



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

(21) PI 0714616-7 A2



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

(22) Data de Depósito: 01/08/2007
(43) Data da Publicação: 11/06/2013
(RPI 2214)

(51) Int.Cl.:

C07D 403/12
A61K 31/495
A61K 31/496
A61K 38/06
A61K 38/07
A61K 38/08
A61K 38/12
A61P 37/00
C07D 241/08
C07H 5/06
C07K 5/083
C07K 7/06
C07K 7/64

(54) Título: COMPOSTO BIOATIVO MULTIFUNCIONAL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM COMPOSTO

(30) Prioridade Unionista: 04/08/2006 US 60/835428

(73) Titular(es): Manus Pharmaceuticals (Canada) Ltd.

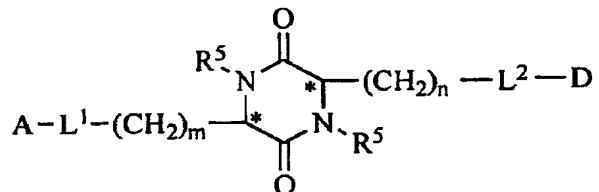
(72) Inventor(es): Vladislav I. Deigin

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT CA2007001357 de
01/08/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/014613de
07/02/2008

(57) Resumo: COMPOSTO BIOATIVO MULTIFUNCIONAL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM COMPOSTO. A presente invenção mostra composto bioativos multifuncionais de fórmula (I) constituídos de uma porção imunorregulatória ligada em um grupo estabilizador e suas composições farmacêuticas úteis no tratamento de distúrbios imunes e distúrbios hematopoiéticos tais como citopenia imune, mieloma múltiplo, leucose linfóide crônica, linfomas linfocíticos, linfossarcomas.



“COMPOSTO BIOATIVO MULTIFUNCIONAL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM COMPOSTO”
CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos compostos, às composições, 5 aos métodos, e às aplicações de uma abordagem nova para administrar compostos bioativos a pacientes em necessidade dos mesmos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Radioterapia e quimioterapia são métodos de tratamento bem estabelecidos para doenças malignas. Células, que crescem e se dividem 10 rapidamente, são mais vulneráveis aos efeitos de radiação e de agentes citotóxicos. Dentre aquelas afetadas estão células tumorais, e células normais incluindo células capilares e intestinais, e células dos sistemas hematopoiético e imune. Dano nas células normais dos sistemas hematopoiético e imune por radiação e agentes citotóxicos muitas vezes tem consequências ameaçadoras 15 da vida, e limita a capacidade de administrar uma dose terapêutica total.

Tem havido pesquisa extensiva para identificar agentes que protegerão células hematopoiéticas e imunológicas normais dos efeitos da radioterapia e da quimioterapia, ou ajudam na reconstituição de células suprimidas por estas terapias. Por exemplo, fator beta-1 de crescimento 20 transformante tem sido relatado em ser útil para proteger células-tronco hematopoiéticas da mielotoxicidade de drogas quimioterapêuticas ou terapia de radiação (Patente U.S. de No. 5.278.145 de Keller et al.). Uma composição liofilizada contendo albumina humana em timosina alfa-1 também foi relatada em exercer uma atividade conservativa contra a progressão de leucemia em 25 camundongos cujos sistemas imunes foram severamente danificados pelo tratamento com agentes citostáticos ou tratamento de radiação. Fatores de crescimento hematopoiético tais como interleucina-3 e CSF têm sido usados para potencializar resposta imune ou ajudar na reconstituição de sangue normal após supressão de célula hematopoiética induzida por radiação-ou-

quimioterapia (WO 88/05469 de Anderson et al., U.S. 4.959.455 de Ciarletta et al; U.S. 4.999.291 de Souza).

5 Semina et al. (Radiatsionnaya Biologiya Radioekologiya 33(3), 1993; WO 89/06134) têm mostrado que o enantiômero levorrotatório (L) do dipeptídeo H-Glu-Trp OH atua como um imunoestimulante e pode induzir a proliferação de células. Como tais, estes dipeptídeos são úteis na reconstituição de células hematopoiéticas e imunes após quimioterapia ou terapia de irradiação.

10 Vários peptídeos com propriedades imunorregulatórias têm sido sintetizados (por exemplo, SU 1.582.393; EP 230.052; US 4.190.646; US 5.008.246; e US 5.013.723). Muitos laboratórios científicos têm tentado desenvolver métodos para preparar derivados sintéticos de peptídeos naturais, que são mais ativos do que seus análogos naturais (por exemplo, EP 136.720; e EP 137.904).

15 Patente Australiana de No. AU-B-29308/89 (correspondendo a WO 089/06134) ensina a preparação de Glu-Trp e seu uso para tratar condições de deficiência imune. WO 93/08815 publicada por Khavinson et al. mostra o peptídeo Glu-Trp e monômeros cíclicos e polímeros do mesmo, para uso no tratamento de imunossupressão.

20 Deigin et al., Patentes dos Estados Unidos 6.051.683, publicada aos 18 de Abril de 2000 e 6.159.940 publicada aos 12 de Dezembro de 2002, descrevem peptídeos imunorregulatórios de fórmula geral:

X-Glu-Trp-Y

25 que podem estimular a resposta imune e modular hematopoiese;

sendo que X é hidrogênio, glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, N-valina, prolina, tirosina, fenil-alanina, triptofano, D-alanina, D-leucina, D-isoleucina, D-valina, D-N-valina, D-prolina, D-tirosina, D-fenil-alanina, D-triptofano, ácido γ -amino-butírico ou ácido ξ -amino-capróico; Y é

glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, N-valina, prolina, tirosina, fenilalanina, triptofano, D-alanina, D-leucina, D-isoleucina, D-valina, D-N-valina, D-prolina, D-tirosina, D-fenil-alanina, D-triptofano, γ -valina, D-N-valina, D-prolina, D-tirosina, D-fenil-alanina, D-triptofano, ácido γ -amino-butírico, 5 ácido ξ -amino-capróico, -OH, NH₂, N₂H₃, ou a amida mono- ou dissubstituída (C1-C3); e mais particularmente H-Ile-Glu-Trp-OH.

Deigin et al., Patentes dos Estados Unidos 5.736.519 publicada aos 7 de Abril de 1998; 6.103.699 publicada aos 15 de Agosto de 2000 e 6.410.515 publicada aos 25 de Junho de 2003 descrevem peptídeos 10 imunorregulatórios de fórmula geral:



para reconstituição de células após radiação ou quimioterapia, para inibir proliferação celular, e para imunossupressão, sendo que X é hidrogênio, glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, N-valina, prolina, 15 tirosina, fenil-alanina, triptofano, D-alanina, D-leucina, D-isoleucina, D-valina, D-N-valina, D-prolina, D-tirosina, D-fenil-alanina, D-triptofano, ácido γ -amino-butírico ou ácido ξ -amino-capróico; A é ácido D-glutâmico ou é ácido D- γ -glutâmico; e Y é glicina, alanina, leucina, isoleucina, alanina, D-leucina, D-isoleucina, D-valina, D-N-valina, D-prolina, D-tirosina, D-fenilalanina, D-triptofano, ácido γ -amino-butírico ou ácido ξ -amino-capróico; A é ácido D-glutâmico ou ácido D- γ -glutâmico; e Y é glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, N-valina, prolina, tirosina, fenil-alanina, triptofano, D-alanina, D-leucina, D-isoleucina, D-valina, D-N-valina, D-prolina, D-tirosina, D-fenil-alanina, D-triptofano, ácido γ -amino-butírico, ácido ξ -amino-capróico, hidroxila, ou um grupo amida; e mais particularmente H- γ -D-Glu-20 Trp-OH.

Deigin et al., Patentes dos Estados Unidos 6.184.208, publicada aos 6 de Fevereiro de 2001 e 6.248.716, publicada aos 19 de Junho de 2001 descrevem peptídeos imunorregulatórios de fórmula geral:

X-Tyr-Y-Phe-Z-A

que reduzem estresse, estimulam ganho de peso, zona de crescimento de epitélio, processos anabólicos e reparativos e de cicatrização de ferimento; sendo que X é hidrogênio, arginina, D-arginina, ornitina, D-ornitina, lisina, D-lisina, homoarginina, D-homoarginina, citrulina, D-citrulina; Tyr é tirosina; Y é D-alanina, D-valina, D-leucina, D-isoleucina, D-fenil-alanina, D-asparagina, D-triptofano, D-prolina, D-serina, D-treonina, D-tirosina, D-hidróxi-prolina, D-cisteína, D-cisteil-cisteína, D-metionina, D-lisina, D-homoarginina, D-arginina, D-histidina, ácido D-aspártico, ácido D-glutâmico, D-β-D-homoarginina, D-arginina, D-histidina, ácido D-aspártico, ácido D-glutâmico, D-β-alanina, ou D-ornitina; Phe é fenil-alanina; Z é alanina, D-alanina, valina, D-valina, leucina, D-leucina, isoleucina, D-isoleucina, fenil-alanina, D-fenil-alanina, asparagina, D-asparagina, glicina, glutamina, D-glutamina, triptofano, D-triptofano, prolina, D-prolina, serina, D-serina, treonina, D-treonina, tirosina, D-tirosina, hidróxi-prolina, D-hidróxi-prolina, cisteína, D-cisteína, cisteil-cisteína, cisteína, D-cisteína, D-cisteil cisteína, D-cisteína-D-cisteína, metionina, D-metionina, lisina, D-lisina, arginina, D-arginina, histidina, D-histidina, ácido aspártico, ácido D-aspártico, ácido glutâmico, ácido D-glutâmico, β-alanina, D-β-alanina, ornitina, ou D-ornitina; e, A é hidroxila ou amida substituída (C1-C3); e mais particularmente H-Arg-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-OH.

Composições para a liberação, em particular, de agentes ativos compreendendo um sistema baseado em diceto-piperazina são descritas em várias patentes e pedidos de patente pertencentes a Emisphere Technologies, Inc., incluindo por exemplo, Patentes U.S. de Nos. 6.663.898, 6.395.774, 6.331.318, 5.976.569 e 5.693.338, bem como Pedidos de Patente U.S. de Nos. 20030198658, 20030155993 e 20030028250. Nestas composições, a diceto-piperazina é tipicamente adicionada como um componente separado.

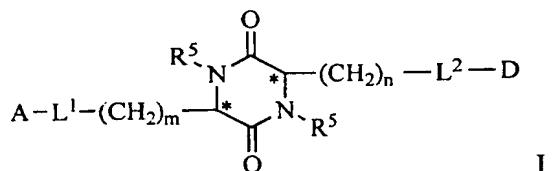
Permanece uma necessidade de métodos eficazes para

liberação de compostos bioativos no corpo que podem ser prontamente ajustados para quaisquer aplicações ou para aplicações múltiplas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção representa uma plataforma nova para a liberação terapêutica de compostos bioativos multifuncionais. A invenção refere-se às moléculas que possuem uma porção imunorregulatória ligada em um grupo estabilizador. O grupo estabilizador atua como um carreador eficaz para o imunorregulador para dentro do corpo. Ademais, o imunorregulador e o estabilizador podem estar opcionalmente ligados em outra molécula funcionalmente bioativa. A molécula bioativa possui quer outra atividade imunorregulatória, atividade que complementa ou realiza sinergia com a porção imunorregulatória quer uma atividade terapêutica diferente.

Conseqüentemente, a presente invenção inclui um composto bioativo multifuncional selecionado de um ou mais de um composto de fórmula I:



sendo que

A é um radical imunorregulatório selecionado do grupo consistindo de Trp, Tyr, Phe, His, arila e heteroarila, onde os grupos arila e heteroarila podem estar opcionalmente substituídos com 1 a 6 substituintes independentemente selecionados do grupo consistindo de halo, OH, OC_{1-6} alcoxila, C_{1-6} alquila, C_{2-6} alquenila, C_{2-6} alqueniloxila, NH_2 , $\text{NH}(\text{C}_{1-6}\text{alquila})$, $\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{alquil})(\text{C}_{1-6}\text{alquila})$, CN, CF_3 , OCF_3 , NO_2 , $\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-6}\text{alquila}$, $\text{C}(\text{O})\text{OC}_{1-6}\text{alquila}$, $\text{SO}_2\text{C}_{1-6}\text{alquila}$, SO_2NH_2 , $\text{SO}_2\text{NHC}_{1-6}\text{alquila}$, fenila e C_{1-6} alquilenofenila,

e onde heteroarila é um anel carbocíclico aromático contendo

de 5 a 10 átomos de carbono, no qual 1 a 4 átomos de carbono têm sido substituídos por um heteroátomo selecionado de um ou mais de O, S e N-R¹, onde R¹ é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, C₁₋₄alquilenosarila, C(O)C₁₋₆alquila, C(O)arila, SO₂C₁₋₆alquila e SO₂arila quando o átomo de N estiver hibridizado em sp³, ou é um par de elétrons sozinho quando o átomo de N estiver hibridizado em sp²;

L¹ e L² são cada um independentemente um grupo de ligação selecionado do grupo consistindo de uma ligação simples,-C(O)-C(O)NR²-, -NR²C(O)-, -NR²-, -C(O)-O-, -OC(O)-, -S-S-, SO₂NR²-, NR²SO₂-, -S-e-O-;

R² é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, C₁₋₆alquilenosarila, C(O)C₁₋₆alquila, C(O)arila, SO₂C₁₋₆alquila e SO₂arila;

R⁵ é H ou C₁₋₆alquila;

* é a configuração L ou D ou suas misturas;

m é um número inteiro entre 1 e 50;

n é um número inteiro entre 0 e 50; e

D é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, qualquer cadeia lateral de um aminoácido e qualquer molécula funcionalmente ativa, e sais, solvatos e pró-drogas farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos.

A presente invenção adicionalmente se refere às composições farmacêuticas compreendendo um composto bioativo multifuncional da invenção e um carreador farmaceuticamente aceitável.

Também estão incluídos na presente invenção métodos de tratamento de distúrbios imunes, e opcionalmente de outros distúrbios no mesmo indivíduo, compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um composto bioativo multifuncional da invenção a um indivíduo em necessidade da mesma. Ademais, é proporcionado um uso de um composto bioativo multifuncional da invenção para tratar distúrbios imunes, e opcionalmente outros distúrbios no mesmo indivíduo, bem como um uso de

um composto bioativo multifuncional da invenção para preparar um medicamento para tratar distúrbios imunes, e opcionalmente outros distúrbios no mesmo indivíduo.

Outras características e vantagens da presente invenção se tornarão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada. Deve ser entendido, contudo, que a descrição detalhada e os exemplos específicos embora indiquem modalidades preferidas da invenção são fornecidos apenas por meio de ilustração, porque várias mudanças e modificações dentro do espírito e do escopo da invenção se tornarão evidentes para aqueles pessoas experientes na arte a partir desta descrição detalhada.

DESCRIÇÃO BREVE DOS DESENHOS

A invenção será agora descrita em relação os desenhos nos quais:

Figura 1 é um espectro de NMR de ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OMe), que é um composto de uma modalidade da presente invenção.

Figura 2 mostra o gráfico de diluição de titulação de OVA + CFA.

Figura 3 mostra o gráfico de diluição de titulação de compostos 33a, 33b, 17 e OVA. Figura 4 mostra uma ilustração gráfica da atividade adjuvante de compostos 17, 19, 26a, 26b, 33a, 33b e OVA.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

(i) Definições

As seguintes abreviações padrão para os resíduos de aminoácido são usadas em todo o relatório descritivo: Ala-alanina; Arg-arginina; Asn-Asparagina; Asp-ácido aspártico; Cys-cisteína; Glu-ácido glutâmico; iGlu-ácido iso-glutâmico; Gln-glutamina; His-histidina; Lys-lisina; Met-metionina; Ser-serina; Thr-treonina; Phe-fenil-alanina; Gly-glicina; Ile-isoleucina; Leu-leucina; Pro-prolina; Val-valina; Nval-N-valina; Trp-triptofano; e Tyr-tirosina.

O termo "Ph" significa fenila.

O termo "Bn" significa benzila.

O termo "Me" significa metila.

O termo "alquila" como aqui usado significa grupos alquila de cadeia linear e/ou ramificada contendo de um a seis átomos de carbono e inclui metila, etila, propila, isopropila, t-butila, pentila, hexila e semelhante.

O termo "alcoxila" como aqui usado significa grupos alcoxila de cadeia linear e/ou ramificada contendo de um a seis átomos de carbono e inclui metoxila, etoxila, propiloxila, isopropiloxila, t-butoxila, hexiloxila e semelhante.

O termo "alquenila" como aqui usado significa grupos alquenila de cadeia linear e/ou ramificada contendo de dois a seis átomos de carbono e uma a três ligações duplas e inclui vinila, alila, 1-butenila, 2-hexenila e semelhante.

O termo "alqueniloxila" como aqui usado significa grupos alqueniloxila de cadeia linear e/ou ramificada contendo de dois a seis átomos de carbono e uma a três ligações duplas e inclui viniloxila, aliloxila, propeniloxila, buteniloxila, hexeniloxila e semelhante.

O termo "alquileno" como aqui usado significa radicais alquila lineares e/ou ramificados bifuncionais contendo o número especificado de átomos de carbono.

O termo "halo" como aqui usado significa halogênio e inclui cloro, fluoro, bromo, iodo e semelhante.

O termo "farmaceuticamente aceitável" significa compatível com o tratamento de animais, em particular, de humanos.

O termo "sal farmaceuticamente aceitável" significa um sal de adição de ácido ou sal de adição de base que é adequado para ou compatível com o tratamento de animais, em particular, de humanos.

O termo "sal de adição de ácido farmaceuticamente aceitável"

como aqui usado significa qualquer sal inorgânico ou orgânico não-tóxico de qualquer composto básico da invenção, ou de qualquer um de seus intermediários. Compostos básicos da invenção que podem formar um sal de adição de ácido incluem aqueles tendo um nitrogênio básico, por exemplo 5 NH_2 e $\text{NHC}_1\text{4alquila}$. Ácidos inorgânicos ilustrativos que formar sais adequados incluem ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico e ácido fosfórico, bem como sais de metal tais como mono-hidrogeno-orto-fosfato de sódio e hidrogeno-sulfato de potássio. Ácidos orgânicos ilustrativos que 10 formam sais adequados incluem ácidos mono-, di- e tricarboxílicos tais como ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido malônico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido benzóico, ácido fenil-acético, ácido 15 cinâmico, e ácido salicílico. Quaisquer sais de mono-e di-ácidos podem ser formados, e tais sais podem existir em qualquer forma hidratada, solvatada ou substancialmente anidra. Em geral, os sais de adição de ácido dos compostos da invenção são mais solúveis em água e vários solventes orgânicos hidrofilicos, e geralmente demonstram pontos de fusão mais altos em comparação com suas formas de base livre. A seleção do sal apropriado será 20 conhecida por uma pessoa experiente na arte. Outros sais não-farmacologicamente aceitáveis, e.g. oxalatos, podem ser usados, por exemplo, no isolamento dos compostos da invenção, para uso em laboratório, ou para conversão subsequente em um sal de adição de ácido farmacologicamente aceitável.

O termo "sal de adição de base farmacologicamente aceitável" 25 como aqui usado significa qualquer sal de adição de base inorgânica ou orgânica não-tóxica de qualquer um dos compostos ácidos da invenção. Bases inorgânicas ilustrativas incluem hidróxido de lítio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio, hidróxido de magnésio ou hidróxido de bário. Bases orgânicas ilustrativas que formam sais adequados

incluem aminas orgânicas alifáticas, alicíclicas ou aromática tais como metil-amina, trimetil-amina e picolina ou amônia. A seleção do sal apropriada será conhecida por uma pessoa experiente na arte.

O termo "solvato" como aqui usado significa um composto da invenção, ou um sal farmaceuticamente aceitável de um composto da invenção, sendo que moléculas de um solvente adequado estão incorporadas no retículo cristalino. Um solvente adequado é fisiologicamente tolerável na dosagem administrada. Exemplos de solventes adequados são etanol, água e semelhante. Quando água é o solvente, a molécula é chamada de um "hidrato".

O termo "composto(s) da invenção" como aqui usado significa composto(s) de Fórmula I, e/ou seus sais, solvatos e/ou pró-drogas farmaceuticamente aceitáveis.

É para ficar claro que a presente invenção inclui sais, solvatos e pró-drogas farmaceuticamente aceitáveis de compostos da invenção e misturas compreendendo dois ou mais compostos da invenção, sais farmaceuticamente aceitáveis dos compostos da invenção (onde aplicável), solvatos farmaceuticamente aceitáveis dos compostos da invenção e pró-drogas dos compostos da invenção.

O termo uma "quantidade efetiva" ou uma "quantidade suficiente" de um agente como aqui usado é aquela quantidade suficiente para produzir resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos, e, como tal, uma "quantidade efetiva" depende do contexto no qual ela está sendo aplicada. Por exemplo, no contexto de administração de um agente que atua como um imunomodulador, uma quantidade efetiva de um agente é, por exemplo, uma quantidade suficiente para alcançar uma tal modulação em resposta imune em comparação com a resposta obtida sem a administração do agente.

Como aqui usado, e como bem entendido na arte, "tratamento"

é uma abordagem para obter resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos. Resultados clínicos benéficos ou desejados podem incluir, mas não são limitados a, alívio ou melhoria de um ou mais sintomas ou condições, diminuição da extensão de doença, estado estabilizado (i.e. não piorado) de doença, prevenção de disseminação da doença, atraso ou diminuição da velocidade de progressão da doença, melhoria ou paliação do estado doentio, e remissão (quer parcial quer total), quer detectável quer indetectável. "Tratamento" também pode significar prolongamento da sobrevivência em comparação com a sobrevivência esperada se não receber tratamento.

"Paliação" de uma doença ou de um distúrbio significa que a extensão e/ou as manifestações clínicas indesejáveis de um distúrbio ou de um estado doentio são minoradas e/ou o curso de tempo da progressão é tornado mais lento ou prolongado, em comparação com o não tratamento do distúrbio.

O termo "modular" como aqui usado inclui a inibição ou supressão de uma função ou atividade (tal como resposta imune) bem como a intensificação de uma função ou atividade.

"Inibir" ou "suprimir" ou "reduzir" uma função ou atividade, tal como resposta imune, é reduzir a função ou atividade quando comparado com sob outros aspectos as mesmas condições exceto para uma condição ou um parâmetro de interesse, ou alternativamente, em comparação com outras condições.

"Intensificar" ou "aumentar" ou "estimular" uma função ou atividade, tal como resposta imune, é aumentar a função ou atividade quando comparado com sob outros aspectos as mesmas condições exceto para uma condição ou um parâmetro de interesse, ou alternativamente, em comparação com outras condições.

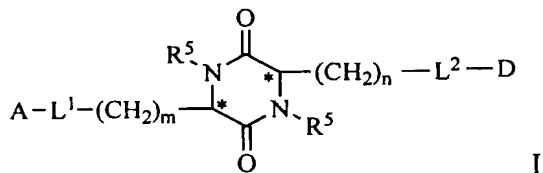
O termo "indivíduo" como aqui usado inclui todos os membros

do reino animal incluindo humano. O indivíduo é preferivelmente um humano.

(ii) Compostos da invenção

A presente invenção refere-se aos compostos compreendendo uma porção imunorregulatória, uma porção estabilizadora e, opcionalmente uma outra porção funcionalmente ativa. As porções são unidas via vários grupos de ligação para proporcionar um composto multifuncional que pode ser usado para tratar múltiplos distúrbios no mesmo indivíduo.

Conseqüentemente, a presente invenção inclui um composto multifuncional bioativo selecionado de um ou mais de um composto de fórmula I:



sendo que

A é um radical imunorregulatório selecionado do grupo consistindo de Trp, Tyr, Phe, His, arila e heteroarila, onde os grupos arila e heteroarila podem estar opcionalmente substituídos com 1 a 6 substituintes independentemente selecionados do grupo consistindo de halo, OH, OC₁₋₆alcoxila, C₁₋₆alquila, C₂₋₆alquenila, C₂₋₆alqueniloxila, NH₂, NH(C₁₋₆alquila), N(C₁₋₆alquil)(C₁₋₆alquila), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₆alquila, C(O)OC₁₋₆alquila, SO₂C₁₋₆alquila, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₆alquila, fenila e C₁₋₆alquilenofenila,

20

e onde heteroarila é um anel carbocíclico aromático contendo de 5 a 10 átomos de carbono, no qual 1 a 4 átomos de carbono têm sido substituídos por um heteroátomo selecionado de um ou mais de O, S e N-R¹, onde R¹ é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, C₁₋₄alquilenarila, C(O)C₁₋₆alquila, C(O)arila, SO₂C₁₋₆alquila e SO₂arila quando o átomo

25

de N estiver hibridizado em sp^3 , ou é um par de elétrons sozinho quando o átomo de N estiver hibridizado em sp^2 ;

5 L^1 e L^2 são cada um independentemente um grupo de ligação selecionado do grupo consistindo de uma ligação simples,-C(O)-C(O)NR²-, -NR²C(O)-,-NR²-,-C(O)-O-,-OC(O)-,-S-S-, SO₂NR²-, NR²SO₂-, -S-e-O-;

R^2 é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, C₁₋₆alquilenos-arila, C(O)C₁₋₆alquila, C(O)arila, SO₂C₁₋₆alquila e SO₂arila;

R^5 é H ou C₁₋₆alquila;

* é a configuração L ou D ou suas misturas;

10 m é um número inteiro entre 1 e 50;

n é um número inteiro entre 0 e 50; e

D é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, qualquer cadeia lateral de um aminoácido e qualquer molécula funcionalmente ativa,

15 e sais, solvatos e pró-drogas farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos.

Nos compostos da presente invenção, A é um radical imunorregulatório. O termo "radical imunorregulatório" refere-se a qualquer grupo contendo aromático ou heteroaromático tendo atividade imuno- ou 20 hemossupressiva ou atividade imuno- ou hemoestimulativa. Especificamente, A é selecionado do grupo consistindo de Trp, Tyr, Phe, His, arila e heteroarila, onde os grupos arila e heteroarila podem estar opcionalmente substituídos com 1 a 6 substituintes independentemente selecionados do grupo consistindo de halo, OH, OC₁₋₆alcoxila, C₁₋₆alquila, C₂₋₆alquenila, C₂₋₆alqueniloxila, NH₂, NH(C₁₋₆alquila), N(C₁₋₆alquil)(C₁₋₆alquila), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₆alquila, C(O)OC₁₋₆alquila, SO₂C₁₋₆alquila, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₆alquila, fenila e C₁₋₆alquilenos-fenila, e onde heteroarila é um anel carbocíclico aromático contendo de 5 a 10 átomos de carbono, no qual 1 a 4 átomos de carbono têm sido substituídos por um heteroátomo selecionado de

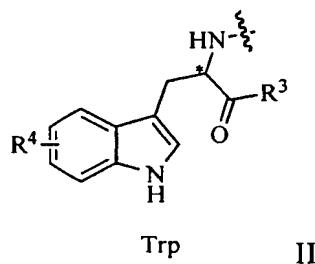
um ou mais de O, S e N-R¹, onde R¹ é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, C₁₋₆alquíleno-arila, C(O)C₁₋₆alquila, C(O)arila, SO₂C₁₋₆alquila e SO₂arila quando o átomo de N estiver hibridizado em sp³, ou é um par de elétrons sozinho quando o átomo de N estiver hibridizado em sp². Em 5 modalidades da invenção, A é selecionado do grupo consistindo de Trp, Tyr, Phe, His, arila e heteroarila, onde os grupos arila e heteroarila podem estar opcionalmente substituídos com 1 a 3 substituintes independentemente selecionados do grupo consistindo de halo, OH, OC₁₋₄alcoxila, C₁₋₄alquila, C₂₋₄alquenila, C₂₋₄alqueniloxila, NH₂, NH(C₁₋₄alquila), N(C₁₋₄alquil)(C₁₋₄alquila), 10 CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₄alquila, C(O)OC₁₋₄alquila, SO₂C₁₋₄alquila, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₄alquila, fenila e C₁₋₄alquíleno-fenila, e onde heteroarila é um anel carbocíclico aromático contendo de 5 a 10 átomos de carbono, no qual 1 a 3 átomos de carbono têm sido substituídos por um heteroátomo selecionado de um ou mais de O, S e N-R¹, onde R¹ é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₄alquila, C₁₋₂alquíleno-arila, C(O)C₁₋₄alquila, C(O)arila, 15 SO₂C₁₋₄alquila e SO₂arila quando o átomo de N estiver hibridizado em sp³, ou é um par de elétrons sozinho quando o átomo de N estiver hibridizado em sp². Em outras modalidades da invenção, A é selecionado do grupo consistindo de Trp, arila e heteroarila, sendo que arila é fenila ou naftila e heteroarila é piridinila, imidazolila, tienila, furanila, indolila, isoquinolinila, quinolinila, benzotienila, benzofuranila, benzotiazolila, tiazolo, benzooxazolila, benzoisoxazolila, benzoisotiazolila ou semelhante, com o anel indol de Trp, arila e heteroarila estando não substituído ou substituído com 1 a 2 substituintes independentemente selecionados do grupo consistindo de halo, 20 OH, C₁₋₄alcoxila, C₁₋₄alquila, C₂₋₄alquenila, C₂₋₄alqueniloxila, NH₂, NH(C₁₋₄alquila), N(C₁₋₄alquil)(C₁₋₄alquila), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₄alquila, C(O)OC₁₋₄alquila, SO₂C₁₋₄alquila, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₄alquila, fenila e C₁₋₄alquíleno-fenila. 25

Quando A é selecionado de Trp, Tyr, Phe ou His, este grupo

pode estar conectado em um grupo de ligação via o grupo amina ou carboxila. Quando não conectado no grupo de ligação, o grupo amina ou carboxila livre pode estar derivado. Por exemplo, a amina pode estar mono- ou dialquilada com C₁₋₆alquila, acilada com uma C(O)C₁₋₆alquila ou convertida em NH₃⁺ pela adição de um ácido farmaceuticamente aceitável. Ademais, o grupo carboxila pode estar esterificado, por exemplo como um C₁₋₆alquil-éster, convertido na amida correspondente que também pode estar mono- ou diesterificado com C₁₋₆alquila, convertido em sua hidrazina correspondente ou em seu sal de adição de base correspondente. Em outro aspecto da presente 5 invenção, tem sido verificado que quando A é Trp, a atividade imuno- e hemomodulatória deste grupo pode ser controlada pela estereoquímica no carbono- α . Por exemplo, quando a estereoquímica estiver na configuração-D, este grupo pode possuir atividade imuno- e hemodepressiva. Conseqüentemente, a atividade imunomodulatória das moléculas da presente 10 invenção pode ser controlada e ajustada para usos específicos e terapias de combinação.

15

Em uma modalidade da invenção, A é um grupo tendo a fórmula II:



sendo que R³ é selecionado do grupo consistindo de H, OC₁₋₆alquila, NH₂, NHC₁₋₆alquila, N(C₁₋₆alquila)₂, NHNH₂ e OY, onde Y é um 20 cátion farmaceuticamente aceitável;

R⁴ é 1 a 4 substituintes que são independentemente selecionados do grupo consistindo de H, halo, OH, OC₁₋₆alcoxila, C₁₋₆alquila, C₁₋₆alquenila, C₁₋₆alqueniloxila, NH₂, NH(C₁₋₆alquila), N(C₁₋₆alquil)(C₁₋

$\text{C}_{1-6}\text{alquila}$), CN, CF_3 , OCF_3 , NO_2 , $\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-6}\text{alquila}$, $\text{C}(\text{O})\text{OC}_{1-6}\text{alquila}$, $\text{SO}_2\text{C}_{1-6}\text{alquila}$, SO_2NH_2 , $\text{SO}_2\text{NHC}_{1-6}\text{alquila}$, fenila e $\text{C}_{1-6}\text{alquíleno-fenila}$; e

* é a configuração L ou D ou suas misturas.

A presente invenção inclui compostos de Fórmula I sendo que 5 R^3 é selecionado do grupo consistindo de H, $\text{OC}_{1-6}\text{alquila}$, NH_2 , $\text{NHC}_{1-6}\text{alquila}$, $\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{alquila})_2$, NHNH_2 e OY , onde Y é um cátion farmaceuticamente aceitável. Em modalidades da invenção, R^3 é selecionado do grupo consistindo de H, $\text{OC}_{1-4}\text{alquila}$, NH_2 , $\text{NHC}_{1-4}\text{alquila}$, $\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{alquila})_2$, NHNH_2 e OY . Em outras modalidades da invenção, R^3 é selecionado do 10 grupo consistindo de H, Me, NH_2 , NHMe , NMe_2 , NHNH_2 e OY . O cátion "Y" pode ser qualquer cátion farmaceuticamente aceitável, por exemplo Na^+ , K^+ e Zn^{2+} .

Os compostos de Fórmula I também incluem aqueles nos quais 15 R^4 é 1 a 4 substituintes que são independentemente selecionados do grupo consistindo de H, halo, OH, $\text{OC}_{1-6}\text{alcoxila}$, $\text{C}_{1-6}\text{alquila}$, $\text{C}_{1-6}\text{alquenila}$, $\text{C}_{1-6}\text{alqueniloxila}$, NH_2 , $\text{NH}(\text{C}_{1-6}\text{alquila})$, $\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{alquil})(\text{C}_{1-6}\text{alquila})$, CN, CF_3 , OCF_3 , NO_2 , $\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-6}\text{alquila}$, $\text{C}(\text{O})\text{OC}_{1-6}\text{alquila}$, $\text{SO}_2\text{C}_{1-6}\text{alquila}$, SO_2NH_2 , $\text{SO}_2\text{NHC}_{1-6}\text{alquila}$, fenila e $\text{C}_{1-6}\text{alquíleno-fenila}$. Em modalidades da invenção, 20 R^4 é 1 a 3 substituintes que são independentemente selecionados do grupo consistindo de H, halo, OH, $\text{OC}_{1-4}\text{alcoxila}$, $\text{C}_{1-4}\text{alquila}$, $\text{C}_{2-4}\text{alquenila}$, $\text{C}_{2-4}\text{alqueniloxila}$, NH_2 , $\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{alquila})$, $\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{alquil})(\text{C}_{1-4}\text{alquila})$, CN, CF_3 , OCF_3 , NO_2 , $\text{C}(\text{O})\text{OC}_{1-4}\text{alquila}$, $\text{SO}_2\text{C}_{1-4}\text{alquila}$, SO_2NH_2 , $\text{SO}_2\text{NHC}_{1-4}\text{alquila}$, fenila e $\text{C}_{1-4}\text{alquíleno-fenila}$. Em outras modalidades da invenção, R^4 é 1 a 3 substituintes.

25 Em outras modalidades da invenção, R^4 é 1 a 3 substituintes que são independentemente selecionados do grupo consistindo de H, halo, OH, OMe , Me, vinila, viniloxila, NH_2 , NHMe , NMe_2 , CN, CF_3 , OCF_3 , NO_2 , $\text{C}(\text{O})\text{Me}$, $\text{C}(\text{O})\text{OMe}$, SO_2Me , SO_2NH_2 , SO_2NHMe , fenila e benzila. Em ainda outras modalidades da invenção, R^4 é um substituinte selecionado do grupo

consistindo de H, halo, OH, OMe, Me, vinila, viniloxila, NH₂, NHMe, NHMe₂, CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)Me, C(O)OMe, SO₂Me, SO₂NH₂, SO₂NHMe, fenila e benzila. Em ainda outras modalidades da invenção, R⁴ é H.

Nos compostos bioativos multifuncionais da presente invenção, cada um de L¹ e L² é um grupo de ligação independentemente selecionado do grupo consistindo de uma ligação simples,-C(O)-,-C(O)NR²-,-NR²C(O)-,-NR²-,-C(O)-O-, -OC(O)-,-S-S-, SO₂NR²-, NR²SO₂-S-e-O-, onde R² é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, C₁₋₆alquíleno-arila, C(O)C₁₋₆alquila, C(O)arila, SO₂C₁₋₆alquila e SO₂aril. Em modalidades da invenção, cada um de L¹ e L² é independentemente selecionado do grupo consistindo de uma ligação simples,-C(O)-,-C(O)NR²-,-NR²C(O)-,-NR²-,-C(O)-O-, -OC(O)-e-O-. Em outras modalidades da invenção, cada um de L¹ e L² é independentemente selecionado do grupo consistindo de-C(O)-,-NR²-,-C(O)NR²-e-NR²C(O)-. Em outras modalidades da invenção, R² é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₄alquila, C₁₋₄alquíleno-arila, C(O)C₁₋₄alquila, C(O)Ph, SO₂C₁₋₄alquila e SO₂Ph. Em ainda outras modalidades da invenção, R² é selecionado do grupo consistindo de H, Me, Bn, C(O)Me, C(O)Ph, SO₂Me e SO₂Ph. Em ainda outras modalidades da invenção, R² é H.

Nos compostos bioativos da invenção, m é um número inteiro entre 1 e 50. Em modalidades da invenção, m é um número inteiro entre 1 e 25. Em outras modalidades da invenção, m é um número inteiro entre 1 e 10. Em ainda outras modalidades da invenção, m é um número inteiro entre 1 e 6.

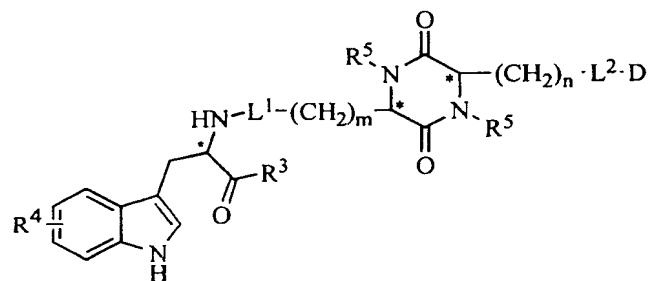
Os compostos bioativos multifuncionais da invenção incluem aqueles onde n é um número inteiro entre 0 e 50. Em modalidades da invenção, n é um número inteiro entre 0 e 25. Em outras modalidades da invenção, n é um número inteiro entre 0 e 10.

Os compostos de Fórmula I, incluem aqueles nos quais R⁵ é selecionado do grupo consistindo de H e C₁₋₆alquila e * representa a configuração D ou L ou suas misturas. Em modalidades da invenção, R⁵ é

selecionado de H e C₁₋₄alquila, especificamente H e Me. Em outras modalidades da invenção, ambos * estão substancialmente na configuração D ou ambos estão substancialmente na configuração L.

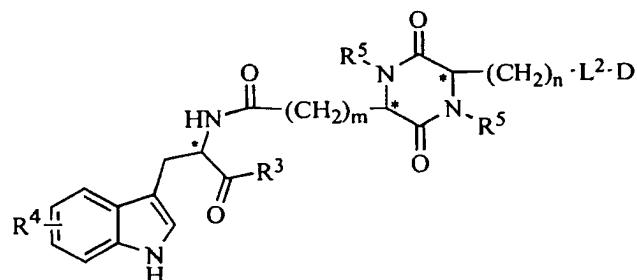
Os compostos bioativos multifuncionais da invenção também incluem aqueles onde D é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, qualquer cadeia lateral de um aminoácido e qualquer molécula funcionalmente ativa. Em modalidades da invenção, D é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₄alquila, qualquer cadeia lateral de um aminoácido e qualquer molécula funcionalmente ativa. Molécula funcionalmente ativa significa qualquer molécula tendo um efeito farmacológico no indivíduo. Este efeito farmacológico pode ser um que complementa, intensifica ou realiza sinergia com o grupo imunorregulatório A, ou pode proporcionar outra ação farmacêutica de modo que quando os compostos bioativos da invenção são administrados ao indivíduo, terapia de combinação é efetuada. Mais do que uma molécula funcionalmente ativa pode ser usada. Exemplos de moléculas funcionalmente ativas incluem, mas não são limitados a, adjuvantes tal como palmitoil; analgésicos tais como analgésicos de peptídeo, opiatos e antídotos tal como dermorphina, morfina, naloxona e seus derivados; vacinas sintéticas tais como determinantes antigênicos-epítopos-T e-B; anticorpos, tais como 10 farmacóforos farmacêuticos incluindo moléculas pequenas tais como metotrexato, diclofenac, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, cetoprofeno; açúcares; lipídeos; e nucleotídeos.

Em uma modalidade da presente invenção, os compostos bioativos multifuncionais de Fórmula I têm a seguinte fórmula:



sendo que L^1 , L^2 , D , R^3 , R^4 , R^5 , m , n e $*$ têm os significados proporcionados acima.

Em uma outra modalidade da invenção, os compostos bioativos multifuncionais de Fórmula I têm a seguinte fórmula:



sendo que L^2 , D , R^3 , R^4 , R^5 , m , n e $*$ têm os significados proporcionados acima.

Exemplos de compostos bioativos multifuncionais e sais, solvatos e pró-drogas farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos, representando modalidades específicas da presente invenção são mostrados em Tabelas 1 e 9.

Todos os compostos da invenção têm mais do que um centro assimétrico. Onde os compostos de acordo com a invenção possuir mais do que um centro assimétrico, podem existir como diastereômeros. É para ser entendido que todos tais isômeros e suas misturas em qualquer proporção estão incluídos dentro do escopo da presente invenção. É para ser entendido que embora a estereoquímica relativa dos compostos da invenção possa ser como mostrada em qualquer compostos dado aqui mostrado, tais compostos da invenção também podem conter certas quantidades (e.g. menos do que 20%, preferivelmente menos do que 10%, mais preferivelmente menos do que 5%) de compostos da invenção tendo estereoquímica alternada.

Os compostos da invenção podem ser preparados a partir de materiais iniciais conhecidos. Geralmente, os compostos são preparados por copulação de duas ou mais entidades juntas, por exemplo, usando química de copulação padrão (e.g. formação de ligações peptídicas, ligações amida,

ligações de dissulfeto, e ligações éster, etc.). O grupo diceto-piperazina pode ser preparado usando química conhecida. Por exemplo, diceto-piperazinas podem ser formadas por ciclodimerização de derivados de éster de aminoácido como descrito por Katchalski et al. em J. Amer. Chem. Soc., 68, 5 879 880 (1946), por ciclização de derivados de éster de dipeptídeo, ou por desidratação térmica de derivados de aminoácido e solventes de ebulição alta como descrito por Kopple et al. em J. Org. Chem., 33 (2), 862-864 (1968).

Em alguns casos, as químicas usadas para preparar os compostos da invenção podem ter de ser modificadas, por exemplo, pelo uso 10 de grupos protetores, para prevenir reações secundárias devido aos grupos reativos, tais como grupos reativos ligados como substituintes. Isto pode ser realizado por meio de grupos protetores convencionais, por exemplo como descrito em "Protective Groups in Organic Chemistry" McOmie, J.F.W. Ed., Plenum Press, 1973 e em Greene, T.W. e Wuts, P.G.M., "Protective Groups 15 in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 3^a Edição, 1999.

A formação de um sal de composto desejado é realizada usando técnicas padrão. Por exemplo, o composto neutro é tratado com um ácido ou uma base em um solvente adequado e o sal formado é isolado por filtração, extração ou qualquer outro método adequado.

20 A formação de solvatos dos compostos da invenção variará dependendo do composto e do solvato. Em geral, solvatos são formados por dissolução do composto no solvente apropriado e isolamento por esfriamento ou usando um anti-solvente. O solvato é tipicamente seco ou azeotropado sob condições ambientes.

25 A presente invenção inclui dentro de seu escopo, pró-drogas dos compostos da invenção. Em geral, tais pró-drogas serão derivados funcionais de um composto da invenção que são prontamente conversíveis in vivo no composto do qual ela é nociionalmente derivada. Pró-drogas dos compostos da invenção podem ser ésteres convencionais formados com grupo

hidroxila, tiol, amino ou carboxila disponível. Por exemplo, um grupo OH ou NH₂ disponível em um composto da invenção pode ser acilado usando um ácido ativado na presença de uma base, e opcionalmente, em solvente inerte (e.g. um cloreto de ácido em piridina). Alguns ésteres comuns que têm sido utilizados como pró-drogas são fenil-ésteres, ésteres (C8-C24) alifáticos, acil-óxi-metil-ésteres, carbamatos e ésteres de aminoácido. Em outras modalidades, as pró-drogas dos compostos da invenção são aquelas nas quais um ou mais dos grupos hidroxila nos compostos é/são mascadado(s) como grupos que podem ser convertidos em grupos hidroxila *in vivo*.

10 Procedimentos convencionais para a seleção e a preparação de pró-drogas adequadas são descritos, por exemplo, em "Design of Prodrugs" ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

A presente invenção inclui formas radiomarcadas de compostos da invenção, por exemplo, compostos da invenção marcados pela incorporação dentro da estrutura com ³H ou ¹⁴C ou um halogênio radioativo tal como ¹²⁵I. Um composto radiomarcado da invenção pode ser preparado usando métodos padrão conhecidos na arte. Por exemplo, trítio pode ser incorporado em um composto da invenção usando técnicas padrão, por exemplo, por hidrogenação de um precursor adequado para um composto da invenção usando gás trítio e um catalisador. Alternativamente, um composto da invenção contendo iodo radioativo pode ser preparado a partir de derivado de trialquil-estanho correspondente (adequadamente trimetil-estanho) usando condições de iodação padrão, tal como iodeto [¹²⁵I] de sódio na presença de cloramina-T em um solvente adequado, tal como dimetil-formamida. O composto de trialquil-estanho pode ser preparado a partir do composto halogenado não-radioativo correspondente, adequadamente composto de iodo, usando condições padrão de estanilação catalisada por paládio, por exemplo hexametil-di-estanho na presença de tetraquis(trifenil-fosfina)paládio (0) em um solvente inerte, tal como dioxano, e em temperaturas elevadas,

adequadamente cerca de 50 a 100°C.

(iii) Usos

A presente invenção proporciona novos compostos de Fórmula I. Conseqüentemente, a presente invenção inclui todos os usos dos compostos da invenção incluindo seu uso em métodos terapêuticos e composições farmacêuticas, seu uso em ensaios diagnósticos e seu uso como ferramentas de pesquisa.

A presente invenção em particular se refere às composições farmacêuticas compreendendo um composto bioativo multifuncional da invenção e um carreador farmaceuticamente aceitável.

Também incluídos na presente invenção estão os métodos de tratar distúrbios imunes, e opcionalmente outros distúrbios no mesmo indivíduo, compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um composto bioativo multifuncional da invenção a um indivíduo em necessidade da mesma. Ademais, é proporcionado um uso de um composto bioativo multifuncional da invenção para tratar distúrbios imunes, e opcionalmente outros distúrbios no mesmo indivíduo, bem como um uso de um composto bioativo multifuncional da invenção para preparar um medicamento para tratar distúrbios imunes, e opcionalmente outros distúrbios no mesmo indivíduo.

Em um aspecto, a invenção proporciona um método de modular o sistema imune e/ou hematopoiese em um animal compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um composto bioativo multifuncional da invenção a um indivíduo em necessidade da mesma.

Em uma modalidade da invenção, é proporcionado um método de estimular o sistema imune compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um composto bioativo multifuncional da invenção a um indivíduo em necessidade da mesma. Em outra modalidade, a invenção proporciona um método de restaurar hematopoiese em um animal com hematopoiese

prejudicada, por exemplo causada por irradiação ou agentes citostáticos, compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um composto bioativo multifuncional da invenção a um indivíduo em necessidade da mesma.

Em ainda outra modalidade, a invenção proporciona um método para tratar distúrbios hematopoiéticos, por exemplo, sem limitação a, 5 citopenia imune, mieloma múltiplo, leucose linfóide crônica, linfomas linfocíticos, linfossarcomas e em particular, leucose linfóide celular-B, compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um composto multifuncional bioativo da invenção a um indivíduo em necessidade da 10 mesma.

Em outra modalidade, a invenção proporciona um método para tratar distúrbios imunes e/ou hematopoiéticos tal como câncer em um animal compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um composto bioativo multifuncional da invenção a um indivíduo em necessidade da mesma, 15 possivelmente em combinação com um agente citostático. O agente citostático pode ser, por exemplo, óxi-uréia ou hipertermia.

Em ainda outra modalidade, a invenção também se refere a um método de imunossuprimir um sistema imune em um animal compreendendo administrar uma quantidade efetiva de um composto bioativo multifuncional da invenção a um indivíduo em necessidade da mesma. Em uma modalidade, 20 o composto pode ser administrado antes do transplante de um órgão ou de medula óssea. As propriedades imunorregulatórias dos compostos da invenção podem ser controladas, por exemplo, pela estereoquímica na porção "A" e "*" do composto.

Os compostos da invenção podem ser usados na forma de base 25 livre, ácido livre, na forma de sais, solvatos e/ou pró-drogas. Todas as formas estão dentro do escopo da invenção.

De acordo com os métodos da invenção, os compostos, sais, pró-drogas ou solvatos dos mesmos podem ser administrados a um paciente

em uma variedade de formas dependendo da rota de administração selecionada, como será entendido por aqueles pessoas experientes na arte. As composições da invenção podem ser administradas, por exemplo, por administração oral, parenteral, bucal, sublingual, nasal, retal, emplastro, 5 bomba ou transdermal (tópica) e as composições farmacêuticas podem ser formuladas conformemente. Administração parenteral inclui modos de administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, transepitelial, nasal, intrapulmonar, intratecal, retal e tópica. Administração parenteral pode ser administrada por infusão contínua durante um período de 10 tempo selecionado.

Um composto da invenção pode ser oralmente administrado, por exemplo, com um diluente inerte ou com um carreador edível assimilável, ou pode ser encerrado dentro de cápsulas de gelatina de película dura ou mole, ou pode ser comprimido em tabletes, ou pode ser incorporado 15 diretamente com o alimento da dieta. Para administração terapêutica oral, o composto da invenção pode ser incorporado com excipiente e usado na forma de tabletes ingestíveis, tabletes bucais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, bolachas, e semelhante.

Um composto da invenção também pode ser administrado 20 parenteralmente. Soluções de um composto da invenção podem ser preparadas em água adequadamente misturada com um tensoativo tal como hidróxi-propil-celulose. Dispersões também podem ser preparadas em glicerol, poli(etileno-glicóis) líquidos, DMSO e misturas dos mesmos com ou sem álcool, e em óleos. Sob condições ordinárias de armazenagem e uso, 25 estas preparações contêm um conservante para evitar o crescimento de microorganismos. Uma pessoa experiente na arte saberia como preparar formulações adequadas. Procedimentos e ingredientes apropriados para a seleção e a preparação de formulações adequadas são descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences (2003-20^a edição) e em The United

States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19) publicada em 1999.

As formas farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem dispersão ou soluções aquosas injetáveis e pós estéreis para a preparação extemporânea de dispersões ou soluções injetáveis. Em todos os casos, as 5 formas precisam ser estéreis e ser fluidas na extensão que exista seringabilidade fácil. Ampolas são dosagens unitárias convenientes.

Composições para administração nasal podem ser convenientemente formuladas como aerossóis, gotas, geles e pós.

10 Formulações de aerossol tipicamente compreendem uma solução ou suspensão fina da substância ativa em um solvente aquoso ou não-aquoso fisiologicamente aceitável e são normalmente apresentadas em quantidades de dose unitária ou de múltiplas doses na forma estéril dentro de um recipiente vedado, que pode tomar a forma de um cartucho ou refil para uso com um 15 dispositivo de atomização. Alternativamente, o recipiente vedado pode ser um dispositivo dispensador unitário tal como um inalador nasal de dose unitária, ou um dispensador de aerossol equipado com uma válvula dosadora que é intencionado para ser jogado fora após o uso. Onde a forma de dosagem compreende um dispensador de aerossol, ela conterá um propelente que pode 20 ser um gás comprimido ou um propelente orgânico tal como fluoro-cloro-hidrocarboneto. As formas de dosagem de aerossol também podem tomar a forma de um bomba-atomizador.

Composições adequadas para administração bucal ou sublingual incluem tabletes, comprimidos, pastilhas, sendo que o ingrediente 25 ativo é formulado com um carreador tal como açúcar, acácia, tragacanto, ou gelatina e glicerina. Composições para administração retal estão convenientemente na forma de supositórios contendo uma base de supositório convencional tal como manteiga de cacau.

Composições para administração tópica podem incluir, por

exemplo, por exemplo, propileno-glicol, isopropil-álcool, óleo mineral e glicerina. Preparações adequadas para administração tópica incluem preparações líquidas ou semi-líquidas tais como linimentos, loções, aplicadores, emulsões de óleo-em-água ou de água-em-óleo tais como cremes, 5 ungüentos ou pastas; ou soluções ou suspensões tais como gotas. Em adição aos ingredientes previamente mencionados, as preparações tópicas podem incluir um ou mais ingredientes adicionais tais como diluentes, tampões, agentes aromatizantes, aglutinantes, agentes tensoativos, espessantes, lubrificantes, conservantes, e.g. hidróxi-benzoato de metila (incluindo 10 antioxidantes), agentes emulsificadores e semelhante.

Composições de liberação direta ou prolongada podem ser formuladas, e.g. lipossomos ou aquelas nas quais o composto ativo está protegido com revestimentos diferencialmente degradáveis, tais como por microencapsulação, revestimentos múltiplos, etc. Também é possível secar 15 por congelamento os compostos da invenção e usar os liofilizados obtidos, por exemplo, para a preparação de produtos para injeção.

Os compostos da invenção podem ser administrados a um indivíduo sozinhos ou em combinação com carreadores farmaceuticamente aceitáveis, como observado acima, cuja proporção é determinada pela 20 solubilidade e natureza química do composto, pela rota de administração escolhida e pela prática farmacêutica padrão.

A dosagem dos compostos e/ou composições da invenção podem variar dependendo de muitos fatores tais como as propriedades farmacodinâmicas do composto, o modo de administração, a idade, a saúde e 25 o peso do paciente recipiente, a natureza e a extensão dos sintomas, a freqüência do tratamento e o tipo de tratamento concorrente, se houver, e a velocidade de depuração do composto no indivíduo a ser tratado. Uma pessoa experiente na arte pode determinar a dosagem apropriada baseada sobre os fatores acima. Por exemplo, no tratamento tópico, ungüentos, cremes ou

loções contendo de 1-1.000 µg/g de um composto da invenção podem ser administrados. Preparações orais podem ser formuladas, preferivelmente como tabletes, cápsulas, ou gotas, contendo de 0,5-1.000 µg de um composto da invenção por unidade de dosagem. Os compostos da invenção podem ser administrados inicialmente em uma dosagem adequada que pode ser ajustada conforme exigido, dependendo da resposta clínica. Para tratamento *ex vivo* de células durante um período curto, por exemplo por 30 minutos a 1 hora, podem ser usadas doses mais altas de composto do que para tempo longo em terapia *in vivo*.

10 Em adição aos usos terapêuticos mencionados acima, os compostos da invenção também são úteis em ensaios diagnósticos, ensaios de triagem e como ferramentas de pesquisa.

15 Em ensaios diagnósticos, os compostos da invenção podem ser úteis em identificação ou detecção de um distúrbio imune. Em uma tal modalidade, os compostos da invenção podem ser radiomarcados (como descrito aqui anteriormente) e contatados com uma população de células. A presença do radiomarcador sobre as células pode indicar um distúrbio imune.

20 Em ensaios de triagem, os compostos da invenção podem ser usados para identificar outros compostos que modulam respostas imunes. Em tais ensaios, os compostos também podem ser radiomarcados.

Os seguintes exemplos não-limitantes são ilustrativos da presente invenção:

EXEMPLOS

Materiais e Métodos

25 Experimentos de NMR foram realizados em um espetrômetro Bruker Avance DRX 500. Os espectros foram adquiridos em 0,6 µL de (CD₃)₂SO a 30°C (99,95% de Deutério, Deiton, S.Peterburg). Um tempo de relaxação de 5,0 s foi usado. Os deslocamentos químicos de ¹H foram determinados em relação àqueles (arbitrariamente escolhidos como 2,5 ppm a

30°C) do sinal de (CH₃)₂SO.

Análises por HPLC foram realizadas em um dispositivo cromatográfico de gradiente analítico System Gold Beckman. Coluna Ultrasphere-ODS, 5 µm, 205 mm x 4,6 mm. Detecção-espectrofotômetro UV, 5 λ 214 nm. Temperatura ambiente. Gradiente tampão fosfato de trietil-amônio 0,02M (pH=3,0) em acetonitrila (de 0% de tampão A a 100% de tampão B). Tampão A-15% de fosfato de trietil-amônio 0,02M em acetonitrila. Tampão B-50% de fosfato de trietil-amônio 0,02M em acetonitrila.

10 Espectros de massa foram adquiridos em um espectrômetro de massa VISION 2000 MALDI.

Exemplo 1. Preparação de ciclo-L-Ala-L-Glu(OH)

(a) Preparação de Boc-L-Ala-L-Glu(OBzl)-OH

Boc-L-Ala-ONSu (56,5 g, 0,1 mol) e 26,1 g (0,11 mol) de H-L-Glu(OBzl)-OH foram misturados com 500 mL de dioxina/água (1:1) e N-metil-morfolina (11,7 mL) até a mistura alcançar um pH de cerca de 9 a 9,2. 15 A suspensão foi dissolvida após 12 a 18 horas na temperatura ambiente. Solventes foram evaporados em vácuo e o óleo residual foi dissolvido em 500 mL de EtOAc que foi então transferido para um funil de separação e lavado com 3x200 mL de H₂SO₄ 5% em água para pH neutro. A camada orgânica foi 20 separada e seca com sulfato de sódio anidro. Após secagem, EtOAc foi evaporado em vácuo. O produto bruto foi um óleo e o rendimento foi 40,5g (~100%). R_f=0,6 (CHCl₃:Et-Ac:MeOH=6:3:1).

(b) Preparação de Boc-L-Ala-L-Glu(OBzl)-ONp

Boc-L-Ala-L-Glu(OBzl)-OH (40,5 g, 0,1 mol) foi dissolvido 25 em 300 mL de EtOAc e combinado com 17 g (0,12 mol) de p-nitro-fenol. A reação foi mantida a 0°C por 1 hora. DCC (24,7 g, 0,12 mol) foi então adicionado. A reação foi agitada por 1 hora a 0°C e por 4 horas na temperatura ambiente. O precipitado de DCU foi filtrado e o solvente foi evaporado em vácuo. O óleo residual foi então dissolvido em éter. O

precipitado foi filtrado e lavado com éter e hexano. O rendimento foi 35 g (64%). $R_f = 0,7$ ($\text{CHCl}_3:\text{Et-Ac:MeOH}=6:3:1$).

(c) Preparação de ciclo-L-Ala-L-Glu(OBzl)

Boc-L-Ala-L-Glu(OBzl)-ONp (56,0 g, 0,1 mol) foi dissolvido e esfriado para 15°C. TFA foi adicionado e a mistura foi agitada por 1 hora e gradualmente aquecido para temperatura ambiente. Completitude da reação foi monitorada por TLC usando o sistema $\text{CHCl}_3:\text{Et-OAc:MeOH}=6:3:1$. Após completitude da reação, a mistura foi evaporada em vácuo em vácuo, então duas vezes evaporada com isopropanol e dissolvida em 500 mL de EtOAc. N-metil-morfolina foi adicionada até a mistura alcançar um nível de pH de 9 a 9,5. Após 12 horas, o ciclo-L-Ala-L-Glu(OBzl) precipitou. O precipitado foi filtrado, lavado com EtOAc, éter e hexano. O rendimento foi 21,0 g (70%). $R_f = 0,55$ ($\text{CHCl}_3:\text{EtOAc:MeOH:AcOH}=6:3:1:0,1$); dados de HPLC:tempo de retenção 15,9 min.

15 (d) Preparação de ciclo-L-Ala-L-Glu(OH)

Ciclo-L-Ala-L-Glu(OBzl) (14,5 g, 0,05 mol) foi dissolvido em 200 mL de trifluoro-etanol e então 1,5 g de negro de paládio foram adicionados. Hidrogênio foi borbulhado através da suspensão e a mistura foi agitada por 48 horas. A completitude da reação foi monitorada por TLC. Após a reação estar completa, o catalisador foi filtrado e o solvente foi evaporado em vácuo. O peptídeo residual foi dissolvido em 200 mL de água destilada e as impurezas foram extraídas com 3x100 mL de EtOAc. A fase aquosa foi combinada e evaporada em vácuo. O precipitado foi lavado com éter e hexano e então seco em ar. O rendimento foi 10,2 g (94%). $R_f = 0,2$ ($\text{CHCl}_3:\text{EtOAc:MeOH:AcOH}=6:3:1:0,1$); $R_f = 0,5$ ($\text{CHCl}_3:\text{EtOAc:MeOH:AcOH}=6:3:1:0,1$); dados de HPLC:tempo de retenção 6,7 min.

Exemplo 2: Preparação de ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH)

(a) Preparação de ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OMe)

Ciclo-L-Ala-L-Glu-(OH) (2,2 g, 0,01 mol) foi dissolvido em

50 mL DMF e então aquecido para 60°C. Após o peptídeo ter dissolvido, a mistura foi esfriada para-15°C. Cloro-formiato de iso-butila (1,5 mL, 0,012 mol) esfriado para-15°C foi adicionado, seguido pela adição de 1,4 mL (0,012 mol) de N-metil-morfolina. A reação foi agitada por 5 min a-15°C e uma solução de 2,8 g (0,011 mol) de HClH-L-Trp-OMe em 20 mL de DMF e 1,4 mL (0,012 mol) de N-metil-morfolina, ambos esfriados para-15°C, foram adicionados. Após 1 hora de agitação a 0°C, a reação foi gradualmente aquecida para a temperatura ambiente 4 horas. O precipitado foi filtrado e o solvente foi evaporado em vácuo. O óleo residual foi dissolvido em 100 mL de mistura de n-butanol/água e transferido para um funil de separação. A camada orgânica foi separada e lavada com 3x50 mL de H₂SO₄ 5% e 3x50 mL de NaHCO₃ 5% em água. N-butanol foi evaporado em vácuo e éter foi adicionado no óleo residual. O precipitado foi filtrado e lavado com éter e hexano. O rendimento foi 3,4 g (80%). R_f =0,7 (CHCl₃:Et-Ac:MeOH:AcOH=6:3:1:0,1); dados de HPLC:tempo de retenção 16,6 min. O espectro de ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OMe) é apresentado em Figura 1.

(b) Preparação de ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH)

Ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OMe) (1,1 g, 0,0025 mol) foi suspenso em 50 mL de EtOH e 0,15 g de NaOH (0,0075 mol) em 25 mL de 20 água foi adicionado. A mistura foi agitada por-2 horas. Após completitude da reação, HCl foi adicionado até a mistura alcançar um pH de cerca de 7. O solvente foi evaporado em vácuo. A mistura residual foi transferida para um funil de separação e 50 mL de n-butanol e água com pH=3 foram adicionados. a camada orgânica foi separada, lavada com água para pH neutro 25 e então evaporada em vácuo. O resíduo foi evaporado duas vezes com isopropanol e então éter foi adicionado. O precipitado foi filtrado e lavado com éter e hexano. O rendimento foi 0,9 g (82%). R_f =0,5 (CHCl₃:Et-Ac:MeOH:AcOH=6:3:1:0,1); dados de HPLC:tempo de retenção 9,3 min.; dados de espectro de massa: [M+ H⁺ + Na] =407,7.

Em uma maneira semelhante, os seguintes compostos adicionais foram preparados. Dados de espectro de massa para alguns destes compostos são proporcionados abaixo.

Ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OMe)	
Ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH):	Dados de espectro de massa: $[M + H^+ + Na] = 407,7$
Ciclo-D-Ala-D-Glu-(D-Trp-OMe)	
Ciclo-D-Ala-D-Glu-(D-Trp-OH):	Dados de espectro de massa: $[M + H^+ + Na] = 407,9$
Ciclo-L-Ala-L-Glu-(D-Trp-OMe)	
Ciclo-L-Ala-L-Glu-(D-Trp-OH):	Dados de espectro de massa: $[M + H^+ + Na] = 408,1$
Ciclo-D-Ala-D-Glu-(L-Trp-OMe)	
Ciclo-D-Ala-D-Glu-(L-Trp-OH):	Dados de espectro de massa: $[M + H^+ + Na] = 407,6$
Ciclo-D-Ala-D-Asp-(D-Trp-OMe)	
Ciclo-D-Ala-D-Asp-(D-Trp-OH):	Dados de espectro de massa: $[M + H^+ + Na] = 394,1$
Ciclo-D-Ala-D-Asp-(L-Trp-OMe)	
Ciclo-D-Ala-D-Asp-(L-Trp-OH):	Dados de espectro de massa: $[M + H^+ + Na] = 394,7$
Ciclo-L-Ala-L-Asp-(D-Trp-OMe)	
Ciclo-L-Ala-L-Asp-(D-Trp-OH)	
Ciclo-L-Ala-L-Asp-(L-Trp-OMe)	
Ciclo-L-Ala-L-Asp-(L-Trp-OH):	Dados de espectro de massa: $[M + H^+ + Na] = 395,3$

Exemplo 3: Preparação de ciclo-L-Lys(H₂N)-L-Glu-(L-Trp-5 NH₂)

(a) Preparação de Fmoc-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl)-OH

Fmoc-L-Lys(Boc)-ONSu (56,5 g, 0,1 mol) e 26,1 g (0,11 mol)

de H-L-Glu(OBzl) OH foram misturados com 500 mL de dioxina/água (1,1) e N-metil-morfolina (11,7 mL) até a mistura alcançar um pH de cerca de 9 a 9,2. Após 12 a 18 horas na temperatura ambiente, a suspensão foi dissolvida. Os solventes foram evaporados em vácuo. O óleo residual foi dissolvido em 5 500 mL de EtOAc, que foi então transferido para um funil de separação e lavado com 3x200 mL de H₂SO₄ 5% em água para pH neutro. A camada orgânica foi separada e seca com sulfato de sódio anidro. Após secagem, o EtOAc foi evaporado em vácuo. O produto bruto foi um óleo e o rendimento foi 69,0 g (~100%). R_f=0,8 (CHCl₃:Et-Ac:MeOH=6:3:1).

10 (b) Preparação de H-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl)-OH

Fmoc-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl)-OH (69,0 g, 0,1 mol) foi dissolvido em 300 mL de piridina 20% em dioxano e agitado por 1 hora na temperatura ambiente. O solvente foi evaporado em vácuo e óleo residual foi dissolvido em AcOH 0,1%. O precipitado foi filtrado e lavado com AcOH 15 0,1% e água para pH neutro. O rendimento foi 43,7 (94%). R_f =0,5 (CHCl₃:MeOH: AcOH 32% =5:3:1).

15 (c) Preparação de ciclo-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl)

H-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl)-OH (23,0, 0,05 mol) foi dissolvido em 100 mL de piridina e refluxado por ~4 horas. A reação foi 20 monitorada por TLC usando o sistema de CHCl₃:MeOH: AcOH 32% =5:3:1. Após completitude da reação, a mistura foi evaporada em vácuo em vácuo e 500 mL de AcOH 0,1% foi adicionada. O ciclo-L-Lys(Boc) L-Glu(OBzl) foi precipitado. O precipitado foi filtrado, lavado com água e seco em um forno a vácuo a 40°C. O rendimento foi 20,9 (86%). R_f =0,75 (CHCl₃:MeOH: AcOH 25 32% =5:3:1); dados de HPLC:tempo de retenção 19,2 min.

(d) Preparação de ciclo-L-Lys(Boc)-L-Glu(OH)

Ciclo-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl) (22,2 g, 0,05 mol) foi dissolvido em 200 mL de trifluoro-etanol e 1,5 g de negro de paládio foram adicionados. Hidrogênio foi borbulhado através da suspensão com agitação

por 48 horas. A reação foi monitorada por TLC. Após a reação estar completa, o catalisador foi filtrado e o solvente foi evaporado em vácuo. O peptídeo residual foi dissolvido em 200 mL de água destilada e as impurezas foram extraídas com 3x100 mL de EtOAc. A fase aquosa foi combinada e evaporada em vácuo. O precipitado foi lavado com éter e hexano e seco em ar. O rendimento foi 16,7 g (90%). $R_f = 0,4$ (CHCl₃:EtOAc:MeOH:AcOH 32%:6:3:1:0,1); dados de HPLC:tempo de retenção 12,7 min.

5 (e) Preparação de ciclo-L-Lys(Boc)-L-Glu-(L-Trp-NH₂)

10 Ciclo-L-Lys(Boc)-L-Glu-(OH) (3,7 g, 0,01 mol) foi dissolvido em 50 mL de piridina e 0,012 mol de TBTU foi adicionado, seguido pela adição de 1,4 mL (0,012 mol) de N-metil-morfolina. A reação foi agitada por 5 min na temperatura ambiente e uma solução de 2,8 g (0,011 mol) de HClH-L-Trp-NH₂ em 20 mL de piridina e 1,4 mL (0,012 mol) de N-metil-morfolina foram adicionados. A reação foi monitorada por TLC. Após 4 horas de agitação, o solvente foi evaporado em vácuo e o óleo residual foi dissolvido em 100 mL de mistura de n-butanol/água e transferido para um funil de separação. A camada orgânica foi separada e lavada com 3x50 mL de H₂SO₄ 5% e 3x50 mL de NaHCO₃ 5% em água. N-butanol foi evaporado em vácuo e éter foi adicionado no óleo residual. O precipitado foi filtrado e lavado com éter, e hexano. O rendimento foi 5,0 g (88%). $R_f = 0,6$ (CHCl₃:EtOAc:MeOH:AcOH 32%:6:3:1:0,1); dados de HPLC:tempo de retenção 18,6 min.

15 (f) Preparação de ciclo-L-Lys(H₂N)-L-Glu-(L-Trp-NH₂)

20 Ciclo-L-Lys(Boc)-L-Glu-(L-Trp-NH₂) (2,9 g, 0,005 mol) foi dissolvido em 50 mL de 50% TFA/CH₂Cl₂ contendo 0,1% de ditiotreitol. A mistura foi agitada por ~1 hora. Após completitude da reação, os solventes foram evaporados em vácuo. O óleo residual foi dissolvido em 50 mL de água e transferido para um funil de separação. Acetato de etila (50 mL) foi adicionado. As impurezas residuais foram extraídas. A camada orgânica foi

separada e então descartada. A água foi evaporada em vácuo e o óleo foi dissolvido em 50 mL de água destilada e liofilizado. O rendimento foi 2,7 g (92% como trifluoro-acetato). $R_f = 0,35$ (CHCl₃:Et-Ac:MeOH:AcOH=6:3:1,0,1); dados de HPLC:tempo de retenção 7,9 min.

5 Exemplo 4: Efeitos de agentes imunossupressores *in vivo*

O efeito das substâncias testadas sobre a medula óssea intacta foi estudado *in vivo*. Os peptídeos foram introduzidos em camundongos em maneiras diferentes: injetados subcutaneamente, intraperitonealmente (IP) ou introduzidos per os em camundongos doadores intactos, nas doses de 10-1000 μ g/kg. Dois dias após administração de preparação, os camundongos foram mortos. Suspensão de medula óssea foi preparada e injetada intravenosamente em camundongos letalmente irradiados. A atividade formadora de colônia foi avaliada no dia 8. Os animais de teste foram camundongos (CBA x C57 B1) F1 (30 camundongos por teste, média de 3 testes).

15 Como pode ser visto da Tabela 2, foi verificado que a introdução de timodepressina e dos ciclopeptídeos novos da presente invenção em camundongos intactos diminuiu a população de CFU-S na medula óssea.

20 Uma comparação das atividades dos ciclopeptídeos novos da presente invenção e da timodepressina sobre a suspensão de população CFU-S na medula óssea é mostrada em Tabela 3.

Exemplo 5: Efeitos de agentes imunoestimulantes *in vivo*

25 Foi realizado um estudo para comparar a atividade de Neogen e dos novos peptídeos cíclicos da presente invenção na redução dos efeitos nocivos de radiação ionizante.

Neste estudo, foi aplicado o método de colônias de baço exógenas. Uma suspensão de células intactas de medula óssea foi irradiada *ex vivo* na dose de 1 Gy. Doses diferentes de Neogen ou de peptídeos cíclicos

foram injetadas IP, IM, subcutaneamente ou introduzidas per os em pacientes recipientes letalmente irradiados dentro de uma hora após a injeção de medula óssea irradiada. Colônias foram contadas no dia 8. Todos os dados em cada grupo foram a média de três testes.

5 Os dados em Tabela 4 mostram que Neogen pode estimular o processo de regeneração sobre células precursoras hematopoiéticas. Este processo foi mostrado em ser eficaz com injeção IM ou IP, mas não via administração per os. Novos peptídeos cíclicos sob investigação possuíram a mesma faixa de atividade durante administração sistêmica e são oralmente 10 ativos na faixa de dosagem de 10-100 µg/kg.

Exemplo 6: Atividade adjuvante de ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-ONa)

Atividade adjuvante foi testada em 5 grupos de camundongos (C57B16). Cada grupo consistiu de 5 animais. Três imunizações foram 15 realizadas:

Primeira imunização:

1. Grupo com Índice de estimulação (CFA)

2. Grupo com ovalbumina (OVA de ovo) (25 microgramas/camundongo)

20 3. Grupo com CFA +ovalbumina (25 microgramas/camundongo)

4. Grupo com ovalbumina (25 microgramas/camundongo) + peptídeo 1 micrograma/camundongo

25 5. Grupo com ovalbumina (25 microgramas/camundongo) + peptídeo 10 microgramas/camundongo

Segunda imunização:

O mesmo conjunto 21 dias após a primeira imunização por injeção de 12,5 microgramas de ovalbumina/camundongo aos grupos 2-5.

Terceira imunização:

O mesmo conjunto 35 dias após a primeira imunização por injeção de 12,5 microgramas de ovalbumina/camundongo aos grupos 2-5.

No dia 42, o sangue total de cada camundongo foi colhido. O sangue foi reunido de cada grupo de camundongos. O índice de estimulação de cada grupo foi comparado. O índice de estimulação foi calculado como uma razão entre densidade óptica (OD =1) de reuniões diluídas de grupos 3-5 para a densidade óptica (OD =1) de reuniões diluídas de grupo 2 (controle sem adjuvante).

Como pode ser visto em Tabela 5, os resultados deste experimento mostram que o ciclopeptídeo Ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-O_{Na}) sozinho, até mesmo sem outra modificação pela copulação de função palmitoil ou açúcar, possui atividade adjuvante e aumenta em 75% títulos de anticorpos para ovalbumina.

Exemplo 7: Atividade adjuvante de ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH) (Composto 17)

Atividade adjuvante foi testada em 6 grupos de camundongos. Cada grupo consistiu de 5 animais. Três imunizações foram realizadas como segue:

Primeira imunização:

- 20 1. Camundongos de Números 1 a 5-Índice de estimulação (CFA = controle)
2. Camundongos de Números 6 a 10-ovalbumina (OVA de ovo) 25 microgramas por animal + adjuvante 100 microgramas por animal
3. Camundongos de Números 11 a 15-ovalbumina 25 microgramas por animal + CFA
4. Camundongos de Números 16 a 20-ovalbumina 25 microgramas por animal
5. Camundongos de Números 21 a 25-ovalbumina 25 microgramas por animal + adjuvante 1 micrograma por animal

6. Camundongo de Números 26 a 30-ovalbumina 25 microgramas por animal + adjuvante 10 microgramas por animal

Segunda imunização:

O mesmo conjunto 21 dias após primeira imunização por 5 injeção de 12,5 microgramas de ovalbumina/camundongo aos camundongos de números 6 a 30.

Terceira imunização:

O mesmo conjunto 35 dias após primeira imunização por 10 injeção de 12,5 micrograma de ovalbumina/camundongo aos camundongos de números 6 a 30.

No dia 42, foram colhidas amostras de sangue de cada camundongo. O índice de estimulação de cada grupo foi comparado. O índice de estimulação foi calculado pela divisão da diluição de soros reunidos de teste dando OD=1 pela diluição de soros de teste reunidos de camundongos 15 imunizados sem o adjuvante, dando OD=1. Os resultados são mostrados em Tabela 6.

Exemplo 8: Atividades adjuvantes de ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH) (Composto 17), ciclo [L-Lys(Palmitoil)-L-Glu(D-Trp-OH)] (Composto 26a), ciclo [D Lys(Palmitoil)-D-Glu(D-Trp-OH)] (Composto 26b), ciclo-L-Lys(N-acetil-Glicosamina-N-acetil-muramil)-L-Glu-(L-Trp-OH) (Composto 33a), e ciclo-D Lys(N-acetil-Glicosamina-N-acetil-muramil)-D-Glu-(L-Trp-OH) (Composto 33b).

Estágio 1:

Atividade adjuvante foi testada em 11 grupos de camundongos 25 Balb/c (obtidos de Stolbovaya Breeding Station). Cada grupo consistiu de 7 animais. Três imunizações foram realizadas como segue:

Primeira imunização:

Grupo 1-ovalbumina 25 microgramas por animal
(Camundongos de Números 1 a 7)

Grupo 2-ovalbumina 25 microgramas por animal + CFA
(Índice de estimulação) (Camundongos de Números 8 a 14)

Grupo 3-ovalbumina 25 microgramas por animal + adjuvante
de composto 33a 100 microgramas por animal (Camundongos de Números 15
5 a 21)

Grupo 4-ovalbumina 25 microgramas por animal + adjuvante
de composto 33a 10 microgramas por animal (Camundongos de Números 22
a 27)

Grupo 5-ovalbumina 25 microgramas por animal + adjuvante
10 de composto 33a 1 micrograma por animal (Camundongos de Números 28 a
35)

Grupo 6-ovalbumina 25 microgramas por animal + adjuvante
de composto 33b 100 microgramas por animal (No. 36 a 42)

Grupo 7-ovalbumina 25 microgramas por animal + adjuvante
15 de composto 33b 10 microgramas por animal(Camundongos de Números 43 a
49)

Grupo 8-ovalbumina 25 microgramas por animal + adjuvante
de composto 33b 1 micrograma por animal (Camundongos de Números 50 a
56)

20 Grupo 9-ovalbumina 25 microgramas por animal + adjuvante
de composto 17 100 microgramas por animal (Camundongos de Números 57
a 63)

25 Grupo 10-ovalbumina 25 microgramas por animal + adjuvante
de composto 17 10 microgramas por animal (Camundongos de Números 64 a
70)

Grupo 11-ovalbumina 25 microgramas por animal + adjuvante
de composto 17 1 micrograma por animal (Camundongos de Números 71 a
77)

Segunda imunização:

O mesmo conjunto 14 dias após primeira imunização por injeção de 12,5 microgramas de ovalbumina/camundongo aos camundongos de números 1 a 77.

Terceira imunização:

5 O mesmo conjunto 28 dias após primeira imunização por injeção de 12,5 microgramas de ovalbumina/camundongo aos camundongos de números 1 a 77.

No dia 35 após primeira imunização, foram colhidas amostras de sangue de cada camundongo.

10 Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA):

Solução de OVA (10 microgramas/mL) em tampão carbonato de sódio 0,05 M (pH 9,5) foi adicionada em cavidades de placa, 0,1 mL por cavidade e incubada a 4°C por 16 horas. A solução de OVA foi então removida e a placa foi lavada 4 vezes com PBS contendo Tween-20 0,05%.

15 Tal lavagem foi realizada após cada estágio de incubação. Diluições seriais duplas de soros (partindo de 1:100 ou 1:1000) foram adicionadas nas cavidades, 0,1 mL por cavidade e incubadas a 37°C por 1 hora seguido por incubação (1 hora, 37°C) com anticorpos IgG de cabra anti-camundongo conjugados com HRP (0,1 mL, 1 mg/mL em PBS) e então com 0,1 mL de 20 solução de substrato-0,05% de H₂O₂ e 0,05% de o-fenileno-diamina em tampão citrato de sódio 0,05M com um pH de 4,5. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de H₂SO₄ 12,5%. Absorbância foi medida em um comprimento de onda de 492 nm usando um Multiscan Plus MKII (Flow Laboratories, Grã-Bretanha). Título de anticorpo anti-proteína significativo

25 (para soros individuais) foi avaliado como a diluição de soro produzida como um valor de absorbância maior do que 0,1 ODU e o mínimo ultrapassa três vezes o nível de controle. O título de anticorpo foi apresentado e-log de diluição (Figuras 2 e 3). O índice de estimulação para soros reunidos foi calculado pela divisão da diluição de soros reunidos de teste produzindo

OD=1 pela diluição de soros reunidos de camundongos sem o adjuvante, produzindo OD=1. Os resultados das atividades adjuvantes de ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH) (Composto 17), ciclo-L-Lys(N-acetil-Glicosamina-N-acetil-muramil)-L-Glu-(L-Trp-OH) (Composto 33a) e ciclo-D-Lys(N-acetil-Glicosamina-N-acetil-muramil)-D-Glu-(L-Trp-OH) (Composto 33b) são mostrados em Tabela 7 e as atividades adjuvantes de ciclo [L-Lys(Palmitoil)-L-Glu(D-Trp-OH)] (Composto 26a) e ciclo-[D-Lys(Palmitoil)-D-Glu(D-Trp-OH)] (Composto 26b) são mostrados em Tabela 8 bem como em Figura 4 que inclui os resultados das atividades adjuvantes de ciclo-L-Lys-L-Glu-(L-Trp-OH) (composto 19). É notado que os peptídeos de compostos 26a e 26b são solúveis em NH₄OH 0,1% em uma concentração de 1 mg por 1 a 2 mL. Os peptídeos permanecem solúveis quando titulados com AcOH 0,1% para pH = 8,4 a 8,5. Como pode ser visto dos resultados das atividades adjuvantes do compostos em Figura 4, composto 17 é ativo a 1, 10 e 100 µg/kg; composto 19 é ativo a 100 µg/kg; composto 33a é ativo a 100 µg/kg; composto 33b não é um composto ativo, composto 26a é ativo a 10 µg/kg; e composto 26b não é um composto ativo.

Exemplo 9: Estudos sobre novos análogos de dermorfina.

(i) Avaliação de atividade periférica de opióide

Atividade periférica de opióide dos peptídeos foi avaliada tendo por base a capacidade de inibir as contrações eletricamente induzidas de íleo de porquinho-da-índia isolado (GPI) (Kosterlitz, H.W. et al., "The effect of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibition a-and b-adrenoreceptors in the longitudinal muscle of the guinea pig ileum", Brit. J. Pharmacol., Vol. 39., Páginas 398 a 413, 1970).

O segmento de GPI cerca de 1 cm de comprimento foi posicionado dentro de um banho de órgão de 10 mL contendo solução de Krebs a 34°C. A composição da solução de Krebs foi (mM): NaCl-118; KCl-4,70; CaCl₂-2,52; KH₂PO₄-0,93; MgSO₄-1,27; NaHCO₃-25; glicose-11,0.

Tensão em repouso do órgão foi 1 g. O segmento de GPI foi estimulado por duração de pulsos individuais de 1 ms com 0,1 Hz a 80 V. A solução com órgãos isolados foi constantemente aerada. As concentrações foram registradas em um modo isométrico por um sensor K 30 (Hugo Sachs Elektronic KG) com registrador de papel Rikadenki-series (Japão).

As substâncias testadas foram dissolvidas em água destilada e adicionadas cumulativamente no banho de órgão em um volume de 5 a 30 mcl. Cada substância subsequente foi adicionada após os órgãos isolados serem lavados 3 ou 4 vezes por 12-15 min. Tendo por base os dados obtidos, curvas de dose-efeitos foram plotadas e a atividade de substâncias foi expressada por IC_{50} ou pD_2 . O índice pD_2 foi igual a um logaritmo decimal negativo da concentração de substância causando 50% do efeito máximo.

Tratamento estatístico dos resultados foi realizado pelo teste-t de Student.

Novos análogos de dermorphina foram testados no modelo padrão de teste e ligação de íleo de porquinho-da-índia. Para cada molécula, a EC_{50} foi determinada como a concentração de substância causando a redução da amplitude de contração em 50% do nível básico.

A preparação padrão em todos os experimentos foi dermorphina. Para confirmação de atividade de opióide, o antagonista específico naloxson foi usado na concentração de $10^{-5}M$. Cada molécula foi testada em 5 repetições independentes e atividade relativa foi calculada como logaritmo negativo de EC_{50} (pD_2).

Como pode ser visto em Tabela 9, todos os peptídeos testados têm níveis diferentes de atividades de opióide, dentro da faixa de 10^{-9} a $10^{-5}M$, com a exceção de H-Tyr-Tyr-Pro-Ser NH₂ (Composto 51) e D-Ala-D-Glu-(D-Trp)-OH (Composto 54).

(ii) Atividade analgésica de novos análogos de peptídeo opióide.

Duzentos e vinte híbridos de primeira geração de

camundongos F1 (CBAxC57D foram usados no teste de atividade analgésica usando o teste de retirada de cauda ("*tail flick*"). A temperatura da água estava a 48°C. O efeito máximo foi para o período de 30 segundos. Todos os peptídeos foram injetados intraperitonealmente nas doses de 5, 10 ou 20 mg/kg. Efeito analgésico foi estimado no intervalo de tempo de 15 a 120 min após a injeção de peptídeo. Critério-t de Student foi usado para cálculos estatísticos dos resultados. Significâncias estatísticas estavam no nível de $p<0,05$. Os resultados dos testes são mostrados em Tabela 10.

10 (iii) Atividade analgésica de Dermorfina e análogos após administração oral e administração intraperitoneal.

Para estimativa de atividade oral de ciclopeptídeos novos da presente invenção, o teste de retirada de cauda ("*tail flick*") foi usado. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos usando administração intraperitoneal.

15 Atividade antinociceptiva dos peptídeos da presente invenção foi avaliada em experimentos sobre camundongos machos BALB/c pesando 22 a 24 g. Os peptídeos foram dissolvidos em solução salina e administrados intraperitonealmente ou intragastricamente.

20 O teste de retirada de cauda ("*tail flick*") (D'Amour, F.E. et al. "A Method for Determining Loss of Pain Sensation", J. Pharmacol. Exp. Ther., Vol. 72, Páginas 74 a 79, 1941) foi realizado em um analgesímetro de tipo 812, Hugo Sachs Electronick KG. Atividade antinociceptiva foi definida como a ausência de resposta de retirada de cauda sob estimulação com feixe focado de radiação calorífica com 6 s em resposta de linha base de 2,0-3,0 segundos.

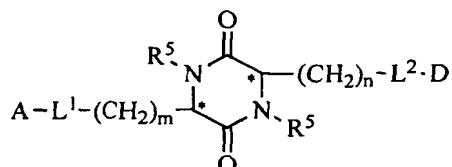
25 Tratamento estatístico dos resultados foi realizado pelo teste-t pareado de Student. Os resultados destes testes são mostrados em Tabelas 11 e 12. Como pode ser visto dos experimentos, apenas cicloanálogos sobre neuropeptídeos são ativos em administração oral (intragastricamente).

Embora a presente invenção tenha sido descrita com referência

ao que é presentemente considerado como sendo os exemplos preferidos, é para ser entendido que a invenção não é limitada aos exemplos descritos. Ao contrário, a invenção é intencionada para cobrir várias modificações e arranjos equivalentes incluídos dentro do espírito e do escopo das 5 reivindicações anexadas.

Todas as publicações, patentes e pedidos de patente são aqui incorporados(as) como referências em sua totalidade na mesma extensão como se cada publicação, patente ou pedido de patente fosse específica e individualmente indicado como sendo incorporada(o) como referência em sua totalidade. Onde um termo no presente pedido é encontrado como estando definido diferentemente em um documento aqui incorporado como referência, a definição aqui fornecida é para ser utilizada como a definição do termo.

Tabela 1. Exemplos de compostos bioativos multifuncionais e sais, solvatos e pró-drogas farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos da 15 presente invenção.



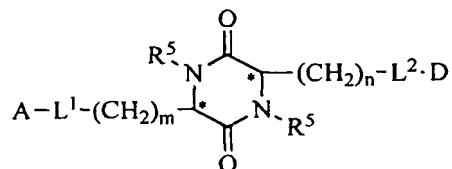
(a) Imuno- e hemodepressivos testados:

Composto	A	L ¹	m	*	n	L ²	D	R ⁵
1	D-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	1	ligação	H	H
2	D-Trp-OH	-CO-	2	D-D	1	ligação	H	H
3	D-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	1	ligação	Bz	H
4	D-Trp-OH	-CO-	2	D-D	1	ligação	Bz	H
5	D-Trp-ONH ₂	-CO-	2	D-D	1	ligação	Bz	H
6	D-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	1	ligação	Ph	H
7	D-Trp-OH	-CO-	2	D-D	1	ligação	Ph	H
8	D-Trp-NH ₂	-CO-	2	D-D	1	ligação	Ph	H
9	D-Trp-NH ₂	-CO-	2	D-D	4	ligação	H ₂ N	H
10	L-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	1	ligação	H	H
11	L-Trp-OH	-CO-	2	D-D	1	ligação	H	H
12	D-Trp-OMe	-CO-	1	D-D	1	ligação	H	H
13	D-Trp-OH	-CO-	1	D-D	1	ligação	H	H
14	L-Trp-OMe	-CO-	1	D-D	1	ligação	H	H
15	L-Trp-OH	-CO-	1	D-D	1	ligação	H	H

(b) Imuno- e hemoestimulantes testados

Composto	A	L ¹	m	*	n	L ²	D	R ⁵
16	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	1	ligação	H	H
17	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L-	1	ligação	H	H
18	L-Trp-NH ₂	-CO-	2	L-L	4	ligação	H ₂ N	H
19	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	4	ligação	H ₂ N	H
20	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	4	ligação	H ₂ N	H
21	D-Trp-OMe	-CO-	1	L-L	1	ligação	H	H
22	D-Trp-OH	-CO-	1	L-L-	1	ligação	H	H
23	L-Trp-OMe	-CO-	1	L-L	1	ligação	H	H
24	L-Trp-OH	-CO-	1	L-L	1	ligação	H	H

Tabela 1. Exemplos de compostos bioativos multifuncionais e sais, solvatos e pró-drogas farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos da presente invenção (Continuada).



5

(c) Adjuvantes testados

Composto	A	L ¹	m	*	n	L ²	D	R ⁵
25	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Palma	H
26a	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Palma	H
26b	L-Trp-OH	-CO-	2	D-D	4	-NH-	Palma	H
27	L-Trp-NH ₂	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Palma	H
28	D-Trp-OMe	-CO-	1	L-L	4	-NH-	Palma	H
29	D-Trp-OH	-CO-	1	L-L	4	-NH-	Palma	H
30	L-Trp-OMe	-CO-	1	L-L	4	-NH-	Palma	H
31	L-Trp-OH	-CO-	1	L-L	4	-NH-	Palma	H
32	L-Trp-NH ₂	-CO-	2	L-L	4	-NH-	N-Acetil-Glicosamina (1-4)-N-Acetil-muramil-	H
33a	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	4	-NH-	N-Acetil-Glicosamina (1-4)-N-Acetil-muramil-	H
33b	L-Trp-OH	-CO-	2	D-D	4	-NH-	N-Acetil-Glicosamina (1-4)-N-Acetil-muramil-	H

*Palm = Palmitoil (hexadecanoil)

(d) Analgésicos peptídicos + derivados imunorreativos

Composto	A	L ¹	m	*	n	L ²	D	R ⁵
34	D-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ma-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
35	D-Trp-OH	-CO-	2	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
36	D-Trp-NI-12	-CO-	2	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
37	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
38	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
39	L-Trp-NH ₂	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
40	D-Trp-OMe	-CO-	1	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
41	D-Trp-OH	-CO-	1	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
42	L-Trp-OMe	-CO-	1	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
43	L-Trp-OH	-CO-	1	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H

Tabela 2: Formação de colônia de baço por células de medula óssea de camundongos tratados com peptídeos.

Tratamento de doador e método de introdução	Contagem de colônias CFU-8-S por 10 ⁵ células M±M	Supressão %
Controle	11,2± 0,4	-
ciclo-DAla-DGlu-(DTrp-ONA) (i/p)	5,0±0,3 *	70
ciclo-DAla-DGlu-(DTrp-ONA) (per/os)	6,0±0,7*	58
ciclo-DAla-DGlu-(DTrp-OMe) (s/c)	6,8±0,4*	47
ciclo-DAla-DGlu-(DTrp-OMe) (per/os)	7,4±0,4*	40
ciclo-LAla-LGlu-(LTrp-ONA) (i/p)	11,7± 0,8	0
ciclo-LAla-LGlu-(DTrp-ONA) (i/p)	8,8± 0,2*	20
ciclo-DAla-DAsp-(DTrp-OH) (per/os)	9,0± 0,2	26,5
ciclo-DPhe-DGlu-(DTrp-ONA) (per/os)	8,1± 0,4*	28
ciclo-DTyr-DGlu-(DTrp-OH) (per/os)	6,3±0,9*	44
γDGLu-DTrp (Timodepressina) (i/p)	6,3±0,6*	55

*P <0,05 compare com controle

Tabela 3: Comparação das atividades dos novos compostos da invenção e de timodepressina sobre a supressão de população de CFU-S na medula óssea.

Substância (Dose-micrograma/por camundongo)	Contagem de colônias CFU-8-S por 10^5 células $M \pm m$	Supressão %
controle	$9,9 \pm 0,7$	-
γ DGlu-DTrp (Timodepressina) 200,0 (per/os)	$5,1 \pm 0,2^*$	52
γ DGlu-DTrp (Timodepressina) 20,0 (per/os)	$6,4 \pm 0,5^*$	41
γ DGlu-DTrp (Timodepressina) 2,0 (per/os)	$8,0 \pm 0,5$	33
γ DGlu-DTrp (Timodepressina) 0,2 (per/os)	$10,2 \pm 0,3$	0
γ DGlu-DTrp (Timodepressina) 0,2 (i/p)	$5,7 \pm 0,4^*$	51
ciclo-DAla-DGlu-(DTrp-ONa) 0,2 (per/os)	$5,3 \pm 0,6^*$	59
ciclo-DAla-DGlu-(DTrp-OMe) 0,2 (per/os)	$6,5 \pm 0,5^*$	42
ciclo-DAla-DAsp-(DTrp-OMe) 0,2 (per/os)	$8,4 \pm 0,6^*$	28
ciclo-DAla-DAsp-(DTrp-ONa) 0,2 (per/os)	$6,8 \pm 0,8^*$	55
ciclo-DPhe-DGlu-(DTrp-ONa) 0,2 (per/os)	$8,1 \pm 0,4^*$	28
ciclo-DTyr-DGlu-(DTrp-ONa) 0,2 (per/os)	$6,3 \pm 0,9^*$	44

* $P < 0,05$ compare com controle

5 Tabela 4: Efeito de Neogen ou de novos peptídeos cíclicos da invenção sobre a formação de colônias exógenas de baço pela irradiação de medula óssea *in vitro* com 1 Gy.

Dose de radiação	Peptídeo	Dose de peptídeo, μ g/kg	Rota de administração	Contagem de colônias	Estimulação %
-	-	-	-	$11,9 \pm 0,4$	100
1 Gy	-	-	-	$6,2 \pm 0,6^{**}$	0
1 Gy	Neogen	10	IP	$9,7 \pm 0,4^*$	81,5
1 Gy	Neogen	100	IP	$9,2 \pm 0,7^*$	77,3
1 Gy	Neogen	10	IM	$11,6 \pm 0,8^*$	97,5
1 Gy	Neogen	100	IM	$11,8 \pm 0,9^*$	99,1
1 Gy	Neogen	100	per/os	$6,7 \pm 0,5$	0
1 Gy	Neogen	1000	per/os	$6,1 \pm 0,3$	0
1 Gy	Ciclo-LAla-LGlu-(LTrp-ONa)	100	IP	$9,6 \pm 0,7^*$	80,7
1 Gy	Ciclo-LAla-LGlu-(LTrp-ONa)	10	IP	$8,0 \pm 0,4^*$	67,2
1 Gy	Ciclo-LAla-LGlu-(LTrp-ONa)	100	per/os	$11,7 \pm 0,6^*$	98,3
1 Gy	Ciclo-LAla-LGlu-(LTrp-OMe)	100	per/os	$8,9 \pm 0,5^*$	74,8
1 Gy	Ciclo-LAla-LGlu-(LTrp-OMe)	100	s/c	$8,0 \pm 0,5^*$	67,2

* * Significância foi calculada em relação a este grupo * $P < 0,05$

Tabela 5: Atividade adjuvante de ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-ONa).

Produto testado	Índice de estimulação
CFA (grupo 1)	-
Controle (grupo 2)	1,00
Grupo com CFA +ovalbumina (25 micrograma/camundongo) (grupo 3)	2,40
Ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-ONa) 1 µg/camundongo (grupo 4)	1,18
Ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-ONa) 10 µg/camundongo (grupo 5)Ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-ONa) 10 µg/camundongo (grupo 5)	1,74

Tabela 6: Atividade adjuvante de ciclo-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH) (Composto 17).

Adjuvante	Índice de estimulação
Composto 17 a 100 microgramas	1,14
Composto 17 a 10 microgramas	1,74
Composto 17 a 1 microgramas	1,18
Adjuvante completo de Freund	2,40
Camundongos de Números 6 a 20-ovalbumina 25 microgramas por animal	1,0

5

Tabela 7: Títulos de anticorpo anti-OVA após imunizações com adjuvante-proteína e índices de estimulação correspondentes.

Imunogene	Adjuvante	Dose, µg por animal	Título de anticorpo anti-proteína (para soros individuais)								Título de anticorpo anti-proteína (soros reunidos)	Índice de estimulação
OVA		100	4,8	4,8	5,4	5,1	6,4	5,1	5,7	5,5	6,8	
	Composto 33a	10	4,4	5,7	4,7	5,7	5,7	5,7	5,4	5,1	3,5	
		1	5,1	4,2	5,4	4,1	5,1	5,4	5,4	4,8	2,9	
	Composto 33b	100	4,8	5,4	4,2	5,1	5,1	5,4	5,4	4,8	2,9	
		10	4,8	4,5	5,2	5,1	5,4	4,3	5,4	5,4	4,1	
		1	5,2	4,8	4,8	4,8	4,5	5,1	4,8	5,1	3,5	
		100	4,5	4,2	4,2	4,2	5,1	5,1	4,8	4,8	2,3	
	Composto 17	10	4,8	4,2	4,1	4,5	5,4	4,5	3,9	4,5	1,9	
		1	5,1	4,2	4,5	5,1	5,4	5,1	4,5	4,8	2,6	
	CFA		5,3	6,8	6,2	5,3	6,2	6,8	5,9	6,2	13	
	Nenhum		4,2	4,5	4,2	4,5	4,8	4,5	3,9	4,5	1	

Tabela 8: Índices de estimulação para compostos adjuvantes

26a e 26b.

Imunogene	Adjuvante	Dose, μg por animal	Título de anticorpo anti-proteína							Reunião	Índice de estimulação
OVA	Composto 26b	100	15	16	17	18	19	20	21	4,8	2,6
			4,5	4,5	4,8	4,8	4,2	4,8			
		10	29	30	31	32	33	34	35	4,8	2,7
			4,7	5,1	4,7	4,8	4,7	-	4,8		
		1	36	37	38	39	40	41		5,1	4,9
			5,4	4,5	3,8	3,5	5,1	5,4			
	Composto 26a	100	22	23	24	25	26	27	28	5,1	3,3
			4,8	4,4	4,8	5,1	4,8	4,8	5,4		
		10	42	43	44	45	46	47	48	5,7	6,5
			5,5	5,5	5,8	5,5	5,7	5,7	5,5		
		1	49	50	51	21	53	54	55	4,4	2,0
			4,8	5,1	4,5	4,4	5,1	5,1	5,1		
	CFA		8	9	10	11	12	13	14	6,2	18
			6,2	5,9	6,2	6,2	6,2	6,2	5,9		
	Nenhum		1	2	3	4	5	6	7	3,9	1
			4,1	4,2	4,2	3,9	4,5	3,9	3,5		

Tabela 9: Resultados de teste *in vitro* (atividade de ligação de receptor de GPI- μ) teste da atividade periférica de opióide de peptídeos.

Composto	Análogos de Dermorfina	EC ₅₀ Mediana em M	Valor de pD ₂ (M \pm m)	Antagonismo com naloxona 10 ⁻⁵ M
44	Ciclo-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala)-L-Glu(OH)]	5,7 x 10 ⁻⁷	6,15 \pm 0,10	+
45	Ciclo-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala)-L-Glu(L-Trp-OMe)]	2 x 10 ⁻⁶	5,68 \pm 0,09	+
46	Ciclo-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-NH ₂)]	1,1 x 10 ⁻⁸	7,96 \pm 0,02	+
47	Ciclo-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-OH)]	3,3 x 10 ⁻⁸	7,52 \pm 0,07	+
48	(Dermorfina) H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂	2,5 x 10 ⁻⁹	8,56 \pm 0,12	+
49	H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-NH ₂	3 x 10 ⁻⁶	7,55 \pm 0,11	+
50	H-Tyr-D-Ala-Phenyl-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-NH-CH ₃	9,5 x 10 ⁻⁹	7,95 \pm 0,07	+
51	H-Tyr-Tyr-Pro-Ser-NH₂	---	---	---
52	Arg-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-OH	3 x 10 ⁻⁶	5,50 \pm 0,07	+
53	H-Arg-Tyr-D-Ala-Phe-D-AlaOH	1 x 10 ⁻⁶	6,06 \pm 0,12	+
54	D-Ala-D-Glu-(D-Trp)-OH	---	---	---
55	H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-OH	1 x 10 ⁻⁶	5,81 \pm 0,16	+
56	H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-OH	5 x 10 ⁻⁸ (1x10 ⁻⁸)	7,53 \pm 0,22	+

Tabela 10: Atividade analgésica de análogos de peptídeo opioíde.

Estrutura	Dose (mg/kg)	Camundongos de Número	Nível de sensibilidade inicial, (s)	Tempo após injeção de peptídeo (min.)					
				15	30	45	60	90	120
Duração do efeito (s)									
Dermorfina:	5	8	3,6±0,2	11,0±1,0	14,4±3,0	17,2±2,4	13,2±1,3,2	4,7±0,3	-
Tyr-DAla-Phe-Gly-Tyr Pro-Ser-NH ₂	10	10	4,4±0,3	11,7±1,0	16,6±2,2	17,0±2,3	10,2±1,2	3,9±0,2	-
Opilong:	5	10	3,0±0,1	9,0±1,7	10,3±2,6	14,3±3,7	10,8±1,9	6,4±1,5	3,5±0,2
Tyr-DAla-Phe-DAla-Tyr-Pro-Ser-NHMe	10	10	2,9±0,2	5,9±0,7	10,7±0,8	12,2±2,6	7,2±11,2	6,9±1,4	3,7±0,4
Ciclo-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-OH)]	10	15	3,7±0,2	6,8±0,6	6,3±0,7	8,4±1,4	7,7±1,7	6,7±1,0	4,6±0,3
	20	10	3,4±0,2	7,8±0,5	8,3±0,8	8,7±1,2	9,5±1,2	9,7±1,3	8,2±1,7
Ciclo-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-NH ₂)]	10	10	3,2±0,3	11,6±1,7	15,5±1,6	15,7±1,2	13,0±1,5	9,9±1,5	6,8±0,5
	20	10	3,0±0,2	1,4±1,6	18,1±2,3	16,8±2,2	12,7±1,8	11,7±1,2	6,3±0,6

Dados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) mostrados em negrito.

5

Tabela 11. Atividade analgésica de Dermorfina e análogos após administração oral como determinado pelo teste de remoção de cauda ("tail flick").

Estrutura	Dose (mg/kg)	Camundongos de Número	Nível de sensibilidade inicial, médio (s)	Tempo após injeção de peptídeo (min.)					
				15	30	60	90	120	
Duração do efeito (s)									
Tyr-DAla Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂ Dermorfina	50	6	2,2±0,1	2,4±0,1	2,30,1	2,3±0,1	3,4±0,5		
Tyr-DAla Phe-DAla-Tyr-Pro-Ser-NHMeOpilong	50	7	2,6±0,1	3,3±0,6	2,3±0,1	-	4,3±0,6		
Ciclo-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-OH)]	50	8	2,20,1	3,7*±0,5	3,9*±0,5	4,1*±0,5	4,0*±0,5	-	
Ciclo-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-NH ₂)]	50	6	2,7±0,1	4,5*±0,1	4,1*±0,5	5,5*±0,5	5,5*±0,4	5,5*±0,5	
Tramadol	50	6	2,6±0,1	2,6±0,1	4,6*±0,5	4,4*±0,5	4,4*±0,6	4,4*±0,5	

Dados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) mostrados em negrito.

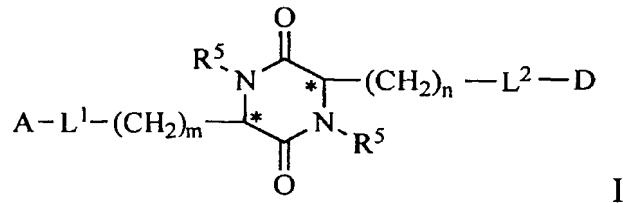
Tabela 12: Atividade analgésica de Dermorfina e análogos após administração intraperitoneal.

Estrutura	Dose (mg/kg)	Camundongos de Número	Nível de sensibilidade inicial, médio (s)	Tempo após injeção de peptídeo (min.)					
				15	30	45	60	90	120
Duração do efeito (s)									
Tyr-DAla-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂ Dermorfina	10	8	2,2±0,2	5,6*±0,4	6,0*±0				
Tyr-DAla-Phe-DAla-Tyr-Pro-Ser-NHMe Opilong	10	6	2,0±0,1	3,6±0,7	5,6*±0,4	5,5*±0,6	5,2*±0,6	-	-
Ciclo-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-OH)]	10	9	2,1±0,1	4,1±0,4	5,6*±0,4	4,8*±0,6	-	-	-
Ciclo-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp NH ₂)]	10	5	2,1±0,1	3,9±0,8	5,3*±0,7	5,2*±0,6	-	-	-
Arg-Tyr-DAla-Phe-DAla-OH	10	9	2,4±0,1	2,7±0,1	-	-	-	-	-

Dados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) mostrados em negrito.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto bioativo multifuncional, caracterizado pelo fato de ser selecionado de um ou mais de um composto de fórmula I:



sendo que

5 A é um radical imunorregulatório selecionado do grupo
consistindo de Trp, Tyr, Phe, His,

L^1 e L^2 são cada um independentemente um grupo de ligação selecionado do grupo consistindo de uma ligação simples, $-C(O)-C(O)NR^2-$, $-NR^2C(O)-$, $-NR^2-$, $-C(O)-O-$, $-OC(O)-$, $-S-S-$, SO_2NR^2- , NR^2SO_2- , $-S-e-O-$;

10 R² é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, C₁₋₆alquileno-arila, C(O)C₁₋₆alquila, C(O)arila, SO₂C₁₋₆alquila e SO₂arila;

R^5 é H ou C_{1-6} alquila;

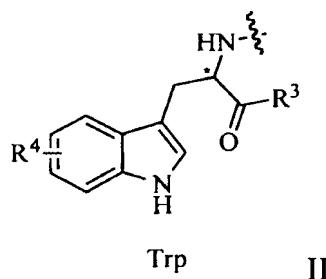
* é a configuração L ou D ou suas misturas.

m é um número inteiro entre 1 e 50;

D é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, qualquer cadeia lateral de um aminoácido e qualquer molécula funcionalmente ativa.

e sais, solvatos e pró-drogas farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que A é um grupo tendo a fórmula II:



sendo que R^3 é selecionado do grupo consistindo de H, OC_{1-6} alquila, NH_2 , NHC_{1-6} alquila, $N(C_{1-6}$ alquila)₂, $NHNH_2$ e OY , onde Y é um cátion farmaceuticamente aceitável;

R^4 é 1 a 4 substituintes independentemente selecionados do grupo consistindo de H, halo, OH, OC_{1-6} alcoxila, C_{1-6} alquila, C_{1-6} alquenila, C_{1-6} alqueniloxila, NH_2 , $NH(C_{1-6}$ alquila), $N(C_{1-6}$ alquil)(C_{1-6} alquila), CN, CF_3 , OCF_3 , NO_2 , $C(O)C_{1-6}$ alquila, $C(O)OC_{1-6}$ alquila, SO_2C_{1-6} alquila, SO_2NH_2 , SO_2NHC_{1-6} alquila, fenila e C_{1-6} alquileno-fenila;

e

* é a configuração L ou D ou suas misturas.

3. Composto de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que R^3 é selecionado do grupo consistindo de H, Me, NH_2 , $NHMe$, NMe_2 , $NHNH_2$ e OY .

4. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 3, caracterizado pelo fato de que Y é selecionado do grupo consistindo de Na^+ , K^+ e Zn^{2+} .

5. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizado pelo fato de que R^4 é 1 a 3 substituintes independentemente selecionados do grupo consistindo de H, halo, OH, OMe, Me, vinila, viniloxila, NH_2 , $NHMe$, NMe_2 , CN, CF_3 , OCF_3 , NO_2 , $C(O)Me$, $C(O)OMe$, SO_2Me , SO_2NH_2 , SO_2NHMe , fenila e benzila.

6. Composto de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que R^4 é H.

7. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que cada um de L¹ e L² é independentemente selecionado do grupo consistindo de -C(O)-, -NR²-, -C(O)NR²-e-NR²C(O)-.

5 8. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que R² é selecionado do grupo consistindo de H, Me, Bn, C(O)Me, C(O)Ph, SO₂Me e SO₂Ph.

9. Composto de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que R² é H.

10 10. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que m é um número inteiro entre 1 e 25.

11. Composto de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que n é um número inteiro entre 0 e 10.

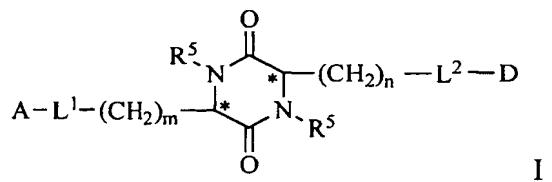
12. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 1 a 11, caracterizado pelo fato de que R⁵ é H ou Me.

13. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que ambos * no anel diceto-piperazina estão substituídos na configuração D ou ambos * estão substituídos na configuração L.

20 14. Composto de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que D é uma molécula funcionalmente ativa, e a molécula funcionalmente ativa é selecionada do grupo consistindo de adjuvantes tais como palmitoil; analgésicos tais como analgésicos peptídicos; opiatos e anticorpos tais como dermorphina, morfina, naloxona e seus derivados; vacinas 25 sintéticas tais como epítopos-B e T determinantes antigênicos; farmacóforos farmacêuticos incluindo moléculas pequenas tais como metotrexato, diclofenac, ibuprofeno, indometacina, naproxeno e cetoprofeno; açúcares; lipídeos; e nucleotídeos.

15. Composto bioativo multifuncional, caracterizado pelo fato

de ser selecionado de um ou mais de um composto de fórmula I:



sendo que

A é um radical imunorregulatório selecionado do grupo consistindo de Trp, Tyr, Phe, His, arila e heteroarila, onde os grupos arila e heteroarila podem estar opcionalmente substituídos com 1 a 6 substituintes independentemente selecionados do grupo consistindo de halo, OH, OC₁₋₆alcoxila, C₁₋₆alquila, C₂₋₆alquenila, C₂₋₆alqueniloxila, NH₂, NH(C₁₋₆alquila), N(C₁₋₆alquil)(C₁₋₆alquila), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₆alquila, C(O)OC₁₋₆alquila, SO₂C₁₋₆alquila, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₆alquila, fenila e C₁₋₆alquilenofenila, e

onde heteroarila é um anel carbocíclico aromático contendo de 5 a 10 átomos de carbono, no qual 1 a 4 átomos de carbono têm sido substituídos por um heteroátomo selecionado de um ou mais de O, S e N-R¹, onde R¹ é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, C₁₋₄alquilenarila, C(O)C₁₋₆alquila, C(O)arila, SO₂C₁₋₆alquila e SO₂arila quando o átomo de N estiver hibridizado em sp³, ou é um par de elétrons sozinho quando o átomo de N estiver hibridizado em sp²;

L¹ e L² são cada um independentemente um grupo de ligação selecionado do grupo consistindo de uma ligação simples, -C(O)-C(O)NR²-, -NR²C(O)-, -NR²-, -C(O)-O-, -OC(O)-, -S-S-, SO₂NR²-, NR²SO₂, -S-e-O-;

R² é selecionado do grupo consistindo de H, C₁₋₆alquila, C₁₋₆alquilenarila, C(O)C₁₋₆alquila, C(O)arila, SO₂C₁₋₆alquila e SO₂arila;

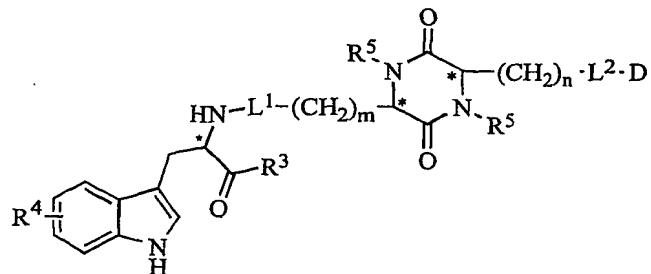
R⁵ é H ou C₁₋₆alquila;

* é a configuração L ou D ou suas misturas.

25 m é um número inteiro entre 1 e 50;

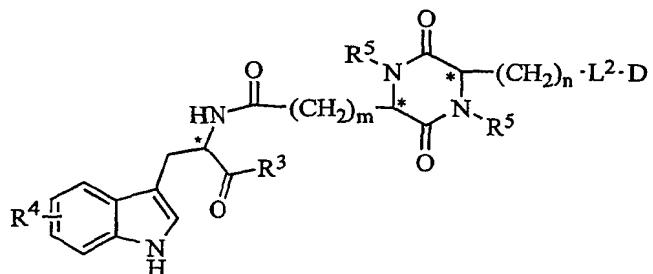
n é um número inteiro entre 0 e 50; e
D é qualquer molécula funcionalmente ativa.

17. Composto bioativo multifuncional de Fórmula I, caracterizado pelo fato de ter a seguinte fórmula:



5 sendo que L¹, L², D, m, n, R⁵ e * são como definidos na reivindicação 1; e R³ e R⁴ são como definidos na reivindicação 2.

18. Composto bioativo multifuncional de Fórmula I, caracterizado pelo fato de ter a seguinte fórmula:



10 sendo que L², D, m, n, R⁵ e * são como definidos na reivindicação 1; e R³ e R⁴ são como definidos na reivindicação 2.

19. Composto bioativo multifuncional de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser selecionado de um ou mais de os compostos 1 a 43 em Tabela 1.

15 20. Composto bioativo multifuncional de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser selecionado de um ou mais de os compostos 44 a 56 em Tabela 9.

21. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender o composto bioativo multifuncional como definido em qualquer

uma das reivindicações 1 a 20 e um carreador farmaceuticamente aceitável.

22. Uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para o tratamento e distúrbios imunes e outros distúrbios.

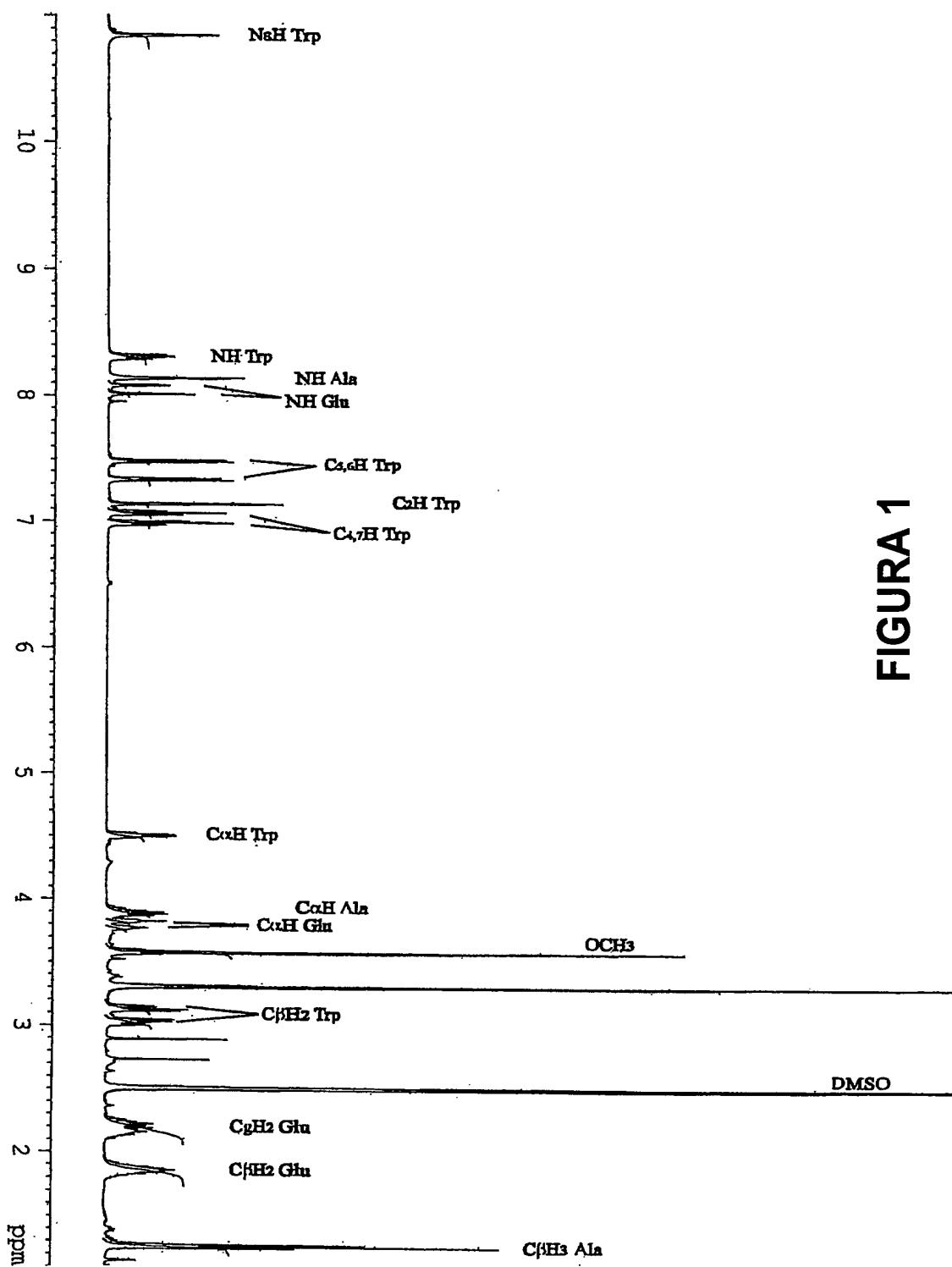


FIGURA 1

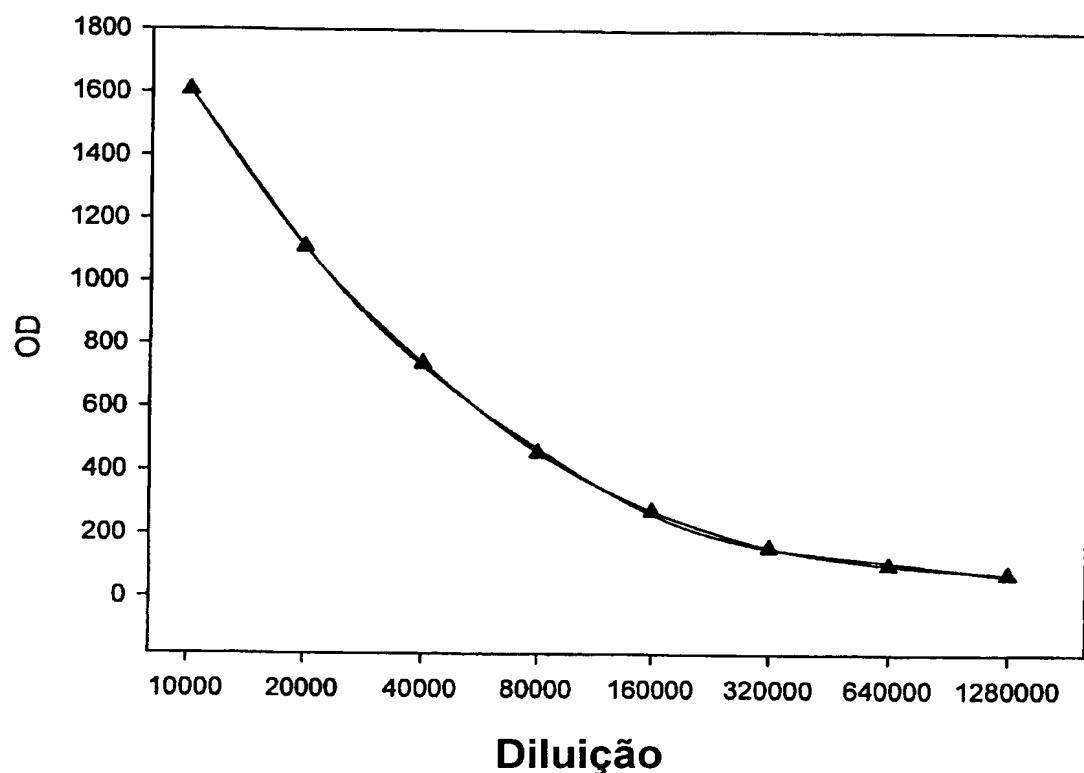
FIGURA 2**OVA + CFA**

FIGURA 3

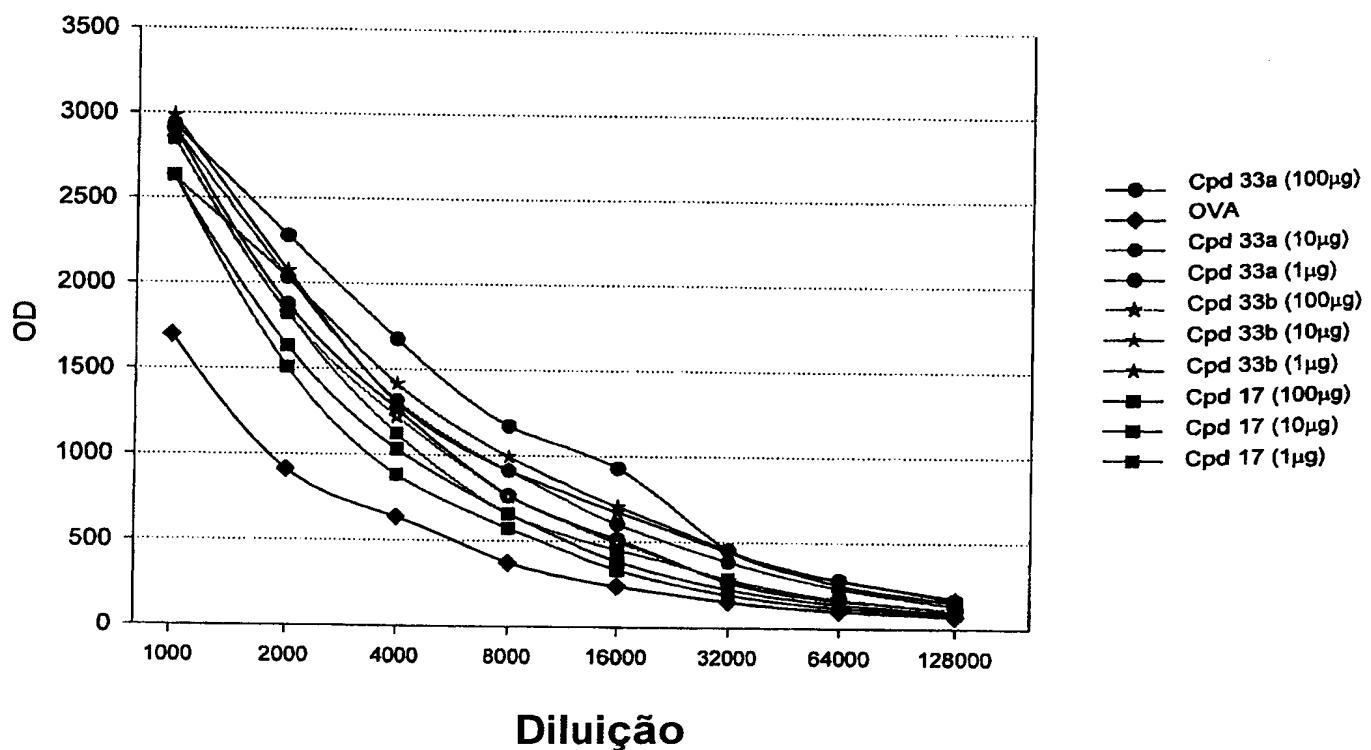
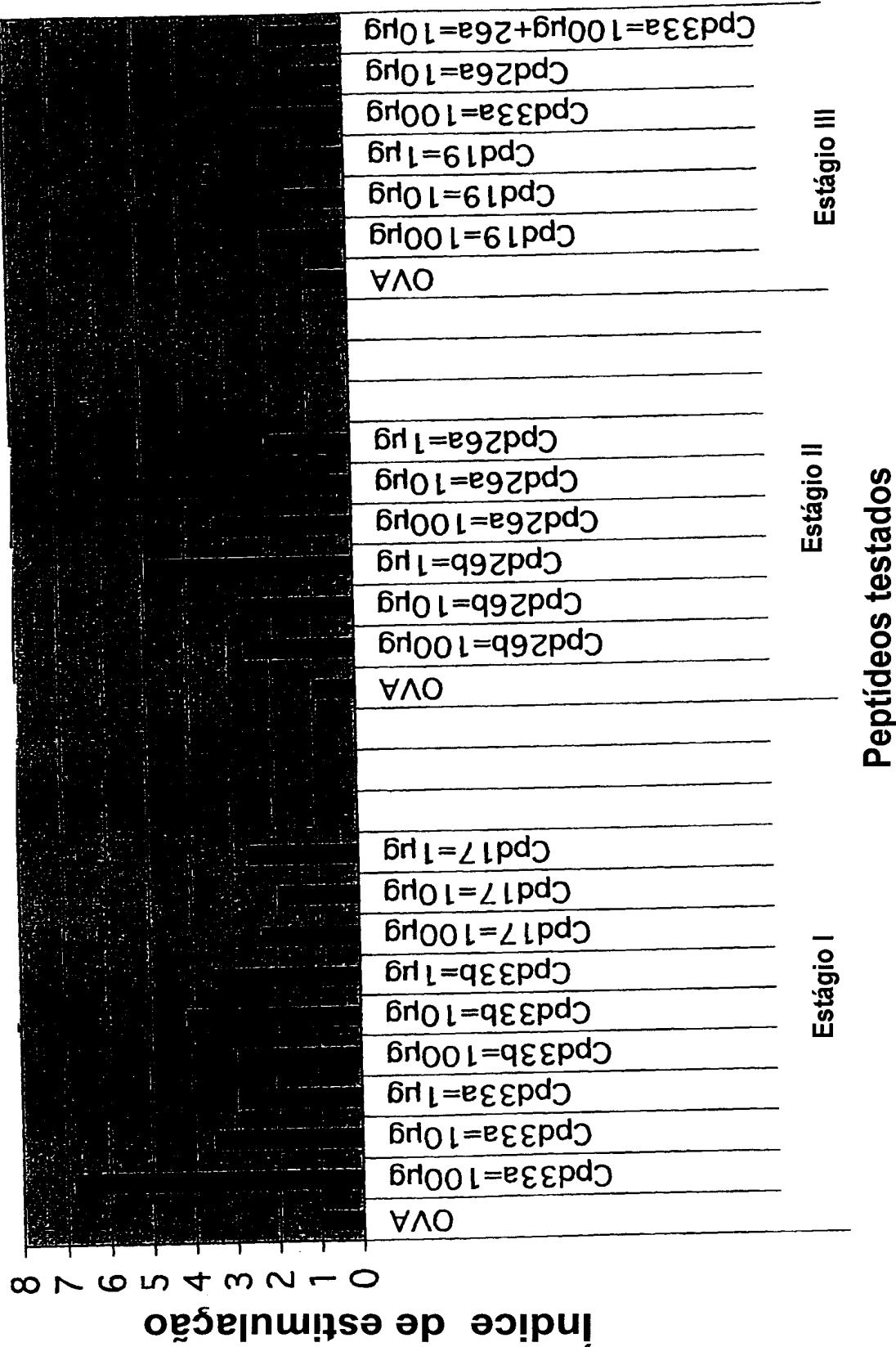


FIGURA 4

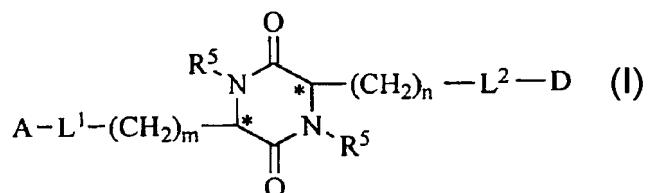
Atividade adjuvante de ciclopeptídeos



RESUMO

“COMPOSTO BIOATIVO MULTIFUNCIONAL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM COMPOSTO”

A presente invenção mostra compostos bioativos multifuncionais de fórmula (I)



constituídos de uma porção imunorregulatória ligada em um grupo estabilizador e suas composições farmacêuticas úteis no tratamento de distúrbios imunes e distúrbios hematopoiéticos tais como citopenia imune, mieloma múltiplo, leucose linfóide crônica, linfomas linfocíticos, linfossarcomas.