos conceitos de peptídeo bivalente.

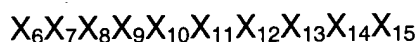
De acordo com uma modalidade preferida, todas as unidades peptídicas (em que cada unidade peptídica é considerada como uma unidade de ligação a receptor) se ligam ao mesmo receptor-alvo. Contudo, elas podem ser heterogêneas, assim, diferindo quanto à sua seqüência de aminoácido.

De acordo com uma modalidade preferida, as referidas unidades peptídicas se ligam ao receptor de EPO, desse modo, dimerizando o complexo do receptor de EPO. De preferência, elas induzem à transdução de sinal e são, assim, agonistas do receptor de EPO. As unidades peptídicas, respectivamente, os domínios de ligação monoméricos que criam as unidades peptídicas, podem ser selecionados do grupo de peptídeos miméticos de EPO. Peptídeos miméticos de EPO apropriados são bem-conhecidos no estado da técnica e podem ser usados com relação à presente invenção (por favor refira-se, por exemplo, ao WO 96/40772; WO 96/40749; WO 01/38342; WO 01/091780; WO 2004/101611; WO 2004/100997; WO 2004/101600; WO 2004/101606).

Outras unidades peptídicas miméticas de EPO adequadas que podem ser usadas de acordo com a presente invenção compreendem domínios de ligação de pelo menos 10 aminoácidos de comprimento que se ligam ao receptor de EPO. Elas, de preferência, não compreendem prolina na posição comumente referida como posição 10 do peptídeo mimético de EPO (para a numeração, por favor refira-se a Wrighton e outros, 1996 e Johnson,

1998), mas um aminoácido positivamente carregado. Esses peptídeos miméticos de EPO trazem um motivo de aminoácido característico para uma estrutura de beta-giro (Wrighton e outros), em que o domínio de ligação da unidade peptídica de acordo com essa modalidade não compreende uma prolina no referido motivo de beta-giro na posição 10, mas um aminoácido positivamente carregado, de preferência K ou R. Também, outros aminoácidos básicos, especialmente aminoácidos não-naturais, tal como homoarginina, poderiam ser usados. As posições 9 e 10 do domínio de ligação do mimético de EPO podem ser ocupadas por ácido 5-aminolevulínico (5-AIs). O domínio do peptídeo também pode trazer R na posição 17.

De acordo com uma modalidade, pelo menos um dos domínios de ligação ao receptor de EPO das unidades peptídicas compreende a seguinte seqüência de aminoácidos:



em que cada aminoácido é selecionado de aminoácidos naturais ou não-naturais e:

X_6 é C, A, E, ácido α -amino- γ -bromobutírico ou homocisteína (hoc);

X_7 é R, H, L, W ou Y ou S;

X_8 é M, F, I, homo-serinmetiléter (hsm) ou norisoleucina;

X_9 é G ou uma troca conservativa de G;

X_{10} é uma troca não-conservativa de prolina;

ou X_9 e X_{10} são substituídos por um único aminoácido;

X_{11} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido;

X_{12} é T ou A;

X_{13} é W, 1-nal, 2-nal, A ou F;

X_{14} é D, E, I, L ou V;

X_{15} é C, A, K, ácido α -amino- γ -bromobutírico ou homocisteína

(hoc)

contanto que X_6 ou X_{15} seja C ou hoc.

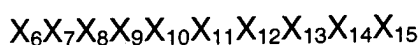
O comprimento de um domínio de ligação da referida unidade peptídica está, de preferência, entre dez a quarenta ou 50 a 60 aminoácidos.

Em modalidades preferidas, o peptídeo de consenso representa um comprimento de pelo menos 10, 15, 18 ou 20 aminoácidos. Naturalmente, eles podem ser incrustados, respectivamente, compreendidos de seqüências mais longas. As seqüências de peptídeo monomérico descritas podem ser percebidas como domínios de ligação para o receptor de EPO. Como peptídeos miméticos de EPO, eles são capazes de ligação a e ativação do receptor de EPO.

Foi muito surpreendente que esses peptídeos exibissem atividades miméticas de EPO embora uma ou - de acordo com algumas modalidades - mesmo ambas as prolina pudessem ser substituídas por outros aminoácidos naturais ou não-naturais. Na verdade, os peptídeos de acordo com a invenção têm uma atividade comparável com aquela de peptídeos contendo prolina. Contudo, é notável que os aminoácidos que substituem resíduos de prolina não representem uma troca conservativa, mas antes, uma troca não-conservativa. De preferência, um aminoácido positivamente carregado, tal como aminoácidos básicos, tais como K, R e H e especialmente K, é usado para substituição. O aminoácido não-conservativo usado para substituição também pode ser um aminoácido não-natural e é, de preferência, um com uma cadeia lateral positivamente carregada. Também compreendidos são os respectivos análogos dos aminoácidos mencionados. Um exemplo adequado de um aminoácido não-natural é homoarginina. De acordo com uma modalidade, o peptídeo traz um aminoácido positivamente carregado na posição 10, exceto quanto ao aminoácido natural arginina. De acordo com essa modalidade, a prolina 10 é, assim, substituída por um aminoácido selecionado de K, H ou um aminoácido positivamente carregado não-natural, tal como, por exemplo, homoarginina. É preferido que os peptídeos representem uma lisina ou homoarginina na posição 10. Conforme descrito acima, também a prolina na posição 17 poderia ser substituída por um aminoácido não-conservativo. A esse respeito, também é preferido que o referido aminoácido não-conservativo seja um com uma cadeia lateral positivamente carregada, tal como K, R, H ou um respectivo aminoácido não-natural, tal como, por exemplo, homoarginina. De acordo com uma sub-modalidade

dessa modalidade, o peptídeo traz um aminoácido positivamente carregado na posição 17, exceto quanto ao aminoácido natural arginina. De acordo com essa modalidade, a prolina 17 é, assim, substituída por um aminoácido selecionado de K, H ou um aminoácido positivamente carregado não-natural, tal como homoarginina. É preferido que os peptídeos representem uma lisina ou homoarginina na posição 17.

O domínio de ligação ao EPO-R pode, além disso, compreender uma seqüência dos seguintes aminoácidos:



em que cada aminoácido é indicado através de abreviação pela letra padrão e:

X_6 é C;

X_7 é R, H, L ou W;

X_8 é M, F ou I;

X_9 é G ou uma troca conservativa de G;

X_{10} é uma troca não-conservativa de prolina;

X_{11} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido;

X_{12} é T;

X_{13} é W;

X_{14} é D, E, I, L ou V;

X_{15} é C.

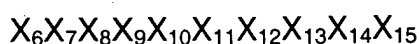
Além disso, X_7 pode ser serina, X_8 pode ser hsm ou norisoleucina e X_{13} também pode ser 1-nal, 2-nal, A ou F. O comprimento do peptídeo de consenso está, de preferência, entre dez a quarenta ou cinquenta ou sessenta aminoácidos. Em modalidades preferidas, o peptídeo de consenso compreende pelo menos 10, 15, 18 ou 20 aminoácidos.

Outros peptídeos miméticos de EPO que podem ser usados de forma a criar as unidades peptídicas de acordo com a presente invenção são definidos pelas seguintes seqüências peptídicas de consenso:

Um peptídeo capaz de ligação ao receptor de EPO selecionado do grupo consistindo em:

- peptídeos compreendendo a seguinte seqüência de consenso

de aminoácidos:



em que cada aminoácido é selecionado de um aminoácido natural ou não-natural e:

5 X_6 é um aminoácido com uma cadeia lateral funcionalmente capaz de formação de uma ligação covalente ou A ou ácido α -amino- γ -bromobutírico;

X_7 é R, H, L, W, Y ou S;

X_8 é M, F, I, homo-serinametiléter ou norisoleucina;

10 X_9 é G ou uma troca conservativa de G;

X_{10} é uma troca não-conservativa de prolina (ou, de acordo com outra modalidade, prolina ou uma troca conservativa de prolina);

ou X_9 e X_{10} são substituídos por um único aminoácido;

X_{11} é selecionado de qualquer aminoácido;

15 X_{12} é um aminoácido polar não carregado ou A;

X_{13} é W, 1-nal, 2-nal, A ou F;

X_{14} é D, E, I, L ou V;

20 X_{15} é um aminoácido com uma cadeia lateral funcionalmente capaz de formação de uma ligação covalente ou A ou ácido α -amino- γ -bromobutírico; e

- fragmentos funcionalmente equivalentes, derivados e variantes dos peptídeos definidos pela seqüência de consenso acima, que representam uma atividade mimética de EPO e têm um aminoácido na posição X_{10} que constitui uma troca não-conservativa de prolina (ou, de acordo com outra modalidade, prolina ou uma troca conservativa de prolina) ou em que X_9 e X_{10} são substituídos por um único aminoácido.

25

De acordo com a seqüência de consenso da primeira modalidade, X_6 e X_{15} representam aminoácidos com uma cadeia lateral funcionalmente capaz de formação de uma ligação covalente. Esses aminoácidos são, assim, capazes de formação de uma unidade de ligação em ponte. De acordo com uma modalidade, os aminoácidos na posição X_6 e X_{15} são escolhidos de modo que eles sejam capazes de formação de uma ligação em ponte

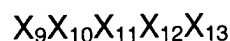
30

intramolecular dentro do peptídeo através de formação de uma ligação covalente entre os mesmos. Formação de uma ligação em ponte intramolecular pode levar à ciclização do peptídeo. Exemplos de unidades de ligação em ponte adequadas são a ligação em ponte de dissulfeto e a ligação em ponte de disselenida. Exemplos adequados de aminoácidos representando tais funcionalidades de formação de ligação em ponte em suas cadeias laterais são, por exemplo, cisteína e derivados de cisteína, tais como homocisteína ou selenocisteína, mas também tiolisina. A formação de uma ligação em ponte de disselenida, por exemplo, entre dois resíduos de selenocisteína, tem mesmo vantagens com relação a uma ligação em ponte de cisteína. Isso é porque uma ligação em ponte de selenida é mais estável em ambientes de redução. A conformação do peptídeo é, assim, preservada mesmo sob condições difíceis.

Contudo, é evidente que também aminoácidos são adequados na posição X_6 e X_{15} , representando uma cadeia lateral com uma funcionalidade que permite a formação de diferentes ligações covalentes tais como, por exemplo, uma ligação de amida entre um aminoácido tendo uma cadeia lateral positivamente carregada (por exemplo, os aminoácidos proteinogênicos K, H, R ou ornitina, DAP ou DAB) e um aminoácido tendo uma cadeia lateral negativamente carregada (por exemplo, os aminoácidos proteinogênicos D ou E). Outros exemplos são ligações em ponte de amida e tioéter.

Um peptídeo de pelo menos 10 aminoácidos de comprimento capaz de ligação ao receptor de EPO selecionado das seguintes alternativas:

(a) um peptídeo compreendendo a seguinte seqüência central de aminoácidos:



em que cada aminoácido é selecionado de aminoácidos não-naturais ou naturais e em que:

X_9 é G ou uma troca conservativa de G;

X_{10} é uma troca não-conservativa de prolina (ou, de acordo com outra modalidade, prolina ou uma troca conservativa de prolina);

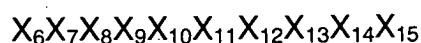
ou X_9 e X_{10} são substituídos por um único aminoácido;

X_{11} é selecionado de qualquer aminoácido;

X_{12} é um aminoácido polar não carregado ou A;

X_{13} é naftilalanina.

5 (b) um peptídeo capaz de ligação ao receptor de EPO compreendendo a seguinte seqüência de aminoácidos:



em que cada aminoácido é selecionado de aminoácidos naturais ou não-naturais e:

10 X_6 é C, A, E, ácido α -amino- γ -bromobutírico ou homocisteína (hoc);

X_7 é R, H, L, W ou Y ou R, H, L, W, Y ou S;

X_8 é M, F, I, homo-serinametiléter ou norisoleucina;

X_9 é G ou uma troca conservativa de G;

15 X_{10} é uma troca não-conservativa de prolina;

ou X_9 e X_{10} são substituídos por um único aminoácido;

X_{11} é selecionado de qualquer aminoácido;

X_{12} é T ou A;

X_{13} é 1-nal, 2-nal

20 X_{14} é D, E, I, L ou V;

X_{15} é C, A, K, ácido α -amino- γ -bromobutírico ou homocisteína

(hoc)

contanto que X_6 ou X_{15} seja C ou hoc;

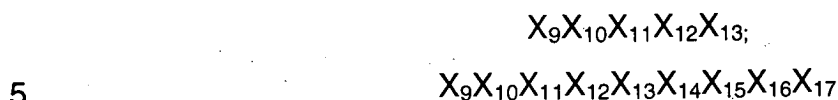
25 (c) fragmentos funcionalmente equivalentes, derivados e variantes dos peptídeos definidos pelas seqüências de consenso acima que representam uma atividade mimética de EPO e têm um aminoácido na posição X_{10} que constitui uma troca não-conservativa de prolina (ou, de acordo com outra modalidade, prolina ou uma troca conservativa de prolina) ou em que X_9 e X_{10} são substituídos por um único aminoácido e uma naftilalanina na

30 posição X_{13} .

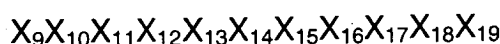
Um peptídeo de pelo menos 10 aminoácidos de comprimento, capaz de ligação ao receptor de EPO e compreendendo uma atividade ago-

nista, selecionado do grupo consistindo em:

- peptídeos compreendendo pelo menos uma das seguintes seqüências centrais de aminoácidos:



ou



em que cada aminoácido é selecionado de aminoácidos naturais ou não-naturais e em que pelo menos uma das posições X_{10} , X_{17} ou X_{19} é

um aminoácido negativamente carregado e em que:

X_9 é G ou uma troca conservativa de G;

X_{11} é selecionado de qualquer aminoácido;

X_{12} é um aminoácido polar não carregado ou A; de preferência treonina, serina, asparagina ou glutamina;

X_{13} é W, 1-nal, 2-nal, A ou F;

X_{14} é D, E, I, L ou V;

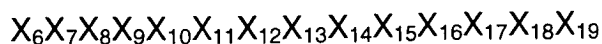
X_{15} é um aminoácido com uma cadeia lateral funcionalmente capaz de formação de uma ligação covalente ou A ou ácido α -amino- γ -bromobutírico;

X_{16} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência G, K, L, Q, R, S, Har ou T;

X_{18} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência L ou Q;

- fragmentos funcionalmente equivalentes, derivados e variantes dos peptídeos definidos pelas seqüências de consenso acima, que representam uma atividade mimética de EPO e em que pelo menos uma das posições X_{10} , X_{17} ou X_{19} é um aminoácido negativamente carregado.

O peptídeo mimético de EPO tendo um aminoácido negativamente carregado em pelo menos uma das posições X_{10} , X_{17} ou X_{19} também pode ser descrito pela seguinte seqüência de consenso ampliada:



em que cada aminoácido é selecionado de aminoácidos naturais

ou não-naturais e em que:

X_6 é um aminoácido com uma cadeia lateral funcionalmente capaz de formação de uma ligação covalente ou A ou ácido α -amino- γ -bromobutírico;

5 X_7 é R, H, L, W ou Y ou S;

X_8 é M, F, I, Y, H, homo-serinametiléter ou norisoleucina;

X_9 é G ou uma troca conservativa de G;

no caso em que X_{10} não é um aminoácido negativamente carregado, X_{10} é prolina, uma troca conservativa de prolina ou uma troca não-conservativa de prolina ou X_9 e X_{10} são substituídos por um único aminoácido;

X_{11} é selecionado de qualquer aminoácido;

X_{12} é um aminoácido polar não carregado ou A; de preferência treonina, serina, asparagina ou glutamina;

15 X_{13} é W, 1-nal, 2-nal, A ou F;

X_{14} é D, E, I, L ou V;

X_{15} é um aminoácido com uma cadeia lateral funcionalmente capaz de formação de uma ligação covalente ou A ou ácido α -amino- γ -bromobutírico;

20 X_{16} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência G, K, L, Q, R, S, Har ou T;

no caso em que X_{17} não é um aminoácido negativamente carregado, X_{17} é selecionado de qualquer aminoácido, de preferência A, G, P, Y ou um aminoácido natural, não-natural ou derivatizado positivamente carregado, de preferência K, R, H, ornitina ou homoarginina;

25 X_{18} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência L ou Q;

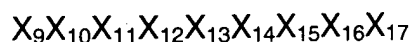
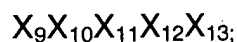
no caso em que X_{19} não é um aminoácido negativamente carregado, X_{19} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência um aminoácido positivamente carregado, tal como K, R, H, ornitina ou homoarginina;

30 contanto que pelo menos um de X_{10} , X_{17} ou X_{19} seja um aminoá-

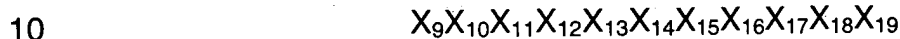
cido negativamente carregado.

Um peptídeo de pelo menos 10 aminoácidos de comprimento, capaz de ligação ao receptor de EPO e compreendendo uma atividade agonista, selecionado do seguinte grupo de peptídeos:

- 5 (a) um peptídeo compreendendo a seguinte seqüência central de aminoácidos:



ou



em que cada aminoácido é selecionado de aminoácidos naturais ou não-naturais, e em que:

X_9 é G ou uma troca conservativa de G;

X_{11} é selecionado de qualquer aminoácido;

- 15 X_{12} é um aminoácido polar não carregado ou A; de preferência treonina, serina, asparagina ou glutamina;

X_{13} é W, naftilalanina, A ou F;

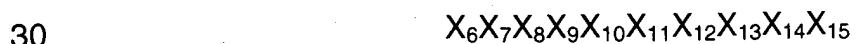
X_{14} é D, E, I, L ou V;

- 20 X_{15} é um aminoácido com uma cadeia lateral funcionalmente capaz de formação de uma ligação covalente ou A ou ácido α -amino- γ -bromobutírico,

bem como fragmentos funcionalmente equivalentes, derivados e variantes dos peptídeos definidos pela seqüência de consenso acima, que representam uma atividade mimética de EPO,

- 25 em que pelo menos uma das posições X_{10} , X_{16} , X_{17} ou X_{19} representa um aminoácido não proteínogênico positivamente carregado tendo uma cadeia lateral a qual é alongada comparado com lisina;

(b) um peptídeo, especialmente um sendo capaz de ligação ao receptor de EPO compreendendo a seguinte seqüência de aminoácidos:



em que cada aminoácido é selecionado de aminoácidos naturais ou não-naturais e:

X_6 é C, A, E, ácido α -amino- γ -bromobutírico ou homocisteína
(hoc);

X_7 é R, H, L, W ou Y ou S;

X_8 é M, F, I, homo-serinametiléter ou norisoleucina;

5 X_9 é G ou uma troca conservativa de G;

X_{10} é Har

X_{11} é selecionado de qualquer aminoácido;

X_{12} é T ou A;

X_{13} é W, 1-nal, 2-nal, A ou F;

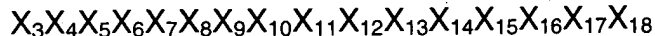
10 X_{14} é D, E, I, L ou V;

X_{15} é C, A, K, ácido α -amino- γ -bromobutírico ou homocisteína

(hoc)

contanto que X_6 ou X_{15} seja C ou hoc;

15 (c) um peptídeo compreendendo a seguinte seqüência de aminoácido:



em que X_6 a X_{15} têm o significado acima da variante (b) e em que:

X_3 é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência D, E, L, N, S, T ou V;

20 X_4 é Y;

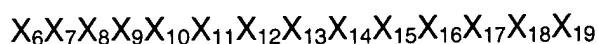
X_5 é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência A, H, K, L, M, S, T ou I.

X_{16} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência G, K, L, Q, R, S ou T;

25 X_{17} é homoarginina;

X_{18} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido.

Esses peptídeos também podem ser descritos pela seguinte seqüência central de aminoácidos:



30 em que cada aminoácido é selecionado de aminoácidos naturais ou não-naturais e em que:

X_6 é um aminoácido com uma cadeia lateral funcionalmente ca-

paz de formação de uma ligação covalente ou A ou ácido α -amino- γ -bromobutírico;

X_7 é R, H, L, W ou Y ou S;

X_8 é M, F, I, Y, H, homo-serinametiléter ou norisoleucina;

5 X_9 é G ou uma troca conservativa de G;

no caso em que X_{10} não é um aminoácido não proteinogênico positivamente carregado tendo uma cadeia lateral a qual é alongada comparado com lisina, X_{10} é prolina, uma troca conservativa de prolina ou uma troca não-conservativa de prolina ou X_9 e X_{10} são substituídos por um único aminoácido;

10

X_{11} é selecionado de qualquer aminoácido;

X_{12} é um aminoácido polar não carregado ou A; de preferência treonina, serina, asparagina ou glutamina;

X_{13} é W, 1-nal, 2-nal, A ou F;

15 X_{14} é D, E, I, L ou V;

X_{15} é um aminoácido com uma cadeia lateral funcionalmente capaz de formação de uma ligação covalente ou A ou ácido α -amino- γ -bromobutírico;

no caso em que X_{16} não é um aminoácido não proteinogênico positivamente carregado tendo uma cadeia lateral a qual é alongada comparado com lisina, X_{16} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência G, K, L, Q, R, S ou T;

no caso em que X_{17} não é um aminoácido não proteinogênico positivamente carregado tendo uma cadeia lateral a qual é alongada comparado com lisina, X_{17} é selecionado de qualquer aminoácido, de preferência A, G, P, Y ou um aminoácido natural, não-natural ou derivatizado positivamente carregado, de preferência K, R, H ou ornitina;

25

X_{18} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência L ou Q;

30

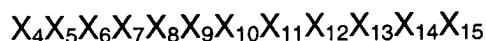
no caso em que X_{19} não é um aminoácido não proteinogênico positivamente carregado tendo uma cadeia lateral a qual é alongada comparado com lisina, X_{19} é independentemente selecionado de qualquer aminoá-

cido, de preferência um aminoácido positivamente carregado, tal como K, R, H ou ornitina;

5 contanto que pelo menos um de X_{10} , X_{16} , X_{17} ou X_{19} seja um aminoácido não proteínogênico positivamente carregado tendo uma cadeia lateral a qual é alongada comparado com lisina.

As unidades peptídicas miméticas de EPO monoméricas, pelo menos duas das quais construídas de uma unidade peptídica, poderiam compreender um único aminoácido substituindo os resíduos de aminoácido X_9 e X_{10} . De preferência, ambos os resíduos são substituídos por um amino-
10 ácido não-natural, por exemplo, ácido 5-aminolevulínico ou ácido 5-aminovalérico.

Em uma outra modalidade, os domínios de ligação usados nas unidades peptídicas compreendem a seguinte seqüência:

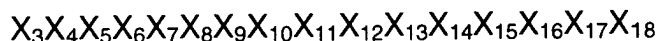


15 em que X_6 a X_{15} têm o significado acima e em que:

X_4 é Y;

X_5 é independentemente selecionado de qualquer aminoácido e é, de preferência, A, H, K, L, M, S, T ou I.

Os domínios de ligação podem ser estendidos e podem compreender a seqüência de consenso:



em que X_4 a X_{15} têm o significado acima e em que:

X_3 é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência D, E, L, N, S, T ou V;

25 X_{16} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência G, K, L, Q, R, S ou T, mais preferivelmente K, R, S ou T;

X_{17} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido, de preferência A, G, P, R, K, Y ou um aminoácido não-natural como uma cadeia lateral positivamente carregada, mais preferivelmente R, K ou um
30 aminoácido não-natural, tal como homoarginina;

X_{18} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido.

Em uma outra modalidade da invenção, é preferido que os pep-

tídeos compreendam X_6 como C, E, A ou hoc, de preferência C e/ou X_7 como R, H ou Y e/ou X_8 como F ou M e/ou X_9 como G ou A, de preferência G e/ou X_{10} como K e/ou X_{11} como V, L, I, M, E, A, T ou norisoleucina e/ou X_{12} como T e/ou X_{13} como W e/ou X_{14} como D ou V e/ou X_{15} como C ou hoc, de preferência C e/ou X_{17} como P, Y ou A. Contudo, também é preferido que X_{17} seja K ou um aminoácido não-natural com uma cadeia lateral positivamente carregada, tal como homoarginina.

A figura 19 descreve ainda monômeros peptídicos novos e adequados representando atividade mimética de EPO. Em conjunto com a presente invenção, eles podem ser usados como domínios de ligação adequados (monômeros) para criação de unidades peptídicas de acordo com a presente invenção. Além disso, eles podem ser usados como peptídeos miméticos de EPO monoméricos ou multiméricos, conforme descrito acima.

No início (N término) e final (C término) dos monômeros de ligação, até cinco aminoácidos podem ser removidos e/ou adicionados.

Como apenas as características funcionais do peptídeo são decisivas - aqui a capacidade de se ligar a e, no caso de um agonista do receptor de EPO, ativar o receptor de EPO, a seqüência de aminoácido precisa da unidade peptídica pode variar. Acima são fornecidos apenas exemplos adequados de peptídeos miméticos de EPO de forma a sustentar o conceito geral. Contudo, também outros peptídeos miméticos de EPO com uma seqüência de aminoácido diferente podem ser usados em conjunto com a presente invenção.

De acordo com outra modalidade, as referidas unidades peptídicas se ligam ao receptor de TPO, desse modo, dimerizando o complexo do receptor de TPO. De preferência, elas induzem à transdução de sinal e são, assim, agonistas do receptor de TPO. As unidades peptídicas, respectivamente, os domínios de ligação monoméricos que criam as unidades peptídicas, podem ser selecionados do grupo de peptídeos miméticos de TPO. Peptídeos miméticos de TPO apropriados são bem-conhecidos no estado da técnica e podem ser usados com relação à presente invenção. Exemplos adequados são, por exemplo, descritos no WO 98/25965, US5932546,

WO0024770, Cwirla, S. E., P. Balasubramanian, D. J. Duffin, C. R. Wags-
trom, C. M. Gates, S. C. Singer, A. M. Davis, R. L. Tansik, L. C. Mattheakis,
C. M. Boytos, P. J. Schatz, D. P. Baccanari, N. C. Wrighton, R. W. Barrett e
W. J. Dower (1997). "Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as po-
5 tent as the natural cytokine." Science **276** (5319): 1696-1699, US6083913,
US6465430, US5869451, US6121238, US6251864, Dower, W. J., S. E.
Cwirla, P. Balasubramanian, P. J. Schatz, D. P. Baccanari e R. W. Barrett
(1998). "Peptide agonists of the thrombopoietin receptor." Stem Cells **16** Supl
2: 21-29, WO05023834, WO0024770, a descrição de todos os documentos
10 com relação à estrutura/seqüência de aminoácido dos peptídeos miméticos
de TPO é totalmente incorporada por referência.

As unidades peptídicas de acordo com a invenção podem com-
preender, além de L-aminoácidos ou D-aminoácidos estereoisoméricos, a-
minoácidos não-naturais/não-convencionais, tais como aminoácidos al-
15 fa, alfa-dissubstituídos, N-alkil aminoácidos ou ácido láctico, por exemplo, 1-
naftilalanina, 2-naftilalanina, homo-serina-metiléter, β -alanina, 3-
piridilalanina, 4-hidróxiprolina, O-fosfo-serina, N-metilglicina (sarcosina), N-
acetil-serina, N-acetilglicina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-
hidróxilisina, nor-lisina, ácido 5-aminolevulínico ou ácido 5-aminovalérico. O
20 uso de N-metilglicina (MeG) e N-acetilglicina (AcG) é especialmente preferi-
do, em particular em uma posição terminal. Também dentro do escopo da
presente invenção estão peptídeos os quais são peptídeos retro, inverso e
retro/inverso dos peptídeos definidos e aqueles peptídeos consistindo inte-
iramente de D-aminoácidos.

25 Também, derivados dos peptídeos podem ser usados, por e-
xemplo, os produtos da oxidação de metionina ou glutamina deamidada, ar-
ginina e amida no C-término.

Aqui, as abreviações para o código de uma letra como letras
maiúsculas são aquelas da nomenclatura padrão de peptídeo, estendida
30 pela adição de aminoácidos não-naturais.

Código	Aminoácido
A	L-alanina
V	L-valina
L	L-leucina
I	L-isoleucina
M	L-metionina
F	L-fenilalanina
Y	L-tirosina
W	L-triptofano
H	L-histidina
S	L-serina
T	L-treonina
C	L-cisteína
N	L-asparagina
Q	L-glutamina
D	L-ácido aspártico
E	L-ácido glutâmico
K	L-lisina
R	L-arginina
P	L-prolina
G	glicina
Ava, 5-Ava	ácido 5-aminovalérico
Als, 5-Als	ácido 5-aminolevulínico
MeG	N-metilglicina
AcG	N-acetilglicina
Hsm	homo-serina metiléter
Har	homoarginina
1nal	1-naftilalanina
2nal	2-naftilalanina
βAla	beta-alanina
hoc/hcy	homocisteína

Ac	acetilado
Am	amidado
Dap	ácido diamino propiônico
Dab	ácido diamino butírico
Aad	ácido alfa-amino adípico
Asu	ácido alfa-amino-subérico
Adi	ácido adípico
Glr	ácido glutárico
Sec	selenocisteína

As unidades peptídicas podem ser modificadas, por exemplo, através de trocas conservativas de um único aminoácido. Tal troca altera a estrutura e função de uma molécula de ligação, mas ligeiramente na maioria dos casos. Em uma troca conservativa, um aminoácido é substituído por outro aminoácido dentro de um grupo com propriedades similares.

Exemplos de grupos correspondentes são:

- aminoácidos tendo cadeias laterais não-polares: A, G, V, L, I, P, F, W, M
- aminoácidos não carregados tendo cadeias laterais polares: S, T, G, C, Y, N, Q
- aminoácidos tendo cadeias laterais aromáticas: F, Y, W
- aminoácidos positivamente carregados: K, R, H
- aminoácidos negativamente carregados: D, E
- aminoácidos de tamanho ou peso molecular similar, em que o peso molecular dos aminoácidos substituintes desvia em um máximo de +/- 25% (ou +/- 20%, +/- 15%, +/- 10%) do peso molecular do aminoácido original.

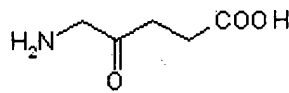
Mais especificamente, Wrighton e outros (Patente US 5.773.569 e patentes associadas) examinaram em detalhes, usando técnicas de phage display, quais aminoácidos de um peptídeo mimético de EPO podem ser substituídos, ao mesmo tempo em que se mantém a atividade. Eles também investigaram e publicaram dados sobre possível truncamento, isto é, o comprimento mínimo de um determinado peptídeo monomérico.

De acordo com uma modalidade da invenção, monômeros sele-

cionados do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 2, 4-9 fornecidas abaixo são usadas para a formação de pelo menos uma unidade peptídica bivalente. Boa atividade mostra um peptídeo com K na posição 10 e K na posição 17, conforme em SEQ ID NO: 2.

- 5 **SEQ ID NO 2: GGTYSCHFGKLTWVCKKQGG**
SEQ ID NO 4: GGTYSCHFGKLTWVCKPQGG
SEQ ID NO 5: GGTYSCHFGRLTWVCKPQGG
SEQ ID NO 6: GGTYSCHFGRLTWVCKKQGG

Incorporação de ácido 5-aminolevulínico (Als):



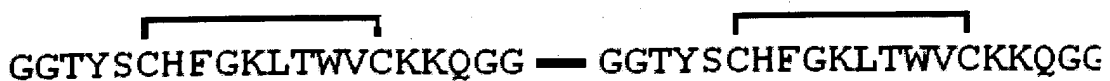
5-Als

- 10 **SEQ ID NO 7: GGTYSCHF-(Als)-LTWVCKPQGG**
SEQ ID NO 8: GGTYSCHF-(Als)-LTWVCKKQGG
SEQ ID NO 9: GGTYSCHFGKLT-1nal-VCKKQRG

De acordo com uma modalidade, as unidades peptídicas são formadas com base em monômeros de acordo com SEQ ID NO 2 e 4 to 9 conforme fornecido acima ou modificações das mesmas. Os peptídeos podem, por exemplo, ser modificados através de uma troca conservativa de um único aminoácido em que, de preferência, não mais do que 1, 2 ou 3 aminoácidos são trocados. De preferência, esses peptídeos são modificados como para AcG no N-término e MeG no C-término.

20 Alguns exemplos de unidades peptídicas apropriadas para dimerização do receptor de EPO são subseqüentemente listados. As barras acima dos domínios de ligação simbolizam ligações em ponte de dissulfeto intramoleculares opcionais, mas preferidas.

SEQ ID NO 10 (baseada em SEQ ID NO 2):



25 SEQ ID No 11



O ligante nessas estruturas bivalentes é feito padronizado através de modelamento molecular para evitar distorções da conformação bioativa (figura 1).

SEQ ID NO 12

- 5 A seqüência ligante pode ser encurtada em um resíduo de glicina. Essa seqüência também é um exemplo de um ligante composto por um resíduo de glicina que forma, ao mesmo tempo, parte do domínio de ligação (veja SEQ ID NO: 2).

GGTYSCHFGKLTWVCKKQG — GGTYSCHFGKLTWVCKKQGG

SEQ ID NO 14:

GGTYSCHFGKLTWVCKKKGG — GGTYSCHFGKLTWVCKKDGG

- 10 Essa seqüência apresenta uma unidade peptídica bivalente contínua abrigando dois domínios de ligação (heterogêneos) ligeiramente diferentes. Tais peptídeos bivalentes não seriam acessíveis economicamente com uma abordagem de dimerização da técnica anterior (veja acima). A vantagem dessa molécula heterodimérica repousa no fato de que os aminoácidos de desvio (presentemente K e D no C-término) interagem uns com os outros, desse modo, estabilizando o dímero. Assim, é vantajoso incorporar as respectivas modificações de estabilização na molécula através de modelamento molecular.

Um outro exemplo é:

20 GGTYSCHFGKLT-1nal-VCKKQRG-GGTYSCHFGKLT-1nal-VCKKQRG

De acordo com uma outra modalidade, o peptídeo traz, opcionalmente, um aminoácido adicional, de preferência um com uma cadeia lateral reativa, tal como cisteína, no N-término tal como, por exemplo, nas seguintes seqüências:

25 C-GGTYSCHFGKLTWVCKKQGG-GGTYSCHFGKLTWVCKKQGG

C-GGTYSCHFGKLT-1nal-VCKKQRG-GGTYSCHFGKLT-1nal-VCKKQRG

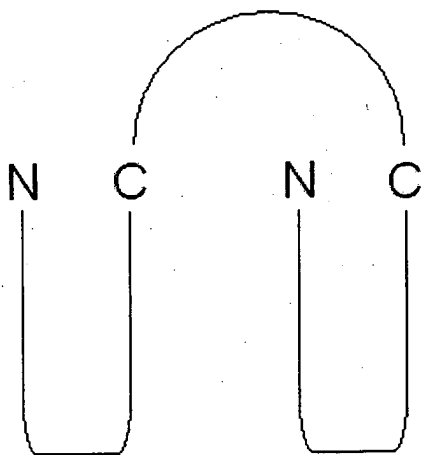
A cadeia lateral reativa de cisteína pode servir como um laço de ligação, por exemplo, para fixação da unidade veículo polimérica. Os peptí-

deos, além disso, compreendem, opcionalmente, ligações em ponte de dissulfeto intramoleculares entre as primeira e segunda e/ou terceira e quarta cisteínas.

5 As unidades monoméricas, conforme exemplificado por SEQ ID 2, 4-9 e 12, 13 e 15, 15a, podem ser favoravelmente combinadas às unidades peptídicas.

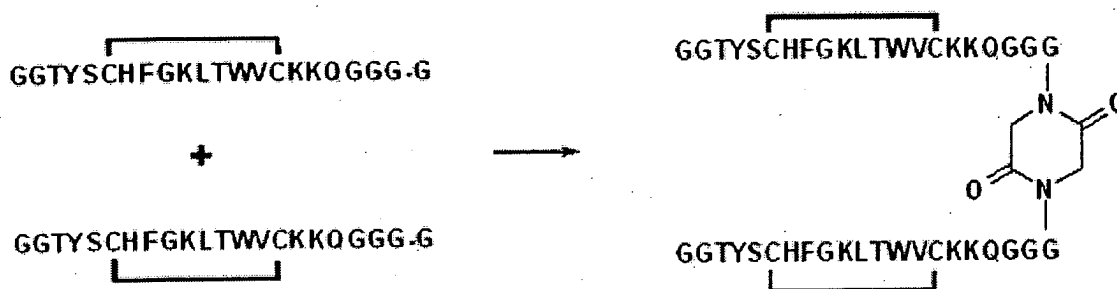
Exemplos para métodos de dimerização sendo aplicados aos monômeros das unidades peptídicas incluem (mas não estão limitados a):

10 1. A dimerização via conexão do C-término para o N-término, em que o C-término de um dos referidos peptídeos monoméricos é covalentemente ligado ao C-término do outro peptídeo. O ligante/espaçador entre os monômeros pode conter uma unidade de dicetopiperazina. Uma base de dicetopiperazina Gly-Gly preferida pode ser obtida através de ativação do monômero de glicina C-terminal. Esse princípio também pode ser usado para
15 formação de uma dimerização C-terminal.

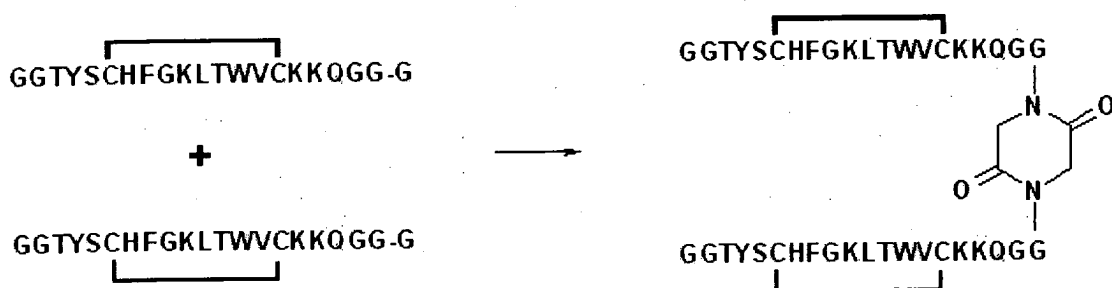


As fórmulas e exemplos a seguir representam quatro exemplos padronizados os quais são otimizados através de modelamento molecular:

(a) dímero com base em SEQ ID NO 2 (a conformação do dímero é mostrada na figura2):



(b) dímero com base em SEQ ID NO 2 com um ligante encurtado em uma glicina; a conformação é mostrada na figura 3.

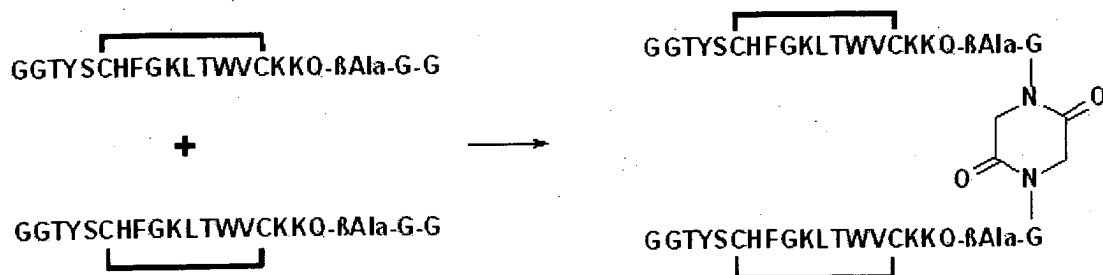


(c) dímero com base em SEQ ID NO 2 com uma glicina substituída por beta-alanina (figura 4). O monômero (SEQ ID NO 16) também é aplicável como um peptídeo mimético de EPO.

5



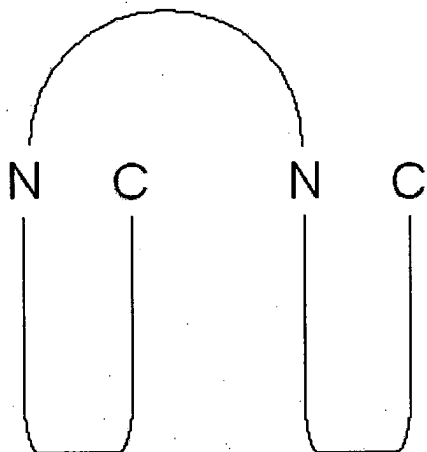
(d) dímero com base em SEQ ID NO 2 com uma glicina alternativa substituída por beta-alanina (figura 5). O monômero (SEQ ID NO 17) também pode ser aplicado como um peptídeo mimético de EPO.



2. A dimerização via conexão do N-término para o N-término, em que o N-término de um dos referidos peptídeos monoméricos é covalente-

10

mente ligado ao N-término do outro peptídeo, pelo que a unidade espaçadora contém, de preferência, um bloco de construção de ácido dicarboxílico.



- (a)-Em uma modalidade, os dímeros resultantes com base em SEQ ID NO 2 alongados no N-término por um resíduo de glicina (SEQ ID NO 18) contêm uma unidade de hexanodioila como ligante/espaçador (figura 6):

GGGTYSCHFGKLTWVCKKQGG

|

CO-(CH₂)₄-CO

|

GGGTYSCHFGKLTWVCKKQGG

10

- (b) Em uma modalidade alternativa, a dimerização pode ser obtida usando uma unidade de octanodioila como ligante/espaçador (figura 7):

GGGTYSCHFGKLTWVCKKQGG

|

CO-(CH₂)₆-CO

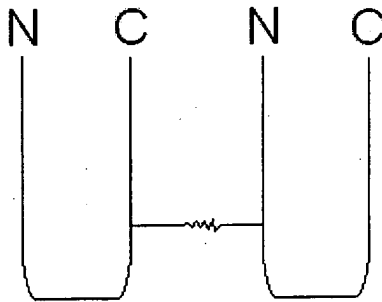
|

GGGTYSCHFGKLTWVCKKQGG

15

3. A dimerização via as cadeias laterais, em que uma cadeia la-

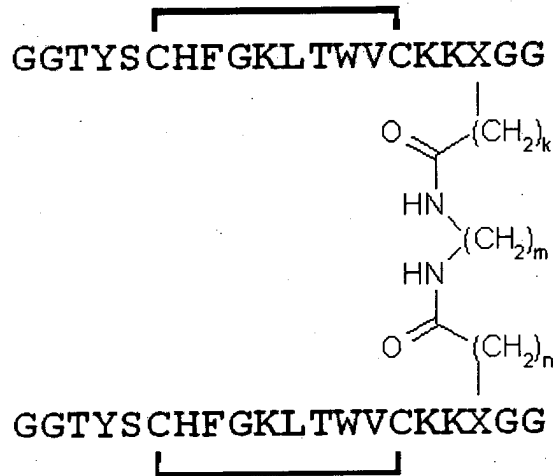
teral de aminoácido de um dos referidos peptídeos monoméricos é covalentemente ligada a uma cadeia lateral de aminoácido do outro peptídeo com inclusão de uma molécula espaçadora adequada conectando os dois monômeros peptídicos.



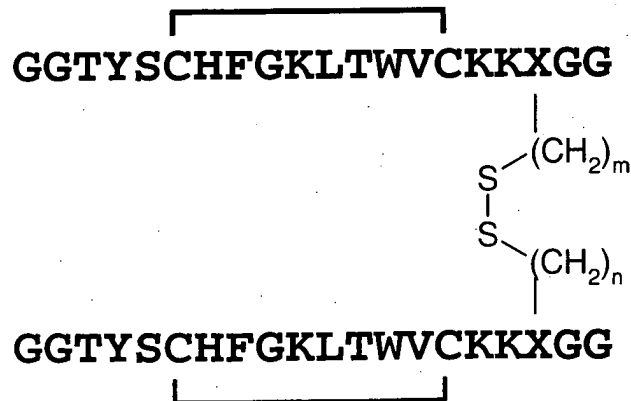
5

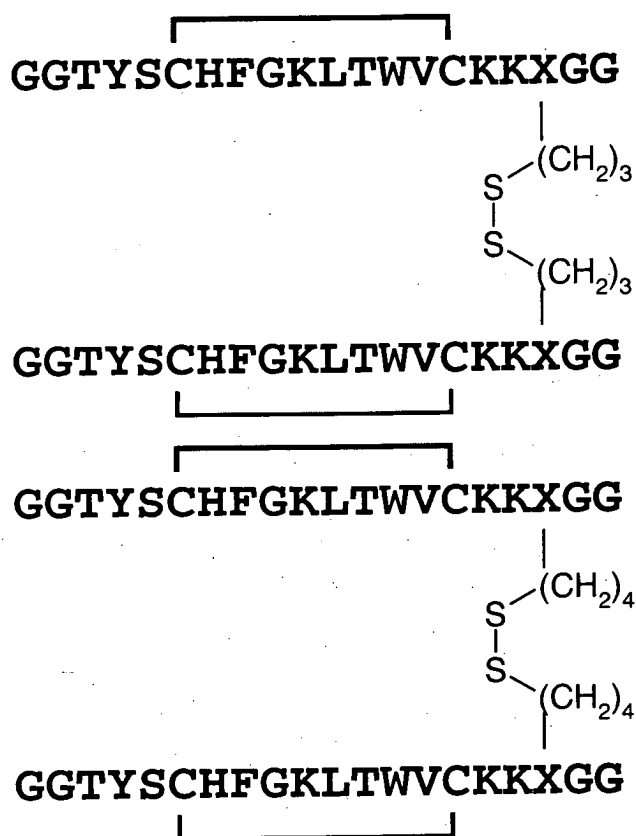
Isso pode incluir:

(a) a conexão via uma ligação de amida:



(b) ou a conexão via uma ligação em ponte de dissulfeto:





O X simboliza o núcleo de parte principal do respectivo aminoácido que participa na formação da respectiva ligação peptídica.

De acordo com uma estratégia diferente, a ligação em ponte covalente dos monômeros peptídicos uns aos outros, desse modo, formando a

5 unidade peptídica, é formada entre as cadeias laterais do aminoácido C-terminal da primeira unidade peptídica monomérica e o aminoácido N-terminal do segundo monômero peptídico. Conseqüentemente, é preferido, de acordo com essa estratégia de dimerização, que os peptídeos monoméricos a serem

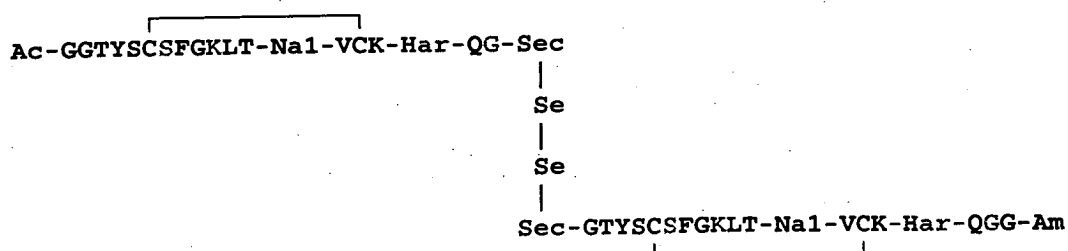
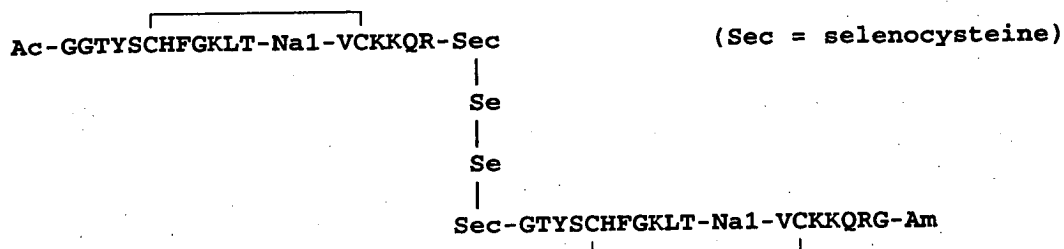
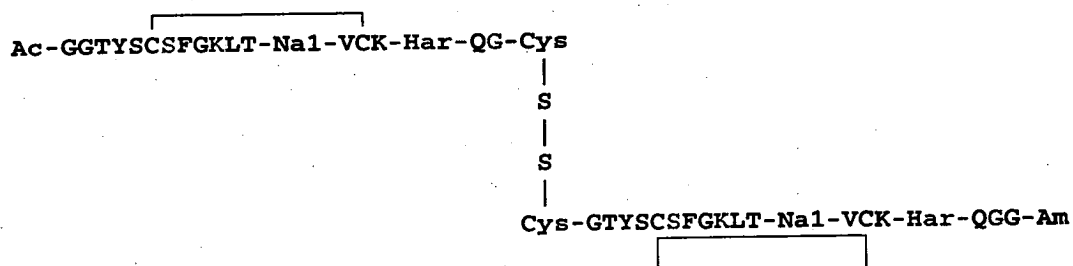
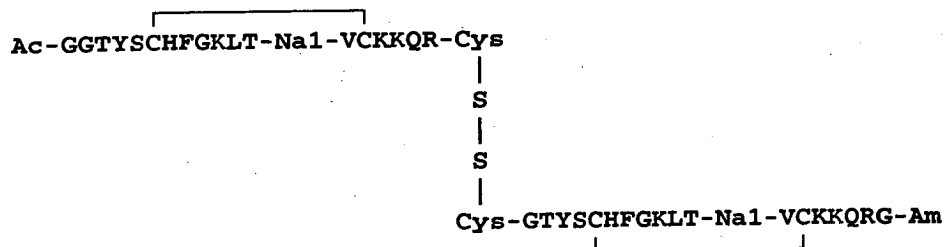
10 dimerizados tragam um aminoácido com uma funcionalidade que forma uma ligação em ponte, quer no N- ou C-término, desse modo, permitindo a formação de uma ligação covalente entre o último aminoácido do primeiro peptídeo e o primeiro aminoácido do segundo peptídeo. A ligação que cria o dímero é, de preferência, covalente. Exemplos adequados de respectivas ligações em

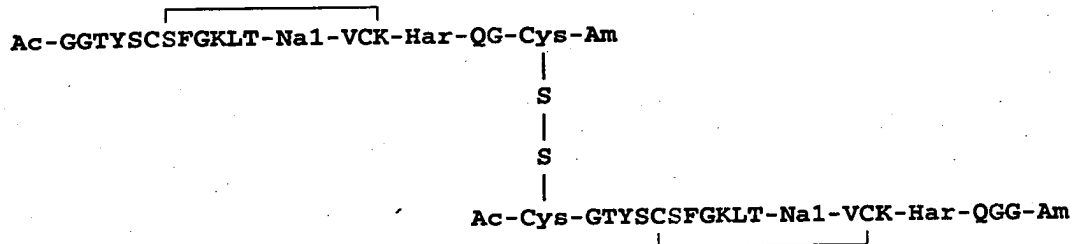
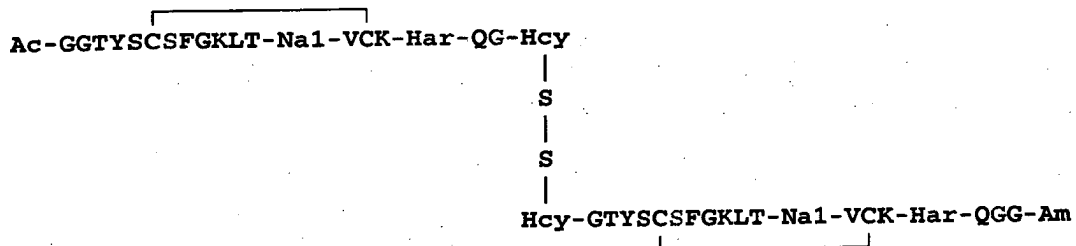
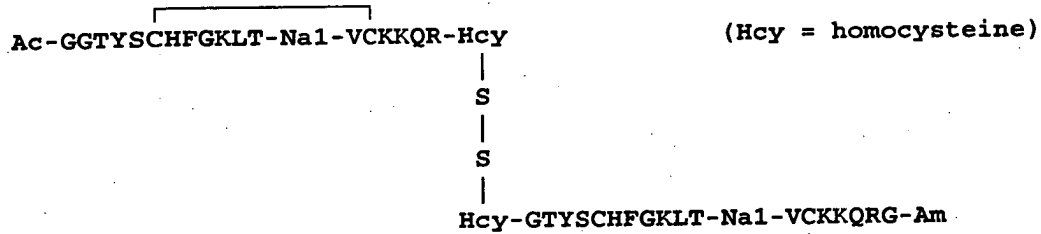
15 ponte são, por exemplo, a ligação em ponte de dissulfeto e a ligação em ponte de disselenida. Contudo, também, por exemplo, ligações de amida entre aminoácidos positiva e negativamente carregados ou outras ligações covalentes, tais como ligações de tioéter, são adequadas como porções de ligação.

Aminoácidos preferidos adequados para formação das respectivas ligações em ponte de conexão entre as unidades de ligação monoméricas para formar a unidade peptídica final são, por exemplo, cisteína, derivados de cisteína, tais como homocisteína ou selenocisteína ou tiolisina. Eles formam ligações em ponte de dissulfeto ou, no caso de aminoácidos contendo selênio, ligações em ponte de disselenida.

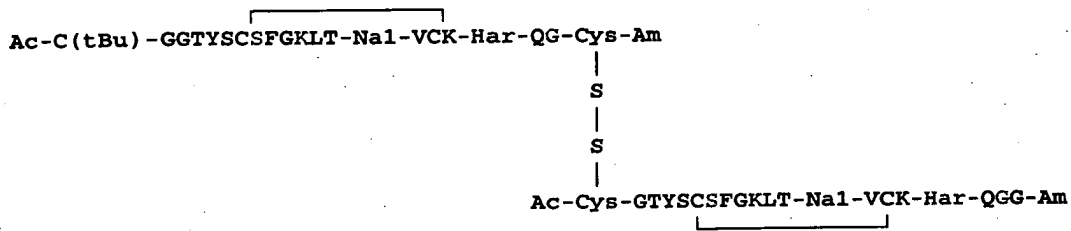
Exemplos adequados para dímeros de unidade peptídica respectivamente criados são fornecidos abaixo usando peptídeos miméticos de EPO como exemplos:

10



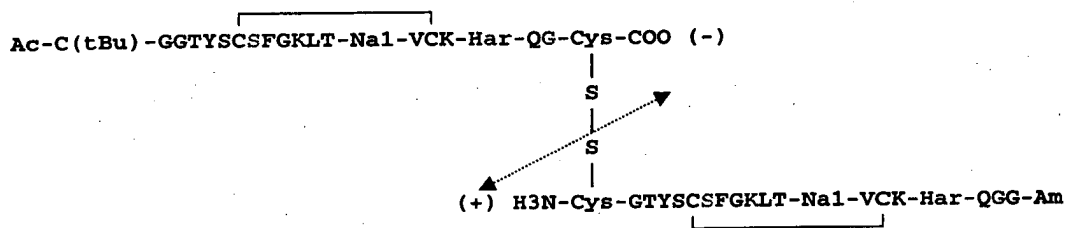


De acordo com um outro desenvolvimento, o N- ou C-término do dímero peptídico (e, conseqüentemente, das respectivas unidades peptídicas monoméricas estando localizadas no início ou no final do dímero) compreende um aminoácido extra, permitindo o acoplamento do veículo polimérico, tal como HES, de forma a criar o composto supravaleante. Conseqüentemente, o aminoácido introduzido traz uma respectiva funcionalidade de acoplamento, tal como, por exemplo, um grupo SH-. Um exemplo comum para tal aminoácido é cisteína. Contudo, também outros aminoácidos com um grupo funcional que permite a formação de uma ligação covalente (por exemplo, todos aminoácidos negativa e positivamente carregados) são adequados.

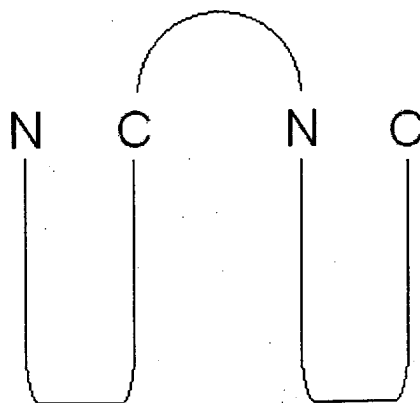


As barras sobre os monômeros peptídicos representam ligações em ponte intramoleculares covalentes; nesse caso, ligações em ponte de dissulfeto.

- 5 De acordo com um outro desenvolvimento, o aminoácido no C e/ou N término envolvido na formação de uma ligação em ponte covalente para conexão de unidades monoméricas a um dímero representa um grupo carregado tal como, por exemplo, o grupo COO^- ou NH_3^+ . Essa característica leva a uma estabilização favorável da estrutura da ligação em ponte intermolecular:



- 10 4. A dimerização através de formação de peptídeos bi- ou multivalentes contínuos já foi esboçada acima.



O conceito central dessa estratégia se abstém da síntese dos peptídeos monoméricos que formam parte do peptídeo multi- ou bivalente em reações distintas antes de dimerização ou multimerização, mas sintetizar

o peptídeo bi- ou multivalente final em uma etapa como um único peptídeo; por exemplo, em uma única reação em fase sólida. Assim, uma etapa de dimerização ou multimerização distinta não é mais necessária. Esse aspecto proporciona uma grande vantagem, isto é, o controle completo e independente de cada posição de seqüência na unidade peptídica final. O método
5 permite abrigar facilmente pelo menos dois domínios de ligação receptor-específicos diferentes em uma unidade peptídica em virtude de controle independente de cada posição de seqüência.

Conforme para os monômeros e peptídeos di- ou multiméricos,
10 os peptídeos bivalentes/multiméricos contínuos podem ser modificados, por exemplo, através de acetilação ou amidação ou ser alongados em posições C-terminais ou N-terminais.

Todas as possíveis modificações também se aplicam à modificação do ligante. Em particular, seria vantajoso fixar porções poliméricas solúveis ao ligante tal como, por exemplo, PEG, amido ou dextranos.
15

A síntese do peptídeo multi- ou bivalente final de acordo com a invenção pode favoravelmente também incluir duas formações subseqüentes e independentes de ligações de dissulfeto ou outras ligações intramoleculares dentro de cada um dos domínios de ligação. Desse modo, os peptídeos podem
20 ser ciclizados.

As cadeias laterais reativas dos peptídeos podem servir como um laço de ligação, por exemplo, para outras modificações. As unidades peptídicas compreendem, opcionalmente, ligações em ponte intramoleculares entre aminoácidos tendo uma funcionalidade de cadeia lateral de formação de ligação em ponte tal como, por exemplo, as cisteínas.
25

Os peptídeos podem ser modificados, por exemplo, através de acetilação ou amidação ou ser alongados nas posições C-terminais ou N-terminais. Extensão com um ou mais aminoácidos em um dos terminos (N ou C), por exemplo, para preparo de um sítio de fixação para o veículo polímero freqüentemente leva a uma unidade peptídica bivalente heterodimérica a qual pode ser fabricada como um peptídeo contínuo.
30

Vários aminoácidos reativos são conhecidos no estado da técni-

ca de forma a acoplar veículos à proteínas e peptídeos. Um aminoácido de acoplamento preferido é cisteína, o qual pode ser acoplado ao N ou C término ou ser introduzido dentro da seqüência peptídica. Contudo, a direção de acoplamento pode fazer uma diferença considerável e, assim, deve ser cuidadosamente escolhida para a unidade peptídica. Isso seria demonstrado com base no exemplos a seguir de um peptídeo mimético de EPO:

São usados os dois dímeros a seguir:

AGEM400C6C4

10
 1 2 3 4 4
 1 0 0 0 0 1
 Ac-GGTYSCHFGKLT-1-Nal-VCKKQRGGGTYSCHFGKLT-1-Nal-VCKKQRG-Cys(tBu)-NH₂

AGEM40C6C4

15
 1 2 3 4 4
 1 0 0 0 0 1
 Ac-Cys(tBu)-GGTYSCHFGKLT-1-Nal-VCKKQRGGGTYSCHFGKLT-1-Nal-VCKKQRG-NH₂

1-Nal: 1-Naftilalanina

Cys(tBu): L-cisteína S-*terc.*-butila protegida

20 Os 41 meros AGEM400C6C4 e AGEM40C6C4 possuem a mesma seqüência central. Os aminoácidos 1-40 de AGEM40C6C4 são iguais aos aminoácidos 2-41 de AGEM40C6C4. A única diferença é a posição da cisteína tBu-protégida. Esse aminoácido não está envolvido na interação receptor/fármaco, mas se destina a funcionar como o grupo de ligação a um veículo polimérico no conjugado final. No caso de AGEM400C6C4, a cisteína tBu-protégida é presa ao C término, no caso de AGEM40C6C4, ela é presa ao N término. As barras de conexão representam ligações em ponte de cisteína.

Existem duas vantagens do AGEM400C6C4 com relação ao AGEM40C6C4.

30 A primeira vantagem é sua acessibilidade sintética. O AGEM400C6C4 pode ser isolado em maiores rendimentos globais do que o AGEM40C6C4. No caso da síntese da seqüência linear de AGEM40C6C4, um CIZ-22 meros (CIZ-RGGGTYSCHFGKLT-1-Nal-VCKKQRG-NH₂, CIZ: grupo 2-Clorobenzilóxicarbonila) é observado como um subproduto. Durante purificação da seqüência linear com cromatografia de líquido de alta pressão de fase reversa (RP-HPLC), ele exibe comportamento cromatográfico similar

ao precursor linear de AGEM40C6C4 e, portanto, torna-se difícil separá-lo, levando a uma perda no rendimento global do produto desejado. No caso de AGEM400C6C4, nenhum composto análogo é encontrado.

A segunda vantagem do AGEM400C6C4 com relação ao A-
 5 GEM40C6C4 repousa na implementação mais fácil de uma análise do conju-
 gado final do peptídeo desprotegido com um veículo polimérico. Uma estraté-
 gia para a análise de um conjugado peptídico é a degradação seletiva do con-
 jugado através de clivagem com endoproteases. Idealmente, todo o peptídeo
 é liberado do veículo polimérico durante a hidrólise enzimática. Esses frag-
 10 mentos peptídicos podem ser identificados e quantificados através de técnicas
 analíticas padrão, tais como HPLC com detecção por MS ou UV, etc.

No caso do AGEM400C6C4, a clivagem pode ser realizada com
 tripsina - uma endoprotease que é conhecida por clivar, de modo altamente
 seletivo, ligações que repousam C terminais dos aminoácidos carregados
 15 arginina e lisina (F. Lottspeich, H. Zorbas (Hrsg.), "Bioanalytik", Spectrum
 Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998). Aplicado aos conjugados de
 AGEM400C6C4, isso assentará fragmentos livres que cobrem 38 de 41 ami-
 noácidos do peptídeo original ligado à molécula veículo. No caso do A-
 GEM40C6C4, fragmentos de apenas 21 de 41 aminoácidos são liberados
 20 através de digestão triptica:

Conjugado de AGEM400C6C4

Ac-GGTYSCHFGLT-1-NaI-VCKKQRGGTYSCHFGLT-1-NaI-VCKKQRG-Cys-polímero

25 conjugado de AGEM40C6C4

polímero-(Ac)Cys-GGTYSCHFGLT-1-NaI-VCKKQRGGTYSCHFGLT-1-NaI-VCKKQRG-NH₂

Fragmentos que são assentados livre e podem ser detectados através de
 análises posteriores são marcados em cinza.

Uma vez que a análise de um Ingrediente farmacêutico Ativo é
 30 uma questão chave durante seu desenvolvimento, o AGEM400C6C4 tem
 uma clara vantagem com relação ao AGEM40C6C4.

Assim, no caso de um aminoácido positivamente carregado es-
 tar localizado nas respectivas posições, é altamente preferido incorporar o
 aminoácido de ligação (aqui cisteína) no C-término porque é possível gerar

um fragmento peptídico quase completo, uma vez que o sítio de clivagem é em virtude da arginina na posição X₁₉ do monômero tipicamente muito à direita antes do polímero. Respectivos métodos de montagem, conforme descrito acima, também podem ser usados para o preparo de multímeros como unidades peptídicas.

É destacado que todos os domínios de ligação descritos aqui, sozinhos ou como parte de um peptídeo bivalente, também podem ser combinados com um ou mais de outros domínios peptídicos idênticos ou diferentes de modo a formar respectivas unidades peptídicas bi- ou multivalentes homo- ou heterogêneas.

As unidades peptídicas são opcionalmente modificadas como AcG no N-término e MeG no C-término.

As unidades peptídicas podem ser modificadas, por exemplo, através de acetilação ou amidação ou ser alongadas em posições C-terminais ou N-terminais. Extensão com um ou mais aminoácidos em apenas um dos dois terminos, especialmente para o preparo de fixação da última unidade veículo, freqüentemente leva a uma unidade peptídica bivalente heterodimérica a qual pode ser fabricada como um peptídeo contínuo (veja acima).

A síntese do peptídeo multi- ou bivalente final de acordo com a invenção pode, favoravelmente também, incluir duas formações subseqüentes e independentes de ligações de dissulfeto ou outras ligações intramoleculares dentro de cada um dos domínios de ligação.

A presente invenção ainda compreende respectivos métodos de produção de composto, em que as unidades peptídicas são conectadas às respectivas unidades veículo. Os compostos da presente invenção podem, vantajosamente, ser usados para o preparo de composições farmacêuticas humanas e/ou veterinárias. As indicações dependem das unidades peptídicas presas às mesmas.

No caso de acoplamento de peptídeos miméticos de EPO, os compostos de acordo com a presente invenção são especialmente adequados para as mesmas indicações que a eritropoietina. Assim, a presente in-

venção também proporciona um método para tratamento de um paciente sofrendo de um distúrbio que é suscetível a tratamento com um agonista de eritropoietina compreendendo administração, ao paciente, de uma dose ou quantidade terapêuticamente eficaz de um composto da presente invenção trazendo uma unidade peptídica compreendendo uma atividade agonista de eritropoietina.

A eritropoietina é um membro da superfamília de citocina (veja acima). Além de estimular efeitos descritos na introdução, descobriu-se também que a eritropoietina estimula células-tronco. Os miméticos de EPO descritos aqui, assim, são adequados para todas as indicações causadas por efeitos associados à células-tronco. Exemplos não limitativos são a prevenção e/ou tratamento de doenças associadas ao sistema nervoso. Exemplos são lesões, doenças ou distúrbios neurológicos, tais como, por exemplo, Parkinsonismo, mal de Alzheimer, coreia de Huntington, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doença de Gaucher, doença de Tay-Sachs, uma neuropatia, lesão nervosa periférica, um tumor cerebral, uma lesão na coluna espinhal ou uma lesão por derrame. Os peptídeos miméticos de EPO de acordo com a invenção são também utilizáveis para o tratamento preventivo e/ou curativo de pacientes sofrendo de ou em risco de sofrer de insuficiência cardíaca. Exemplos são enfarte cardíaco, doença da artéria coronária, miocardite, tratamento por quimioterapia, alcoolismo, cardiomiopatia, hipertensão, doenças cardíacas valvulares, incluindo insuficiência mitral ou estenose aórtica, e distúrbios da glândula tireóide, síndrome coronariana crônica e/ou aguda. Além disso, os miméticos de EPO podem ser usados para estimulação da mobilização fisiológica, proliferação e diferenciação de células precursoras endoteliais, para estimulação de vasculogênese, para o tratamento de doenças relacionadas a uma disfunção de células precursoras endoteliais e para a produção de composições farmacêuticas para o tratamento de tais doenças e composições farmacêuticas compreendendo os referidos peptídeos e outros agentes adequados para estimulação de células precursoras endoteliais. Exemplos de tais doenças são hipercolesterolemia, diabetes mellitus, doenças de inflamação crônica endotélio-mediadas, endotélio-

se, incluindo retículo-endoteliose, aterosclerose, doença cardíaca coronariana, isquemia do miocárdio, angina pectoris, doenças cardiovasculares idade-relacionadas, doença de Raynaud, hipertonia induzida por gravidez, insuficiência renal crônica ou aguda, insuficiência cardíaca, cicatrização de ferimentos e doenças secundárias.

Os compostos trazendo unidades peptídicas miméticas de EPO são especialmente úteis para o tratamento de distúrbios que são caracterizados por uma deficiência de eritropoietina ou uma população de células sangüíneas vermelhas baixa ou defectiva e especialmente para o tratamento de qualquer tipo de anemia e derrame. Tais composições farmacêuticas podem opcionalmente compreender veículos farmacêuticamente aceitáveis de forma a adotar a composição para o procedimento de administração pretendido. Métodos de distribuição adequados, bem como veículos e aditivos, são descritos, por exemplo, no WO 2004/101611, aqui incorporado por referência.

No caso do composto trazer unidades peptídicas miméticas de TPO (tendo uma atividade agonista), os compostos podem ser usados para todas as indicações que a trombopoietina. Eles são, assim, úteis para a prevenção e tratamento de doenças mediadas pela TPO tais como, por exemplo, distúrbios hematológicos, incluindo trombocitopenia, granulocitopenia e anemia e o tratamento de malignidades hematológicas. Assim, a presente invenção também proporciona um método para tratamento de um paciente sofrendo de um distúrbio que é suscetível ao tratamento com um agonista de trombopoietina compreendendo administração, ao paciente, de uma dose ou quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da presente invenção trazendo uma unidade peptídica compreendendo uma atividade agonista de trombopoietina.

EXEMPLOS

A. Ilustração do conceito de compostos supraválentes

O conceito das moléculas supraválentes será explicado por meio de exemplos. A figura 13 mostra um exemplo de uma molécula supraválente simples de acordo com a invenção. Dois peptídeos bivalentes contínuos são

conectados N-terminalmente através de uma porção PEG bifuncional trazendo grupos maleimida. Cisteína foi escolhida como sítio de fixação reativo para a unidade veículo de PEG.

5 Contudo, moléculas supraválentes podem compreender mais de duas unidades bi- ou multivalentes contínuas. A figura 14 proporciona um exemplo que é baseado em uma unidade veículo com uma unidade de glicerol central como unidade de ramificação e compreendendo três peptídeos bivalentes contínuos. Novamente, cisteína foi usada para fixação. A figura 20 mostra um exemplo usando HES como unidade veículo polimérica. HES foi
10 modificado de modo que ele traz grupos maleimida que reagem com os grupos SH das unidades peptídicas. De acordo com o exemplo, todos os sítios de fixação são ligados à unidades peptídicas. Contudo, também pequenas unidades de PEG (por exemplo, 3 a 10 kD) poderiam ocupar pelo menos alguns dos sítios de fixação.

15 Conforme explicado acima, o conceito supraválente também pode ser estendido a polímeros dendríticos polivalentes em que uma unidade veículo dendrítica e/ou polimérica está conectada a um grande número de peptídeos bivalentes contínuos. Por exemplo, a unidade de ramificação dendrítica pode ser baseada em glicerol (por favor, refira-se a Haag 2000, aqui
20 incorporado por referência).

Um exemplo para uma molécula supraválente baseada em uma unidade veículo com uma unidade de ramificação dendrítica contendo seis peptídeos bivalentes contínuos é mostrado na figura 15.

25 Outros exemplos de moléculas supraválentes compreende unidades veículo com amidos ou dextranos, as quais são oxidadas usando, por exemplo, ácido periódico, para abrigar um grande número de funções aldeído. Em uma segunda etapa, muitos peptídeos bivalentes são presos à unidade veículo e juntos formam a molécula final. Por favor, note que mesmo várias centenas (por exemplo, 50 a 1000, de preferência 150 a 800, mais
30 preferivelmente 250 a 700) unidades peptídicas podem ser acopladas à molécula veículo a qual é, por exemplo, HES. Contudo, também, menos unidades peptídicas podem ser ligadas à molécula de HES, conforme é mostrado

nas figuras, especialmente se peptídeos miméticos de EPO são acoplados. O número médio de unidades peptídicas a ser acoplado pode ser escolhido de cerca de 2 a 1000, 2 a 500, 2 a 100, 2 a 50, de preferência 2 a 20 e, mais preferivelmente, 2 a 10, dependendo do peptídeo e do(s) receptor(es) a ser(em) ligado(s).

A figura 16 demonstra o conceito de uma simples molécula supravalente biodegradável. Dois peptídeos bivalentes contínuos são conectados N-terminalmente através de duas porções PEG bifuncionais que são conectadas via um ligante biodegradável tendo uma posição de clivagem intermediária. Os ligantes permitem a ruptura da grande unidade PEG nas subunidades, desse modo, facilitando a eliminação renal.

As vantagens referentes ao efeito de supravalencia foram muito surpreendentes e inesperados. Inicialmente, temia-se que a conjugação a uma macromolécula pudesse reduzir a eficácia. Essa expectativa era baseada nas presumidas desvantagens na taxa de ligação em virtude de taxas de difusão reduzidas com moléculas maiores. Outra expectativa era que, dos vários APIs peptídicos ligados a um veículo, nem todos fossem capazes de se ligar ao receptor potencialmente em virtude de problemas estéricos de simultânea ligação ou em virtude do número de receptores, os quais podem ser atingidos pelas extensões do veículo macromolecular, ser limitado e possivelmente estar abaixo do número de APIs peptídicos. Assim, um aumento de potência do peptídeo de API (Ingrediente Farmacêutico Ativo) conforme é observado com o conceito de supravalencia da presente invenção, não era esperado.

Por outro lado, em virtude das alterações farmacocinéticas significativas que um veículo macromolecular é capaz de introduzir, a potência *in vivo* poderia ter sido aperfeiçoada em virtude do tempo de meia-vida mais longo do complexo todo de peptídeo/veículo. Esse fenômeno também tem o efeito de que um efeito de supravalencia é difícil de determinar *in vivo*, uma vez que ele é uma entidade farmacodinâmica a qual tem de ser determinada separadamente. Ensaio *in vitro*, assim, não são apenas suficientes, mas poderiam ser a única forma útil de demonstrar claramente o efeito de supra-

valência.

O efeito de supervalência, conforme descrito na presente invenção, pode ser demonstrado através de comparação de quantidades molares de API peptídico (conjugado a um veículo vs. não conjugado).

5 Um experimento foi realizado em um ensaio padrão com células TF-1, conforme recomendado pela Farmacopéia Européia para a determinação de atividade semelhante à EPO *in vitro* (por favor, veja também abaixo). Basicamente, células TF-1 (sua proliferação sendo dependente da presença de atividade semelhante à EPO) são cultivadas na presença de várias concentrações de EPO ou substâncias miméticas de EPO. Os números de célula resultantes são quantificados usando o ensaio colorimétrico com MTT e medições fotométricas. Baseado nesses dados, é possível determinar as relações de dose-resposta normalizadas para cada determinada substância.

10 Nesse ensaio, EPO e o peptídeo AGEM40 (veja abaixo), o último sendo um peptídeo bivalente contínuo com atividade mimética de EPO conhecida, foram usados.

AGEM40 foi usado como um peptídeo não conjugado e como peptídeo conjugado a um veículo macromolecular (nesse caso, hidroxietil amido com peso molecular médio de 130 kD; a fonte comercial é o Pharmacia, Voluven como substituto de plasma). O tamanho do bloco de construção desse conjugado é de aproximadamente 40 kD, o que significa que a molécula de HES traz, em média, cerca de 2-5, de preferência 3 a 4 porções peptídicas. Também, um HES 200/0.5 pode ser usado. Após modificação do HES de 130 kD, aproximadamente 4 peptídeos de AGEM 40 foram conjugados (peso molecular da molécula conjugada: 150 kD). Quando um HES tendo um peso molecular de 200 kD foi usado, isso totaliza aproximadamente 5 unidades peptídicas conjugadas ao HES (peso molecular da molécula conjugada: 220 kD).

25 A comparação mostrada na figura 33 é baseada em comparação molar da concentração de peptídeo, quer o peptídeo seja conjugado ou não. Surpreendentemente, a potência é crescente (EC50 diminui e a curva de dose/resposta está situada à esquerda do peptídeo não conjugado), desse

modo, demonstrando uma influência farmacodinâmica positiva da conjugação oligovalente a um veículo macromolecular.

Assim - independente dos aperfeiçoamentos farmacocinéticos esperados - o conceito de conjugação de acordo com a invenção aumenta claramente a potência do ingrediente farmacêutico ativo global (API) e, assim, sua eficácia.

Esse é um novo mecanismo, o qual pode ser certamente usado para peptídeos dirigidos ao receptor de EPO, mas potencialmente também para outros alvos farmacológicos membrana-ligados, especialmente outros receptores de citocina, tais como aqueles para trombopoietina, G-CSF, Interleucinas e outros (veja acima).

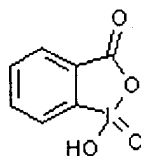
B. Conceitos para conjugação de unidades peptídicas a hidroxietil amido

Conforme esboçado acima, de acordo com uma modalidade, polissacarídeos, tal como hidroxialquil amido e, de preferência, hidroxietil amido, são usados como um veículo polimérico para as unidades peptídicas. De forma a ser capaz de conjugar as unidades peptídicas ao veículo, é possível introduzir grupos de ligação apropriados na molécula de amido de forma a facilitar o acoplamento. De acordo com uma modalidade, grupos amino são introduzidos sobre a parte principal de amido (aqui depois descrito sob o exemplo hidroxietil amido). Existem diferentes estratégias que podem ser seguidas. Três delas são explicadas em maiores detalhes aqui abaixo; uma visão geral sobre esses métodos é fornecida na figura 34.

1. Um processo em duas etapas: grupos aldeído são introduzidos através de oxidação e seguido por aminação reductiva.

A oxidação da molécula de HES pode ser realizada através de vários reagentes de oxidação, por exemplo, periodato de sódio (NaIO_4) e ácido 2-iodoxibenzóico (IBX). A oxidação com NaIO_4 é longa e bem-conhecida e leva a aldeídos através de abertura dos anéis de sacarídeo.

IBX:



pode ser usado estequiometricamente para converter grupos álcool primário em aldeídos sem abertura dos anéis de sacarídeo (veja figura 36, para revisão, veja: V. V. Zhdankin, *Current Organic Synthesis*, 2005, 2, 121-145 e artigos citados). Derivados que são mais solúveis em água são descritos na literatura (Thottumkara, A. P.; Vinod. T. K., *Tetrahedron Lett.*, 2002, 43(4), 569).

De acordo com uma abordagem diferente, o carboidrato (de preferência, uma molécula de amido, tal como HAS) é oxidado através de contato do material de partida contendo o carboidrato (de preferência, uma molécula de amido, tal como HAS) com um reagente que produz um íon de oxoamônio na presença de um agente de oxidação ou através de contato do material de partida diretamente com a espécie reativa, o íon de oxoamônio.

O agente de oxidação é, por exemplo, um agente de oxidação químico, tal como um hipohaleto, por exemplo, hipoclorito e hipobromito de sódio ou peróxido de hidrogênio. Alternativamente, a enzima oxidativa pode ser usada como agente de oxidação (veja, por exemplo, WO 99/23240, aqui incorporado por referência).

O reagente que produz o íon de oxoamônio é, de preferência, um composto de nitroxila, mais preferivelmente um composto de di-terc-nitroxila, tal como 2,2,6,6-Tetrametilpiperidina-1-oxila (TEMPO) ou o respectivo derivado do mesmo. Oxidação com quantidades catalíticas de TEMPO na presença de quantidades estequiométricas de reagente de co-oxidação adequado, isto é, hipoclorito de sódio (NaOCl), leva principalmente à oxidação de grupos álcool primário em aldeídos (veja figura 35, no caso de HES, a posição 6 ou o átomo de C terminal do grupo hidroxietila é convertido a um aldeído) sem abertura dos anéis de sacarídeo (lit: P.L. Bragd, H. van Bekkum, A.C. Besemer, *Topics in Catalysis*, 2004, 27, 1-4; revisão: W. Adam, C. R. Saha-Moller, P. A. Ganeshpure, *Chem. Rev.* 2001, 101, 3499-3548 e artigos citados, A. E. J. de Nooy, A. C. Besemer, H. v. Bekkum, *Carbohydrate Research*, 1995, 269, 89, EP 1 093 467, EP 1 173 409, WO 00/50621, EP 1 077 221, EP 1 149 846).

Alternativamente, ao invés de quantidades catalíticas de TEM-

PO, quantidades estequiométricas das espécies ativas - o composto de oxoamônio - podem ser usadas (lit: J. M. Bobbitt, N. Merbouh, *Organic Syntheses*, 2005, 82, 80). Outros derivados de TEMPO (isto é, 4-acetamido-, 4-hidróxi-TEMPO) são também adequados, especialmente com relação ao pH da reação ou à solubilidade em água.

Após a oxidação, os grupos aldeído obtidos são convertidos em aminas através de aminação redutiva. Como agentes de redução, por exemplo, cianoborohidreto de sódio ou um complexo de borano-dimetilamina (ou outros compostos de borano em complexo) pode ser usado. Como composto de amina, por exemplo, cloreto de amônio ou diaminas, tais como 1,3-diaminopropano, 1,3-diaminopropan-2-ol ou lisina, podem ser, de preferência, usadas em valores de pH ligeiramente ácidos. O uso de diaminas intensifica o comprimento do espaçador entre a parte principal de HES e o fármaco peptídico e o rendimento da aminação redutiva.

Grupos aldeído não convertidos serão reduzidos novamente ao álcool primário de partida.

Uma modificação da oxidação com IBX pode ser feita em DMSO na presença de N-hidróxi-sucinimida (figura 39). Nesse caso, o éster ativado correspondente do ácido urônico é diretamente formado. Essa espécie pode ser diretamente convertida, por exemplo, com diaminas, por exemplo, 1,3-diaminopropano, a um HES aminado (lit: R. Mazitschek, M. M. Ibaier, A. Giannis, *Angew. Chem.* 2002, 114, 21, 4216-4218; A. Schulze, A. Giannis, *Adv. Synth. Catal.* 2004, 346, 252-256).

2. Um processo em duas etapas onde HES é ativado por um agente de "acoplamento" e reagido com excesso de uma amina bisfuncional.

Vários métodos são descritos para a ativação de polissacarídeos, isto é, 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (lit: G. S. Bethell, J. S. Ayers, M. T. W. Hearn, W. S. Hancock, *J. of Chromatography*, 1981, 219, 361-372), epibromoidrina (1-bromo-2,3-epoxipropano, alternativamente, epicloroidrina, respectivamente 1-cloro-2,3-epoxipropano) (lit: H. Döbeli, E. Huchuli, Patente 0253303 B1), cloreto de 2,2,2-trifluoroetano-sulfonila (cloreto de tresila) (lit: H. P. Jennissen, *J. Mol. Recogn.*, 1995, 8, 116-124), bromocianida (BrCN)

(lit: G. S. Bethell, J. S. Ayers, M. T. W. Hearn, W. S. Hancock, *J. of Chromatography*, 1981, 219, 361-372; H. P. Jennissen, *J. Mol. Recogn.*, 1995, 8, 116-124, H. Döbeli, E. Huchuli, Patente EP0253303 B1). Todos os reagentes têm em comum o fato de que eles introduzem grupos funcionais, os quais são altamente reativos e podem ser reagidos em uma segunda etapa com um excesso de nucleófilos bifuncionais, tais como aminas, isto é, cloreto de amônio (não adequado com todos os reagentes de ativação) ou diaminas, isto é, 1,3-diaminopropano, 1,3-diaminopropan-2-ol ou lisina.

5
10 3. Um processo em uma etapa onde HES é ativado através da adição de um precursor de amina adequado.

Precusores de amina adequados são, por exemplo, halogeno-
alquilaminas (isto é, como seus sais, isto é, brometo de bromoetilamônio) ou
aza-anéis reativos, isto é, aziridinas, isto é, L-aziridina-2-carboxilato de lítio.

15 Todas as três estratégias descritas têm em comum que, após a
introdução dos grupos amino no hidroxietil amido, esses grupos amino são
convertidos em maleimidas como um exemplo de um ligante apropriado. Isso
pode ser realizado, por exemplo, através de reação com ácidos ω -
maleimido carboxílicos ativados, isto é, N-hidróxi-succinimida éster de ácido
3-(maleimido)propiónico ou N-hidróxi-succinimida éster de ácido 4-
20 (maleimido)butírico. As maleimidas resultantes representam os grupos fun-
cionais ativos finais para acoplamento com peptídeos que trazem um grupo
tiol livre.

1. Um processo em duas etapas: grupos aldeído são introduzidos através de
oxidação e seguido por aminação redutiva.

25 1.1. Oxidação de álcoois primários em aldeídos

Através de oxidação direta dos álcoois primários em hidroxietil
amido, mais precisamente dos grupos C6-OH da glicose e dos grupos hidro-
xietila, grupos aldeído podem ser formados. Esses produtos da oxidação são
obtidos com agentes de oxidação comercialmente disponíveis, tais como
30 TEMPO ou IBX (por exemplo, Sigma-Aldrich ou Acros).

a) Oxidação com periodato

Esse método é descrito em maiores detalhes na seção experi-

mental sob C (veja abaixo).

b) Oxidação com TEMPO

Usando 2,2,6,6-Tetrametilpiperidina-1-oxila (TEMPO) ou seus derivados, por exemplo, 4-acetamido-TEMPO ou 4-hidróxi-TEMPO e co-oxidantes, tal como hipoclorito de sódio, em uma mistura com brometo de potássio (proporção molar de TEMPO:NaOCl:KBr, por exemplo, 1:40:20), os álcoois primários podem ser oxidados em curtos tempos de reação em torno de 60 min em um tampão de fosfato em uma faixa de pH entre 6-8, pelo que um maior pH aumenta a velocidade de reação. Com uma concentração molar diferente da mistura de oxidação, especialmente do co-oxidante, o número de aldeídos formados pode ser controlado. Conseqüentemente, a quantidade de grupos âncora e, assim, a quantidade de fármaco peptídico sobre o veículo, pode ser controlada através dessa primeira etapa.

A otimização foi monitorada com o reagente de Purpald que forma um aduto púrpura apenas com aldeídos e a titulação redox do hipoclorito restante com um complexo de iodo/amido.

O processamento foi realizado através de técnicas de ultrafiltração usando uma membrana de PES de diferentes cortes de peso molecular, seguido por liofilização (literatura: P.L. Bragd, H. van Bekkum, A.C. Besemer, *Topics in Catalysis*, 2004, 27, 1-4; revisão: W. Adam, C. R. Saha-Moller, P. A. Ganeshpure, *Chem. Rev.* 2001, 101, 3499-3548 e artigos citados; A. E. J. of Nooy, A. C. Besemer, H. v. Bekkum, *Carbohydrate Research*, 1995, 269, 89).

A figura 35 proporciona uma visão geral ilustrativa sobre o mecanismo de oxidação TEMPO-mediada de álcoois primários. Oxidação adicional em carboxilatos ocorre apenas através de uso de um excesso de reagente de oxidação.

c) Oxidação com IBX

Usando o reagente de oxidação ácido 2-Iodoxibenzóico (IBX) ou seus derivados, HES pode ser oxidado em DMSO como solvente. Após um tempo de reação de 1-2 h, o IBX pode ser removido através da adição de água (10 vezes) e o IBX precipitado é removido através de filtração. O pro-

cessamento foi realizado através de técnicas de ultrafiltração usando uma membrana de PES de diferentes cortes de peso molecular, seguido por liofilização.

5 Com uma concentração molar diferente de IBX, o número de aldeídos formados pode ser controlado. Através dessa concentração, a quantidade de grupos âncora e, assim, a quantidade de fármaco peptídico sobre o veículo podem ser controladas também.

A otimização foi monitorada com o reagente de Purpald que forma um aduto púrpura apenas com aldeídos (para uma revisão veja: V. V. Zhdankin, *Current Organic Synthesis*, 2005, 2, 121-145 e artigos citados).

A figura 36 proporciona uma visão esquemática sobre a oxidação de alcóois primários com TEMPO ou IBX, seguido por uma aminação redutiva.

15 A figura 37 ilustra a introdução de grupos maleimida e conjugação com um fármaco peptídico.

1.2 Aminação redutiva

a) Aminação redutiva com cloreto de amônio

Esse método é descrito em maiores detalhes na seção experimental C (veja abaixo).

20 *b) Aminação redutiva com ligante de diamina*

De forma a intensificar o comprimento do espaçador entre a parte principal de HES de um fármaco peptídico e o rendimento da aminação redutiva, a reação de aminação redutiva pode ser realizada com uma diamina, tal como 1,3-diaminopropano, 1,3-diaminopropan-2-ol ou lisina como fonte de amina e diferentes agentes de redução, isto é, cianoborohidreto de sódio ou complexo de borano-dimetilamina.

Exemplo: Aminação redutiva com 1,3-diaminopropano

30 A aminação redutiva do HES oxidado é realizada em um tampão de fosfato a 1 M, pH = 5, com um excesso de 10 vezes de 1,3-diaminopropano, comparado com o agente de oxidação usado na etapa anterior. Após equilíbrio durante aproximadamente 90 min, um excesso de cianoborohidreto de sódio (Na[CN]BH₃) é adicionado em várias porções. O pro-

cessamento foi realizado através de técnicas de ultrafiltração usando uma membrana de PÉS de diferentes cortes de peso molecular, seguido por liofilização. Dos derivados de HES funcionalizados, apenas a faixa de massa molar maior do que 100 kDa foi usada.

- 5 A figura 38 proporciona uma visão geral ilustrativa sobre a aminação redutiva com diaminas, tal como 1,3-diaminopropano, seguido pela introdução dos grupos maleimida, através de, um HES periodato-oxidado.

Oxidação de álcoois primários diretamente em ésteres ativados

- 10 Através de oxidação dos álcoois primários em hidroxietil amido, mais precisamente dos grupos C6-OH da glicose e dos hidroxietila. Para essa oxidação, agentes de oxidação de IBX comercialmente disponíveis (por exemplo, Sigma-Aldrich ou Acros) na presença de N-hidróxi-succinimida (HOSu), o álcool oxidado ao OSu-éster, o qual pode ser diretamente convertido em uma amina usando diaminas.

15 Oxidação com IBX na presença de HOSu - conversão direta à amina

- Usando o reagente de oxidação ácido 2-Iodoxibenzóico (IBX) ou seus derivados na presença de N-hidróxi-succinimida, HES pode ser oxidado em DMSO como solvente. Após 1-2h, a oxidação é o OSu-éster formado em grande excesso (10 vezes) da diamina é adicionado, por exemplo, 1,3-
20 diaminopropano.

- O processamento foi realizado através de técnicas de ultrafiltração usando uma membrana de PÉS de diferentes cortes de peso molecular, seguido por liofilização. Dos derivados de HES otimizados, apenas a faixa de massa molar maior do que 100 kDa foi utilizada (para literatura veja: R.
25 Mazitschek, M. M, Ibaier, A. Giannis, *Angew. Chem.* 2002, 114, 21, 4216-4218; A. Schulze, A. Giannis, *Adv. Synth. Catal.* 2004, 346, 252-256)

A figura 39 ilustra a oxidação de álcoois primários ao OSu-éster, seguido por conversão direta com uma diamina.

2. Um processo em duas etapas onde o HES é ativado por um reagente de
30 "acoplamento" e reagido com um excesso de uma amina bifuncional.

Várias alternativas podem ser aplicadas para introduzir grupos amina sobre a parte principal de HES. Alguns exemplos:

a) *Modificação com carbonildiimidazol (CDI)*

HES seco é suspenso em acetona seca durante 1 h. CDI é adicionado e a mistura é agitada durante 1h. Alternativamente, alguns sais, por exemplo, iodeto de potássio, como ativador/co-nucleófilos podem ser adicionado. O HES é centrifugado (2000 U/min, >10 min). Após decantação, nova acetona é adicionada e o HES é centrifugado novamente. Após 3 vezes lavando com acetona, o HES é captado em tampão de carbonato a 1M, pH 10 e 1,3-diaminopropano (pH de 11) é adicionado e a mistura foi agitada durante 1h. O HES é processado através de ultracentrifugação (MWCO 100 kD), seguido por liofilização.

A figura 40 ilustra a modificação com carbonildiimidazola, seguido por uma diamina para introduzir um grupo amina.

b) *Modificação com epibromoidrina (Epi)*

HES é dissolvido em alguma DMF e epibromoidrina é adicionada (alternativamente, alguns sais, por exemplo, iodeto de potássio, como ativador/co-nucleófilos também podem ser adicionados) e a mistura é agitada durante a noite. O HES é diluído com água (10 vezes) e processado através de ultracentrifugação (MWCO 50 ou 100 kD), seguido por liofilização. O produto é dissolvido em tampão de fosfato a 1M, pH = 7 e 1,3-diaminopropano é adicionado e a mistura é agitada durante 1 h. O HES é processado através de ultracentrifugação (MWCO 50 ou 100 kD), seguido por liofilização.

A figura 41 ilustra a modificação com epibromoidrina, seguido por uma diamina para introduzir um grupo amina.

3. Um processo em uma etapa onde HES é ativado através da adição de um precursor de amina adequado.

a) *Modificação com bromidrato de brometo de 2-aminoetila*

HES é dissolvido em DMSO e bromidrato de brometo de 2-bromoetilamina é adicionado (alternativamente, alguns sais, por exemplo, iodeto de potássio, como ativador/co-nucleófilos também podem ser adicionados) e agitado durante a noite (também, algum aquecimento pode ser usado). O HES é diluído com água (10 vezes) e processado através de ultracentrifugação (MWCO 50 ou 100 kD), seguido por liofilização.

A figura 42 ilustra a modificação com bromidrato de brometo de 2-aminoetila para introduzir um grupo amina.

b) Modificação com L-aziridina-2-carboxilato de lítio

5 HES é dissolvido em DMSO ou uma solução aquosa tamponada e L-aziridina-2-carboxilato de 2-lítio é adicionado (alternativamente, alguns sais, por exemplo, iodeto de potássio, como ativador/co-nucleófilos também podem ser adicionados) e agitado durante a noite. A mistura é diluída com água (10 vezes) e processada através de ultracentrifugação (MWCO 50 ou 100 kD), seguido por liofilização.

10 A figura 43 ilustra a modificação com L-aziridina-2-carboxilato de lítio para introduzidos um grupo amina.

C. Exemplos detalhados de modalidades da presente invenção

I. Síntese peptídica de monômeros

Síntese Manual

15 A síntese é realizada através de uso de um sistema de microondas Discover (CEM) usando Resina de Amida de Rink-PL (taxa de substituição de 0,4 mmol/g) ou Resinas de Wang pré-carregadas em uma escala de 0,4 mmol. Remoção do grupo Fmoc é obtida através da adição de 30 ml de piperidina/DMF (1:3) e irradiação com 100 W durante 3 x 30 seg. Acoplamento de aminoácidos é obtido através da adição de um excesso de 5 vezes de aminoácido em DMF PyBOP/HOBT/DIPEA como aditivos de acoplamento e irradiação com 50 W durante 5 x 30 seg. entre todos os ciclos de irradiação, a solução é esfriada manualmente com o auxílio de um banho de gelo. Após desproteção e acoplamento, a resina é lavada 6 vezes com 30 ml de 20 DMF. Após desproteção do último aminoácido, alguns peptídeos são acetilados através de incubação com 1,268 ml de solução de revestimento (4,73 ml de anidrido acético e 8,73 ml de DIEA em 100 ml de DMSO) durante 5 minutos. Antes de clivagem, a resina é, então, lavada 6 vezes com 30 ml de 25 DMF e 6 vezes com 30 ml de DCM. Clivagem dos peptídeos brutos é obtida 30 através de tratamento com 5 ml de TFA/TIS/EDT/H₂O (94/1/2,5/2,5) durante 120 minutos sob atmosfera inerte. Essa solução é filtrada em 40 ml de éter gelado. O precipitado é dissolvido em acetonitrila/água (1/1) e o peptídeo é

purificado através de RP-HPLC (Kromasil 100 C18 10 μm , 250 x 4,6 mm).

Síntese automática

A síntese é realizada através de uso de um sistema de microondas Odyssey (CEM) usando Resinas de Amida de Rink-PL (taxa de substituição de 0,4 mmol/g) ou Resinas de Wang pré-carregadas em uma escala de 5 0,25 mmol. Remoção de grupos Fmoc é obtida através da adição de 10 ml de piperidina/DMF (1:3) e irradiação com 100 W durante 10 x 10 seg. Acoplamento de aminoácidos é obtido através da adição de um excesso de 5 vezes de aminoácido em DMF PyBOP/HOBT/DIPEA como aditivos de acoplamentos e irradiação com 50 W durante 5 x 30 seg. Entre todos os ciclos de irradiação, a solução é esfriada borbulhando-se nitrogênio através da mistura de reação. Após desproteção e acoplamento, a resina é lavada 6 vezes com 10 ml de DMF. Após desproteção do último aminoácido, alguns 10 peptídeos são acetilados através da incubação com 0,793 ml de solução de revestimento (4,73 ml de anidrido acético e 8,73 ml de DIEA em 100 ml de DMSO) durante 5 minutos. Antes de clivagem, a resina é, então, lavada 6 vezes com 10 ml de DMF e 6 vezes com 10 ml de DCM. Clivagem dos peptídeos brutos é obtida através de tratamento com 5 ml de TFA/TIS/EDT/H₂O 15 (94/1/2,5/2,5) durante 120 minutos sob uma atmosfera inerte. Essa solução é filtrada em 40 ml de éter gelado, o precipitado dissolvido em acetonitrila/água (1/1) e o peptídeo é purificado através de RP-HPLC (Kromasil 100 C18 10 μm , 250 x 4,6 mm). 20

Purificação

Todos os peptídeos foram purificados usando um sistema Nebula-LCMS (Gilson). O material bruto de todos os peptídeos foi dissolvido em 25 acetonitrila/água (1/1) e o peptídeo purificado através de RP-HPLC (Kromasil 100 C18 10 μm , 250 x 4,6 mm). A taxa de fluxo era de 20 ml/min e a proporção de divisão em LCMS de 1/1000.

II. Formação de ligações em ponte de dissulfeto intramolecular

30 Ciclização com K₃[(FeCN₆)]

Solução 1: 10 mg do peptídeo são dissolvidos em TFA a 0,1%/acetonitrila e diluídos com água até que uma concentração de 0,5

mg/ml seja atingida. Bicarbonato de amônio sólido é adicionado para atingir um pH de ap. 8.

5 Solução 2: Em um segundo frasco, 10 ml de TFA a 0,1%/acetonitrila são diluídos com 10 ml de água. Bicarbonato de amônio sólido é adicionado até que um pH de 8 seja atingido e 1 gota de uma solução a 0,1M de $K_3[(FeCN)_6]$ é adicionada.

10 Solução 1 e 2 são adicionadas gota a gota durante um período de 3 horas até que uma mistura de acetonitrila/água (1/1; pH = 8). A mistura é incubada em temperatura ambiente durante a noite e a mistura concentrada e purificada através de LCMS.

Ciclização com resina CLEAR-OX[®]

15 A 100 ml de acetonitrila/água (1/1; TFA a 0,1%), bicarbonato de amônio sólido é adicionado até um pH de 8 ser atingido. Essa solução é desgaseificada borbulhando-se argônio durante 30 minutos. Agora, 100 mg de resina CLEAR-OXTM são adicionados. Após 10 minutos, 10 mg do peptídeo são adicionados como um sólido. Após 2 h de incubação, a solução é filtrada, concentrada e purificada através de LCMS.

Purificação de peptídeos cíclicos:

20 Todos os peptídeos foram purificados usando um sistema Nebula-LCMS (Gilson). O material bruto de todos os peptídeos foi dissolvido em acetonitrila/água (1/1) ou DMSO e o peptídeo foi purificado através de RP-HPLC (Kromasil 100 C18 ou C8 10 μ m, 250 x 4,6 mm). A taxa de fluxo era de 20 ml/min e a proporção de divisão em LCMS de 1/1000.

III. Ensaio *in vitro* com monômeros

25 Ensaio de proliferação com células TF-1 através de incorporação de BrdU

30 Células TF-1 na fase de crescimento logarítmico ($\sim 2,10^5 - 1,10^6$ células/ml; meio RPMI; soro fetal de bezerro a 20%; suplementado com Penicilina, estreptomicina, L-Glutamina; 0,5 ng/ml de Interleucina 3) são lavadas (centrifugar 5 min. a 1500 rpm e ressuspender em RPMI completo sem IL3 a 500.000 células/ml) e pré-cultivadas antes de início do ensaio durante 24 h sem IL-3. No dia seguinte, as células são cultivadas em lâminas com 24- ou 96-cavidades usando pelo menos 6 concentrações e 4 cavidades por

concentração contendo pelo menos 10.000 células/cavidade por agente a ser testado. Cada experimento inclui controles compreendendo EPO recombinante como um agente de controle positivo e cavidades sem a adição de citocina como um agente de controle negativo. Peptídeos e controles de EPO são pré-diluídos em meio até a concentração desejada e adicionados às células, começando um período de cultura de 3 dias sob condições padrões de cultura (37°C, 5% de dióxido de carbono na fase gasosa, atmosfera saturada com água). As concentrações sempre se referem à concentração final de agitação na cavidade durante esse período de cultura de 3 dias. Ao final desse período de cultura, FdU é adicionado até uma concentração final de 8 ng/ml de meio de cultura e a cultura continuada durante 6 horas. Então, BrdU (bromodeoxiuridina) e dCd (2-deoxicidina) são adicionados às suas concentrações finais (10 ng/ml de BrdU; 8 ng/ml de dCD; concentrações finais em meio de cultura) e a cultura continuada durante mais 2 horas.

Ao final desse período de incubação e cultura, as células são lavadas uma vez em solução salina tamponada com fosfato contendo BSA a 1,5% e ressuspensas em uma quantidade mínima de líquido. A partir dessa suspensão, as células são adicionadas gota a gota em etanol a 70% a -20°C. Daí, as células são incubadas durante 10 min sobre gelo e, então, analisadas diretamente ou podem ser armazenadas a 4°C antes de análise.

Antes de análise, as células são peletizadas através de centrifugação, o sobrenadante é descartado e as células ressuspensas em uma quantidade mínima de fluido restante. As células são, então, suspensas e incubadas durante 10 min. em 0,5 ml de HCl a 2 M/triton X-100 a 0,5%. Então, elas são peletizadas novamente e ressuspensas em uma quantidade mínima de fluido restante, o qual é diluído com 0,5 ml de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ a 0,1 N, pH de 8,5 antes de repeletização direto das células. Finalmente, as células são ressuspensas em 40 μl de solução salina tamponada com fosfato (BSA a 1,5%) e divididas em dois tubos de reação contendo 20 μl de suspensão de célula cada. 2 μl de anti-BrdU-FITC (DAKO, clone Bu20a) são adicionados a um tubo e 2 μl de mIgG1-FITC de controle (Sigma) são adicionados ao segundo tubo, começando um período de incubação de 30 min em tempera-

tura ambiente. Então, 0,4 ml de solução salina tamponada com fosfato e 10 µg/ml de iodeto de propídio (concentração final) são adicionados. Análise no citômetro de fluxo se refere à fração de células 4C ou células com maior ploidia e à fração de células BrdU-positivas, assim, determinando a fração de células nos estágios relevantes do ciclo celular.

Ensaio de proliferação com células TF-1 através de MTT

Células TF-1 na fase de crescimento logarítmico ($\sim 2,10^5 - 1,10^6$ células/ml; meio RPMI; soro fetal de bezerro a 20%; suplementado com Penicilina, estreptomicina, L-Glutamina; 0,5 ng/ml de Interleucina 3) são lavadas (centrifugar 5 min. a 1500 rpm e ressuspender em RPMI completo sem IL3 a 500.000 células/ml) e pré-cultivadas antes do ensaio durante 24 h sem IL-3. No dia seguinte, as células são cultivadas em lâminas com 24- ou 96-cavidades usualmente usando pelo menos 6 concentrações e 4 cavidades por concentração contendo pelo menos 10.000 células/cavidade por agente a ser testado. Cada experimento inclui controles compreendendo EPO recombinante como um controle positivo e cavidades sem adição de citocina como agente de controle negativo. Peptídeos e controles de EPO são pré-diluídos em meio até as concentrações desejadas e adicionados às células, começando um período de cultura de 3 dias sob condições padrão de cultura (37°C, 5% de dióxido de carbono na fase gasosa, atmosfera saturada com água). As concentrações sempre se referem à concentração inicial de agente na cavidade durante esse período de cultura de 4 dias.

No dia 4, antes de início da análise, uma série de diluição de um número conhecido de células TF-1 é preparada em uma série de cavidades (0/2500/5000/10000/20000/50000 células/cavidade em 100 µl de meio). Essas cavidades são tratadas da mesma forma que as cavidades de teste e depois fornecida uma curva de calibração da qual números de célula podem ser determinados. Tendo ajustado essas cavidades de referência, MTS e PMS do kit de proliferação de MTT (Promega, ensaio de proliferação de células não-radioativo CellTiter 96 Aqueous) são descongelados em um banho de água a 37°C e 100 µl de solução PMS são adicionados a 2 ml de solução MTS. 20 µl dessa mistura são adicionados a cada cavidade das lâminas de

ensaio e incubados a 37°C durante 3-4 h. 25 µl de dodecil sulfato de sódio a 10% em água são adicionados a cada cavidade antes de medição de E492 em um leitor ELISA.

5 Usando avaliações gráficas, conforme mostrado nas figuras 17 e 18 baseado e cálculos da relação de dose-resposta usando o programa GraphPad, os seguintes valores de EC₅₀ foram determinados com base nos dados de ensaio MTT.

A tabela a seguir mostra os valores de EC₅₀ de alguns monômeros peptídicos exemplificativos:

10	SEQ ID NO 2:	GGTYSCHFGKLTWVCKKQGG	3284 nmols/l
	SEQ ID NO 4:	GGTYSCHFGKLTWVCKPQGG	4657 nmols/l
	SEQ ID NO 5:	GGTYSCHFGRLTWVCKPQGG	5158 nmols/l
	SEQ ID NO 6:	GGTYSCHFGRLTWVCKKQGG	4969 nmols/l
	SEQ ID NO 7:	GGTYSCHF-(AIs)-LTWVCKPQGG	5264 nmols/l
15	SEQ ID NO 8:	GGTYSCHF-(AIs)-LTWVCKKQGG	4996 nmols/l
		GGTYSCHFGPLTWVCKKQGG	2518 nmols/l
		GGTYSCHFAKLTWVCKKQGG	5045 nmols/l
		GGTYSCHFGGLTWVCKPQGG	sem atividade detectável

IV. Síntese de unidades peptídicas miméticas de EPO bivalentes

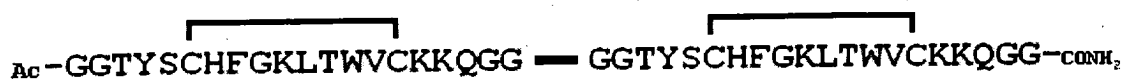
20 Síntese automática de SEQ ID NO 11 linear (AGEM11)

A síntese é realizada através de uso de um sistema de microondas Liberty (CEM) usando Resina de Amida de Rink (taxa de substituição de 0,19 mmol/g) em uma escala de 0,25 mmol. Remoção de grupos Fmoc é obtida através de tratamento duplo com 10 ml de piperidina/DMF (1:3) e irradiação com 50 W durante 10 x 10 seg. Acoplamento de aminoácidos é obtido através de tratamento duplo com um excesso de 4 vezes de aminoácido em DMF PyBOP/HOBT/DIPEA como aditivos de acoplamento e irradiação com 50 W durante 5 x 30 seg. Entre todos os ciclos de irradiação, a solução é esfriada borbulhando-se nitrogênio através da mistura de reação. Após desproteção e acoplamento, a resina é lavada 6 vezes com 10 ml de DMF. Após o ciclo de duplo acoplamento, todos os grupos amino não reagidos são bloqueados através de tratamento com um excesso de 10 vezes de N-(2-

Clorobenziloxicarbonilóxi) succinimida (solução a 0,2 M em DMF) e irradiação com 50 W durante 3 x 30 seg. Após desproteção do último aminoácido, o peptídeo é acetilado através de incubação com 0,793 ml de solução de revestimento (4,73 ml de anidrido acético e 8,73 ml de DIEA em 100 ml de DMSO) durante 5 minutos. Antes de clivagem, a resina é, então, lavada 6 vezes com 10 ml de DMF e 6 vezes com 10 ml de DCM. Clivagem dos peptídeos brutos é obtida através de tratamento com 5 ml de TFA/TIS/EDT/H₂O (94/1/2,5/2,5) durante 120 minutos sob uma atmosfera inerte. Essa solução é filtrada em 40 ml de éter gelado, o precipitado dissolvido em acetonitrila/água (1/1) e o peptídeo é purificado através de RP-HPLC (Kromasil 100 C18 10 µm, 250 x 4,6 mm).

O esquema de purificação de AGEM11 linear, Kromasil 100 C18 10 µm, 250 x 4,6 mm e o gradiente usado, portanto, são representados nas figuras 8 e 9 a partir de acetonitrila a 5% a 50% (TFA a 0,1%) em 50 minutos.

Ciclização de AGEM11 linear



30 mg do peptídeo linear são dissolvidos em 60 ml de solução A. Essa solução e 60 ml de DMSO são adicionados, gota a gota, a 60 ml de solução A (tempo total para adição: 3 h). Após 48 h, os solventes são removidos através de evaporação e o resíduo restante dissolvido em 30 ml de DMSO/água (1/1). 30 ml de ácido acético e 17 mg de iodo (dissolvido em DMSO/água (1/1) são adicionados e a solução é misturada durante 90 minutos em temperatura ambiente. Após o que, 20 mg de ácido ascórbico são adicionados e os solventes são removidos através de evaporação. A mistura bruta é decomposta em acetonitrila/água (2/1) e o peptídeo é purificado através de RP-HPLC (Kromasil 100 C18 10 µm, 250 x 4,6 mm).

Solução A: Acetonitrila/água (1/1) contendo TFA a 0,1%. O pH é ajustado para 8,0 através da adição de bicarbonato de amônio.

Os parâmetros de purificação para AGEM11 cíclico são fornecidos nas figuras 10 e 11 (esquema: Purificação de AGEM11 cíclico, Kromasil

100 C18 10 μm , 250 x 4,6 mm, gradiente de acetonitrila a 5% a 35% (TFA a 0,1%) em 50 minutos).

V. Ensaio de proliferação *in vitro* para determinar a atividade de EPO

5 Células TF1 na fase de crescimento logarítmico ($2,10^5$ - $1,10^6$ células/ml crescidas em RPMI com soro fetal de bezerro a 20% (FCS) e 0,5 ng/ml de IL-3) foram contadas e o número de células necessário para realizar um ensaio foi centrifugado (5 min. 1500 rpm) e ressuspensão em RPMI com FCS a 5% sem IL-3 a 300 000 células/ml. As células foram pré-cultivadas nesse meio (privação) sem IL-3 durante 48 horas. Antes de començar o ensaio, as células foram contadas novamente.

15 Exatamente antes de iniciar o ensaio, soluções de estoque de peptídeos e EPO foram preparadas. Peptídeos foram pesados e dissolvidos em RPMI com FCS a 5% até uma concentração de 1 mM, 467 μM ou 200 μM . Soluções de estoque de EPO estavam a 10 nM ou 20 nM. Duzentos e noventa e dois μl dessas soluções de estoque foram pipeteados em uma cavidade de uma lâmina de cultura com 96 cavidades - uma lâmina foi tomada para cada substância a ser testada. Duzentos μl de RPMI com FCS a 5% foram pipeteados em dezessete outras cavidades em cada lâmina. Os conteúdos foram misturados e 92 μl dessa cavidade foram transferidos para a seguinte e assim por diante. Dessa forma, uma série de diluições (18 diluições) de cada substância foi preparada, de modo que, em cada cavidade consecutiva, a concentração fosse de $1:\sqrt{10}$ da concentração na cavidade antes dessa. De cada cavidade, 3 x 50 μl foram transferidos para três cavidades vazias. Dessa forma, cada concentração de substância foi medida em quadruplicata. Note que a linha de cavidades mais acima e mais abaixo de cada lâmina foi deixada vazia.

25 Células pré-tratadas (privadas) foram centrifugadas (5 min. 1500 rpm) e ressuspensas em RPMI com FCS a 5% em uma concentração de 200 000 células por ml. Cinquenta μl de suspensão de célula (contendo 10 30 000 células) foram adicionados a cada cavidade. Note que, em virtude da adição das células, a concentração final das substâncias nas cavidades era metade da faixa de diluição original. As lâminas foram incubadas durante 72

h a 37°C em 5% de CO₂.

Antes de começar a avaliação, uma faixa de diluição de quantidades conhecidas de células TF-1 em cavidades foi preparada: 0/2500/5000/10000/20000/50000 células/cavidade foram pipeteados (em
5 100 µl de RPMI + FCS a 5%) em quadruplicata.

Para medir o número de células vivas por cavidade, reagente MTT pronto para uso (Promega, CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay) foi descongelado em um banho de água a 37°C. Por cavidade, 20 µl de reagente MTT foram adicionados e as lâminas foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ durante mais 1-2 h. Vinte e cinco µl de uma solução de SDS a 10% foram adicionados e as lâminas foram medidas em um
10 leitor ELISA (Genios, Tecan). Os dados foram processados em planilhas (Excel) e plotados no Graphpad.

Os dados são resumidos na figura 12.

15 ED50 (nM):

EPO 0,0158

BB49 (monomero, SEQ. ID NO 2) 4113

AGEM11 (bivalente) 36,73

20 VI. Ensaio de peptídeo prolongados

Em um ensaio prolongado, aproximadamente 200 seqüências peptídicas foram testadas com relação à sua atividade mimética de EPO.

Os peptídeos foram sintetizados como amidas peptídicas sobre um sistema sintetizador LIPS-Vario. A síntese foi realizada em lâminas de síntese MTP especiais, a escala sendo de 2 µmoles por peptídeo. A síntese
25 seguiu o protocolo padrão com Fmoc usando HOBT como reagente ativador. As etapas de acoplamento foram realizadas como acoplamento 4 vezes. Cada etapa de acoplamento levou 25 min e o excesso de aminoácido por etapa era de 2,8. A clivagem e desproteção dos peptídeos foram feitas com
30 uma solução de clivagem contendo TFA a 90%, TIPS a 5%, H₂O a 2,5% e DTT a 2,5%. A lâmina de síntese contendo o peptídeo final preso à resina foi armazenada por cima de uma lâmina profunda com 96 cavidades. 50 µl da solução de clivagem foram adicionados a cada cavidade e a clivagem foi

realizada durante 10 min, esse procedimento sendo repetido três vezes. O peptídeo clivado foi eluído com 200 µl de solução de clivagem através de fluxo por gravidade na lâmina com cavidade profunda. A desproteção de função da cadeia lateral foi realizada durante mais 2,5 h dentro da lâmina com cavidade profunda. Após o que, o peptídeo foi precipitado com é-
5 ter/hexano gelado e centrifugado. Os peptídeos foram decompostos em solução aquosa neutra e a ciclização foi incubada durante a noite a 4°C. Os peptídeos foram liofilizados.

A figura 19 proporciona uma visão geral sobre os monômeros
10 peptídicos sintetizados e de teste.

Os peptídeos foram testados com relação à sua atividade mimética de EPO em um ensaio de proliferação *in vitro*. O ensaio foi realizado conforme descrito sob V. Em cada dia do ensaio, 40 lâminas de microtitulação foram preparadas para medição da atividade *in vitro* de 38 peptídeos de
15 teste, 1 exemplo de referência e EPO em paralelo. Soluções de estoque de EPO estavam a 20 nM.

Os resultados são fornecidos na figura 19. Conforme pode ser observado a partir dos resultados, os peptídeos de teste que não preenchem o consenso da presente invenção não representam atividade mimética de
20 EPO.

VII. Síntese dos conjugados de peptídeo-HES usando oxidação com periodato

O esquema de reação inicial é representado na figura 21.

O objetivo do método descrito é a produção de um derivado de
25 amido, de acordo com esse exemplo HES, o qual reage seletivamente com grupos tiol sob condições de reação aquosa suave. Essa seletividade é obtida com grupos maleimida.

HES é funcionalizado primeiro com grupos amino e convertido, após o que, ao respectivo derivado de maleimida. As bateladas de reação
30 foram liberadas dos reagentes de baixo peso molecular via membranas de ultrafiltração. O produto, os produtos intermediários, bem como os edutos, são todos polidispersos.

Síntese de HES modificado

Hidroxietil amido (Voluven® 130/0,4 ou Serumwerk Bernburg 200/0,5) foi obtido via diafiltração e subsequente liofilização. O peso molecular médio era de aproximadamente 130 kDa, com um grau de substituição molar de 0,4, respectivamente, 200kD, MS = 0,5.

A síntese foi realizada de acordo com a síntese descrita para amino dextrano na dissertação de Jacob Piehler, "Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern", 1997, aqui incorporado por referência. HES foi ativado através de oxidação parcial seletiva dos grupos hidroxila diólicos em grupos aldeído com periodato de sódio, conforme descrito em Floor e outros (1989). Os grupos aldeído foram convertidos via aminação redutiva com cianoborohidreto de sódio (NaCNBH₃) na presença de amônia em grupos amino (Yalpani e Brooks, 1995).

1.1 Oxidação de álcoois primários em aldeídos

a) Oxidação/abertura com periodato

Através de uma oxidação suave dos 1,2-dióis no sacarídeo através de periodato de sódio em água, grupos aldeído são introduzidos. Usando diferentes concentrações molares do agente de oxidação, o número de grupos âncora disponíveis e, assim, a quantidade de fármaco de peptídeo sobre o veículo pode ser controlada. Para otimizar o protocolo, a oxidação foi monitorada com o reagente de Purpald, que forma um aduto púrpura apenas com aldeídos. O tempo de reação pode ser reduzido para 8-18 h. A quantidade usada de periodato representa 20% do número de blocos de construção de glicose (aplicando uma massa do bloco de construção de glicose de 180 g/mol, DS = 0,4). O processamento foi realizado via ultra filtração e liofilização. A purificação de cada produto polimérico foi realizada através de técnicas de ultrafiltração usando uma membrana de PÉS de diferentes cortes de peso molecular, seguido por liofilização. Dos derivados de HES otimizados, apenas a faixa de massa molar maior do que 100 kDa foi usada.

Análise de aldeído

Qualitativa/Semiquantitativa: Reação de Purpald dos grupos aldeído dispo-

níveis

1.2 Aaminação redutiva

a) Aaminação redutiva com cloreto de amônio

Na etapa seguinte, os grupos aldeído introduzidos foram conver-
5 tidos em aaminas através de uma aaminação redutiva em uma solução satura-
da de cloreto de amônio em um valor de pH ligeiramente ácido com cianobo-
rohidreto de sódio.

Para otimizar o protocolo, os grupos aldeído do material de par-
tida foram acompanhados através do reagente de Purpald e as aaminas for-
10 madas com TNBS. Esses experimentos mostraram que a formação do in-
termediário de imina está em equilíbrio após um período inicial e o agente de
redução adicionado prefere as iminas com relação ao aldeído. Assim, pode
ser descoberto que a reação ótima é realizada através de várias adições do
agente de redução com um tempo total de reação de 24 h.

15 Processamento via precipitação do produto ou ultrafiltração.

Análise de Amina

Qualitativa: reação com niidrina (teste de Kaiser)

Quantitativa: com ácido 2,4,6-trinitrobenzol sulfônico (TNBS) em
comparação com uma amino dextrano.

20 O grau de substituição obtido estava em torno de 2,8%. Isso re-
sulta em uma massa molar de um bloco de construção trazendo um grupo
amino de aproximadamente 6400 g/mol.

Síntese de maleimidopropionil-amino-hidroxietyl amido ("MaIPA-HES")

25 Após os grupos amino serem introduzidos (existem diversas es-
tratégias diferentes, por exemplo, veja acima), o grupo âncora de maleimida
é introduzido com N-hidróxi-succinimida ésteres de ácido alquil (ou aril) α -
maleimido.

Síntese

30 A introdução final dos grupos maleimida no HES é realizada com
N-hidróxi-succinimida éster de ácido 3-maleimidopropiônico (MaIPA-OSu).
Quando usando um excesso (5 a 10 vezes) em um tampão ligeiramente áci-
do, a conversão é quantitativa (tampão de fosfato a 50 mM, pH de 6 ou 7,

DMF a 20%, durante a noite). O produto ultrafiltrado e liofilizado é armazenado a -18°C .

Análise

5 A reação do grupo amino foi verificada com niidrina e TNBS. O número de grupos maleimida introduzidos é demonstrada através de reação de glutathione (GSH) e detecção de grupos tiol em excesso com reagente de Ellmans (DNTB) e via espectroscopia a $700\text{ MHz-}^1\text{H-RMN}$.

10 O grau de substituição obtido estava em torno de 2 % e corresponde a 8500 g/mol por bloco de construção de maleimida (180 g/mol em massa de bloco de construção de glicose, $MS = 0,4$).

15 A figura 22 mostra um espectro por $^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 700 MHz) de HES maleimida-modificado. A proporção dos prótons de maleimida ($6,8\text{ ppm}$) para C-H anomérico ($4,8\text{-}5,6\text{ ppm}$) proporciona um tamanho do bloco de construção de aproximadamente 6.900g/mol (em comparação: o teste com GSH/DNTB proporcionou 7.300g/mol).

20 O número de grupos maleimida e, assim, o tamanho do bloco de construção, pode ser medido através de saturação com GSH e reação com DNTB. A cor amarela formada é significativa e pode ser facilmente quantificada. Esses valores proporcionam tamanhos confiáveis do bloco de construção em entre 5.000 e 100.000 g/mol , dependendo do material de partida usado, respectivamente, da quantidade de periodato na etapa de oxidação. Esse método foi validado através de espectroscopia por $^1\text{H-RMN}$ do produto. Na RMN, o teor de grupos maleimida pode ser quantificado a partir da proporção de todos os sinais anoméricos de C-H e dos prótons do anel de maleimida.

Quantidade de periodato (1^{a} etapa) (eq)	Tamanhos de blocos de construção de maleimida (g/mol)
0,01-0,03	> 55.000
0,02-0,04	~ 35.000-50.000
0,04-0,1	~ 15.000-35.000
0,1-0,3	~ 6.000-7.000

25 Tabela 1: Exemplos para o tamanho do bloco de construção virtual obtível do grupo âncora na parte principal de HES via a oxidação com periodato.

Conjugado de peptídeo-hidroxiethyl amido (Pep-AHES)

Síntese

Um peptídeo contendo cisteína foi usado, o qual tinha um N-término (Pep-IA) ou um (Pep-IB) biotilado livre. Uma mistura a 4:1 de Pep-IA/B foi convertida durante a noite em excesso (aprox. 6 equivalentes com MaIPA-HES em tampão fosfato, 50 mM, pH de 6,5/DMF a 80:20; processamento ocorreu com ultrafiltração e liofilização.

Análise

A absorção de UV foi determinada a 280 nm e o teor restante de grupos maleimida foi determinado com GSH/DNTB.

O rendimento de peptídeo foi quase quantitativo. Quase nenhum grupo maleimida livre era detectável.

Para a conjugação do peptídeo/fármaco, um domínio de peptídeo:

15 Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKKQRG-Am (BB68)

é usado para criação de uma unidade peptídica através de introdução de um grupo tiol livre (por exemplo, através de introdução de um resíduo de cisteína no N-término) como em:

20 Ac-C(tBu)-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKKQRG-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKKQRG-Am (AGEM40)

um excesso de 10-50% do peptídeo desprotegido é conjugado em um tampão ligeiramente ácido durante 1-2 h. As condições foram otimizadas para assegurar, por um lado, que a parte principal de HES, os grupos maleimida e as ligações em ponte de dissulfeto são estáveis e, por outro lado, observar uma conversão quantitativa. Usando diferentes compostos de HES maleimida-funcionalizados, a AplaGen pôde sintetizar uma série de peptídeos miméticos de EPO supravaleantes os quais mostraram um efeito supravaleante *in vitro*. Alguns exemplos são fornecidos abaixo.

Peptídeo mimético de EPO supravalente sobre HES	Grupos maleimida em tamanhos do bloco de construção (g/mol)	Teor teórico de peptídeo (%)	Teor experimental de peptídeo (%)
AGEM40-HES A2	7,300	39	37
AGEM40-HES A3	16,000	23	22
AGEM40-HES A4	44,000	10	10

Tabela 2: Conjugados de peptídeo mimético de EPO supravalentes de AGEM40 com diferentes teores de peptídeo.

5 Uma análise química fácil dos conjugados de peptídeo mimético de EPO supravalente foi realizada em duas etapas. Primeiro, o teor de peptídeo foi quantificado através de HPLC após uma leve hidrólise da parte principal de HES e, segundo, a quantidade de polissacarídeo foi medida através de um teste colorimétrico com fenol após uma hidrólise completa através de ácido sulfúrico.

10 A figura 23 mostra um cromatograma por HPLC (Shimadzu HPLC) da hidrólise de TFA/água dos conjugados de peptídeo mimético de EPO supravalentes AGEM40-AHES A2. Após um determinado tempo, a absorvância por UV de todas as espécies contendo peptídeo é constante em um valor máximo e, através de comparação com o peptídeo livre, um teor de peptídeo de 37% pode ser calculado (valor teórico: 39%).

VIII. Outros experimentos *in vitro*

Muitos dos experimentos descritos abaixo já foram descritos acima. Contudo, os detalhes a seguir proporcionam uma visão geral resumida sobre os testes descritos e resultados. Predominantemente, a cultura de células humanas e ensaios de medula óssea são discutidos.

20 Por um lado, ensaios rápidos baseados em linhagem celular foram usados para verificar a potência de seqüências peptídicas otimizadas por todos os estágios de otimização. Esses ensaios de cultura de células ainda são válidos como testes rápidos de eficácia de um novo peptídeo ou
25 uma nova batelada. Os dois *endpoints*, os quais foram usados para a linha-

gem de células TF-1 (células humanas) são proliferação (aqui usualmente determinada como o número de células vivas em pontos de tempo definidos) e diferenciação, como produção acentuada de hemoglobina em células TF-1.

- 5 Além disso, células primárias (células-tronco de medula óssea humana) foram usadas para ensaios de CFU, os quais são muito próximos da situação *in vivo*. Elas proporcionam respostas à atividade eritropoiética no caso do uso de peptídeos miméticos de EPO como unidades peptídicas de um modo muito mais semelhante ao *in vivo*. Contudo, elas têm de ser manipuladas de modo mais sofisticado e precisam de mais tempo por ensaio do que os ensaios de cultura de células.

Ensaio usando células TF-1 humana

- TF-1 é uma linhagem de células de eritroleucemia humana que prolifera apenas em resposta a determinadas citocinas, tais como IL3 ou EPO. Além disso, células TF-1 podem diferenciar entre um fenotipo eritróide em resposta à EPO. Células TF-1 foram obtidas da DSMZ (Braunschweig, Alemanha). Uma folha de produto está disponível no web site da DSMZ, dsmz.de. TF-1 é a linhagem de células recomendada para avaliação de atividade de EPO pela Farmacopéia Européia.

- 20 O protocolo de cultura interna para manutenção de cultura:

Meio: RPMI + P/S + AmphoB + L-Glut.+ FCS a 20% + h-IL-3

1. - 500 ml de RPMI + 5 ml de P/S + 5 ml de AmphoB
2. - 200 ml de RPMI + PS/AmphoB+ 2,5 ml de L-Glutamina + 50 ml de FCS = meio completo (1 mês a 4°C)
- 25 3. - 45 ml de meio completo + 22,5 ul de h-IL-3 (1 semana a 4°C)

Cultura: Manter entre 200.000 e 1.000.000 células/ml durante 3 dias a 2×10^5 /ml

- Durante 2 dias a 3×10^5 /ml
- Durante 1 dia a 5×10^5 /ml

30 Design de um ensaio de proliferação TF-1

Em um ensaio de proliferação TF-1, células TF-1 são semeadas e cultivadas durante vários dias em concentrações variadas de EPO ou pep-

tídeos miméticos de EPO em uma lâmina com múltiplas cavidades.

Para resultados ótimos, células TF-1 deverão ser cultivadas durante dois dias na ausência de qualquer citocina (privação) antes de iniciar o ensaio. Três dias após começar o ensaio, proliferação celular é medida indiretamente através de avaliação do número de células viáveis.

Um reagente de tetrazólio, denominado MTS, é adicionado, o qual é reduzido para formazano colorido. Essa reação depende de NADH e NADPH, em outras palavras, depende de atividade mitocondrial. A quantidade de formazano é medida espectrofotometricamente. Usando uma faixa de números de células conhecidos para calibração, é possível determinar o número absoluto de células viáveis, presentes sob cada condição. O principal design é também ilustrado na figura 24.

A atividade de um determinado agente nesse ensaio é determinada através de:

1. avaliação se esse agente causa um aumento no número de células viáveis em uma determinada concentração e
2. em qual concentração esse agente exerce um efeito meio-máximo (determinação da EC50).

Resultados de ensaios de proliferação de TF-1

Como uma característica geral, deve ser mencionado que todos os peptídeos miméticos de EPO (EMP1 e os peptídeos prolina-modificados descritos acima) se comportam, nesse ensaio, como agonistas parciais, isto é, a resposta máxima é mais fraca do que a resposta observada com EPO. Todavia, o ensaio pode ser usado para determinar o desvio a esquerda/direita em plotagens normalizadas e, assim, determinar os resultados de otimizações.

O primeiro gráfico representa esse efeito em resposta absoluta sem normalização. Todos os outros gráficos mostram plotagens normalizadas, as quais permitem a determinação de valores de EC50 a partir das curvas.

Duas substâncias de referência foram usadas nos ensaios:

- 1) *EMP1*, uma seqüência peptídica publicada com propriedades

miméticas de EPO conhecidas (Johnson e outros, 1997).

2) *Eritropoietina Humana Recombinante (EPO)*, foi comprada na farmácia como o produto Epoetin alfa da Ortho Biotech (Marca comercial na Alemanha: Erypo^R)

5 As plotagens dessas substâncias são fornecidas como linhas pretas, contínuas para *EPO* e pontilhadas para *EMP1*.

Os peptídeos miméticos de EPO prolina-modificados são mostrados nas figuras a seguir como linhas contínuas coloridas. Esses peptídeos modificados representam a seguinte seqüência:

10 1) *BB49*

Ac-GGTYSCHFGKLTWVCKKQGG

Mostra uma eficácia e potência na mesma faixa que *EMP1*

2) *BB68*

Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKKQRG-Am

15 é ainda mais eficaz do que *EMP1* e *BB49*

3) *AGEM40*,

Ac-C(tBu)-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKKQRG-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKKQRG-Am

20 o qual é um peptídeo contínuo bivalente, o qual foi projetado baseado na seqüência do *BB68* representando características aperfeiçoadas.

4) *AGEM40_HES*,

o qual é um peptídeo avançado, altamente eficaz e potente (*AGEM40*) HESilado de acordo com o princípio de supervalência da presente invenção.

25 Essas seqüências foram usadas como exemplos, *inter alia*, de forma a ilustrar os benefícios do princípio de supervalência.

A figura 25 descreve os resultados de peptídeos miméticos de EPO monoméricos em comparação com a EPO. A figura 25 inclui uma plotagem de dados de absorbância reais documentando a diferença absoluta entre peptídeos em geral e a EPO nesse ensaio.

30 A figura 26 proporciona os valores de EC50 calculados a partir de plotagens normalizadas adaptadas.

A figura 27 mostra o efeito aperfeiçoado de *BB68* comparado

com BB49. Usando o BB68 otimizado como bloco de construção para criação de uma unidade peptídica de acordo com a presente invenção, o efeito foi aperfeiçoado em duas ordens de magnitude adicionais. Isso é documentado na figura 27 e na Tabela correspondente mostrada na figura 28.

5 As unidades peptídicas diméricas foram, então, acopladas ao veículo macromolecular HES em uma densidade otimizada. O API resultante é pelo menos equipotente à EPO em uma comparação molar e muito próximo à EPO em uma comparação de massa (veja figura 29 e figura 30 abaixo).

10 As figuras 30 e as figuras e Tabelas antes demonstram claramente a maior potência do conceito de supervalência. Mantendo a precisão em mente, a qual pode ser obtida com um ensaio de cultura de células, o API obtido é pelo menos equipotente à EPO *in vitro*. Assim, ele é superior a qualquer API peptídico mimético de EPO conhecido não empregando o conceito de supervalência.

15

Ensaio de Medula Óssea

A medula óssea contém células-tronco hematopoiéticas com um potencial para auto-renovação e se desenvolvem em todos os tipos de células sangüíneas. Além disso, a medula óssea contém células progenitoras comprometidas capazes de se desenvolver em uma ou várias linhagens de células sangüíneas. Dentre essas células progenitoras, algumas podem se desenvolver em eritrócitos (progenitores eritróides).

20 Células progenitoras podem ser demonstradas colocando células de medula óssea em meio semi-sólido baseado em metilcelulose. Na presença de um coquetel de citocina apropriado, células progenitoras proliferam e se diferenciam para proporcionar uma colônia de células de uma determinada linhagem. Progenitores mielóides se desenvolvem em colônias granulocíticas (derivadas de um CFU-G), colônias monocíticas (de um CFU-M) ou colônias granulocíticas-monocíticas misturadas (de um CFU-GM).

25 Progenitores eritróides se desenvolvem em uma colônia de eritrócitos (células vermelhas). Dependendo do tamanho da colônia eritróide, as células progenitoras são denominadas BFU-E (proporcionando colônias de 200 cé-

30

lulas ou mais) ou CFU-E (proporcionando colônias de menos de 200 células). Células progenitoras em um estágio mais precoce de comprometimento podem se desenvolver em colônias granulocíticas-eritróides-monocíticas-megacariocíticas misturadas. Esses progenitores precoces são denominados CFU-GEMM.

A EPO estimula o desenvolvimento de colônias eritróides de BFU-E ou CFU-E, se determinadas citocinas estão presentes também. Sem EPO, nenhuma colônia eritróide pode se desenvolver. O crescimento de colônias eritróides a partir de um batelada homogêneo de células de medula óssea em metilcelulose, portanto, é uma medida com relação à atividade de EPO.

Uma vez que os processos acima mencionados são muito similares, se não idênticos, aos processos os quais ocorrem na medula óssea *in vivo*, eles são um excelente prognóstico de atividade semelhante à EPO.

15 Design de Ensaio de Medula Óssea

Células de medula óssea humana (comercialmente disponíveis da Cryosystems, sorologicamente verificadas) são descongeladas de criofrascos e colocadas em meio de metilcelulose com uma determinada base de citocinas (mas sem EPO) em uma densidade celular fixa. EPO ou peptídeo mimético de EPO é adicionado em concentrações variadas. As culturas são incubadas durante 12-14 dias a 37°C. Então, os números de colônias mielóides e eritróides são enumerados através de inspeção microscópica.

End Points de Ensaio de Medula Óssea:

1. Premissas: Culturas sem EPO deveriam proporcionar apenas colônias mielóides (brancas), mas não eritróides (vermelhas). Culturas com EPO proporcionariam um aumento concentração-dependente nas colônias de células vermelhas e um aumento concentração-dependente nos tamanhos das colônias de células vermelhas.

2. Um peptídeo mostra atividade mimética de EPO se ele causa um aumento concentração-dependente nas colônias de células vermelhas e um aumento concentração-dependente nos tamanhos das colônias de células vermelhas. Contudo, um peptídeo não deverá interferir com os números

de colônias mielóides obtidas.

Resultados de Ensaio da Medula Óssea

Os peptídeos miméticos de EPO prolina-modificados descritos acima não estimulam a formação de colônias mielóides, mas mostraram atividade significativa sobre a formação de colônias vermelhas. Qualitativamente, isso é mostrado na figura 31 em uma fotografia de uma lâmina de cultura, enquanto que contagem de colônias é documentada na figura 32.

Listagem de Referências

Wrighton NC, Balasubramanian P, Barbone FP, Kashyap AK, Farrell FX, Jolliffe L, Barrett RW, Dower WJ (1997) Increased potency of an erythropoietin peptide mimetic through covalent dimerization. *Nature Biotechnology* 15: 1261-1265

Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, Kashyap AK, Barbone FP, Mulcahy LS, Johnson DL, Barrett RW, Jolliffe LK, Dower WJ (1996) Small Peptides as Potent Mimetics of the Protein Hormone Erythropoietin. *Science* 273: 458-463

Johnson, D. L., F. X. Farrell e outros. (1997). "Amino-terminal dimerization of an erythropoietin mimetic peptide results in increased erythropoietic activity." *Chemistry and Biology* 4: 939-950.

Haag R, Sunder A, Stumbé JF, *J. Am. Chem. Soc.* (2000), 122, 2954.

Roberts, M. J., M. D. Bentley e outros. (2002). "Chemistry for peptide and protein PEGylation." *Advanced Drug Delivery Review* 54(4): 459-476.

Zalipsky S, Qazen, S, Walker II JA, Mullah N, Quinn YP, (1999) "New detachable poly (ethylene glycol) conjugates: Cysteine-cleavable lipopolymers regenerating natural phospholipid, diacyl phosphatidylethanolamine, *Bioconjug. Chem.* 10: 703-707.

Zhao, X. e outros (1997), "Novel Degradable Poly(ethylene glycol) esters for drug delivery." Em "Poly(ethylene glycol) chemistry and biological applications; Harris JM, Zalipsky, S. Eds.; ACS Symposium Series 680; American Chemical Society: Washington DC, 1997; 458-472.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de ligação a uma molécula-alvo compreendendo:
 - (i) pelo menos duas unidades peptídicas, em que cada unidade peptídica compreende pelo menos dois domínios com uma capacidade de
5 ligação a um alvo;
 - (ii) pelo menos uma unidade veículo polimérica;
em que as referidas unidades peptídicas são presas à referida unidade veículo polimérica.
2. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que a referida
10 molécula-alvo é uma molécula de receptor, de preferência um receptor transmembrana.
3. Composto, de acordo com a reivindicação 2, em que as unidades peptídicas se ligam ao referido receptor e atuam como antagonistas de receptor ou como agonistas de receptor.
- 15 4. Composto de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, em que a referida unidade peptídica tem um comprimento de cerca de 200 aminoácidos ou menos, de cerca de 150 aminoácidos ou menos, de cerca de 100 aminoácidos ou menos ou de cerca de 50 aminoácidos ou menos.
- 20 5. Composto de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, em que a referida unidade veículo polimérica traz cerca de 50 unidades peptídicas ou menos, 25 unidades peptídicas ou menos, 15 unidades peptídicas ou menos, 10 unidades peptídicas ou menos e, de preferência, entre 2 e 6 unidades peptídicas.
- 25 6. Composto de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, em que a referida unidade veículo é ou compreende pelo menos um polímero ramificado, dendrítico ou linear sintético ou natural e é, de preferência, selecionada do grupo consistindo em poliglicerinas, ácido de polissialina, dextranos, polissacarídeos, amidos ou polietileno glicol ou de outros polímeros solúveis em água biologicamente inertes.
- 30 7. Composto de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 6 precedentes, em que a referida unidade veículo polimérica compreende uma unidade de ramificação, em que a referida unidade de ramificação

compreende, de preferência, glicerol ou poliglicerol.

8. Composto de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 7 precedentes, em que a referida molécula veículo tem um peptídeo de pelo menos 5 kD, de preferência de 20 a 200 ou 4000 kD e de 20 a 80 kD no caso em que veículos menores, tal como polietileno glicol, são usados.

9. Composto de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 8, em que a referida unidade veículo é composta de pelo menos duas subunidades poliméricas, em que as referidas subunidades poliméricas são conectadas via pelo menos uma estrutura ligante covalente biodegradável.

10. Composto de acordo com pelo menos uma das reivindicações precedentes, compreendendo uma primeira unidade veículo biodegradável, em que unidades peptídicas e segundas unidades veículo poliméricas são presas à referida primeira unidade veículo polimérica.

11. Composto de acordo com a reivindicação 10, em que a referida segunda unidade veículo tem um peso molecular menor do que a referida primeira unidade veículo e em que aproximadamente 20 a 50% dos sítios de fixação da referida primeira unidade veículo a qual é, de preferência, HES, são ocupados com as referidas segundas unidades veículo as quais são, de preferência, PEG de um peso molecular de cerca de 3 a 10 kD.

12. Composto de acordo com pelo menos uma das reivindicações acima, em que uma unidade veículo polimérica modificada é usada.

13. Composto de acordo com a reivindicação 12, em que a referida unidade peptídica é presa via uma ligação covalente à referida unidade veículo polimérica e a fixação ocorre via um aminoácido reativo, o grupo amino N-terminal e/ou o ácido carboxílico C-terminal das referidas unidade peptídicas, em que o referido aminoácido reativo é, de preferência, selecionado do grupo consistindo em lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina, tirosina e

em que, no caso em que a referida unidade veículo polimérica não possui um grupo de acoplamento reativo apropriado, uma unidade de acoplamento é usada para modificação da unidade veículo polimérica,

em que a referida unidade de acoplamento é, de preferência,

selecionada do grupo consistindo em grupos de acilação os quais reagem com os grupos amino da referida unidade peptídica, grupos de alquilação os quais reagem com grupos sulfidril (mercapto), tiometila, imidazo ou amino sobre a referida unidade peptídica, mais preferivelmente grupos maleimida, grupos de formação de éster e amida os quais reagem com um grupo carboxila da proteína, grupos de formação de dissulfeto os quais reagem com os grupos sulfidril sobre a referida unidade peptídica, tais como grupos 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato), grupos dissulfetos de orto-piridila e alquilmercaptano, grupos dicarbonila, tais como grupos ciclohexandiona e outros grupos 1,2-dicetona os quais reagem com as porções guanidina da referida unidade peptídica; grupos diazo, os quais reagem com grupos fenólicos sobre o referido peptídeo; grupos reativos da reação de brometo de cianogênio com a referida unidade veículo polimérica, os quais reagem com grupos amino sobre a referida unidade peptídica.

15 14. Composto de acordo com a reivindicação 13, em que o referido aminoácido reativo é cisteína e em que o referido grupo de acoplamento é maleimida.

20 15. Composto de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 14 precedentes, em que pelo menos uma das referidas unidades peptídicas se liga a um receptor homo-, di- ou multimérico, de preferência a um membro de receptores de citocina da classe I, incluindo o receptor de eritropoietina (EPOR), receptor de trombopoietina (TPOR), receptor de fator de estimulação de colônia de granulócito (G-CSFR), receptor de hormônio de crescimento (GHR) e receptor de prolactina (PrR).

25 16. Composto de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 14 precedentes, em que pelo menos uma das referidas unidades peptídicas se liga a um receptor hetero-, di- ou multimérico, tal como um receptor de interleucina.

30 17. Composto de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 14 precedentes, em que as referidas unidades peptídicas se ligam a e ativam o receptor de EPO e são selecionadas do grupo consistindo em peptídeos miméticos de EPO.

18. Composto de acordo com a reivindicação 17, em que pelo menos uma das referidas unidades peptídicas compreende um domínio de ligação caracterizado pela seguinte seqüência de aminoácido:

$X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$

5 em que cada aminoácido é selecionado de aminoácidos naturais ou não-naturais e:

X_6 é C, A, E, ácido α -amino- γ -bromobutírico ou homocisteína (hoc);

X_7 é R, H, L, W ou Y ou S;

X_8 é M, F, I, homo-serinmetiléter ou norisoleucina;

10 X_9 é G ou uma troca conservativa de G;

X_{10} é uma troca não-conservativa de prolina;

ou X_9 e X_{10} são substituídos por um único aminoácido;

X_{11} é selecionado de qualquer aminoácido;

X_{12} é T ou A;

15 X_{13} é W, 1-nal, 2-nal, A ou F;

X_{14} é D, E, I, L ou V;

X_{15} é C, A, K, ácido α -amino- γ -bromobutírico ou homocisteína (hoc)

contanto que X_6 ou X_{15} seja C ou hoc.

19. Composto de acordo com a reivindicação 17, em que pelo menos uma das referidas unidades peptídicas compreende um domínio de ligação caracterizado pela seguinte seqüência de aminoácido:

$X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$

em que cada aminoácido é indicado pela abreviação padrão com uma letra e:

25 X_6 é C;

X_7 é R, H, L ou W;

X_8 é M, F ou I;

X_9 é G ou uma troca conservativa de G;

X_{10} é uma troca não-conservativa de prolina;

30 X_{11} é independentemente selecionado de qualquer aminoácido;

X_{12} é T;

X_{13} é W;

X_{14} é D, E, I, L ou V;

X_{15} é C;

ou em que X_9 e X_{10} são substituídos por um único aminoácido.

20. Composto de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 19 precedentes, em que os referidos domínios de ligação (unidades de ligação monoméricas) das referidas unidades peptídicas são internamente conectados via uma estrutura ligante, de preferência um ligante peptídico contínuo.

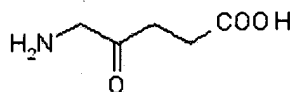
21. Composto de acordo com pelo menos uma das reivindicações 17 a 20 precedentes, em que pelo menos uma das referidas unidades peptídicas compreende um domínio de ligação selecionado do seguinte grupo de peptídeos:

GGTYSCHMGKLT XVCKKQGG
 GGTYTCHFGKLT XVCKKLGG
 15 GGLYSCHFGKIT XVCKKQGG
 GGLYSCHMGKLT WVCRKQGG
 GGLYSCHFGKLT XVQCQKQGG
 GGTYSCHFGKLT WVQCQKQRG
 GGTYSCHFGKLT XVCKKQRG
 20 GGLYACHFGKLT WDCQKQGG
 GGTYTCHFGKLT UVCKKQGG
 GGTYSCHFGKLT UVCKKLGG
 GGTYSCHFGKIT XVCKKQGG
 GGLYSCHFGKLT UVCKKLGG
 25 GGLYACHFGKLT UVCKKQGG
 GGLYSCHMGKLT WLCKKLGG
 GGTYSCHFGKLT WVCKKQGG
 GGTYTCHFGKIT UVCKKQGG
 GGLYSCHFGKLT XVCKKQGG
 30 GGLYACHFGKLT ULCKKQGG
 GGLYSCHFGKLT WVCKKQRG
 GGTYTCHFGKIT XVCKKQGG

GGTYTCHMGKLTWVCKKQRG
GGLYSCHFGKLT XVCKKQRG
GGTYTCHFGKLT XVCKKQGG
GGLYSCHFGKITUVCKKQGG
5 GGLYSCHFGKLT XVCRKQGG
GGTYACHFGKLT XVCKKLG
GGLYACHFGKLT XVCRKQGG
GGTYACHFGKLT XVCKKQGG
GGLYSCHMGKLT XVCRKQGG
10 GGLYSCHFGKLT UVCKKQRG
GGLYSCHMGKLT XVCKKQGG
GGTYTCHMGKLT XVCKKQGG
GGLYSCHFGKLT XVCRKQRG
GGTYSCHFGKLT XVCKKQGG
15 GGTYSCHFGKLT WVCKKQRG
GGTYACHFGKLT WVCKKQRG
GGLYSCHFGKLT WVCQKQRG
GGTYTCHFGKLT XVCKKQRG
GGTYSCHFGKLT WVCKKQGG
20 GGTYSCHFGKLT WVCKPQGG
GGTYSCHFGRLT WVCKPQGG
GGTYSCHFGRLT WVCKKQGG
GGTYSCHF-(Als)-LTWVCKPQGG
GGTYSCHF-(Als)-LTWVCKKQGG
25 GGTYSCHFGKLT-1nal-VCKKQRG
GGTYSCHFGKLT WVCKKQGG-GGTYSCHFGKLT WVCKKQGG
GGTYSCHFGKLT-1nal-VCKKQRG-GGTYSCHFGKLT-1nal-VCKKQRG

em que X é 1-naftilalanina e U é 2-naftalina

e em que ácido 5-aminolevulínico (Als) é:



5-Als

22. Uso de um composto como definido em pelo menos uma das reivindicações 1 a 21, para o preparo de uma composição farmacêutica.

23. Uso de um composto como definido em pelo menos uma das reivindicações 1 a 21, trazendo uma ligação por unidade peptídica a e ativação do receptor de EPO para o preparo de uma composição farmacêutica para a prevenção ou tratamento de um distúrbio que é caracterizado por uma deficiência de eritropoietina ou uma população de células vermelhas sangüíneas baixa ou defectiva e especialmente para o tratamento de qualquer tipo de anemia e derrame.

24. Uso de um composto como definido em pelo menos uma das reivindicações 1 a 21, trazendo uma ligação de unidade peptídica e ativação do receptor de TPO para o preparo de uma composição farmacêutica para a prevenção ou tratamento de um distúrbio que é caracterizado por uma deficiência de trombopoietina e especialmente para o tratamento de distúrbios hematológicos, incluindo trombocitopenia, granulocitopenia e anemia.

25. Composição farmacêutica compreendendo o composto como definido em pelo menos uma das reivindicações 1 a 21, e opcionalmente um veículo farmacêuticamente aceitável.

26. Método para produção de um composto como definido em pelo menos uma das reivindicações 1 a 21, compreendendo:

(i) geração de pelo menos duas unidades peptídicas em que cada unidade peptídica compreende pelo menos dois domínios com uma capacidade de ligação a um receptor;

(ii) geração de pelo menos uma unidade veículo polimérica,

(iii) fixação das referidas unidades peptídicas à referida unidade veículo polimérica.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, em que as referidas unidades peptídicas são sintetizadas como uma cadeia peptídica contínua.

28. Método de acordo com a reivindicação 26 ou 27, em que uma unidade veículo polimérica é usada, a qual tem pelo menos um grupo sobre a mesma o qual é capaz de reação com um grupo químico disponível.

sobre a referida unidade peptídica e, então, reação juntos da unidade veículo polimérica reativa e da unidade peptídica para formar um complexo covalentemente ligado das mesmas utilizando o grupo químico da unidade veículo polimérica.

5 29. Método de acordo com as reivindicações 26 a 28, em que o referido veículo polimérico é uma molécula de amido modificada, a qual tem sido oxidada e em que um grupo amino foi introduzido na parte principal do amido e em que o referido grupo amino é modificado através da introdução de um grupo ligante, de preferência um grupo maleimida.

10 30. Método de acordo com a reivindicação 29, em que a oxidação é realizada através de contato da molécula de amido com um reagente que produz um íon de oxoamônio na presença de um agente de oxidação ou através de contato do material de partida diretamente com a espécie reativa, o íon de oxoamônio.

15 31. Método de acordo com a reivindicação 30, em que o agente de oxidação é um agente de oxidação químico, tal como um hipoclorito como, por exemplo, hipoclorito e hipobromito de sódio ou peróxido de hidrogênio ou uma enzima oxidativa.

20 32. Método de acordo com a reivindicação 30 ou 31, em que o reagente que produz o íon de oxoamônio é, de preferência, um composto de nitroxila, mais preferivelmente um composto de di-terc-nitroxila, tal como 2,2,6,6-Tetrametilpiperidina-1-oxila (TEMPO) ou um derivado do mesmo.



Fig. 1

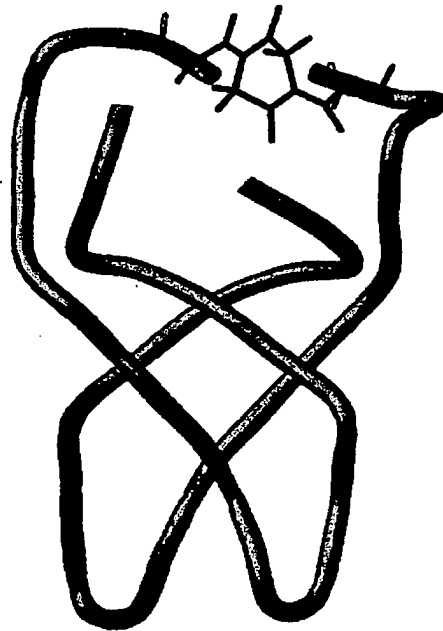


Fig. 2

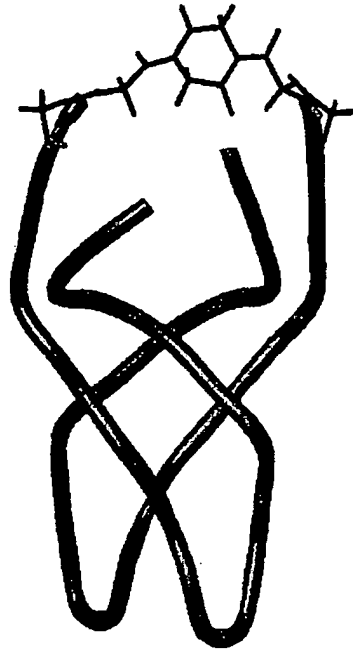


Fig. 3

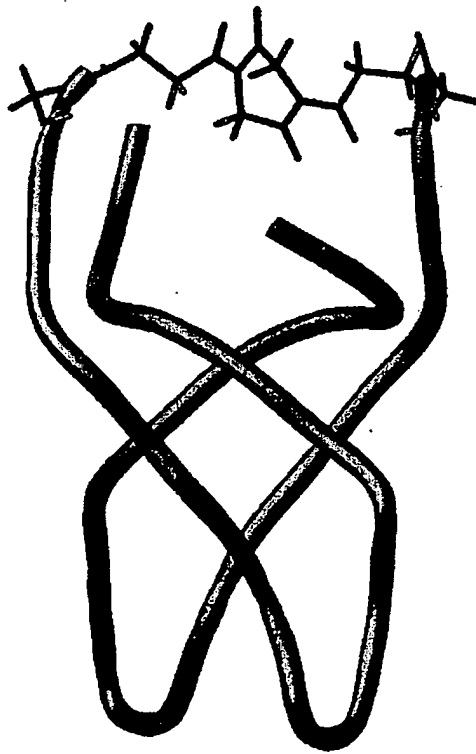


Fig. 4

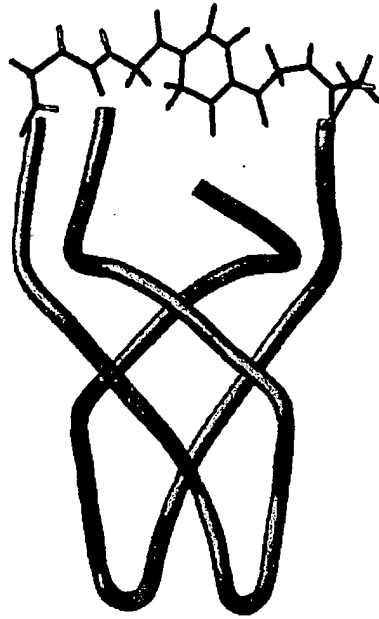


Fig. 5

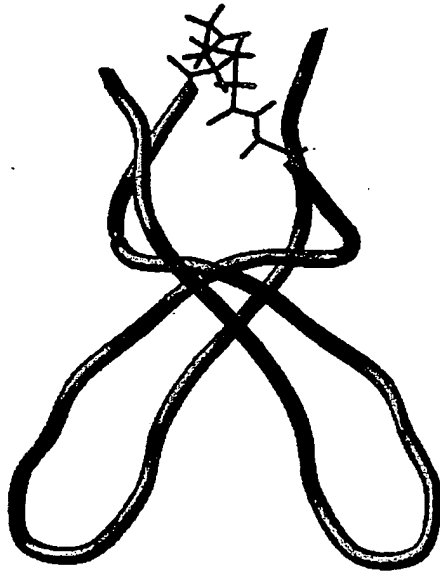


Fig. 6

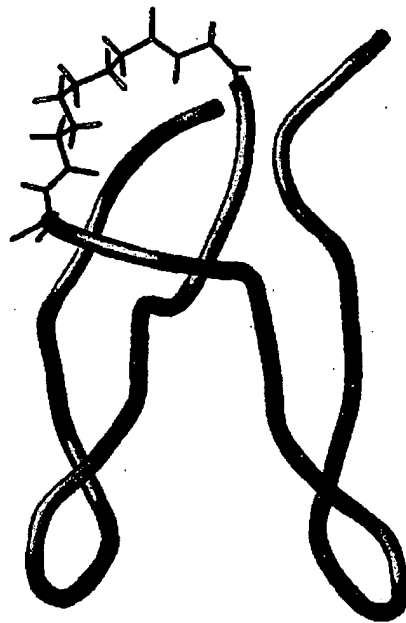


Fig. 7

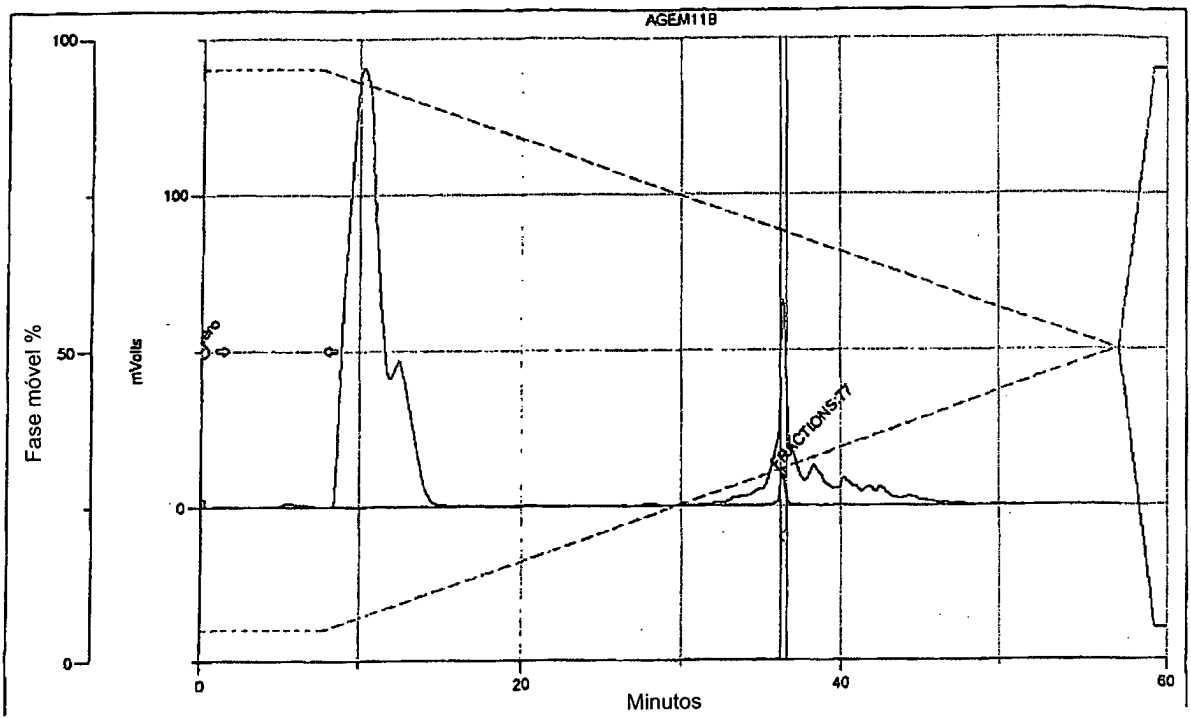


Fig. 8

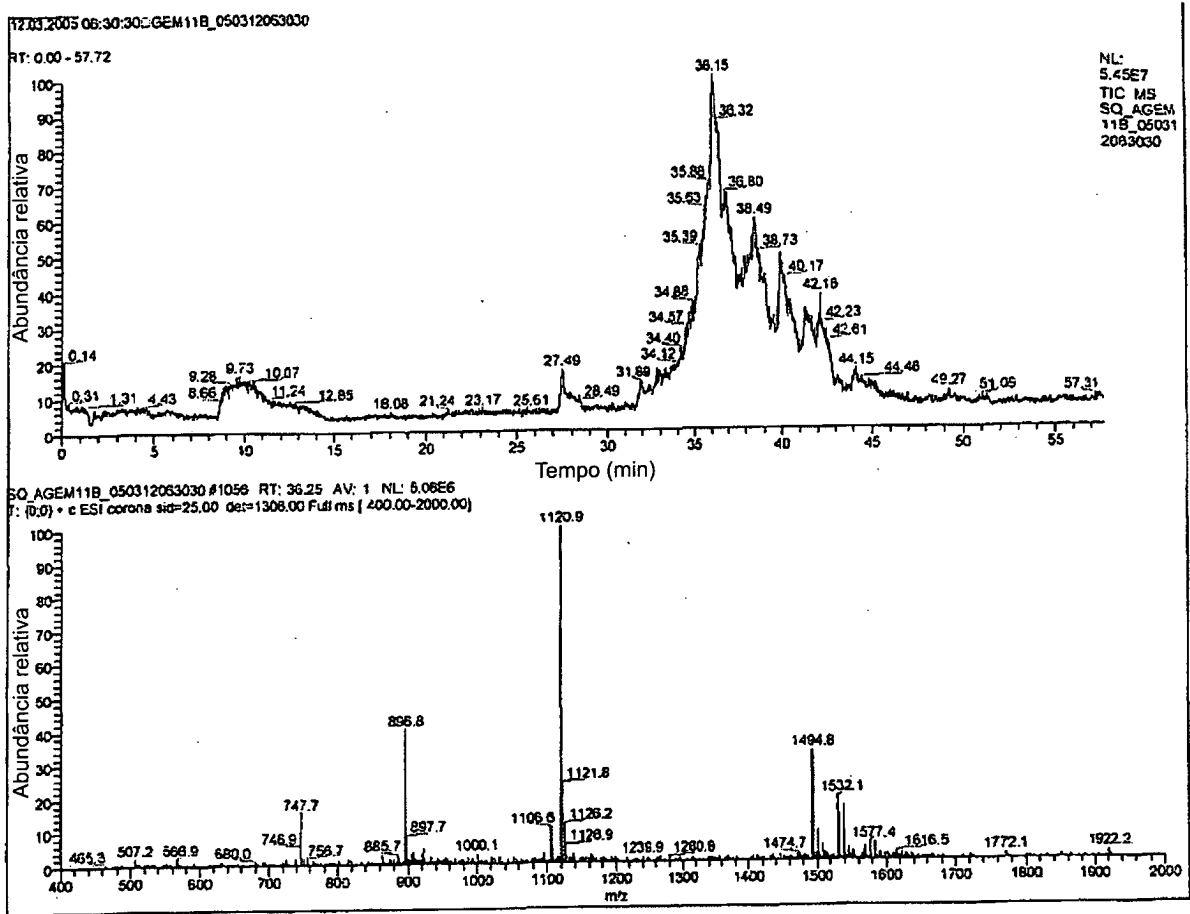


Fig. 9

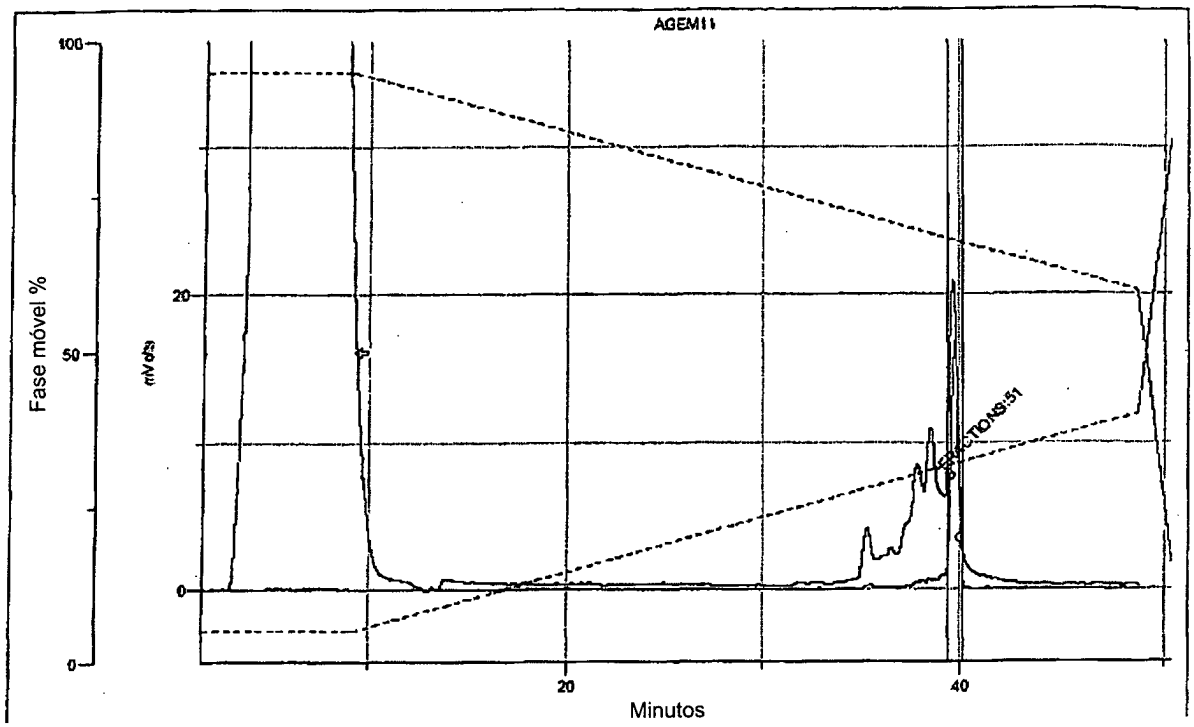


Fig. 10

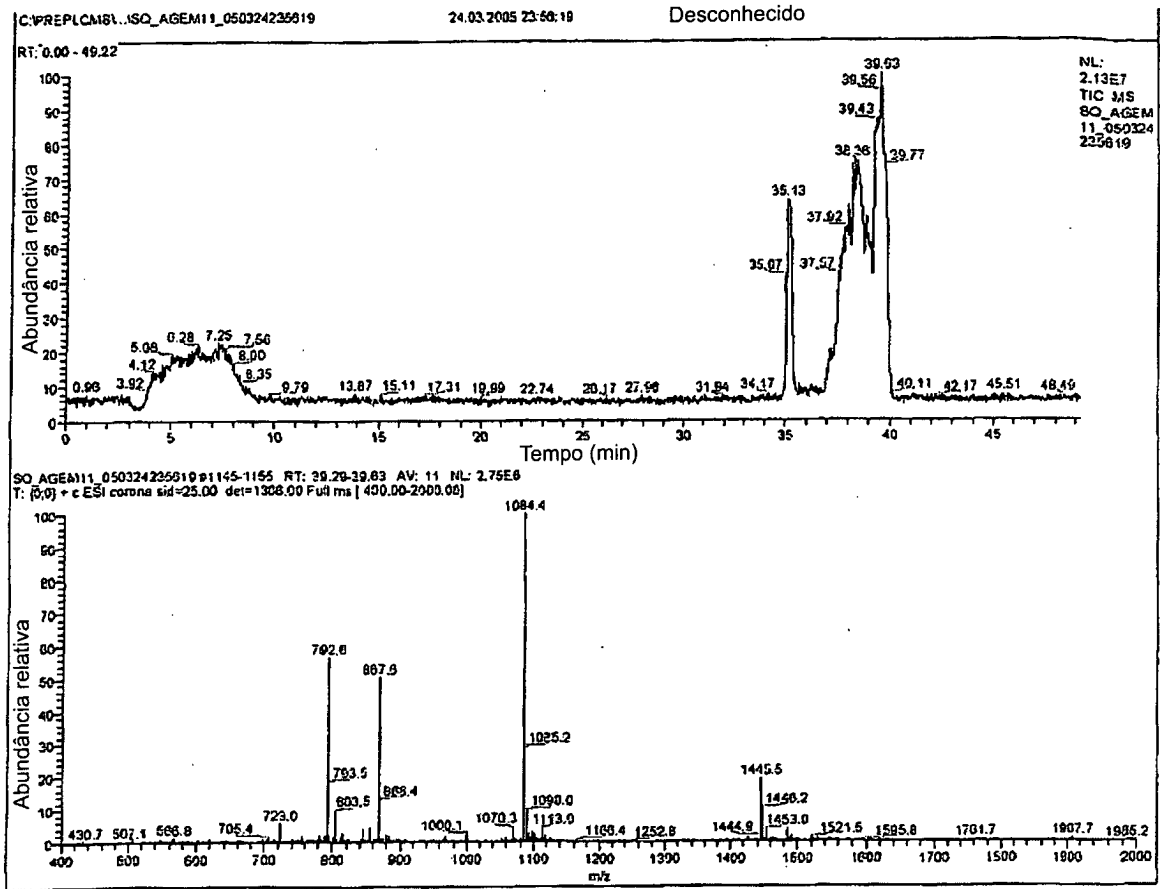


Fig. 11

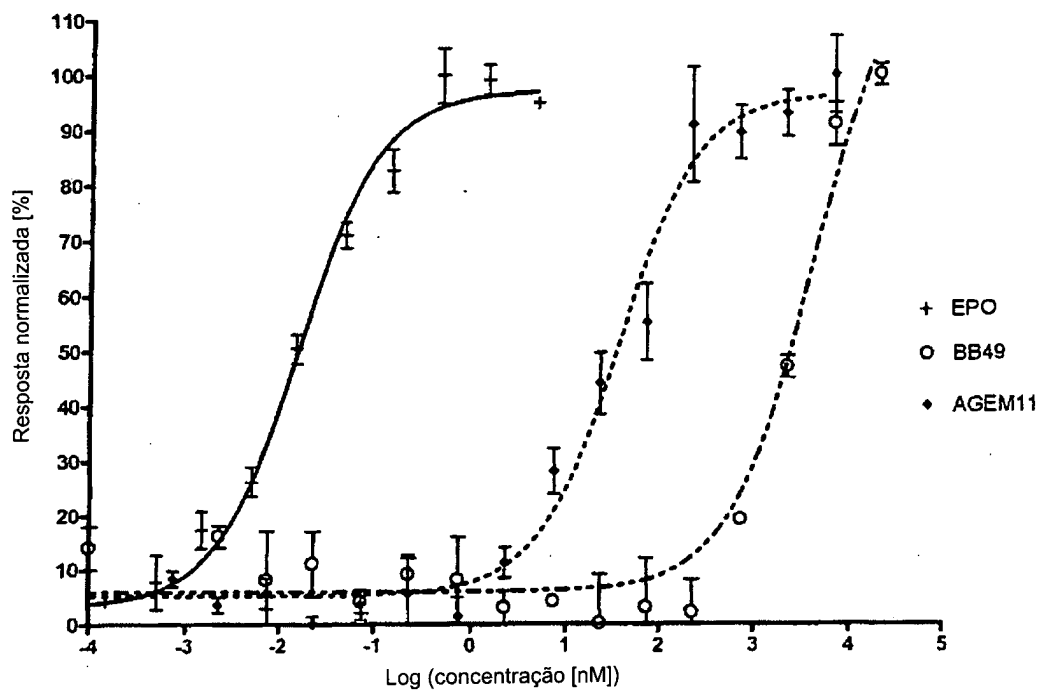


Fig. 12

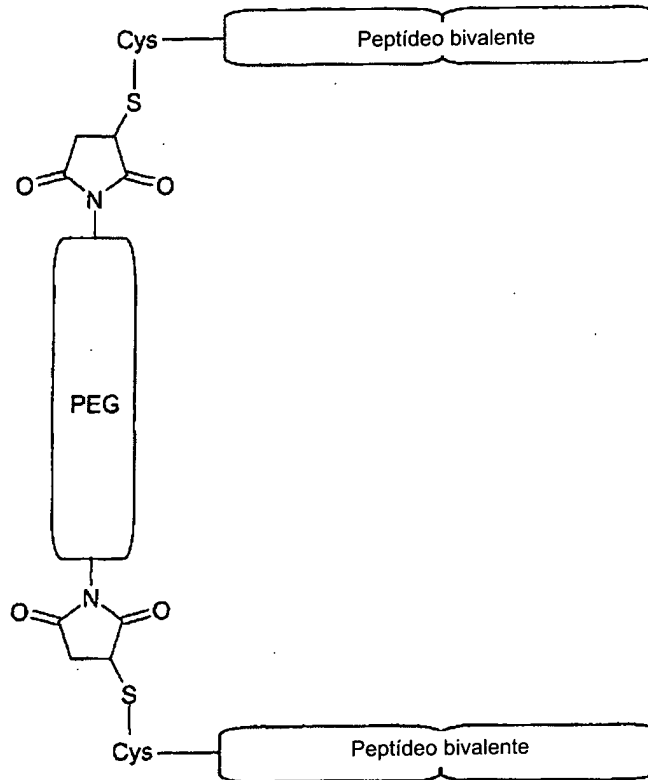


Fig. 13

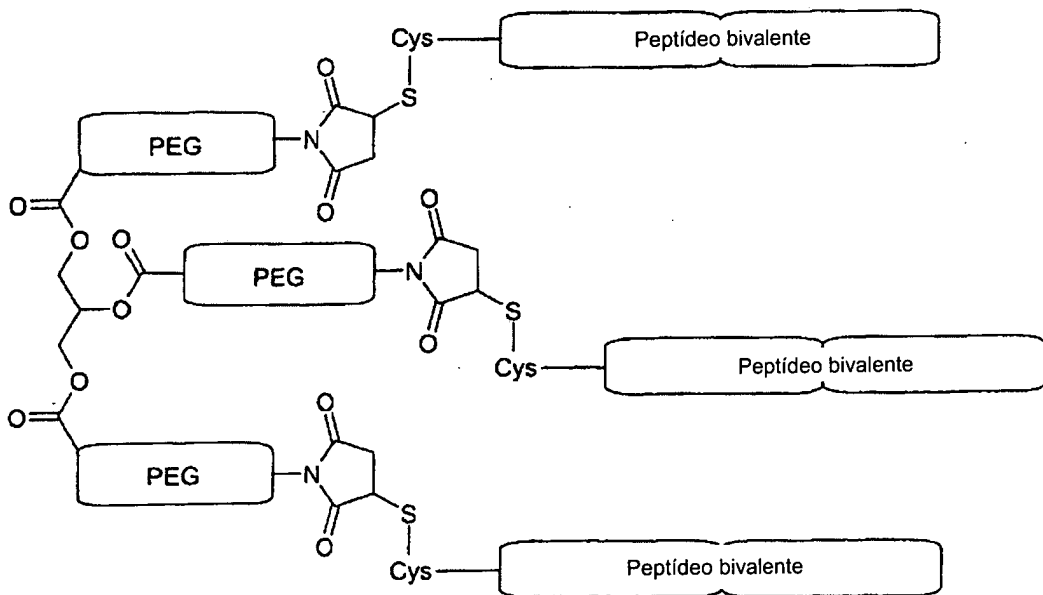


Fig. 14

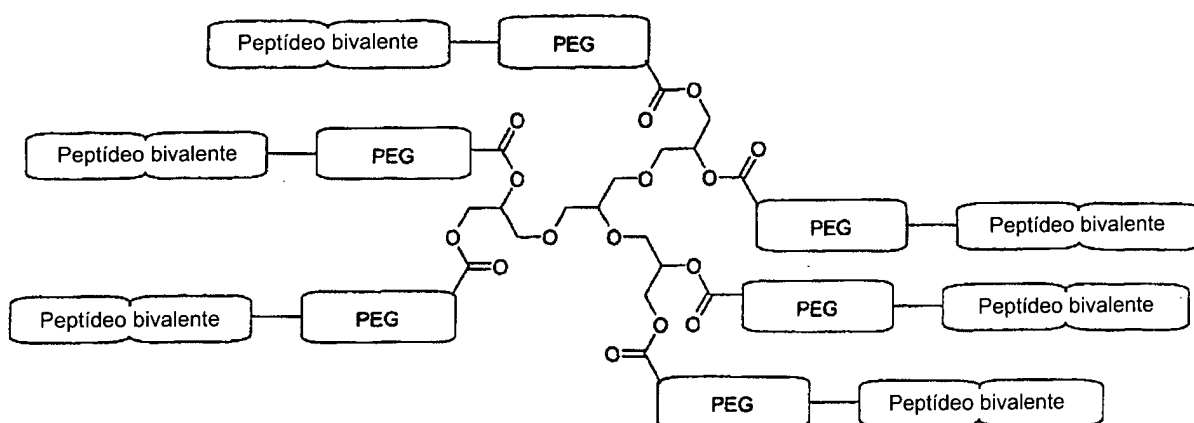


Fig. 15

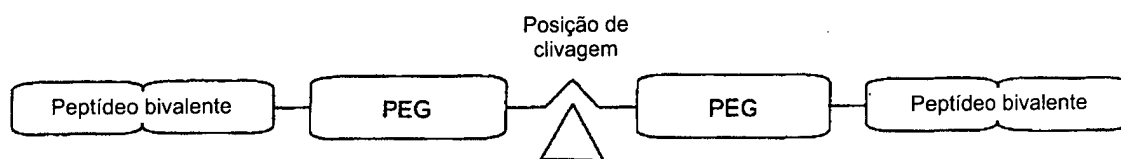


Fig. 16

Figuras 17 e 18: Essas figuras mostram curvas de dose resposta de peptídeos miméticos de eritropoietina de dados brutos obtidos através dos ensaios descritos no exemplo 3b e curvas adaptadas com o programa GraphPad Prism versão 4.

Fig. 17

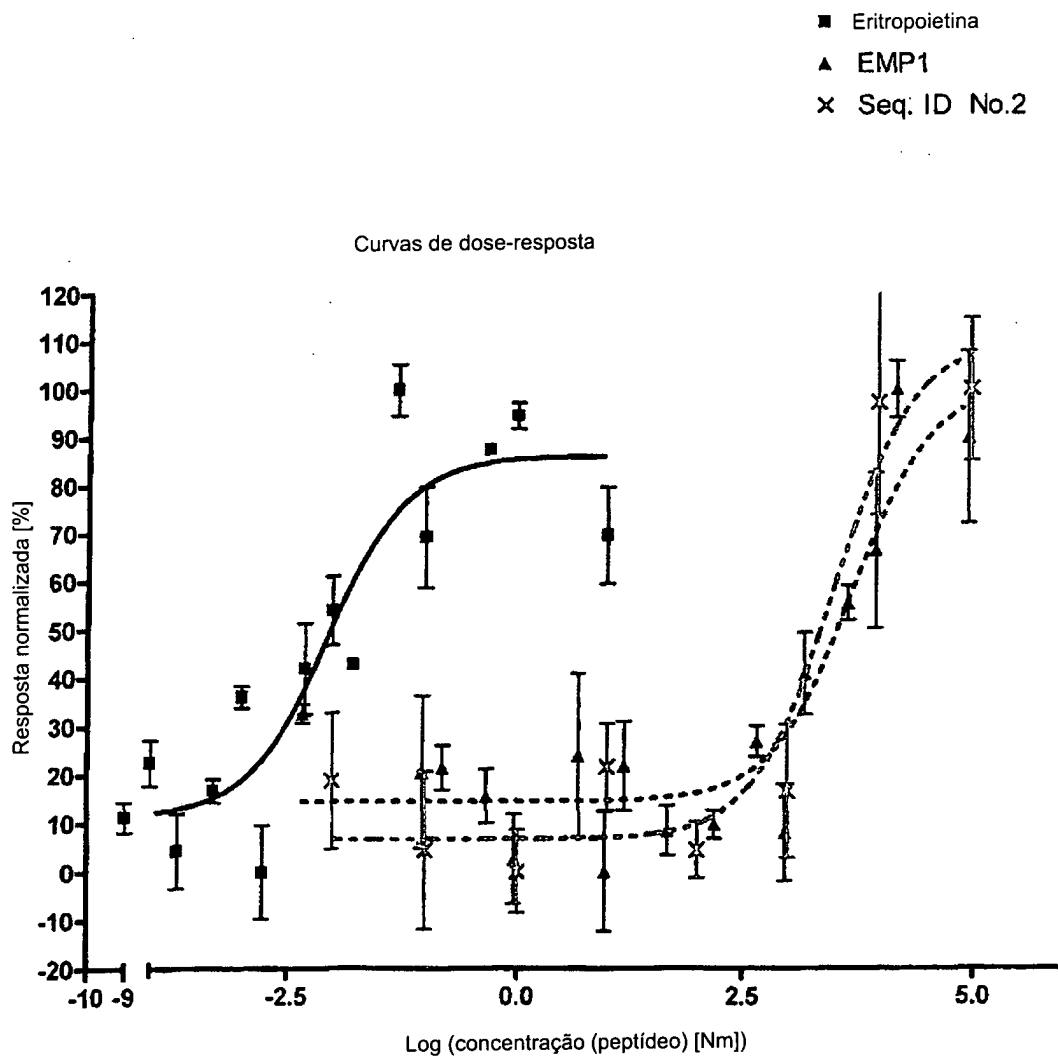


Fig. 18

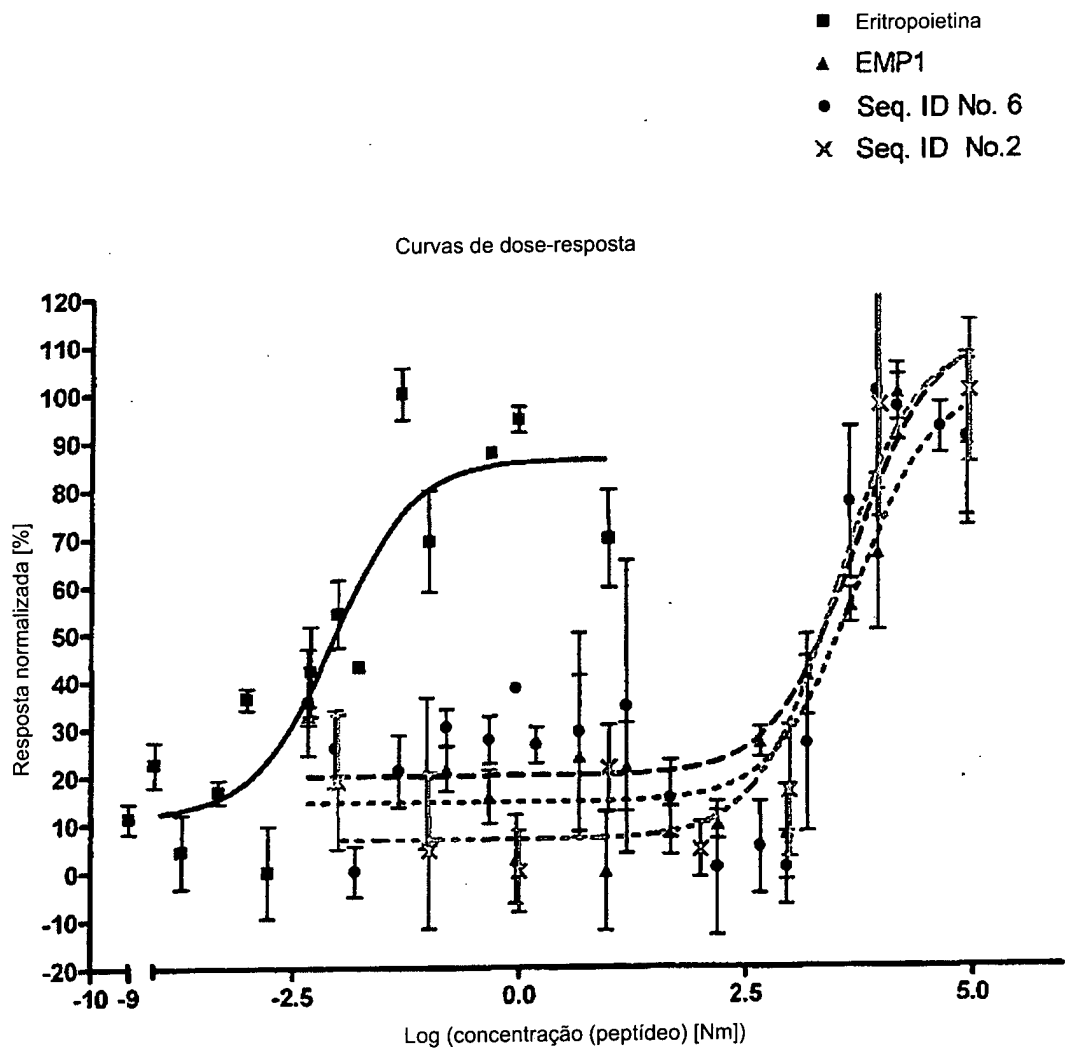


Fig. 19

Seqüência	Aminoácido não usual	Resultado esperado	Resultado testado
GGTYACHFGKLTUVCKKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGTYSCHMGKLT XVCKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGLYACHFGKLTUVCRKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGTYTCHFGKLT XVCKKLG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGLYACHFGKLT XICKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	+
GGLYSCHFGKIT XECKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	+
GGTYACHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKLTWVCKKNGG		pos	+
GGLYACHFGKLT XVCKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	+
GGLYSCHMGKLTWVCKKQRG		pos	+
GGTYLCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTLCSEFGKLT EVCDKQGG		neg	-
GGLYSCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTYHCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKIT XVCKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGLYSCHMGKITWVCRKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKITUVCKKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKLT XVCKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	+
GGLYSCHFGKITWVCKKQRG		pos	+
GGLYSCHMGKLTWVCRKQGG		pos	++
GGLYACHFGKITWVCRKQGG		pos	+
GGLYACHFGKLTWVCRKQRG		pos	+
GGLYSCHMGKLT XDCCKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	+
GGLYACHFGKLTWVCRKLG		pos	+
GGLYSCHFGKLT XVCKKLG	X = 1-naftilalanina	pos	+
GGTYSCHFGKLTWVCSKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKITWVCKKQGG		pos	+
GGDYSCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKLT XVCKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGTYSCHFGKLTWVCQKQRG		pos	++
GGTYSCHFGKLTWVCGKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKLTUVCKKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGTYTCHMGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKLTWVCRKQRG		pos	+
GGTYSCHFGKLT XVCKKQRG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGLYACHFGKLTWVCQKQGG		pos	+
GGLYACHFGKLTWDCQKQGG		pos	++
GGTYSCHFGKLTWVCKKAGG		pos	+
GGTYSCHFGKLTWICKKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKLTWVCLKQGG		pos	+
GGVYSCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+

GGTYSCHFGKITWVCKKQRG		pos	+
GGLYSCHFGKLTWVCRKLGG		pos	+
GGTLSCDFGGLTWVCEKQEG		neg	--
GGTYSCHFGKLTUVCKKLGG	U = 2-naftilalanina	pos	++
GGLYSCHMGKLTWVCKKLGG		pos	+
GGLYSCHMGKLTWDCKKQRG		pos	+
GGTYSCHFGKLTWLCKKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKLTUVCRKQRG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGLYACHMGKLTWDCKKQGG		pos	+
GGTYTCHFGKLTUVCKKLGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGTYACHMGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTGSCEFGGLAKVCEKQEG		neg	-
GGMYSCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGLYSCHMGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKITWVCQKQGG		pos	+
GGTYSCHMGKLTUVCKKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGTYSCHFGKITWVCKKLGG		pos	+
GGTLSCDFGKLTWVCEKQGG		neg	-
GGTYSCHFGKITXVCKKQGG		pos	++
GGTYSCHMGKITWVCKKQGG		pos	+
GGTYSCDPGGLFWVCEKQGG		neg	-
GGLYACHMGKITXVCQKLRG	X = 1-naftilalanina	pos	+
GGTYTCHFGKLTWVCKKLGG		pos	+
GGTYSCHFGKLTXVCKKQRG	X = 1-naftilalanina	pos	+
GGTYSCHMGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTYTCHMGKITWVCKKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKLTUVCKKLGG	U = 2-naftilalanina	pos	++
GGTYACHFGKLTWVCKKLGG		pos	+
GGLYACHFGKLTUVCKKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	++
GGTGSCEAGKLTDVCEKQDG		neg	-
GGLYSCHFGKLTUVCRKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGTYTCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTLSCDFGKLGWVCKKQGG		neg	-
GGTYSCHFGKLTWVCHKQGG		pos	+
GGLYSCHMGKLTWVCQKQGG		pos	+
GGTGSCEFGKLTEVCKKQGG		neg	--
GGLYSCHFGKITWVCKKQAG		pos	+
GGTYSCHFGKLTXVCKKLGG	X = 1-naftilalanina	pos	+
GGLYACHMGKLTWVCRKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKLTWDCKKQGG		pos	+
GGLYSCHMGKLTWLCKKLGG		pos	++
GGTYTCHFGKLTWVCKKQRG		pos	+
GGLYACHFGKLTWECKKLGG		pos	+
GGTGSCDFGKLAWVCDKQEG		neg	--
GGLYACHZGKLTWVCRKQGG	Z = homoserina-metiléter	pos	+

GGLYACHFGKLTWVCKKQRG		pos	+
GGTGS CDAGKLT DVCDKQDG		neg	-
GGLYSCHMGKITWLCKKQGG		pos	-
GGLYACHZGKLTWVCKKQGG	Z = homoserina-metiléter	pos	+
GGTYSCHFGKITWVCKKQGG		pos	+
GGLYSCHMGKLTWVCRKLGG		pos	+
GGLYSCHFGKITWVCRKQAG		pos	+
GGTGS CDFGKLT DVCAKQEG		neg	--
GGTYS CRFGKLTWVCKKQGG		pos	++
GGLYSCHFGKITWVCRKQGG		pos	+
GGTYSCEGGKLGKVCEKQEG		neg	--
GGTLS CDAGGLTKVCDKQDG		neg	--
GGTLSCHPGKLTWVCKKQDG		neg	--
GGTYTCHFGKITUVCKKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	++
GGTYACHFGKITWVCKKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKLTWVCKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGLYSCHMGKLTWICQKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKLTWVCQKQGG		pos	+
GGLYACHFGKLTULCKKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	++
GGTLSCEFGKLFKVCEKQGG		neg	--
GGTYTCHFGKITWVCKKQAG		pos	+
GGLYSCHMGKLTWVCRKQRG		pos	+
GGTYTCHFGKITWVCQKQGG		pos	+
GGTYTCHMGKLTWVCKKLGG		pos	+
GGTYTCHFGKITWVCKKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKLTWVCAKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKLTWVCQKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKLTWVCKKQRG		pos	++
GGLYSCHFGKITUICKKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGTYTCHFGKLTWVCQKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	+
GGTGSCEPGKLT DVCEKQGG		neg	--
GGTYTCHFGKITWVCKKQRG		pos	+
GGTYTCHFGKITXVCKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGTYTCHMGKLTWVCKKQRG		pos	++
GGLYSCHMGKITWVCKKQGG		pos	+
GGLYACHFGKITWECKKQGG		pos	+
GGLYACHMGKITXVCQKLGG	X = 1-naftilalanina	pos	+
GGLYSCHFGKLTWVCKKQRG	X = 1-naftilalanina	pos	+++
GGTYSCHFGKLTUVCKKQRG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGLYACHFGKLTWVCRKQGG		pos	+
GGTYSCEAGKLTWVCKKQEG		neg	--
GGLYACHFGKLTWVCKKLGG		pos	+
GGTYTCHFGKLTWVCKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGLYSCHFGKLTUVCRKLGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGLYSCHFGKLTWVCRKLGG	X = 1-naftilalanina	pos	+

GGTYSCHFGKVTWVCKKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKMTWVCKKQGG		pos	+
GGNYSCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKITUVCRKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGTYTCHFGKLTWVCQKLGG		pos	+
GGLYACHZGKLTWVCKKQGG	Z = homoserina-metiléter	pos	+
GGLYSCHFGKITUVCKKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	++
GGLYSCHFGKLTXVCRKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGAYSCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGSYSCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTLCDFGKLGWVCDKQEG		neg	--
GGTYKCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTYACHFGKLTWVCQKQGG		pos	+
GGLYACHFGKITWVCKKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKLTWVCQKLGG		pos	+
GGTYACHFGKLTXVCKKLGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGLYACHFGKLTXVCRKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGTYSCHFGKLTWVCTKQGG		pos	+
GGTYMCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTYACHFGKLTXVCKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGTYSWFVGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTLCDFGGLGWVCDKQEG		neg	-
GGLYSCHMGKLTXVCRKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGLYSCHFGKLTUVCKKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	++
GGLYSCHMGKLTUECKKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGTYTCHFGKLTWVCQKQGG		pos	+
GGLYACHMGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKLTUVCKKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGLYSCHMGKLTXVCKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGLYACHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKITWVCRKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKLTWECKKQGG		pos	+
GGTYSCLFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKLTWVCRKQGG		pos	+
GGTYSCHZGKLTWVCKKQGG	Z = homoserina-metiléter	pos	+
GGTYSCHFGKLTWVCQKLGG		pos	+
GGLYSCHFGKLTUVCKKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGLYSCHFGKITXVCRKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	+
GGTYTCHMGKLTXVCKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGLYSCHFGKLTXVCRKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGTYTCHFGKLTUVQKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGTYSCHFGKLTUVQKQGG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGTYTCHZGKLTWVCKKQGG	Z = homoserina-metiléter	pos	+

GGLYSCHMGKITWVCQKQRG		pos	+
GGTYSCHFGKITWVCQKQGG		pos	+
GGTYSCHFGKLT XVCKKQGG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGTYSCHFGKLTWVCKKQRG		pos	++
GGTYTCHFGKLTUVCKKQRG	U = 2-naftilalanina	pos	+
GGLYSCHFGKLTWVCKKLGG		pos	+
GGTYACHFGKLTWVCKKQRG		pos	++
GGEYSCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGLYSCHFGKLTWVCQKQRG		pos	++
GGTYTCHFGKLTWVCRKQRG		pos	+
GGTYSCHFGKATWVCKKQGG		pos	+
GGLYACHFGKLTWICKKQRG		pos	+
GGTYSCHFGKTTWVCKKQGG		pos	+
GGTGSCEFGGLGWVCDKQGG		neg	-
GGTYSCHFGKLTWVCKKQGG		pos	+
GGTYTCHFGKLT XVCKKQRG	X = 1-naftilalanina	pos	++
GGTGSCEFGKLTWVCDKQGG		neg	-

Ac-GGTYSCHFGSLTWVCKPQGG-Am

Ac-GGTYSCHFGTLTWVCKPQGG-Am

Ac-GGLYACHMGKIT-Na1-VCQKLGG-Am

Ac-GGLYACHMGRIT-Na1-VCQKLGG-Am

Ac-GGLYACHMGKIT-Na1-VCQKLRG-Am

Ac-GGLYSCHMGKITWVCQKQRG-Am

Ac-GGTYACHFGKLT XVCKKLGG-Am

Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKKQRG-Am

Ac-C-GGLYACHMGKIT-Na1-VCQKLRG-Am

Ac-C-GGTYSCHFGXLTWVCKXQGG-Am

X = acetilisina

Ac-GGLYSCHFGKLT-Na1-VCKKQRG-Am

Ac-GGTYSCHFGXLT-Na1-VCKXQRG-Am

X = acetilisina

Ac-GGTYSCHFG-Orn-LTWVCK-Orn-QGG-Am

Orn = ornitina

Ac-GGTYSCHFGRLT-Na1-VCKKQRG-Am

Ac-GGTYSCHFG-Orn-LT-Na1-VCK-Orn-QRG-Am

Ac-GGTYSCHFG-Har-LTWVCK-Har-QGG-Am	Har = homoarginina
Ac-GGTYSCSFGKLT-Na1-VCK-Har-QRG-Am	
Ac-GGTYSCHFG-Har-LT-Na1-VCK-Har-QRG-Am	
Ac-GGTYSCHfGKLT-Na1-VCKKQRG-Am	f = D-fenilalanina
Ac-GGTYSCSfGKLT-Na1-VCKKQRG-Am	
Ac-GGTYSCHfGKLT-Na1-VCK-Har-QRG-Am	
Ac-GGTYSCSfGKLT-Na1-VCK-Har-QRG-Am	f = D-fenilalanina
Ac-GGT-It3-SCHFGKLT-Na1-VCKKQRG-Am	It3 = 3-iodo-tirosina
Ac-GGT-Nt3-SCHFGKLT-Na1-VCKKQRG-Am	Nt3 = 3-nitro-tirosina
Ac-GGT-Dbt-SCHFGKLT-Na1-VCKKQRG-Am	Dbt = 3,5-dibromo-tirosina
Ac-GGT-Dbt-SCHfGKLT-Na1-VCKKQRG-Am	Dbt = 3,5-dibromo-tirosina, f = D-fenilalanina
Ac-GGTYSCHYGKLTWVCKKQRG-Am	
Ac-GGTYSCHFG-Acl-LT-Na1-VCKKQRG-Am	Acl = acetilisinina
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCK-Acl-QRG-Am	Acl = acetilisinina
Ac-GGTYSCSFG-Har-LT-Na1-VCK-Orn-QRG-Am	
Ac-GGTYSCSFG-Orn-LT-Na1-VCK-Har-QRG-Am	
Ac-GGTYSCSFGKLT-Na1-VCK-Har-QGG-Am	
Ac-GGTYSCSFGKLT-Na1-VCKKQRG-Am	
Ac-GGTYSCHFG-Har-LT-Na1-VCKKQRG-Am	
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VC-Har-KQRG-Am	
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCK-Har-QRG-Am	
Ac-GGLYSCSFGKLT-Na1-VCKKQRG-Am	
Ac-GGLYSCSFGKLT-Na1-VCK-Har-QRG-Am	
Ac-GGT-Dbt-SCHFGKLTWVCKKQGG-Am	Dbt4
Ac-GGL-Dbt-SCHFGKLT-Na1-VCKKQRG-Am	Dbt4
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKKQDG-Am	

Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKKQEG-Am
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKKQ-Aad-G-Am
Ac-GGTYSCHFGELT-Na1-VCKKQRG-Am
Ac-GGTYSCHFGDLT-Na1-VCKKQRG-Am
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKEQRG-Am
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKDQRG-Am
Ac-GGTYSCHFGKLS-Na1-VCKKQRG-Am
Ac-GGTYSCHFGKLQ-Na1-VCKKQRG-Am
Ac-GGTYSCHFGKLN-Na1-VCKKQRG-Am
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCK-K(Glr)-QRG-Am
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCK-K(Adi)-QRG-Am
Ac-GGTYSAHFGKLT-Na1-VAKKQRGC-Am
Ac-GGTYSCHFG-Har-LT-Na1-VCKKQDG-Am
Ac-GGTYSCHFG-Har-LT-Na1-VCKKQEG-Am
Ac-GGTYSCHFG-Har-LT-Na1-VCKKQ-Aad-G-Am
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKDQDG-Am
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCKEQEG-Am
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCK-Aad-Q-Aad-G-Am
Ac-GGTYSCHFG-Har-LT-Na1-VCKDQDG-Am
Ac-GGTYSCHFG-Har-LT-Na1-VCKEQEG-Am
Ac-GGTYSCHFG-Har-LT-Na1-VCK-Aad-Q-Aad-G-Am
Ac-GGTYSCHFGELT-Na1-VCKKQGG-Am
Ac-GGTYSCHFGELT-Na1-VCKEQGG-Am
Ac-GGTYSCHFGELT-Na1-VCKKQEG-Am
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCK-K(Glr)-QGG-Am
Ac-GGTYSCHFGKLT-Na1-VCK-K(Glr)-QEG-Am

Aad = ácido alfa-amino adípico, C6

Fig. 20

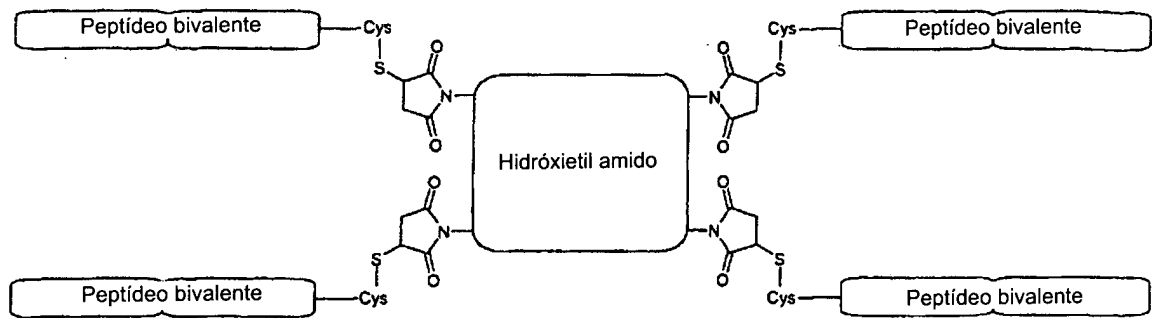


Fig. 21

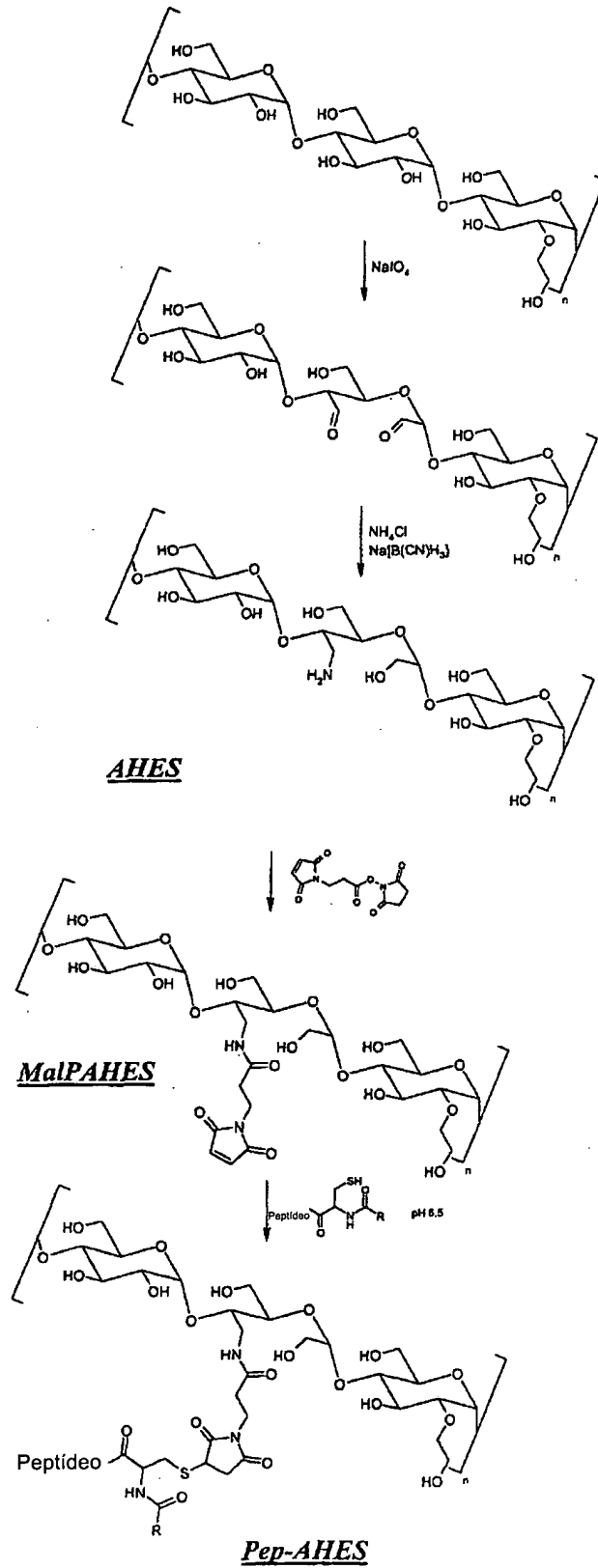


Fig. 22

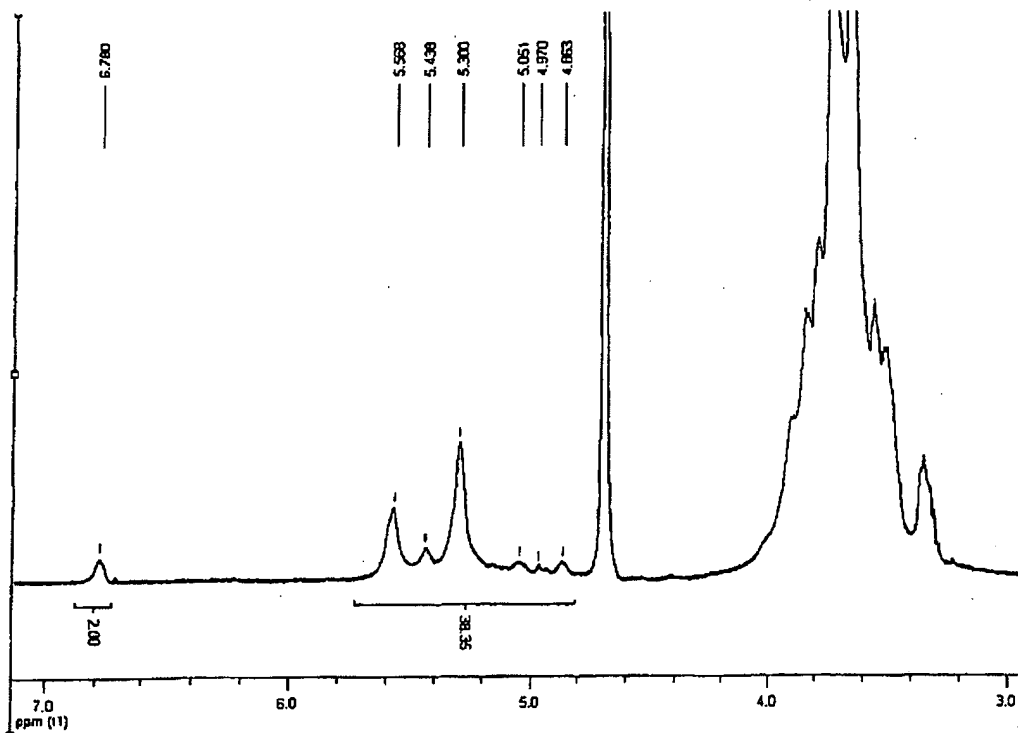


Fig. 23

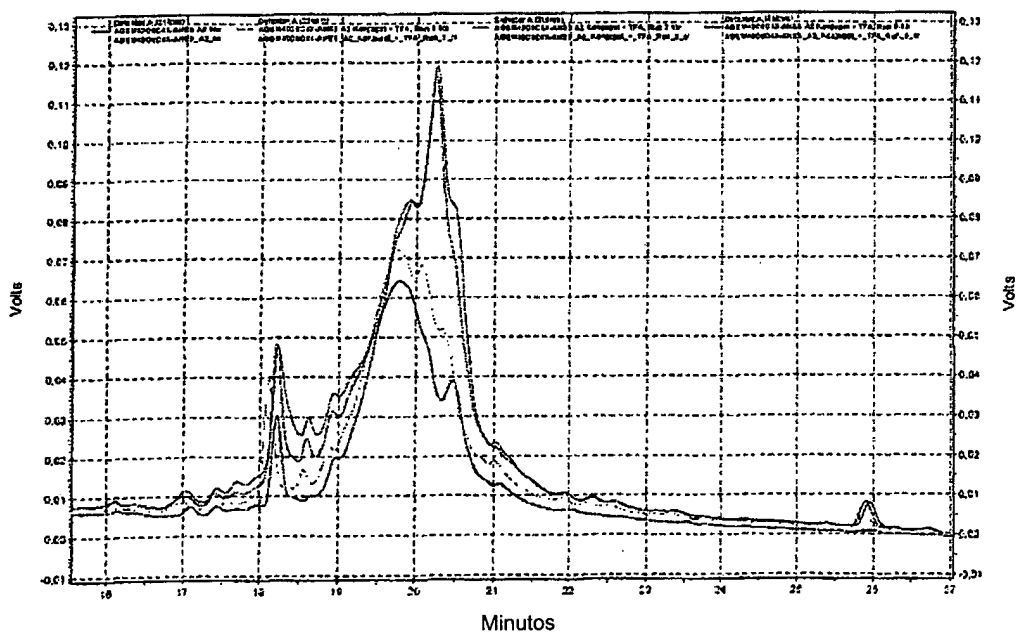


Fig. 24

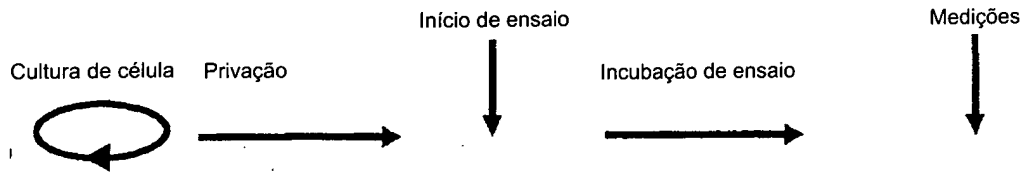


Fig. 25

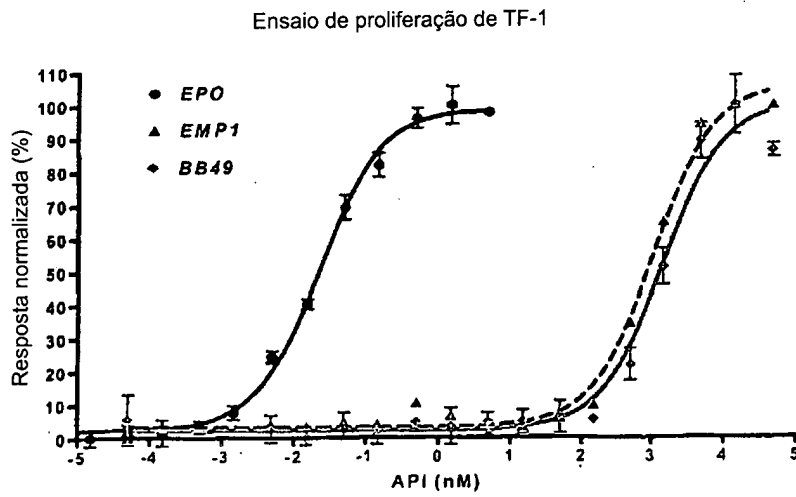
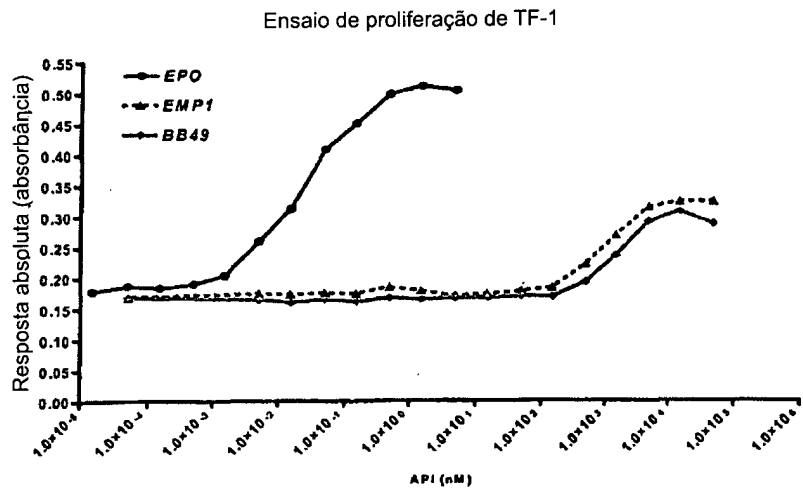


Fig. 26

Substância	EC50 (nM)
EPO	0,02217
EMP1	1073
BB49	1435

Fig. 27

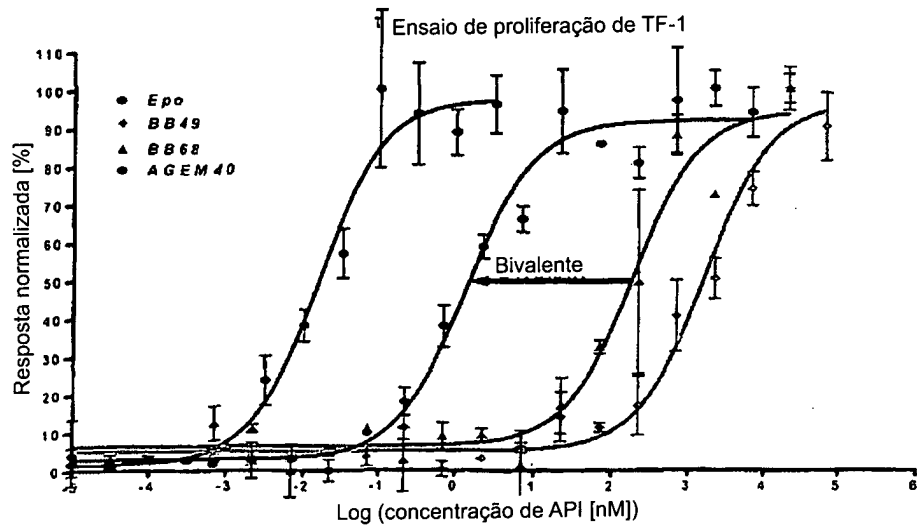
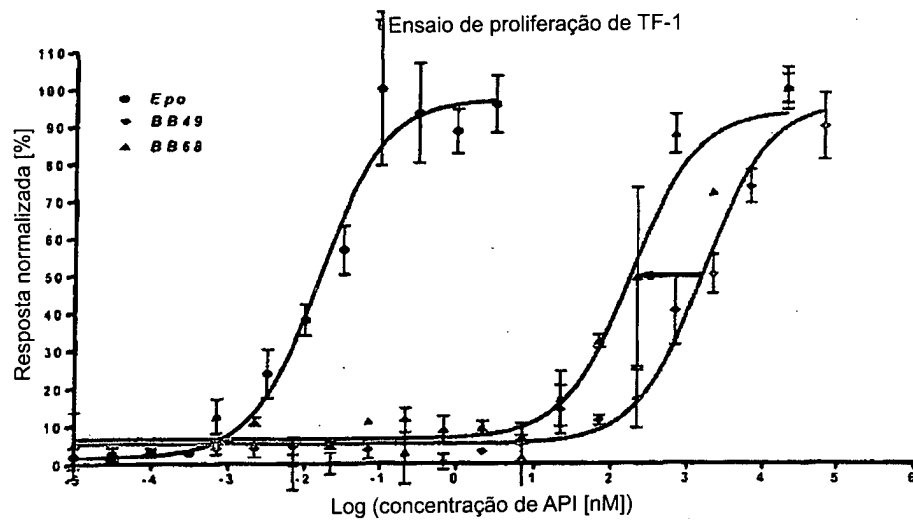


Fig. 28

Substância	EC50 (nM; Exemplo da Fig.28)	EC50 (nM; Exemplo da Fig. 25)
EPO	0,01517	0,02217
EMP1		1073
BB49	1623	1435
BB68	184	
AGEM40	0.662	

Fig. 29

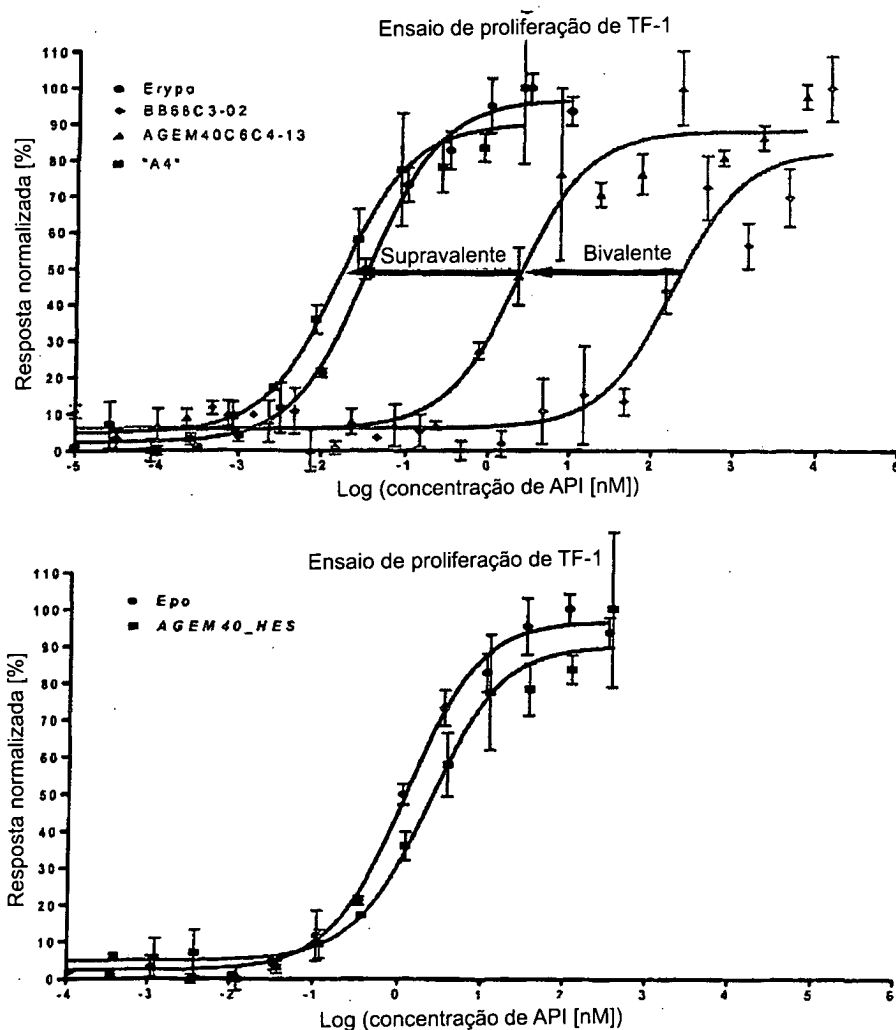


Fig. 30

Substância	EC50 (nM; a Fig.29)	EC50 (nM; a Fig.27)	EC50 (nM; a Fig. 25)
EPO	0,0344	0,01517	0,02217
EMP1			1073
BB49		1623	1435
BB68	183.7	183.5	
AGEM40	2.2	0.662	
AGEM40 HES	0.0159		

Fig. 31

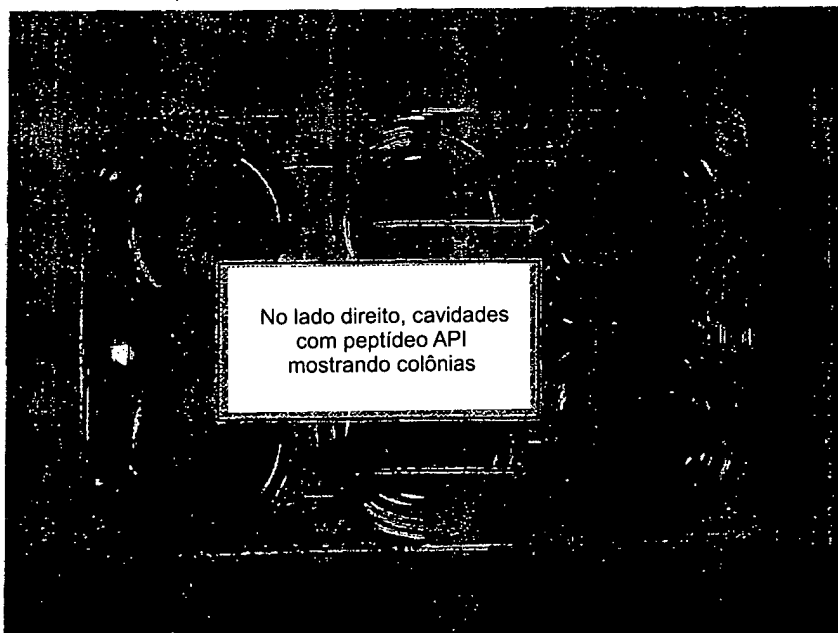


Fig. 32

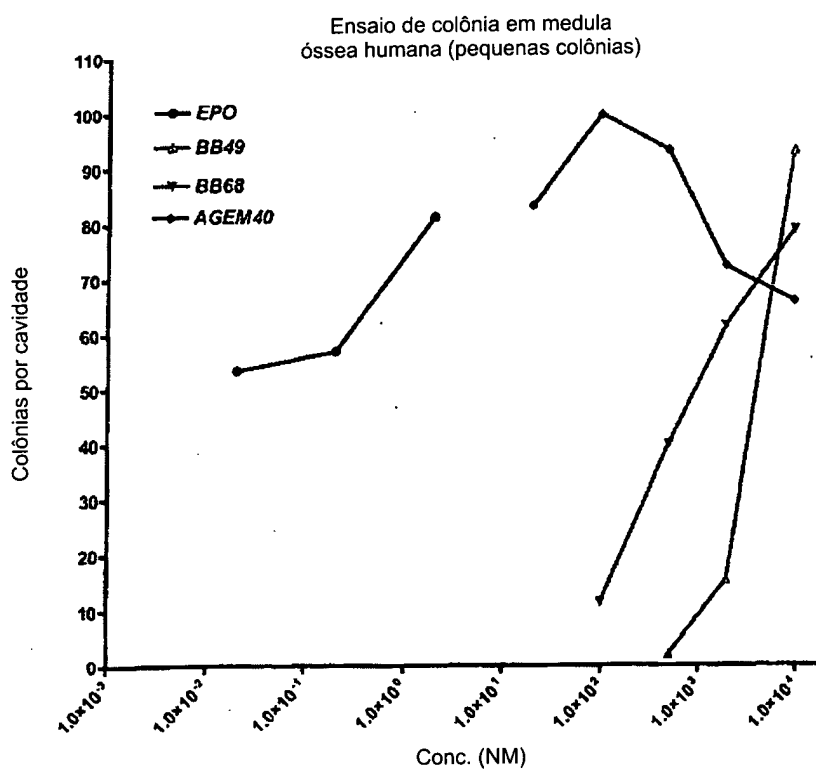
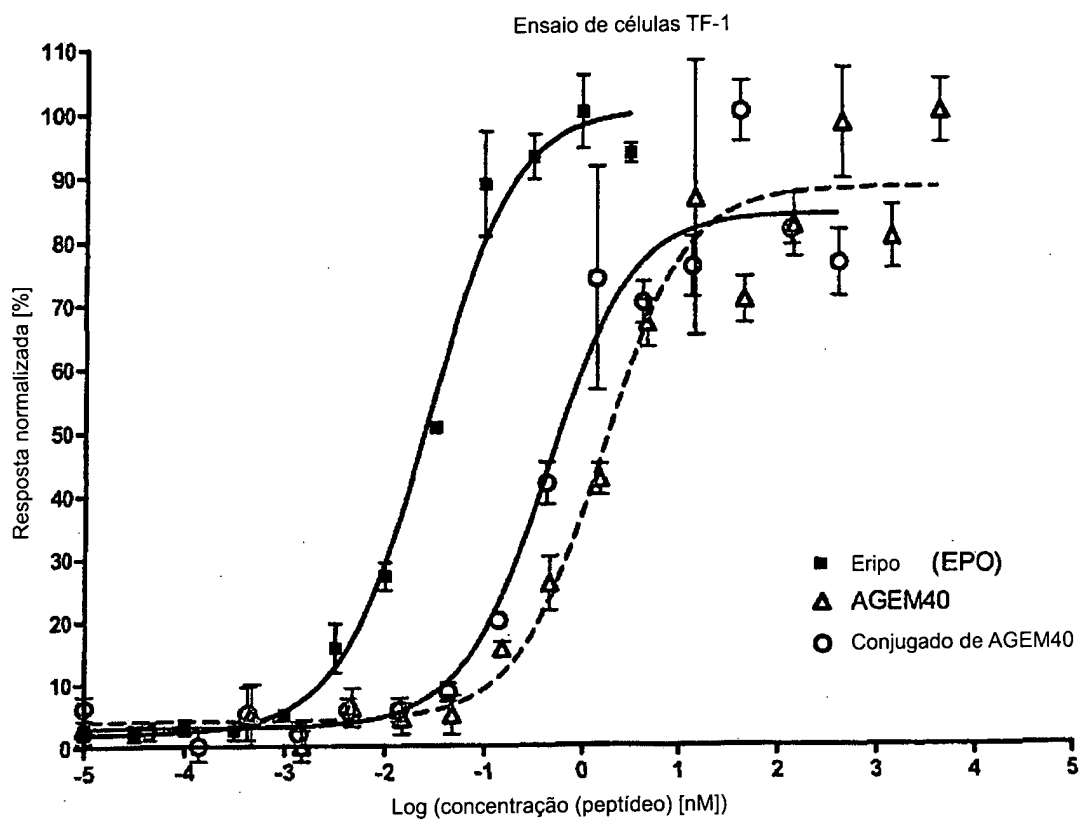


Fig. 33



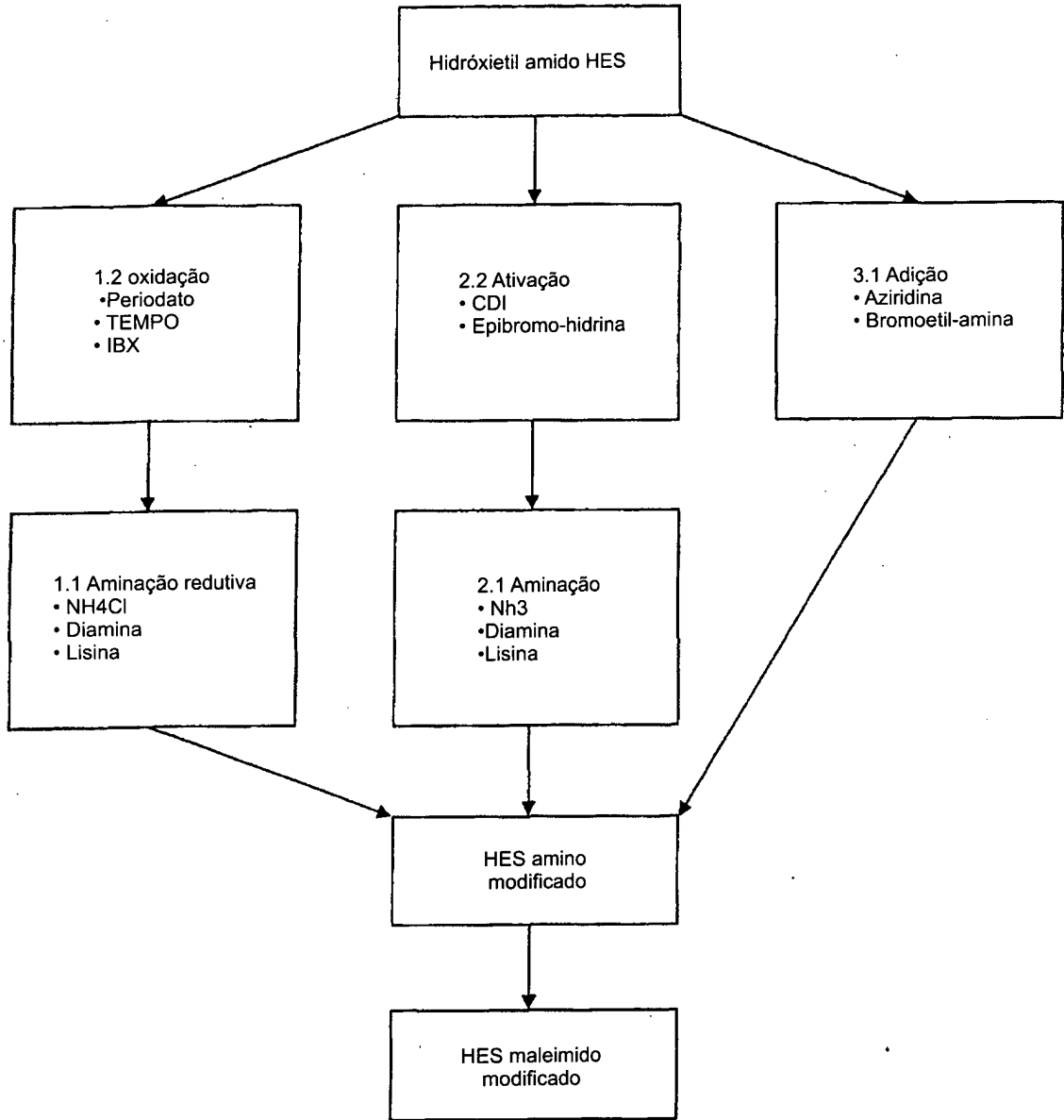


Fig. 34

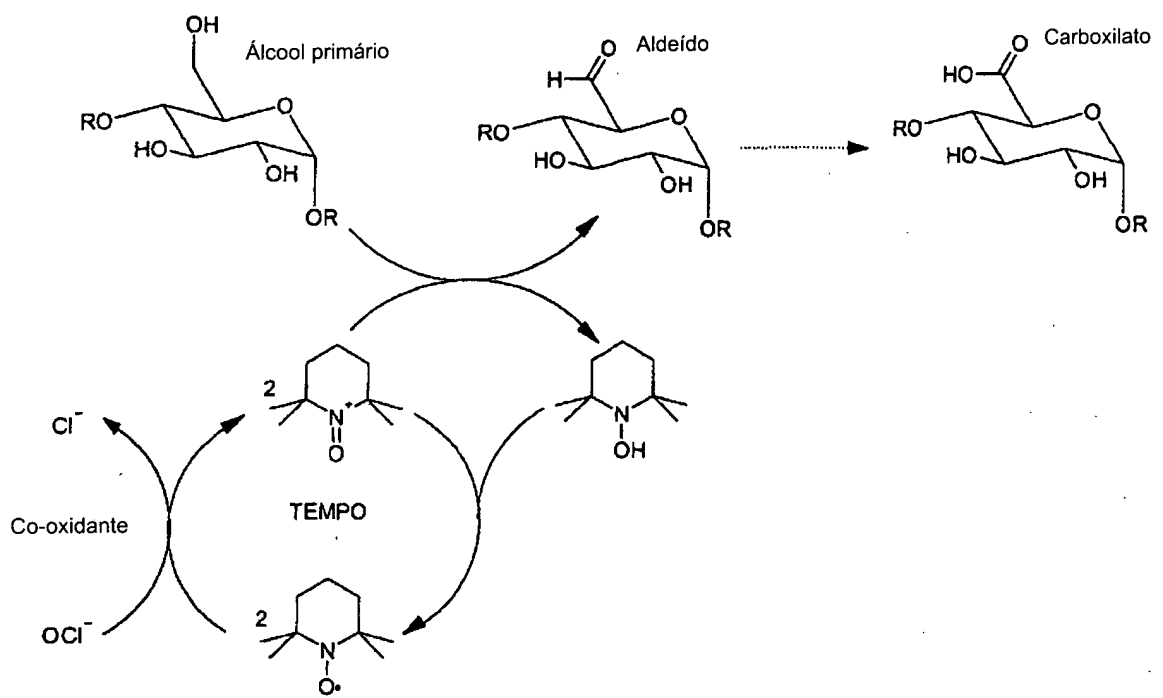


Fig. 35

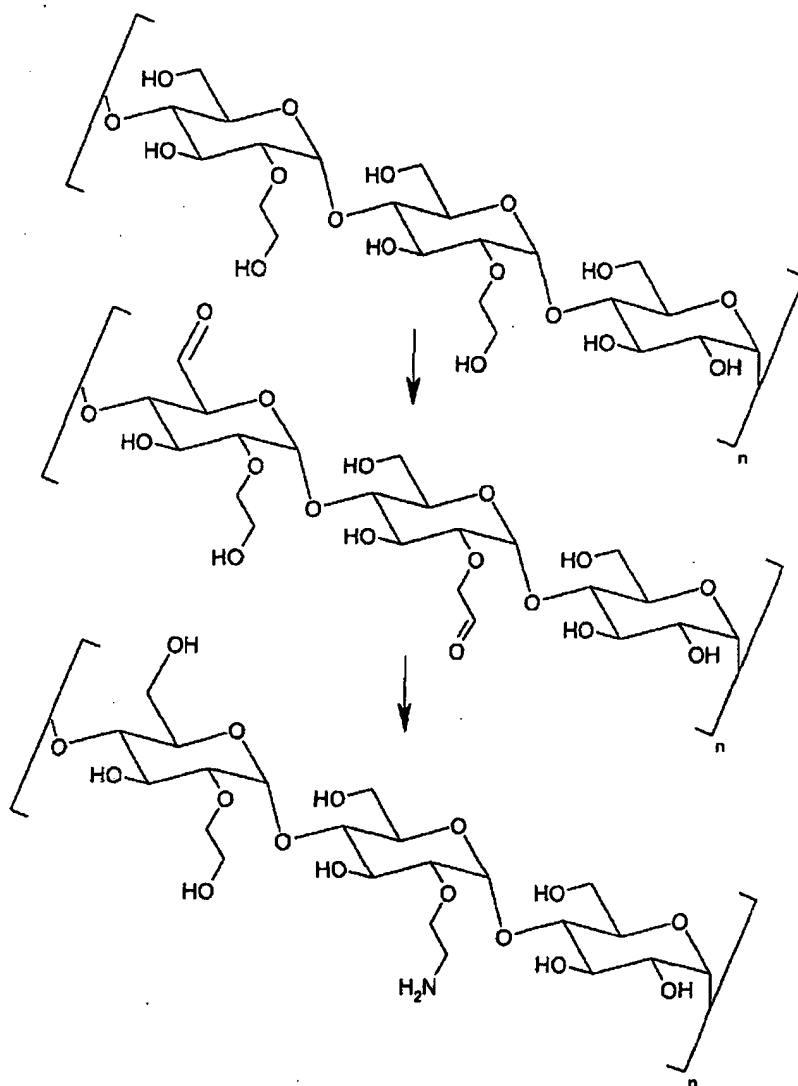


Fig. 36

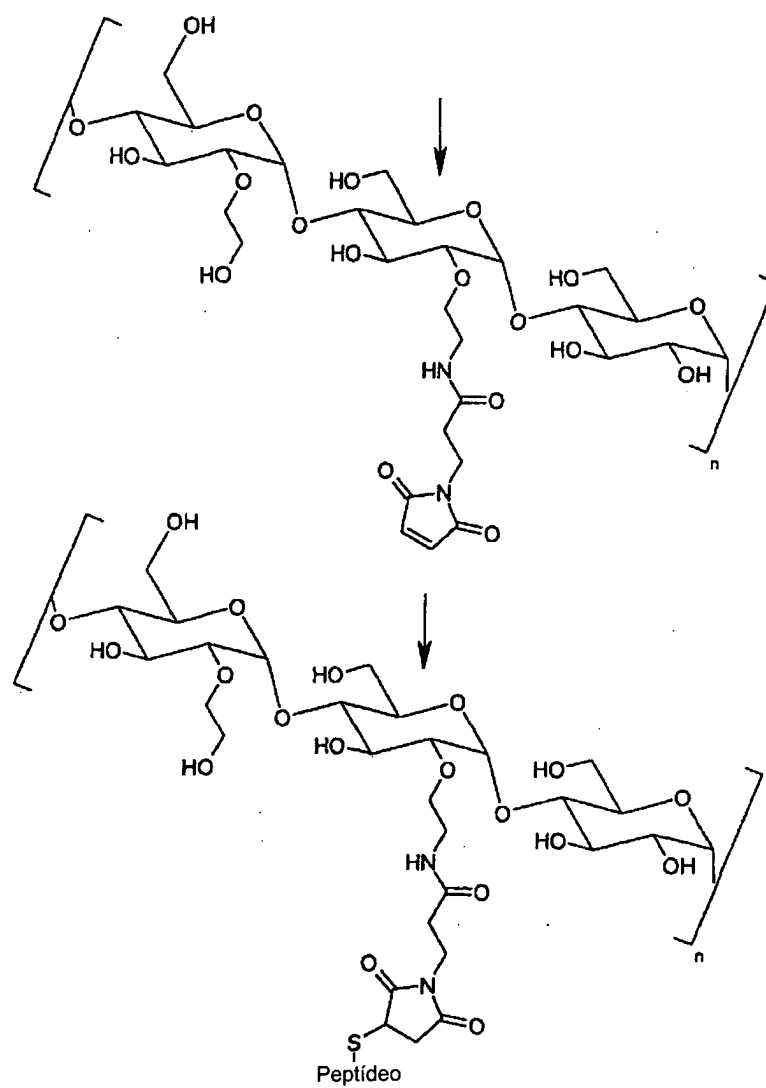


Fig. 37

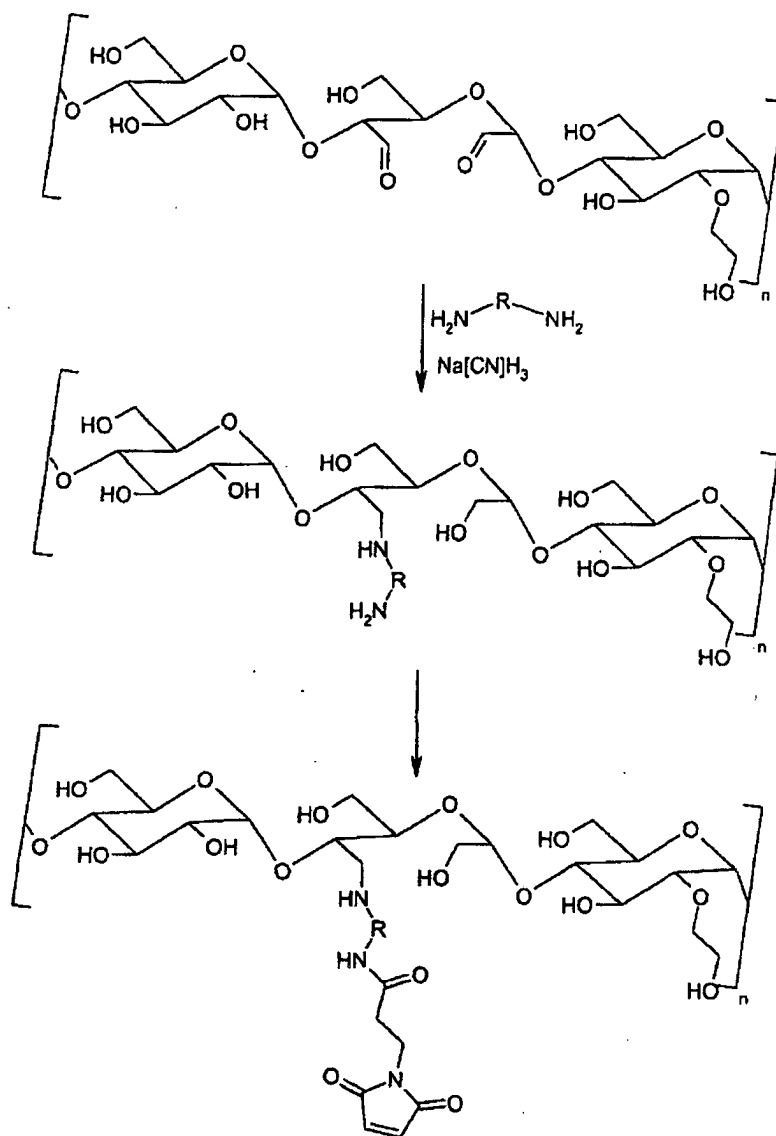


Fig. 38

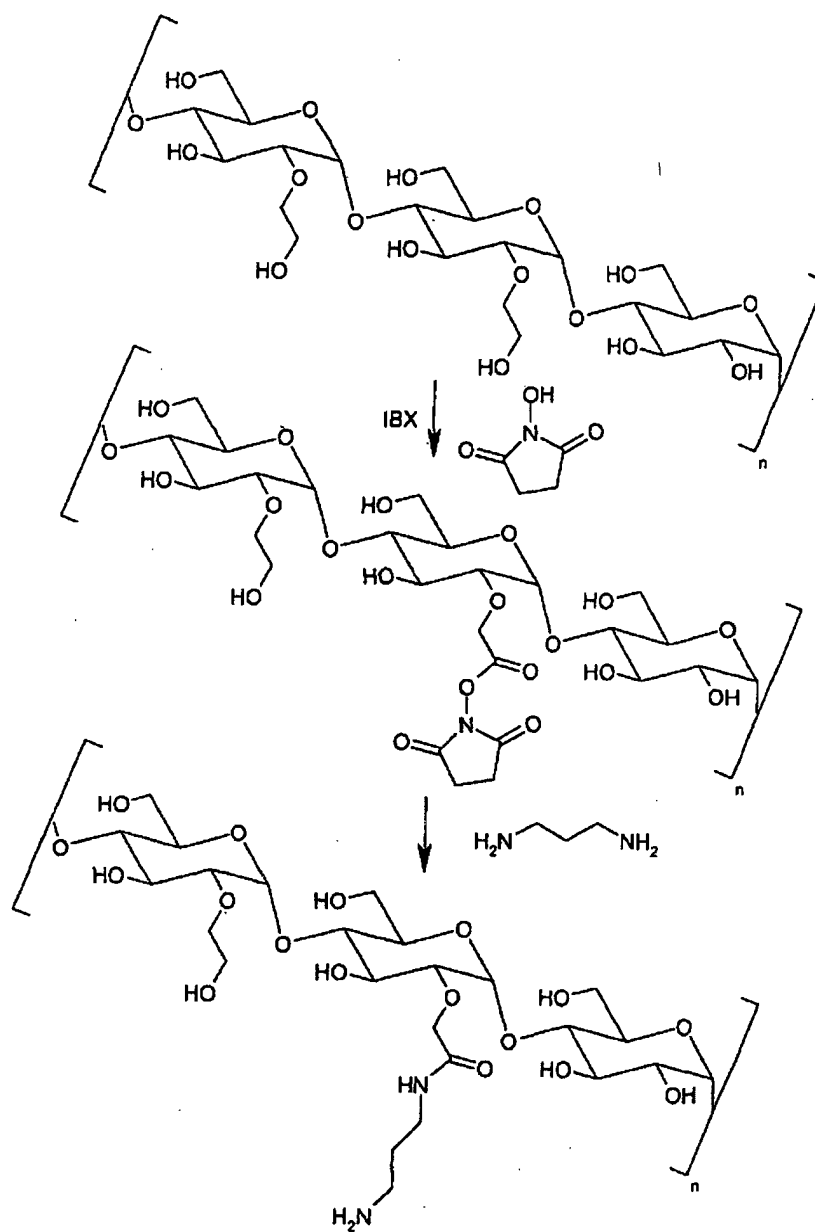


Fig. 39

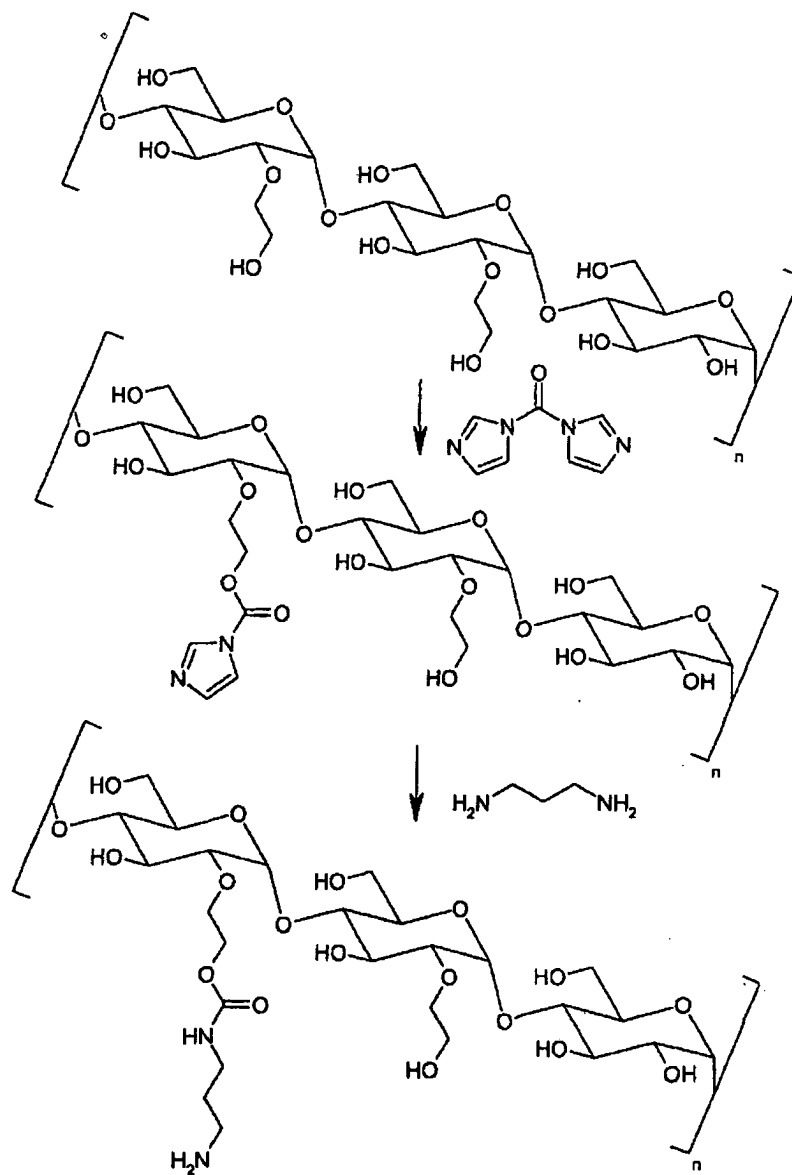


Fig. 40

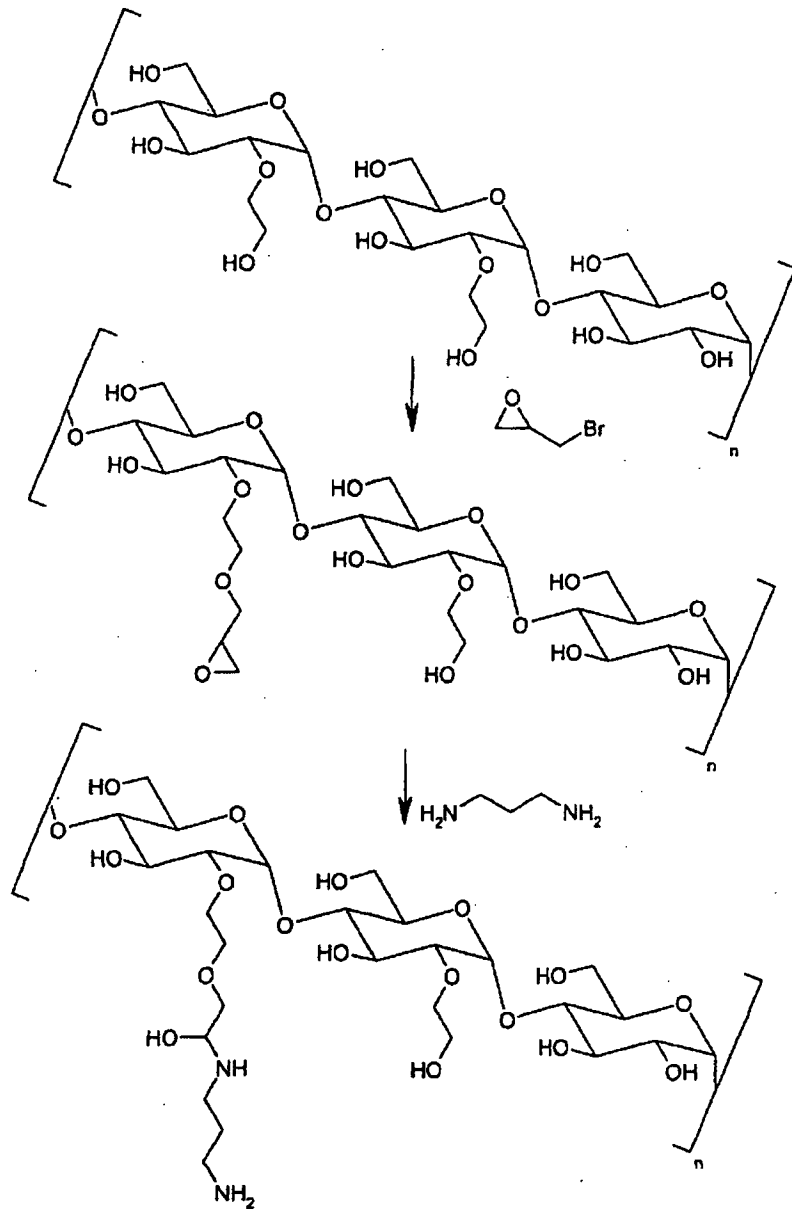


Fig. 41

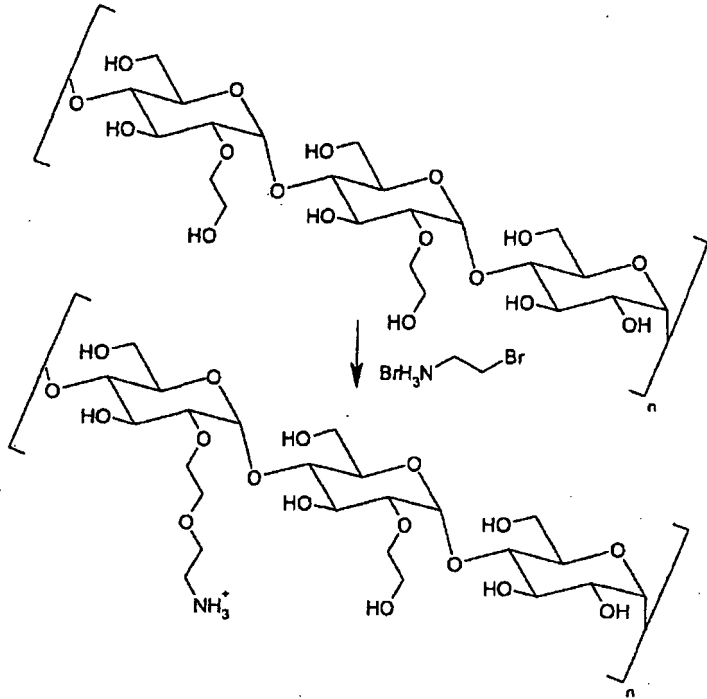


Fig. 42

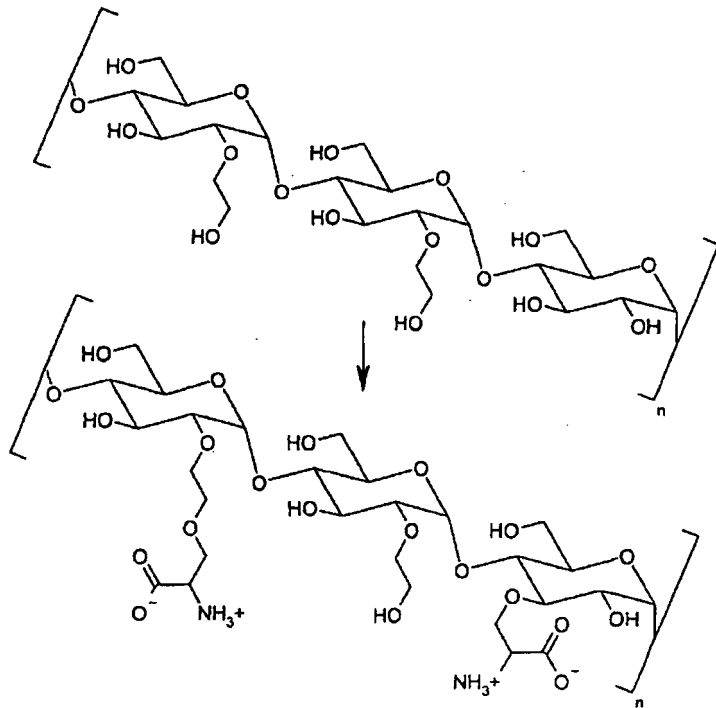


Fig. 43

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSTOS SUPRAVALENTES**".

A presente invenção refere-se a compostos peptídicos supravale-
lentes apresentando uma eficácia intensificada. Compostos supravale-
5 compreendem pelo menos várias unidades peptídicas bivalentes que se li-
gam a um receptor-alvo e são conectadas a uma grande unidade veículo
polimérica.