

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO
Nº 94 580

NOME: NEW YORK UNIVERSITY

EPÍGRAFE: "Processo de preparação de poliaminas não-aromáticas, de composições farmacêuticas e de regulação dos canais iônicos"

INVENTORES: Bruce D. Cherksey, Rodolfo R. Llinas e Mutsuyuki Sugimori

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

Estados Unidos da América em 5 de Julho de 1989 sob o nº. 375.776 e em 26 de Outubro de 1989 sob o nº. 07/427.333



"Processo de preparação de poliaminas não-aromáticas, de composições farmacêuticas e de regulação dos canais iônicos"

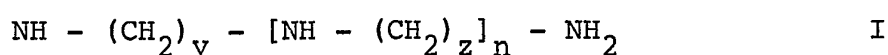
para que

NEW YORK UNIVERSITY, pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de síntese de um composto de poliamina, caracterizado por compreender:

o contacto de um composto de fórmula:



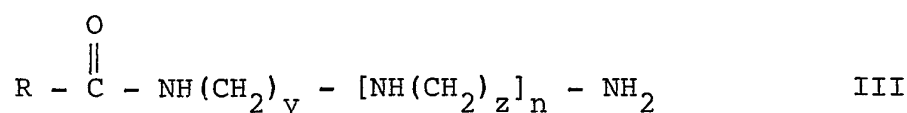
na qual: y e z são números inteiros de 1 a 15

n é um número inteiro de 0 a 2,

com um composto de fórmula:



na qual R é um radical orgânico não aromático contendo, pelo menos, uma porção contendo azoto, seleccionada do grupo consistindo em amino, imino, amido, imido, aminoalquilo, amidoalquilo e imidoalquilo, e na qual R' é um radical alquilo inferior, ocorrendo o referido contacto num solvente possuindo grupos hidroxilo, possuindo o referido solvente um pH alcalino eficaz na manutenção dos grupos amino do composto I na forma não ionizada e obtenção de um composto de poliamina com uma estrutura definida pela fórmula III:

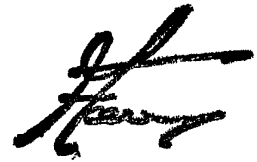


na qual R, y, z e n são definidos como acima, com a



condição de que a distribuição de, pelo menos, um dos grupos metileno ou átomos de azoto, em torno da molécula da referida poliamina, seja assimétrica.

O invento refere-se ainda ao processo de preparação de composições farmacêuticas contendo os compostos de fórmula (I).



MEMÓRIA DESCRITIVA

Este pedido é uma continuação em parte dos (a) Pedido de Patente E.U.A. Nº 219105 apresentado em 14 Julho, 1988 (agora concedido), que é por sua vez uma continuação em parte do Pedido de Patente E.U.A. Nº 154845 apresentado em 10 Fevereiro 1988, (agora abandonado), (b) Pedido do PCT PCT/US89/00558 (publicado como WO89/07608), apresentado em 10 de Fevereiro, 1989 (agora Pedido de Patente E.U.A. Nº 435488 apresentado em 10 Outubro, 1989) e (c) Pedido de Patente E.U.A. Nº 375776 apresentado em 3 Julho, 1989. O governo dos E.U.A. tem direitos sobre este invento através da concessão Nº NS-13742, do National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, e NIH EY-08002 do National Eye Institute, U.S. Public Service, National Institutes of Health.

Campo do Invento

Este invento refere-se, na generalidade, ao uso de compostos de poliamina como agentes reguladores de condutâncias iónicas, nas membranas celulares. Mais especificamente, certos aspectos deste invento referem-se ao uso de certas poliaminas no bloqueamento, modulação ou activação dos canais de cálcio (tal como de outros cationes) em membranas de células neuronais e no bloqueamento, modulação ou activação de canais de cálcio de um tipo específico, em qualquer membrana celular onde tais canais estejam presentes.

Antecedentes do Invento

O transporte passivo de partículas carregadas através de membranas celulares, em resposta a uma variação incremental do campo eléctrico através da espessura da membrana celular, é mediado (e, em grande parte, regulado) por proteínas dos canais ao nível da membrana (incluindo aqueles referidos como canais de cálcio "sensíveis à voltagem" ou "dependentes da voltagem").

Nesta discussão os termos "canal" e "proteína de canal" são usados indistintamente sem implicar que o canal possa, necessariamente, consistir numa única proteína, embora se julgue que os canais que têm sido isolados, sejam proteínas únicas.



A maioria das proteínas de canal medeiam o transporte de uma espécie iónica com uma especificidade substancialmente maior do que o transporte de outras espécies iónicas.

É comum denominar os canais pelos nomes dos iões para os quais eles são específicos: assim, há canais de sódio, canais de potássio, canais de cálcio, etc.

Por sua vez, os canais iónicos, específicos para o transporte de um catião, podem ainda ser divididos em várias subcategorias ou tipos de canais, baseados na maneira como eles interactivam, em resposta a um estímulo eléctrico e/ou químico (farmacológico).

Os canais de cálcio, em particular, que têm sido identificados num grande número de células de diferentes tipos, incluindo neurónios, parecem ter diferenças (tal como semelhanças) na morfologia, nas propriedades e/ou na função.

Algumas destas diferenças são imputáveis à morfologia e função das células, nas quais estes canais ocorrem: por exemplo, os canais de cálcio dos neurónios são de longe os mais complexos em todos os 3 aspectos.

Miller, R.J., infra. Outras diferenças não têm sido relacionadas directamente com o tipo de células; de facto, diferentes tipos de canais de cálcio estão presentes, normalmente, na mesma célula. As células nervosas, por exemplo, apresentam 4 tipos de condutância do cálcio distintas operacionais, e assim há 4 "tipos" de canais de cálcio neuronais (contudo, algumas das propriedades de cada tipo de canais de cálcio neuronais, parecem ser partilhadas pelos canais de cálcio de outros tecidos).

Historicamente, as condutâncias do cálcio neuronais foram primeiro divididas em 2 categorias, baseadas na força accionadora que as activa: a condutância do cálcio com limiar alto (ou HTCC) e a condutância do cálcio com limiar baixo (LTCC). Nos neurónios centrais a HTCC é mais proeminente nas dendrites e a LTCC é mais proeminente no soma ou corpo celular.

Posteriormente, os canais de cálcio neuronais foram agrupados em 3 categorias: os canais T, os quais se julga serem os responsáveis pela LTCC; os canais N, nos quais as propriedades de con

condutância mostram uma correspondência imperfeita com a HTCC; e os canais L, os quais não estão normalmente, representados nos neurônios centrais, mas cujas propriedades de condutância mostram também uma correspondência com a HTCC.

Estas três categorias podem, ainda, ser distinguidas por diferenças nas propriedades farmacológicas. Os canais L são sensíveis às di-hidropiridinas, i.e., são eficazmente bloqueados pelas di-hidropiridinas, tal como a nifedipina e o nitrendipeno, enquanto que os canais T e N são resistentes à di-hidropiridinas.

Num sentido mais lato, os canais T resistem ao bloqueamento por iões cádmio; mais importante, os canais T são especificamente bloqueados por álcoois (especialmente octanol) a 10^{-4} M ou a concentrações inferiores. Finalmente, diz-se que tanto os canais N como L são bloqueados pela omega-conotoxina, uma toxina isolada do veneno do caracol marinho conus geographicus, à qual os canais T são resistentes. Miller, R.J. Science, 1987, 235: 46-52.

Contudo, os canais de cálcio responsáveis pela HTCC (tanto o componente do potencial do patamar dependente do cálcio, como o componente do pico da dendrite de HTCC) em células Purkinje são activados a -50 mV, e são insensíveis à di-hidropiridina, e são resistentes à omega-conotoxina. Estes canais são bloqueados, especificamente, por um agente bloqueador de baixo peso molecular, isolado do veneno de aranhas de teias em funil. Llinas et al., PNAS, 1989, 86:1689-1693. (A especificidade é confirmada pelo facto de este agente bloqueador não bloquear qualquer das condutâncias atribuídas ao canal T, ao canal sódio, aos canais sensíveis à di-hidropiridina, aos canais sensíveis à conotoxina ou ao canal de potássio, excepto quando a condutância deste último, é regulada pelo cálcio). Além disto, os canais de cálcio resistentes à di-hidropiridina e à conotoxina, parecem estar ausentes dos neurónios talâmicos e da oliva inferior. Estes canais de cálcio foram chamados canais P porque foram primeiramente descritos em células Purkinje. Llinas, R.R., et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1989, 560: 103-111.

Os canais do tipo P foram também observados na sinapse gigante da lula e no lobo óptico da lula. Existem também canais de sódio



e de potássio de vários tipos. Ver, na generalidade, Hille, B. ["Ionic Channels of Excitable Membranes", Sinauer Assoc. Inc. Sunderland, Mass. 1984.]

Foram encontrados dois tipos principais de canais de sódio, em células excitáveis electricamente, tais como os neurónios centrais.

Um tipo de canal, responsável pela chamada condutância ao sódio rápida, é especificamente bloqueado por tetrodotoxina (TTX), a toxina isolada do peixe-balão. Um segundo tipo de canal de sódio, responsável pela corrente de sódio lenta, é bloqueado por agentes anestésicos locais, como a lidocaína. Um canal de sódio, claramente diferente, está localizado num tecido não excitável electricamente, tal como o epitélio, e não é bloqueado por TTX ou anestésicos locais, mas é bloqueado pelo diurético amiloride.

Em contraste, pensa-se que existam muitos tipos de canais de potássio. Embora estejam especificamente localizados em neurónios poucos tipos de canais de potássio, muitos estão disseminados por todas as partes do corpo. Os bloqueadores de canais de K^+ conhecidos, tetraetilamónio (TEA), amino-piridinas e quinina mostram uma pequena especificidade para qualquer tipo, em particular, de canais de potássio.

Os agentes que bloqueiam os canais de cálcio com grande afinidade e especificidade, tal como os agentes que activam os canais de cálcio, são úteis como reagentes em investigação electrofisiológica. A possibilidade de utilização destes agentes é essencial para a compreensão das propriedades e funções dos canais de cálcio. Tais agentes são especialmente úteis na concepção de protótipos de drogas e na pesquisa de drogas.

Por exemplo, um agente bloqueador específico para o canal-P, permite a investigação de condutâncias de outros canais (os quais coexistem com o canal-P em várias experiências in vitro ou in vivo), sem interferência da condutância com cálcio do canal P. Para além disto, tal agente bloqueador pode servir como um protótipo da droga, que pode ser usada, p.e., para regular o transporte de cálcio através da membrana celular. Por sua vez, tal droga pode ter potenciais aplicações na prevenção da morte da célula causada por isquemia ou ou-



tros mecanismos de anoxia das vias cerebais, ou ainda por outros factores que provocam ruptura da regulação do transporte do cálcio, tais como o envelhecimento. Tais drogas teriam também uma aplicação potencial no tratamento de alterações de memória e de aprendizagem.

Os agentes bloqueadores dos canais de cálcio da arte anterior, não satisfaziam esta necessidade, por uma ou mais das seguintes razões:

- a) Falta de afinidade com os canais de cálcio particulares. O canal-P é, em particular, resistente à toxina natural, omega-conotoxina, à di-hidropiridina e seus derivados, e a álcoois.
- b) Falta de especificidade. Quando do desenvolvimento de substância que bloqueiam um determinado canal, a especificidade é uma característica essencial a ter em conta.
- c) Não possibilidade de utilização de grandes quantidades a baixos custos. Seria desejável identificar a estrutura química dos agentes bloqueadores do canal P, derivados do veneno de aranhas de teia em funil, bem como a estrutura de derivados activos e seus análogos, bem como outros bloqueadores específicos do canal P, os quais podem ser sintetizados convenientemente e a baixos custos.
- d) Falta de conhecimento do modo de acção do agente bloqueador. A possibilidade de utilização de agentes bloqueadores específicos do canal P, tornaria possível a identificação do sítio da actividade bloqueadora e a concepção de substitutos melhorados ou mesmo de compostos que tenham a propriedade oposta: abrir os canais de cálcio.

Os agentes activadores de canais de cálcio (i.e. agentes que aumentam o influxo de cálcio através destes canais) são mais escassos que os bloqueadores de canais de cálcio.

Um activador específico do canal L, conhecido está disponível comercialmente sob o nome comercial Bay-K8644. Contudo, não há na arte anterior, activadores para os canais -P, -T, ou -N. Há, portanto, uma necessidade ainda mais aguda de activadores de canais de cálcio específicos, de alta potência e/ou disponíveis a baixo custo, do que de agentes bloqueadores de cálcio.



Os activadores específicos dos canais de cálcio podem também ser úteis como reagentes para a investigação mas, ao contrário dos bloqueadores, os activadores podem ser usados para testar propriedades diferentes do canal tais como, por exemplo, os limites da capacidade dos canais-P em permitirem o influxo de cálcio para dentro da célula. Os activadores podem, também, ser usados no estudo da libertação de transmissores sinápticos e noutros aspectos mais pormenorizados da transmissão, p.e. a amplificação da força accionadora, nomeadamente a corrente de cálcio para dentro da pré-sinapse.

Os activadores dos canais de Ca^{2+} do presente invento também têm usos potenciais como protótipos de drogas que exibem propriedades anti-convulsivas (p.e. anti-epilépticas), ansiolíticos tranquilizantes, anti-síndrome de Alzheimer e/ou de melhoramento da memória. Mais geralmente, os activadores são, potencialmente, úteis como protótipos de drogas para alterações patológicas e comportamentais, atribuídas à incapacidade das células (especialmente neurónios) em permitirem o influxo do Ca^{2+} .

Existem necessidades análogas de substâncias que alterem as propriedades de transporte de iões de outros canais iónicos, tais como canais de sódio e potássio. Tais substâncias podem também ter usos terapêuticos, tais como:

A alteração da função dos canais de Na^+ podem ser de utilidade terapêutica para o tratamento de espasmos musculares, torcicolos, tremores, alterações de aprendizagem e do síndrome de Alzheimer. As poliaminas que bloqueiam os canais de sódio lentos podem ter uma utilidade adicional, como anestésicos locais. Agentes que actuam nos canais de Na^+ do epitélio, podiam ser auxiliares úteis no tratamento de fibrose quística e asma, e como agentes hipertensivos.

As drogas que modulam a actividade de canais de K^+ podem ser úteis como agentes de protecção contra os efeitos prejudiciais da isquemia e da hipertensão, protegendo os glóbulos vermelhos do sangue contra os danos da malária e da doença das células falciformes.

Usando-se, separadamente, activadores e bloqueadores do cálcio (bem como outros tipos de moduladores de cálcio), espera-se obter informações de como se organiza o acontecimento da morte celular.

Por exemplo, a influência da presença de um activador de cálcio, no meio extracelular, no início e na velocidade de progressão da "inundação" do cálcio do citossol pode ser medida obtendo-se informações sobre se um aumento da capacidade do transporte de cálcio através da membrana celular influencia o início e a velocidade de libertação do cálcio intracelular e, mais importante, se esta última manifestação de morte da célula pode ser invertida.

Chideckel, E.W. et al., Br. J. Pharmacol., 1986, 89:27-33, referem que uma breve exposição do músculo liso o tracto respiratório das cobaias (músculo da traqueia) a "poliamina", causa a relaxação desta, em resposta à exposição subsequente a iões de potássio extracelulares. Isto é contrário à resposta contráctil normal que estes músculos exibem na ausência de poliaminas (ou de outras drogas bloqueadoras da entrada de iões de cálcio, tais como nifedipina, verapamil, diltiazem ou soluções sem iões cálcio).

Os autores supõem que, inter alia, a espermidina pode ter uma função antagonista do Ca^{++} e que a espermidina e certas outras poliamidas podem ter uma actividade bloqueadora dos canais de cálcio, "talvez" semelhante às das conhecidas drogas bloqueadoras da entrada de Ca^{2+} , referidas acima.

A espermidina foi a única poliamina utilizada nas experiências descritas neste artigo, embora os efeitos de outras poliaminas, relacionadas com o fluxo membranar do Ca^{2+} e com o tratamento do Ca^{2+} celular, sejam citados noutras fontes literárias como se segue:

- * putrescina, causa um aumento na concentração do Ca^{2+} no citossol em fatias do coração e do rim, atribuído tanto a um aumento do influxo do Ca^{2+} extracelular como a uma libertação simultânea do Ca^{2+} mitocôndria.

- * espermina, inibe a contracção espontânea do músculo do útero, duma maneira que pode ser compensada por um aumento da concentração extracelular de Ca^{2+} .

- * espermina e espermidina, têm um efeito relaxante no músculo liso do intestino, do útero, do tracto respiratório e da vascu-



latura.

Os autores não mencionam o tipo de canais de cálcio que dizem estar presentes no músculo da traqueia (ou em qualquer outro tecido mencionado). No que respeita ao músculo da traqueia, a sensibilidade à di-hidropiridina indica que podem estar implicados os canais do tipo L. Quanto a outros tecidos mencionados, nenhuma reivindicação é feita neste artigo, de que canais de cálcio estejam envolvidos (muitos outros factores ou processos podem influenciar a concentração de cálcio no citossol). De facto, alguns dos resultados referidos neste artigo são inconsistentes com o bloqueamento dos canais de cálcio, e (baseado na divulgação deste artigo) não podem ser atribuídos à activação dos canais de cálcio, porque muitos outros factores podem estar envolvidos, incluindo acções sobre os canais de potássio ou directamente sobre o músculo liso (efeitos semelhantes aos da papaverina).

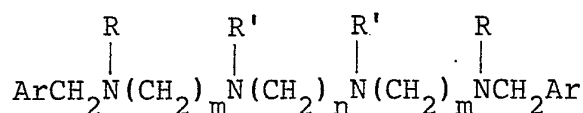
Hirsh, S.R., et al., Psychopharmacology, 1987, 83:101-104 referem que as duas poliamidas, espermina e espermidina, administradas intraperitonealmente, em doses de 5-40 mg/kg, em ratos causam uma inibição dependente da dose, no comportamento espontâneo de subir e correr na roda, que os autores atribuem, na sequência de experiências sucessivas, à modulação da função da dopamina no sistema límbico, por estas poliamidas.

Quando injectadas intracerebralmente (no corpo estriado), estes compostos falham na indução do comportamento assimétrico. Por outro lado, estes compostos antagonizam a hiperactividade (quando injectadas no nucleus accumbens), o que foi considerado consistente com a modulação da função da dopamina, mas não com o bloqueamento do receptor da dopamina. Nenhum efeito sobre a condutância iónica (ou especificamente ao cálcio) é revelado ou sugerido.

Palade, P., 1987, J. Biol. Chem. 262:6149-6154 refere que a libertação do Ca^{2+} (pré-armazenado em subfracções isoladas do retículo sarcoplasmático), usualmente observada a quando da adição de várias substâncias indutoras da libertação (incluindo a cafeína e o timol), pode ser bloqueada por vermelho de ruténio, por certas poliaminas orgânicas (espermina, espermidina e trietilenotetramina), por certos antibióticos (neomicina, canamicina, tobramicina,

gentamicina, estreptomicina, e clindamicina) e por certos polipéptidos (polilisina, poliarginina, algumas histonas, e protamina). Os autores observaram que estes agentes têm uma única característica em comum: a presença de vários grupos amino. Baseando-se na incapacidade das poliaminas afectarem a função da bomba de cálcio, os autores concluíram que o efeito do vermelho de rutênio, da espermina, da neomicina e da polilisina (as quais têm estruturas consideravelmente diferentes) não era devido à interferência com a bomba de Ca^{2+} mas com o bloqueamento dos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático. Muitos destes agentes parecem bloquear a libertação do cálcio em concentrações de nanomolar (estimado). Os autores, salientam ainda que a potência inibidora da libertação do cálcio, parece estar relacionada com o número de grupos amino presentes no composto, baseados no facto de que os antibióticos parecem ser mais potentes numa base de concentração molar. O artigo não divulga, determinação da especificidade destes agentes para os canais de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS), (comparado com outros componentes do transporte iónico e/ou receptores do RS), embora se afirme que as pequenas concentrações, à quais estes agentes são activos podem "sugerir uma potencial utilidade como sonda dos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático". Contudo, os autores admitem que nem o vermelho de rutênio nem a espermina são específicos. Além disso, como as experiências referidas neste artigo mediram unicamente o bloqueamento da libertação do cálcio, elas não estabelecem, positivamente, o envolvimento dos canais de cálcio. Os resultados referidos estão limitados aos canais de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático, o qual tem uma grande condutância (talvez numa ordem de magnitude maior do que a dos outros canais de cálcio conhecidos) e, como afirmado pelos autores, podem estar além disso, limitados a um só tipo de canal de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático. Os autores dizem explicitamente que estes compostos parecem ser activos nos canais de cálcio do RS e não são sensíveis ao trifosfato de inositol.

Melchiorre, C., et al., referem numa série de artigos, que certas polimetilenotetraminas de fórmula:





na qual Ar é um grupo aromático; R, R' são hidrogênio ou metilo e m, n são várias combinações de números inteiros, na gama de 5-14, têm actividades bloqueadoras dos receptores muscarínicos M-2 nas aurículas do coração e no ileum intestinal das cobaias. Pensa-se que alguns destes compostos bloqueiam selectivamente o receptor muscarínico auricular com uma afinidade consideravelmente maior do que a do receptor do ileum, e portanto podem possivelmente servir para distinguir entre os 2 receptores. Nada é dito sobre os canais de cálcio, mas um esquema geral sintético, para as partes não-aromáticas das poliamidas referidas, é apresentado: J. Med. Chem., 1989, 32:79-84; J. Med. Chem., 1985, 28:1643-1647; e Can. J. Physiol. Pharmacol., 1980, 58:1477-1483.

Objectivos do Invento:

O presente invento tem os seguintes objectivos:

- Preparar novos agentes e processos para a regulação de (por exemplo, bloqueando, modulando ou activando) canais iónicos (incluindo canais de cálcio, sódio e potássio), particularmente de canais de cálcio e ainda mais particularmente, de canais de cálcio do tipo-P;
- Preparar novos agentes e processos para regular a libertação do transmissor ou a transmissão sináptica;
- Preparar agentes e processos adicionais para bloquear um ou mais dos canais anteriores, que ultrapassem uma ou mais das vantagens associadas com os agentes bloqueadores conhecidos, descritos acima;
- Usar cada um destes agentes reguladores e métodos para conceber protótipos de drogas que bloqueiam, modulam ou activam canais de cálcio, de sódio e/ou de potássio (com particular ênfase nas drogas que bloqueiam ou activam os canais dos neurónios centrais); e melhorar a compreensão da estrutura, das propriedades e da função dos canais iónicos;
- Conceber substitutos mais activos, menos dispendiosos e/ou melhorados sob outros aspectos, para aqueles agentes e/ou drogas;
- Conceber agentes que tenham funções de modulação, para os

canais de cálcio, de sódio e/ou de potássio, para além da activação ou bloqueamento. Por exemplo, os agentes que actuam sobre a proteína G, em membranas celulares, alteram a actividade dos canais iónicos indirectamente. Outros objectivos deste invento serão evidentes para os peritos na arte face à especificação, reivindicações e desenhos presentes.

Breve descrição dos desenhos

A figura 1A é um traçado da actividade de disparo espontâneo observada em células de Purkinje das cobaias, de acordo com a aplicação de um impulso de corrente de onda quadrada, directo (0,3 nA, 62 mseg) na ausência de quaisquer agentes bloqueadores (controlo).

A figura 1B é um traçado de resposta da célula de Purkinje a um impulso de corrente de onda quadrada, directo de 0,45 nA depois da adição da espermidina: a condutância ao cálcio é bloqueada.

A figura 1C (traço superior) é um traçado da resposta da célula de Purkinje a um impulso de corrente de onda quadrada directo de 0,45 nA depois de: (i) canal-P ter sido bloqueado com espermidina, (ii) a condutância ao potássio ter sido bloqueada com TEA, (iii) a condutância ao sódio ter sido bloqueada com TTX. O restante pico é devido a um canal de cálcio do tipo sensível à di-hidropiridina. Isto é demonstrado na figura 1C (traço inferior) onde o canal-L também é bloqueado pela di-hidropiridina ou, figura 1D (traço inferior) onde o canal-L é bloqueado pela estreptomicina. (O traço superior na Fig. 1D é do mesmo tipo do da figura 1C).

A figura 2 é um gráfico da corrente de cálcio pré-sináptica na sinapse da lula, observada depois da adição de várias quantidades do veneno de A. aperta, numa experiência com voltagem fixa demonstrando-se que este efeito é dependente da dose.

A figura 3 é um gráfico mostrando a fracção do potencial pós-sináptico excitatório (EPSP) restante (com o controlo tomado em 1), depois da adição de várias quantidades do factor bloqueador do canal-P purificado parcialmente, do veneno A. aperta, na sinapse da lula. Os resultados demonstram que o efeito do factor no EPSP depende da dose.

A figura 4 mostra o potencial de acção pós-sináptico na sinapse da lula, de acordo com a estimulação directa do terminal pré-sináptico. O traçado A foi registado antes da adição do composto E ao banho (0,15 ml da preparação do exemplo 2); o traçado B foi registado 4 minutos depois da adição do composto E; e o traçado C foi registado 6 minutos depois da adição do composto E.

Na figura 5, o traço superior é a resposta do potencial pós-sináptico (EPSP), na sinapse da lula, numa experiência com voltagem fixa, (A), antes, e (B), depois da aplicação de espermidina ao banho (o qual já contém TTX e 3-aminopiridina). O traço do meio representa a corrente de cálcio pré-sináptica antes, (A), e depois, (B), da aplicação de espermidina no banho. O traço inferior representa o degrau de uma voltagem aplicada (28 mV, 5,5 mseg).

A figura 6 representa de novo o traçado do potencial pós-sináptico, na sinapse da lula, depois da aplicação de um degrau de voltagem de 38,2 mV/10 mseg numa experiência de voltagem fixa, na presença de TTX e 3-aminopiridina. Foram feitos registos aos 2, 6, 10 e 13 minutos depois da adição de espermidina.

As figuras 7A e B representam o traçado do potencial pós e pré-sináptico na sinapse da lula, na ausência (traço superior) ou presença (traço inferior) do bloqueador de cálcio.

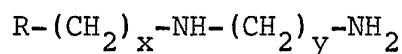
A figura 8 representa a sobreposição de traços dos canais de cálcio influentes (traços I-1 até I-4) da célula pré-sináptica, aos quais foi aplicada uma voltagem de 35 mV/1 mseg (traçado V) e do correspondente EPSP (traços P-1 até P-4) na presença do TTX, TEA e um agente activador do canal de cálcio, um composto produzido por reacção de um etiléster de lisina e espermidina.

Sumário do invento

Um aspecto deste invento é o desenvolvimento de um processo para a regulação do transporte de catiões através das membranas celulares que possuem canais de catiões, correspondendo a exposição duma membrana celular, possuidora de um canal de um ião de tipo específico, a um composto de poliamina não aromático, que tor



na o canal especificamente funcional, tendo a fórmula



na qual y é um número inteiro de 1 a 15; x é um número inteiro de 0 a 15; R é um grupo orgânico não aromático contendo, pelo menos, um grupo amino, imino, amido, imido e/ou pode estar ligado ao resto do composto por um grupo $-CX_2-O-NH-$ (no qual, X é hidrogênio ou um dos X é NH_2), com a condição de que a distribuição de, pelo menos, um dos grupos metileno ou átomos de azoto, em torno da molécula da referida poliamina, seja assimétrica, e de que o composto contenha, pelo menos, três átomos de azoto; estando a referida poliamida presente em quantidades eficazes para bloquear, activar ou de outro modo modular a condutância atribuída a este canal.

Para além disto, o presente invento é dirigido aos próprios compostos com a fórmula antecedentemente apresentada.

Outros aspectos deste invento estão relacionados com processos para bloquear (ou activar, consoante o caso) canais de cálcio e com processos para bloquear (ou aumentar) a libertação do transmissor sináptico, usando um ou mais dos compostos referidos acima, e/ou uma poliamina bloqueadora do canal de Ca^{2+} , isolada do veneno de aranhas de teia em funil.

Outro aspecto deste invento envolve processos para regular os canais iónicos, comutados quer por voltagem, quer por ligando tal como o canal activado por glutamato, seleccionando um composto de acordo com o presente invento, que seja bloqueador, activador ou modulador específico do cálcio, sódio ou potássio, e expondo a célula à presença deste composto para proporcionar o resultado de regulação específica desejada, no canal alvo.

Descrição detalhada das concretizações preferidas

A divulgação de alguns ou todos os documentos citados, incluindo literatura e pedidos de patente são incorporados com referência, na sua totalidade.

O pedido de patente EUA nº 219,105 copendente da requerente apresentado em 14 Julho de 1988 divulga factores activos resis-

tes à ebulição, isolados do veneno das aranhas de teia em funil, por técnicas cromatográficas, e tendo um peso molecular aparente de 200-400 daltons por cromatografia de exclusão por tamanhos utilizando Sephadex G-15 (Pharmacia), têm a propriedade de bloquear os canais de cálcio do tipo P anteriormente mencionadas com especificidade e afinidade elevadas. Estes factores são, além disso, caracterizados pelas seguintes propriedades:

- (a) inactivação na presença de um ácido;
- (b) resistência à redução pelo ditiotritol;
- (c) capacidade de ser acoplado ao gel de Sepharose 4B, acoplado ao éter, (Pharmacia, Piscataway, N.J.)

De acordo com este invento, a análise estrutural do agente bloqueador do canal de cálcio, mais especificamente uma preparação desse agente isolado do veneno da aranha A. aperta por desproteínição, (fervura) seguida pela remoção do precipitado por centrifugação e submetendo o sobrenadante a FPLC (cromatografia líquida de alta pressão - Pharmacia) sob condições de NaCl 0-1,0 M, pH 7,5 e um caudal de 1 ml/minuto usando-se uma coluna de troca iônica, por exemplo, Mono-S (5 x 50 mm) da Pharmacia LKB Biotechnology, Inc., Piscataway, N.J., com a fracção activa (resultante de 0,5 ml de veneno) eluído com NaCl 0,8 M, deu os seguintes resultados:

(a) À espectroscopia de UV (usando um espectrofotômetro de UV Milton-Roy Spectronic, Model 1001), o factor purificado de A. aperta não exibiu absorção óptica a 260-280 nm, nem fluorescência, indicando desse modo que os anéis aromáticos estão ausentes. O comprimento de onda de absorção está fortemente deslocado, quando a amostra é acidificada, mantendo-se relativamente insensível a pH elevado. Este comportamento é consistente com a presença de grupos amino.

(b) À FT-IR (espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier) as amostras foram analisadas como "mulls" de Nujol e pastilhas de KBr. Os espectros obtidos eram relativamente simples e punham em evidência grupos amina e também grupos metileno.

(c) Na análise elementar, a amostra mostrou que as proporções relativas de C:N:H eram aproximadamente 29:14:14.

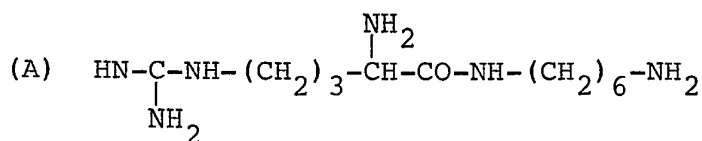
A conclusão obtida deste trabalho foi que o bloqueador do ca-

nal-P de A. aperta (daqui em diante, algumas vezes referido como "FTX") compreende uma estrutura de poliamina não aromática.

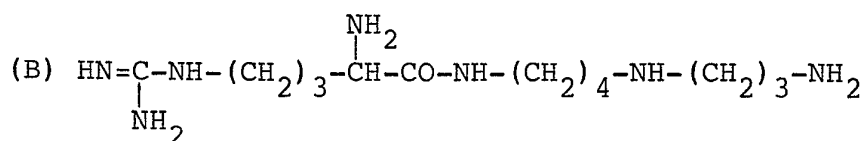
De acordo com o presente invento, poliaminas não aromáticas de cadeia linear ou ramificada têm a capacidade de bloquear ou aumentar os canais de cálcio tipo-P (isto é, canais que mostram uma ou mais das características associadas com os canais-P, primeiramente identificadas nas células de Purkinje e descritas acima).

Aqui, "poliamina" refere-se a um composto que tem, pelo menos, três grupos -NH_2 e/ou -NH- . As poliaminas não aromáticas são preferidas, tendo uma distribuição de grupos metileno e/ou de átomos de azoto assimétrica e ainda mais preferidas são as poliaminas não aromáticas tendo uma porção comportando dois ou mais grupos amina num único átomo de carbono ou em átomos de carbono vizinhos. Por distribuição assimétrica de um grupo metileno e/ou átomos de azoto, entende-se que, as duas porções do composto não são as mesmas: por exemplo, a espermina (a qual não está no âmbito deste invento) tem uma distribuição simétrica, na qual os átomos de azoto estão separados por 4 grupos metileno de cada lado. Por outro lado, o composto P, abaixo, tem uma distribuição assimétrica de átomos de azoto, na qual há um grande número de átomos de N (por número de átomos de carbono) na porção esquerda; o composto H tem uma distribuição assimétrica dos grupos metileno.

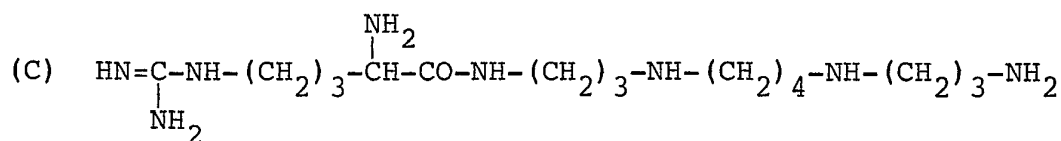
São poliaminas típicas úteis como agentes reguladores dos canais iônicos os seguintes compostos:



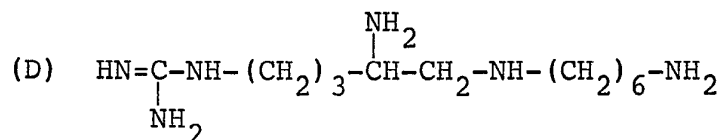
(bloqueador do canal de potássio fraco - sem actividade sobre o canal P)



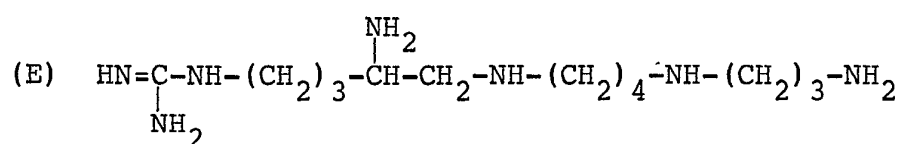
(bloqueador do canal P i.e., actividade para o cálcio semelhante ao factor do veneno da aranha purificado)



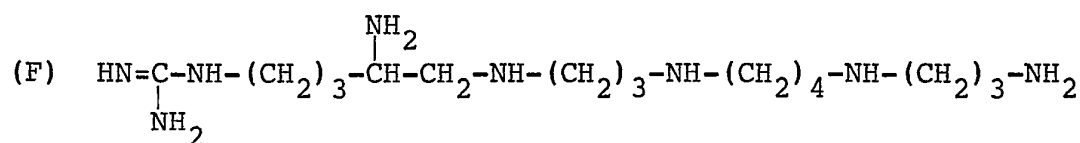
(bloqueador do canal de cálcio - inactivo sobre o canal P)



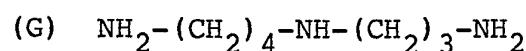
(actividade potencial sobre o canal de potássio)



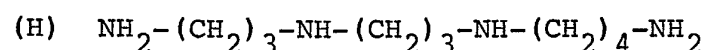
(bloqueador do canal-P)



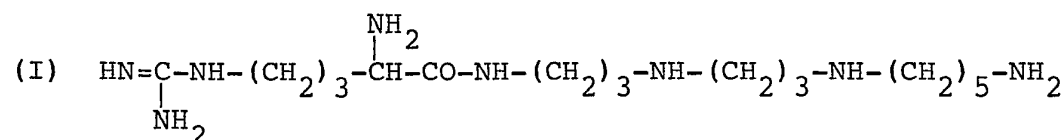
(bloqueador potencial do canal Ca, inactivo em canais-P)



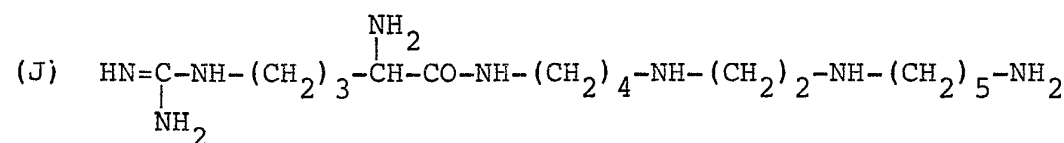
(bloqueador fraco do canal P)



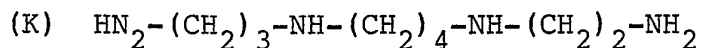
(não activo sobre o canal P)



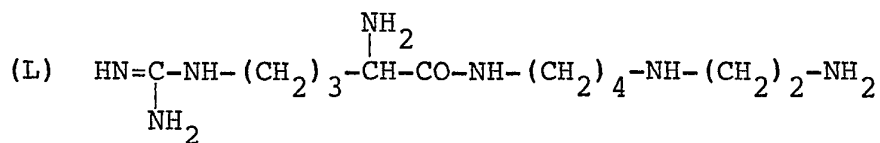
(bloqueador de cálcio potencial)



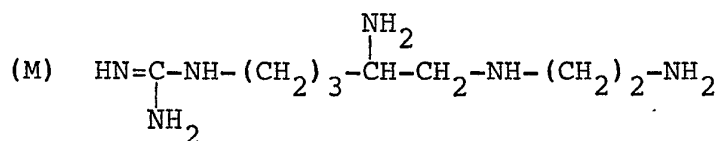
(bloqueador de cálcio potencial)



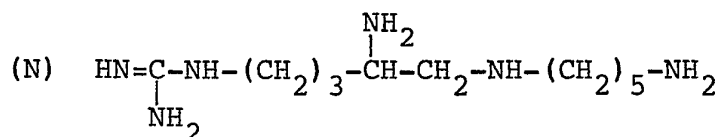
(bloqueador de cálcio potencial)



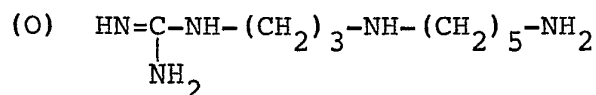
(bloqueador do canal P potencial)



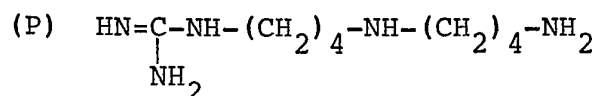
(potencialmente activo para o potássio)



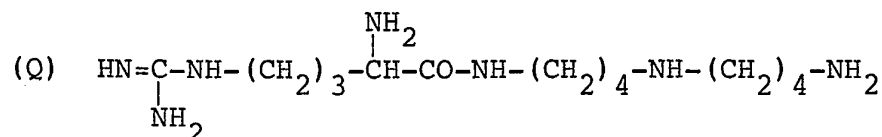
(potencialmente activo para o potássio)



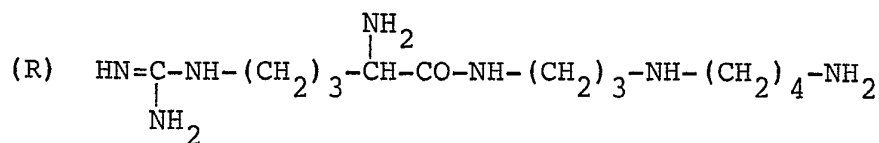
(bloqueador do sódio potencial)



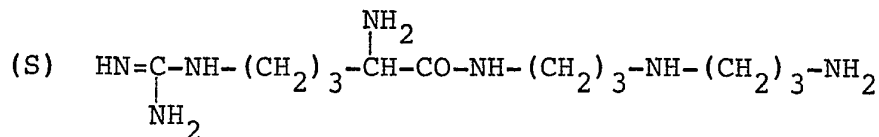
(bloqueador do sódio potencial)



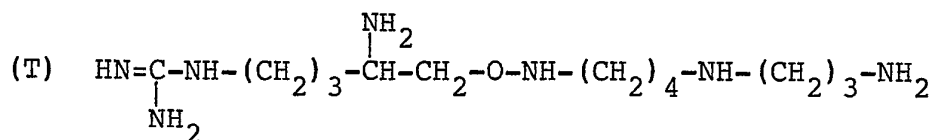
(bloqueador do canal P, i.e., actividade sobre o cálcio semelhante ao FTX, factor do veneno de aranha, purificado)



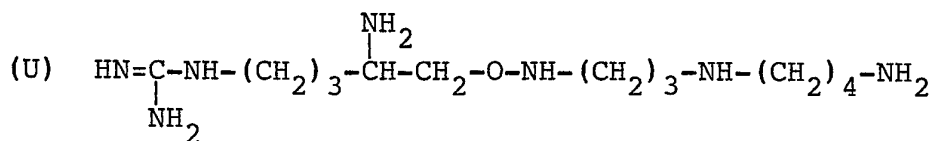
(bloqueador do canal P, i.e., actividade sobre o cálcio semelhante ao FTX, factor do veneno de aranha purificado)



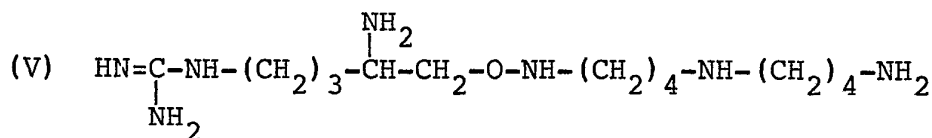
(bloqueador do canal P, i.e., actividade sobre o cálcio semelhante ao FTX, factor do veneno de aranha purificado)



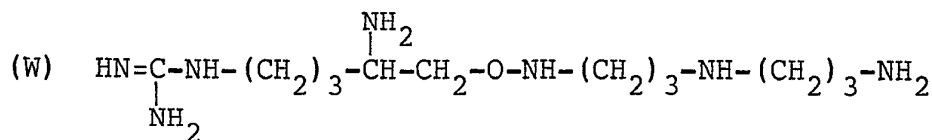
(bloqueador do canal P - semelhante ao FTX)



(bloqueador do canal P - semelhante ao FTX)



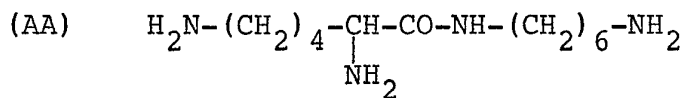
(bloqueador do canal P - semelhante ao FTX)



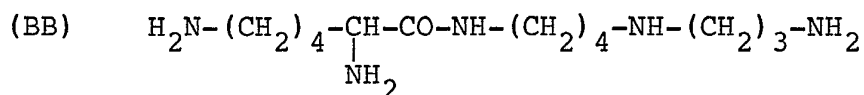
(bloqueador do canal P - semelhante ao FTX)

Exemplos de compostos que têm actividade bloqueadora e/ou activadora dos canais iónicos, incluindo derivados ou análogos dos compostos A-W tendo, p.e., uma porção lisina des-hidroxilada ou des-carboxilada. Para além disto, muitos dos compostos acima e dos seus análogos são activos sobre os canais de sódio ou potássio.

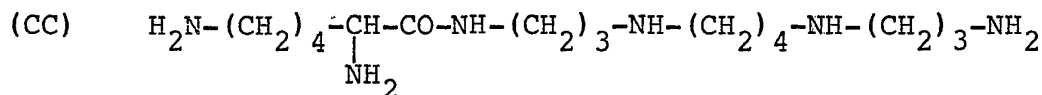
Os seguintes compostos são ilustrativos de poliaminas úteis como agentes reguladores de canais.



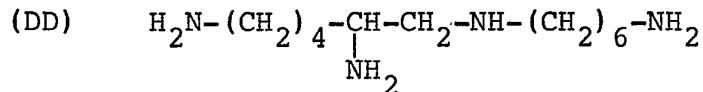
(bloqueador fraco de potássio)



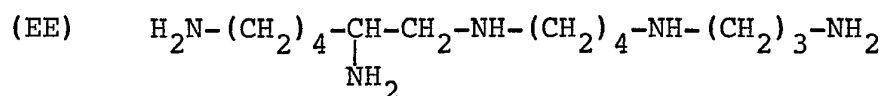
(ativador do canal P)



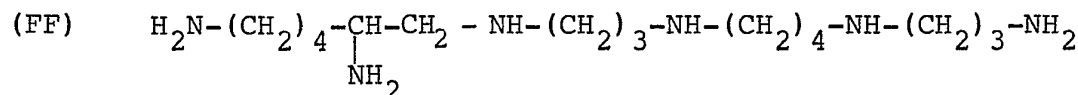
(não bloqueia canais P, ativador do canal P potencial)



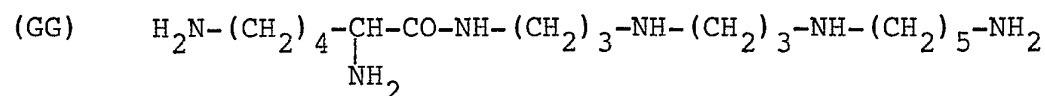
(potencialmente activo para o potássio)



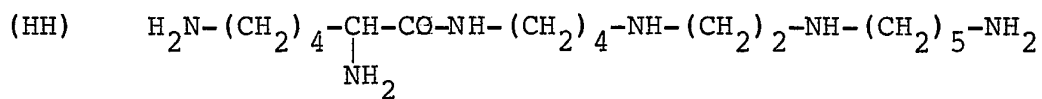
(ativador do cálcio potencial)



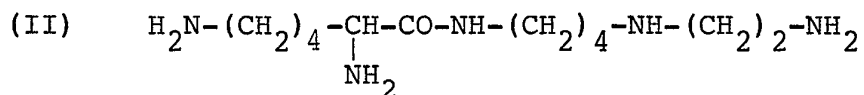
(ativador do cálcio potencial)



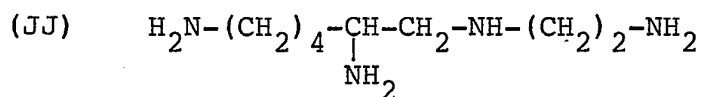
(ativador do cálcio potencial)



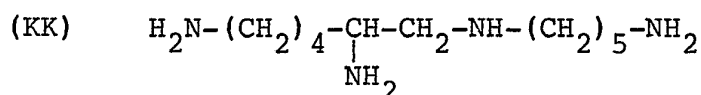
(ativador do cálcio potencial)



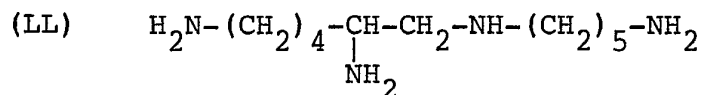
(ativador potencial do cálcio)



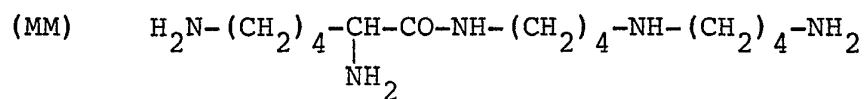
(potencialmente activo para o potássio)



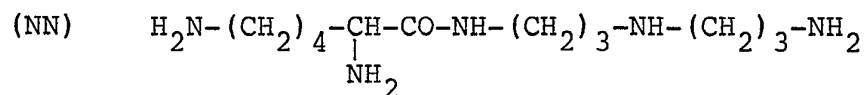
(potencialmente activo para o potássio)



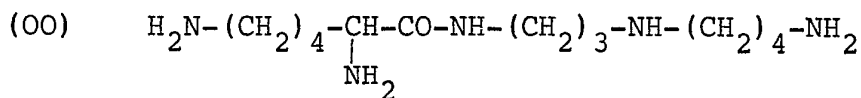
(potencialmente activo para o potássio)



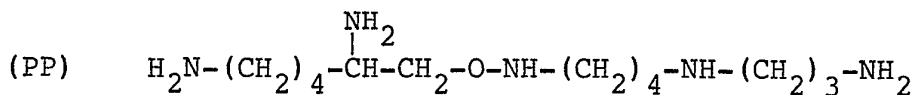
(ativador do canal P)



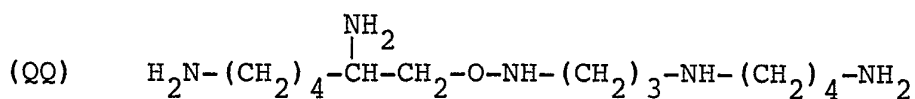
(ativador do canal P)



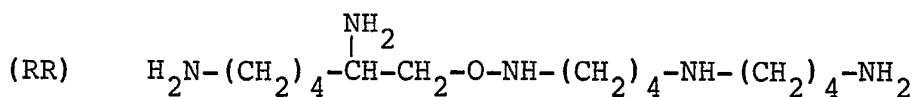
(ativador do canal P)



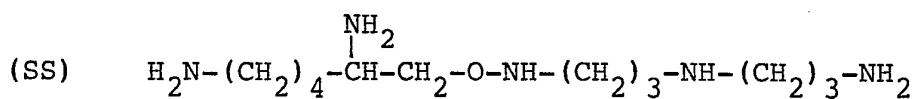
(ativador do canal P)



(ativador do canal P)

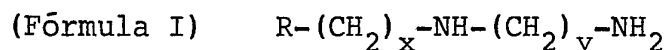


(ativador do canal P)



(ativador do canal P)

Em geral, as poliaminas utilizadas como ativadoras, moduladoras ou bloqueadoras dos canais iônicos, úteis no presente invento, julg-se que sejam representadas pela seguinte fórmula



na qual y é um número inteiro de 1 a 15, preferencialmente de 1 a 6; x é um número inteiro de 0 a 15, preferencialmente 0 a 6; e R é um grupo orgânico não aromático que contém, pelo menos, uma amina (incluindo, mas não limitado, a amina, imino, amido ou imido, amino alquilo, amido alquilo, imidoalquilo, etc; R pode ser também uma combinação de dois ou mais grupos mencionados anteriormente) ou, pode ser acrescentado ao restante da fórmula por via do grupo $-CX_2-O-NH-$, no qual X é hidrogênio ou um dos X é NH_2 , com a condição de que (i) a molécula de poliamina do presente invento não seja simétrica na sua distribuição dos grupos metileno e dos grupos que contêm átomos de azoto, e (ii) que o composto contenha, pelo

menos, três átomos de azoto.

Preferencialmente, as poliaminas do presente invento têm um peso molecular inferior a 800, mais preferencialmente entre 200 e 400.

Tendo em atenção que as seguintes afirmações constituem uma generalização, as quais, naturalmente, terão algumas excepções, pode ser dito que os compostos com a fórmula acima, na qual X é 0 e R não está ligado ao grupo NH da esquerda por via dum metileno ou de uma cadeia de metilenos (i.e., R não contribui para a forma de uma configuração do tipo: -N-C...-N-C-...N-), serão bloqueadores do canal de potássio, que preferencialmente tenham y maior que 6 e ainda mais preferencialmente, simultâneamente, R tem que ser uma porção arginina (por oposição à lisina). Assim, por exemplo, tanto Arg-NH-(CH₂)₁₀-NH₂ como Arg-NH-(CH₂)₁₂-NH₂ são bloqueadores do canal de potássio. Os compostos correspondentes, com uma porção lisina à esquerda, mostram também a mesma actividade bloqueadora do potássio, mas são menos activos.

Os compostos em que o R está ligado à cadeia de poliaminas por via de um grupo alfa-aminometileno (com ou sem interveniência de grupos -CO-, ou -O- ou CH₂) e nos quais tanto o x como o y têm de ser números inteiros positivos, dentro da definição acima, têm actividade sobre os canais de cálcio. Nos canais P, esta actividade será uma actividade bloqueadora, se a porção esquerda tiver como base a arginina, e uma actividade activadora do cálcio se a porção esquerda tiver como base a lisina. Por exemplo, o composto B é um bloqueador de cálcio (canal P); e o composto BB, por outro lado, é um activador de cálcio (canal P).

Os compostos que não têm um grupo alfa-aminometileno e têm uma porção poliamina de cadeia linear com a configuração -NH-(CH₂)_x-NH-(CH₂)_y-NH₂, na qual tanto x como y são maiores que 0, terão actividade bloqueadora de sódio; a especificidade desta, para os canais de sódio parece ser "inversamente proporcional" ao número de grupos metileno na porção R. Assim, H₂N-C(NH)-NH-(CH₂)₄-CO-NH-(CH₂)_x-NH-(CH₂)_y-NH₂ onde x e y são, por exemplo, 3,4; 3,3; 4,3; ou 4,4, não bloqueiam o cálcio nos canais P mas, em vez disso, são bloqueadores fracos do canal de sódio. Quando o número de grupos



metileno de cadeia linear diminui de 4 para 3, a actividade bloqueadora do sódio aumenta, até, finalmente, quando há somente 2 ou menos grupos metileno, a especificidade diminui e tanto o sódio como o cálcio são bloqueados simultâneamente:

Os compostos de poliaminas usados no presente invento, podem ser sintetizados utilizando reagentes bem conhecidos e disponíveis comercialmente e esquemas de síntese bem conhecidos na arte. Alternativamente, os compostos de poliaminas, dentro do âmbito do presente invento, podem ser obtidos de fontes comerciais.

Por exemplo, arginina descarboxilada (agmatina), ou etiléster de arginina, lisina descarboxilada ou metil etiléster da lisina podem ser fornecidas pela Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Outras poliaminas bem conhecidas, tais como, espermina, espermidina, 1,6-diamino-hexano, putrescina, cadaverina podem também ser obtidas da Sigma ou de outras fontes comerciais. Aqueles que não são, eles próprios, activos (p.e. espermina) podem ser usados para sintetizar compostos activos como se segue:

Um protocolo envolve a utilização de um éster de amina em solução aquosa e a reacção deste, sob condições básicas, com uma quantidade apropriada (usualmente equimolar) de diamina ou de outra poliamina, também em solução aquosa (ou na forma líquida).

Ver, na generalidade, March, J., Advanced Organic Chemistry, 3d. Ed., 1985, Wiley & Son, New York.

Outros esquemas de síntese para compostos, dentro do âmbito do presente invento são divulgados em Eldefrawi, A.T., et al., PNAS, 1988, 85:4910-4913; Hashimoto, Y., et al., Tetrahedron Letters, 1987, 28:3511-3514; e Yamamoto, H., et al., J. Am. Chem. Soc., 1981, 103:6133-6135, todos eles podendo ser empregues somente com algumas modificações, se necessário, que são facilmente notadas por aqueles que têm prática habitual na arte.

Outro esquema de síntese, útil, que pode ser aplicado aos presentes compostos, é o que é divulgado em Melchiorre, et al., 1989, supra que envolve o uso de um ácido dicarboxílico, para aumentar o comprimento da poliamina (na presença de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCOCl}$, trietilamina e dioxano com adição de HCl e de etanol, seguida por redução na

presença de hidreto de boro, sulfureto de dimetilo e diglima.

Um dos esquemas de síntese preferidos para os compostos no âmbito deste invento, que contêm uma porção arginina descarboxilada (por exemplo $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ ou $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$) envolve a redução do amino éster protegido, adequado, p.e., $\text{Z}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}-\text{Z})-\text{CO}-\text{OEt}$, (no qual Z é um grupo protector adequado tal como $\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$, onde Ph é um grupo fenilo) na presença de THF (a -78°C) e hidreto de di-isobutilalumínio no correspondente aldeído, a aminação deste produto na presença de cianoboro-hidreto de sódio para produzir a poliamina desejada, a qual pode, então, ser desprotegida e purificada de acordo com métodos bem conhecidos.

Alternativamente, o aminoácido protegido (p.e. o ácido livre correspondente ao éster de etilo referido acima) pode ser primeiramente convertido no correspondente anidrido misto, por reacção com, p.e., $\text{Et}-\text{O}-\text{CO}-\text{Cl}$ (cloreto de etoxicarbonilo) e TEA (trielilamina) e THF (tetra-hidrofurano) a -20°C . O anidrido pode então reagir com um álcool, p.e., metanol, a -10°C na presença de boro-hidreto de sódio para converter o anidrido misto no álcool correspondente. O álcool pode então ser convertido no correspondente halogeneto de acordo com as técnicas de halogenação bem conhecidas. O halogeneto pode ser condensado com a amina adequada (na presença de um depurador de ácido tal como K_2CO_3 e dimetilformamida) para dar o composto alvo protegido, o qual pode ser desprotegido por, p.e., hidrogenólise (H_2 paládio/carbono 10%) ou, quando o grupo protector é Boc, com ácido trifluoracético dando o composto alvo real.

Os compostos, no âmbito do invento, nos quais R está ligado ao grupo NH da cadeia $-\text{N}-\text{C}.. \text{N}$ por via de uma ligação $-\text{O}-$ podem também ser sintetizados através de técnicas bem conhecidas. Por exemplo, o aminoácido adequado (p.e., arginina) pode reagir, preferencialmente, no refluxo, com a poliamina de cadeia linear adequada, p.e., espermina ou $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ ou $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$, na presença de um ácido (p.e., ácido acético) e de um peróxido (tal como peróxido de hidrogénio) para dar o composto desejado, de acordo com o invento (no presente exemplo, este composto pode ser descrito pela fórmula $\text{T}-\text{CX}_2-\text{O}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_x-\text{NH}-(\text{CH}_2)_y-\text{NH}_2$, onde $\text{T}-\text{CX}_2-\text{O}$



seria uma porção arginina modificada com X sendo H, ou um dos dois X sendo NH_2).

Os compostos do presente invento, quando utilizados como reagentes de laboratório, podem ser usados numa larga gama de unidades, desde o nanomolar até nenhum limite superior, em particular. Será apreciado, que as quantidades necessárias, a serem usadas em cada caso, dependerão da actividade de um composto particular (se o composto for um bloqueador, activador ou modulador potente), da sensibilidade do canal específico, no qual este composto é activo (se as propriedades do canal são facilmente modificadas), da especificidade da actividade de um composto particular (se o composto actuar exclusivamente num tipo de canal) e de outros factores, os quais são bem reconhecidos na arte como tendo de ser submetidos a optimização. Tal optimização pode ser facilmente atingida, sem experimentação indevida, por métodos bem conhecidos.

Quando os compostos do presente invento, incluindo sais aceitáveis farmacêuticamente, são usados para fins farmacêuticos (por exemplo, para provocar as modificações de comportamento ou para tratar as alterações comportamentais, referidas acima na secção Antecedentes), podem ser incorporados em composições farmacêuticas nas formas de dosagem orais, entéricas, tópicas, depósito ou parentéricas, contendo um ou mais dos presentes compostos em associação com um ou mais excipientes, cargas, sais, revestimentos, veículos ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis tais como os usados habitualmente nas preparações farmacêuticas, por exemplo, comprimidos, preparações de libertação sustida, cápsulas de gelatina, soluções injectáveis, supositórios ou acopladas a sistemas de fornecimento de drogas, etc. Os limites da dosagem dos ingredientes activos, deverão estar de acordo com os limites preferidos seguintes: 10-100 mg/kg de um composto ou compostos particulares em roedores e 0,05-50 mg/kg no Homem. Será obviamente mais aconselhável usar a quantidade mínima com a qual se consegue obter o efeito desejado, de modo a obter a menor quantidade possível de efeitos colaterais. Além disto, a quantidade por unidade de cada forma de dosagem não necessita, por si só, de constituir uma quantidade eficaz de ingrediente activo, visto que pode ser administrada uma pluralidade de formas de dosagem para obter uma quantidade eficaz por combinação.

Deve, ainda, salientar-se que a quantidade usada e a duração do tratamento deve também ser sujeita a otimização e vai variar com severidade e capacidade de resposta da situação a ser tratada, a idade, o peso e condição física do doente e, frequentemente também, com a via de administração.

O invento vai ser descrito a seguir, por meio de exemplos específicos que o ilustram, sem limitar o seu âmbito:

EXEMPLO 1: ENSAIOS RELATIVOS À ACTIVIDADE DE BLOQUEAMENTO DO CANAL P

A. Sistema de células de Purkinje

Cobaias adultas de Hartley (400-600 gramas do Camm Research Institute, Wayne, New Jersey) anestesiadas com éter ou pentobarbital de sódio (Abbott Pharmaceuticals, Inc., N.Chicago, Ill., 40 mg/kg i.p.) foram decapitadas com uma pequena guilhotina para animais. Foi realizada uma rápida craniotomia para remoção da porção escamosa do osso occipital, o que permitiu a rápida separação, com uma espátula metálica, de toda a massa do cerebelo, incluindo os núcleos cerebelosos. Este tecido foi, então, imediatamente imerso em solução de Krebs-Ringer arejada, contendo NaCl 124 mM; KCl 55 mM; KH_2PO_4 1,2 mM; CaCl_2 2,4 mM; MgSO_4 4,3 mM; NaHCO_3 (26mM); e glucose 10 mM. Esta solução foi mantida refrigerada a 6°C. A massa cerebelosa foi depois cortada sagitalmente e foi isolada uma única fatia de células, com cerca de 2 mm de espessura, do vérmis ou de um dos hemisférios. A fatia foi fixada com cianoacrilato ao fundo de uma câmara de corte de plexiglass e usaram-se blocos de ágar para rodear a fatia proporcionando, assim, um suporte lateral. Uma vez seguro, o tecido foi imerso em solução de Krebs-Ringer a 6°C e cortado ainda mais com um Vibratome Oxford G501 (Ted Pella, Inc., Tustin, CA), para produzir cerca de seis fatias cerebelosas de aproximadamente 200 (ou 300) micro de espessura, contendo secções sagitais de todas as folhas cerebelosas num lado plano rostrocaudal, bem como, substância branca central e células nucleares do cerebelo. A seguir a este procedimento, as fatias foram incubadas em solução de Krebs-Ringer oxigenada (95% O_2 ; 5% CO_2) a 37°C por cerca de uma hora.

Após incubação, uma fatia foi transferida para um prato de re-

gistos tal como aquele descrito em Llinas, R. et al., J. Physiol., 305:171, 1980. A fatia cerebelosa foi colocada numa placa Sylgard (Corning Glass, Corning, New York), no fundo da câmara de registos e segura com um eléctrodo de estímulo, bipolar, pressionando levemente a substância branca. As experiências foram conduzidas a uma temperatura de câmara de 37°C, mantida por um banho de água com temperatura controlada. A solução salina (Ringer) usada para perfusão contínua foi também mantida a 37°C.

Foram usados para bloquear as condutâncias em estudo ou para bloquear as condutâncias iônicas vários agentes bloqueadores de canais que poderiam interferir com uma experiência particular: Foi usada tetrodotoxina ("TTX", 10^{-6} M), para bloquear a condutância ao sódio. Foi usado cloreto de trietilamônio ("TEA", 30 mM), para bloquear a condutância ao potássio; foi usada nitrendipina (10^{-5} - 10^{-6} M) para bloquear os canais L.

Foram introduzidas no banho várias preparações de compostos, a serem testadas como bloqueadores da actividade do canal P, e a corrente foi interrompida por períodos de tempo variados. Estas preparações foram adicionadas como aliquotas de 20-40 microlitros de uma solução contendo uma concentração molar particular de cada substância a ser testada. O volume do banho extracelular foi de 4 cc.

As células de Purkinje foram empaladas com micropipetas registadoras sob visão directa, usando microscopia de modulação de Hoffman. (Hoffman, R., J. Microsc. 110:205-222, 1977). Os registos intracelulares foram obtidos com micropipetas cheias com acetato de potássio 3M ou cloreto de tetraetilamônio (TEA), e tendo uma resistência à corrente contínua, média, de 60-80 megaohms.

A activação sináptica das células foi efectuada com um eléctrodo de estimulação, bipolar, localizado na substância branca na base da folha estudada. A estimulação directa das células de Purkinje foi implementada com amplificador ponte de impedância de entrada elevada (10^{12} ohms).

Nesta série de experiências foram usadas várias concentrações do composto a ser testado, como especificado abaixo: Quanto menor a quantidade de composto activo necessária para o bloqueamento,

maior a afinidade das poliaminas activas para os canais de cálcio. Os resultados representativos, das experiências descritas abaixo, estão ilustrados na fig. 1.

Antes da introdução da poliamina ou de outros compostos bloqueadores de canais no banho, sob a injeção de um impulso externo de corrente (despolarizadora), os neurónios responderam com disparo com picos tanto dependentes do sódio como do cálcio, de acordo com a resposta eléctrica normal das células de Purkinje, na ausência de um bloqueador do canal P (Fig. 1A). As respostas das células foram também medidas a vários intervalos de tempo, depois da introdução de um composto de poliamina no meio da câmara de registo.

Tipicamente, na presença de um bloqueador do canal P uma pequena corrente despolarizadora (aproximadamente 0,3 ou 0,45 nA por 62 msec) origina uma interrupção nos picos de potencial e nos patamares de potencial, sendo a última devida à condutância ao sódio não-inactivadora ("persistente"); os picos do cálcio foram substancialmente reduzidos ou extintos e não há o componente dependente do cálcio no patamar do potencial (Fig. 1B). A Figura 1B foi registada depois da adição de espermidina numa concentração final de 0,8 mM.

A ausência aparente de picos rápidos dependentes do sódio, na Fig. 1B que seria de esperar que seguissem os primeiros picos rápidos observados, é devida ao aumento da resistência da célula, substancial (indicado pelo patamar de potencial dependente do sódio). O bloqueamento de canais de cálcio, impossibilita os iões cálcio de entrarem na célula e, conseqüentemente, a saída da célula dos iões potássio não é activada. Os resultados da fig. 1B são comparáveis à adição do bloqueador do canal P, isolado do veneno da aranha de teia em funil, p.e. A. aperta, como divulgado no Pedido de Patente E.U.A. Nº 219 905.

Na Fig. 1C (traço superior), a condutância ao potássio foi bloqueada com TEA, o qual também foi adicionado ao banho (que já continha TTX e espermidina). O restante do pico do cálcio é devido à existência de outro tipo de canal de cálcio, nas células de Purkinje (o canal P tinha sido bloqueado com espermidina como na experiência da Fig. 1B). O pico da Fig. 1C, é devido à condutância ao cálcio

cio que é resistente à poliamina (e resistente ao veneno da aranha de teia em funil) e portanto não é devido ao bloqueador do canal P. A restante condutância ao cálcio é bloqueada por adição de di-hidropiridina (Fig. 1C, traço inferior) e também por adição (à mesma preparação, Fig. 1D, traço superior) de antibióticos tal como a estreptomicina (Fig. 1D, traço inferior).

A mesma experiência pode ser realizada usando compostos, dentro do âmbito do presente invento, que sejam activadores. É claro que neste caso o resultado seria um aumento na velocidade de subida do pico de cálcio, o qual poderia ser registado numa experiência tal como a geradora da Fig. 1, (excepto que não seria adicionado nenhum agente bloqueador).

B. Electofisiologia com os gânglios estrelados da lula

Foram feitas as seguintes observações em experiências a potencial e intensidade constantes, na sinapse da lula:

Os potenciais de acção foram induzidos por estimulação eléctrica directa do feixe nervoso pré-sináptico da sinapse gigante do gânglio estrelado da lula. Deste modo, o potencial de acção pós-sináptico evocado é mostrado na Fig. 4, com ausência no banho de qualquer agente bloqueador de cálcio (traço A). Quatro minutos depois da adição, de 0,15 ml de preparação do composto E a 3 cc do banho (descrito abaixo), o potencial de acção está marcadamente reduzido (traço B) e completamente extinguido aos 6 min.

A diminuição, e eventual extinção, do potencial de acção pós-sináptico é atribuída ao bloqueamento pelo factor bloqueador do canal P (aqui, composto E), dos canais de cálcio pré-sinápticos. A implicação destes canais de cálcio foi demonstrada noutro tipo de experiências a voltagem constante (Fig. 6), nas quais o potencial pós-sináptico da sinapse da lula (numa preparação contendo tetrodotoxina e 3-aminopiridina) é reduzido, em relação ao tempo, depois da adição de 0,4 ml de uma solução 1mM do composto B bloqueador do canal P a 3 cc do banho. Na Fig. 6, o potencial de acção pós-sináptico da lula evocado por um potencial constante de 38,2 mV, durante 10 mseg, a partir de um potencial de repouso de -60 mV, foi registado 1, 6, 10 e 13 minutos depois da adição do

bloqueador do canal P. O potencial foi reduzido e eventualmente extinto. Deve-se notar que a sinapse da lula é menos acessível aos reagentes do que as células de Purkinje; em consequência são necessárias maiores quantidades de agente bloqueador e/ou maiores períodos de espera para se observar um efeito particular.

A Fig. 5 mostra ainda outra experiência onde é aplicado um degrau a um potencial de 28 mV/5,5 mseg ao terminal pré-sináptico (traço C), na preparação da sinapse da lula, na qual a condutância do cálcio foi bloqueada com TTX e a condutância do potássio foi bloqueada com 3-aminopiridina. A voltagem em degrau aplicada gera uma corrente iônica influente compensatória, na célula pré-sináptica (traço B), o que é devida somente ao cálcio pois as outras condutâncias estão bloqueadas. Na célula pós-sináptica é evocado um potencial pós-sináptico (EPSP) que constitui a resposta normal (curva superior, traço A) na ausência do bloqueador do canal P (aqui, composto B). Ao mesmo tempo, a corrente iônica pré-sináptica na presença do composto B, é, também, reduzida (traço B, curva superior, i.e., curva com menor amplitude).

Isto indica que os bloqueadores do canal P, actuam nos canais de cálcio pré-sinápticos, desde que a relação temporal, na Fig. 5, entre a entrada do cálcio pré-sináptico e a resposta pós-sináptica se mantenha constante e apenas seja reduzida a amplitude da resposta pós-sináptica em relação directa com a redução da corrente de cálcio pré-sináptico. Isto significa que os bloqueadores do canal P, bloqueiam os canais de cálcio pré-sinápticos impedindo o influxo de cálcio e, consequentemente, a esperada libertação do transmissor não ocorre. A reduzida libertação do transmissor causa, por sua vez, uma reduzida resposta pós-sináptica.

Numa experiência com corrente fixa, usando a sinapse da lula, é aplicada uma corrente despolarizadora de amplitude fixa (400 nA, 8,4 mseg) ao terminal pré-sináptico. Na presença de TTX e 3-aminopiridina, o potencial pré-sináptico (pico do cálcio) é, como descrito na fig. 7A, o traço superior.

O potencial pós-sináptico (EPSP) correspondente está descrito na Fig. 7B (traço superior). Sete minutos após a adição do bloqueador do canal P (aqui, composto B) o pico do cálcio pré-sináptico

é reduzido (Fig. 7A, traço inferior) e também o do EPSP (Fig. 7B, traço inferior). O pico do cálcio pré-sináptico depois de bloqueio varia unicamente em amplitude. O potencial pós-sináptico evocado também varia em amplitude. Além disso, o curso do EPSP no tempo, após bloqueamento é o mesmo do que na ausência do bloqueador. Isto indica que os agentes de poliaminas bloqueadores do canal P actuam pré-sinápticamente e não têm um efeito pós-sináptico: se estivesse presente um bloqueamento pós-sináptico, o curso do EPSP no tempo também seria diferente (além da sua amplitude ser inferior).

As figuras 2 e 3 demonstram que o efeito dos agentes bloqueadores do canal P na corrente de cálcio pré-sináptico e no potencial pós-sináptico, depende da dose: ambos decrescem em amplitude com um aumento da quantidade do bloqueador do canal P usado no meio extracelular (na Fig. 2 foi usado veneno e na Fig. 3 foi usado um bloqueador do canal P de A. aperta) parcialmente purificado. A preparação parcialmente purificada foi processada por desproteíntização do veneno (por fervura), centrifugação, remoção da pelote, adição de água até ao volume original, seguida de 2 extracções com butanol, com 20 volumes de butanol. Foi usada a fase aquosa.

Os resultados aqui descritos são qualitativamente os mesmos, independentemente de a poliamina particular, bloqueadora do canal P, utilizada. A única diferença está na potência do bloqueador particular. Os compostos A e B e, especialmente, o composto E parecem ser muito mais potentes do que a espermidina e, por esta razão, estes compostos são preferidos. O factor bloqueador do canal P, purificado proveniente das aranhas de teia em funil, purificado por desproteíntização seguida de cromatografia de troca iónica como descrito acima, também é preferido.

A Fig. 8 é uma sobreposição de traçados de uma experiência com voltagem fixa, na lula (semelhante ao que é ilustrado na Fig. 5, mas com o fundo removido) na qual é aplicada, ao terminal pré-sináptico um degrau de voltagem de 35 mV/1 mseg (traço V), na preparação da sinapse da lula do tipo descrito acima, tendo a condutância ao sódio sido bloqueada com TTX etendo a condutância ao potássio sido bloqueada com TEA. Nesta preparação particular, foram feitas quatro medidas da corrente iónica pré-sináptica após aplicação do mesmo passo de vol

tagem com tempo a mais, antes (traço I-1) e 1,2 e 5 minutos após a aplicação de cerca de 1 mg do produto da reacção do éster de lisina e de espermidina do exemplo 2 por cc do banho (traços I-2 até I-4). Sem este produto, verificar-se-ia que a amplitude da corrente iónica decresceria progressivamente, visto que as células, eventualmente, morreriam.

Contudo, depois da aplicação do composto BB, é gerada uma corrente residual (a qual é devida unicamente ao cálcio pois as outras condutâncias estão bloqueadas). A amplitude máxima da corrente de cálcio em primeiro lugar decresce ligeiramente (I-2) e depois aumenta progressivamente (I-3, I-4) e mostra um pico progressivamente maior (começando a 180 nA para I-2) o que significa, que sob a influência do agente activador, a probabilidade do canal de cálcio estar aberto aumenta e a célula pré-sináptica recebe mais e mais cálcio do meio extracelular. Uma pequena variação na corrente de cálcio pré-sináptica, normalmente (i.e. numa preparação de células frescas sem bloqueadores ou activadores de cálcio) produz uma grande variação no EPSP. Na verdade medidas do EPSP, nesta célula pós-sináptica, mostraram, uma amplitude progressivamente maior para o EPSP (ver traçados EPSP correspondentes de P-1 até P-4). Esta experiência mostra também que os conjugados de lisina-espermidina activam os canais de cálcio e actuam pré-sinapticamente, pois as variações no EPSP estão directamente relacionadas com as variações na célula pré-sináptica. Pode-se prever que o canal activado por este composto é especificamente do tipo P, e que o efeito activador não substituirá pela adição de agentes bloqueadores para outros tipos de canais de cálcio. Além disso, numa experiência em que o produto de reacção do éster de etilo de lisina e de espermidina (ver exemplo 2) foi colocado no banho, não houve bloqueamento do canal de cálcio, após a introdução subsequente, no banho, do factor bloqueador do canal de cálcio, purificado a partir da A. aperta, purificado como descrito acima.

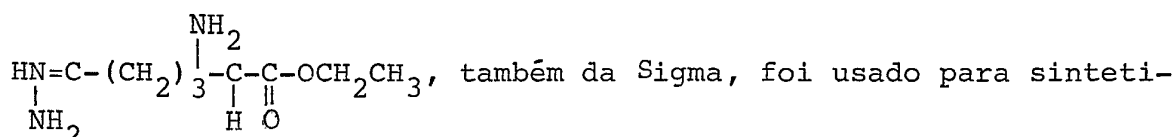
EXEMPLO 2: POLIAMINAS USADAS PARA ACTIVAR OU BLOQUEAR

Os compostos seguintes foram adquiridos ou sintetizados e testados em relação à actividade bloqueadora do canal P e a especificidade de tal actividade:

Os seguintes compostos foram obtidos da Sigma:

Espermidina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
1,6-diamino-hexano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$
espermina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$

Em adição, o éster de etilo de L-arginina



Em resumo, a síntese do composto B envolve o uso de 3×10^{-3} moles do éster de etilo de L-arginina que foi dissolvido em 5 ml de NaOH 1N. Foi adicionada uma quantidade equimolar de espermidina gota a gota, e a reação prosseguiu a 25°C, pH 14, sob agitação. O produto foi levado a pH 7,4 pela adição de HCl 5N. Usaram-se aliquotas de quarenta microlitros desta preparação do composto B em experiências com o sistema de ensaio do exemplo 1.

O composto A foi sintetizado da mesma maneira, excepto que se dissolvem, em primeiro lugar, uma quantidade equimolar de $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$ num volume mínimo de água, antes de ser adicionado ao éster de arginina em NaOH 1N.

O composto E e o seu isômero foram sintetizados como descrito acima.

Em adição, obtiveram-se comercialmente e testaram-se vários antibióticos que contêm porções de poliaminas. Eles são:

Gentamicina (da Elkins-Sinn, Inc., Cherry Hill, N.J.).

Estreptomicina (Pfipharmecs, a divisão da Pfizer, Inc., New York, N. Y.).

Vancomicina (Eli Lilly Industries, Inc., Carolina, Puerto Rico).

Prevê-se que terão as mesmas actividades outros antibióticos contendo grupos amina, tal como a canamicina, sendo quaisquer diferenças mais quantitativas do que qualitativas. Vários destes antibióticos estão comercialmente disponíveis.

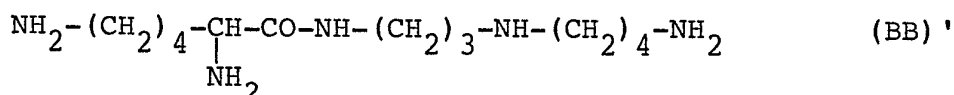


Cada um dos três antibióticos descritos acima como tendo sido testados, foram dissolvidos em água e foram usadas quantidades de 0,1; 0,4 e 0,8 mM. Usou-se 1 mM de vancomicina.

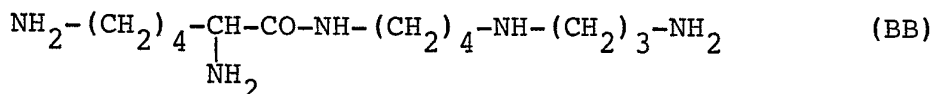
Finalmente, foram também testados os compostos 4-(3-aminopropil)morfolina da Aldrich Chemicals Milwaukee, Wisc., e PHTX433 ("PTX433"), um composto descrito em Eldefrawi et al., 1988, supra (que se acredita ser um antagonista dos receptores de glutamato do músculo da perna do gafanhoto).

Usaram-se quantidades até 1,0 mM de derivados de morfolina e mesmo quantidades maiores de PTX433 para avaliação electrofisiológica da sua actividade bloqueadora do canal P.

Os compostos activadores do canal P



e



foram sintetizados por reacção de uma mistura equimolar de lisina e de espermidina, em água, na presença de uma quantidade equimolar de carbodiimida solúvel em água, nomeadamente sulfonato de N-ciclohexil-N'-[(2-morfolinil)-etil]-carbodiimidametil-p-tolueno (Aldrich Chemical Co.) a pH 4,7. A mistura reaccional foi mantida sob agitação durante 20 horas, à temperatura ambiente. O produto da mistura foi extraído três vezes com acetato de etilo (total cerca de 10 volumes) e a fase aquosa foi recuperada e o pH foi levado a 7,2. A fase aquosa pode ser ainda mais purificada por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) sob um gradiente de 0-1,0M NaCl, pH 7,5 e a um caudal de 1 ml/min usando-se uma coluna de permuta iónica tal como a Mono-S (5x50 mm) da Pharmacia. Alternativamente, pode ser usado outro método de purificação convencional. Contudo, a fase aquosa resultante da extracção final com acetato de etilo, como descrito acima, pode ser usada tal e qual.

Embora os métodos de síntese anteriores não diferenciem os dois compostos (BB) e (BB)' e produz, muito provavelmente, uma mis

tura destes compostos, a potência de activação dos canais de cálcio pelos produtos extraídos (ver Exemplo 1) indica que o mais provável é serem ambos activos.

As técnicas anteriores podem ser usadas para sintetizar outras poliaminas à base de lisina, como a da fórmula I.

Outras técnicas sintéticas que podem ser usadas para produzir só o composto (BB)' consiste em, primeiramente, reagir a lisina com 1,3-diaminopropano, usando, p.e. o método de carbodiimida, acima descrito, e em seguida reagir o produto (de preferência) depois de purificado com 1,4-diaminobutano usando um dos métodos descritos acima para os compostos de da fórmula I. A ordem de utilização, das diaminas pode ser invertida para sintetizar o produto (BB).

EXEMPLO 3: ESTUDOS ADICIONAIS COM UM ACTIVADOR DE CÁLCIO

Nos estudos de um único canal conduzidos como o descrito no pedido do PCTUS89/00558, mas utilizando o produto da reacção lisina-espermidina, o activador do canal de cálcio anteriormente referido aumenta a probabilidade de abertura dos canais de cálcio, mas não parece alterar a condutância dos canais individuais.

O factor bloqueador do cálcio, isolado do veneno de A. aperta, ou o composto B ou E são úteis para as ratazanas quando administrados em doses de 50 a 100 microlitros.

Quantidades similares do composto BB, purificado, não matam estes animais. À observação, as ratazanas ficam plácidas, mas não apresentam quaisquer alterações visíveis dos movimentos, e não estendem os seus membros quando agarrados. O composto BB (e/ou BB') parece ter um efeito calmante, semelhante a um efeito tranquilizante, mas sem grande relaxamento muscular.

EXEMPLO 4: MARCAÇÃO DOS AGENTES REGULADORES DE CÁLCIO COM FLUORESCÉINA

A arginina foi marcada, misturando-a com uma quantidade equimolar de fluoresceína em tampão de borato de sódio, pH 9,5, e deixando-se a mistura reagir de um dia para o outro, no escuro e sob agitação. A fluoresceína em excesso foi extraída por 3 lavagens com acetato de etilo a 10 volumes, por lavagem. A arginina assim

marcada pode ser usada para sintetizar compostos da fórmula I. O éster de etilo de lisina pode ser marcado da mesma forma. Assim, os compostos da fórmula I marcados (tanto activadores como bloqueadores) podem ser utilizados em experiências de fluorescência, utilizando métodos bem conhecidos na arte.

EXEMPLO 5: RESULTADOS DE OUTROS ESTUDOS ELECTROFISIOLÓGICOS

A actividade dos canais P foi registada no sistema do Exemplo 1, na presença e ausência de diversas quantidades dos compostos descritos no Exemplo 2.

Os resultados para o canal P foram os seguintes:

A espermina e o 1,6-diamino-hexano não bloquearam os canais P nas concentrações testadas (até cerca de 1 mM). As condutâncias ao cálcio, atribuídas aos canais P foram as mesmas, tanto na presença como na ausência destes compostos. Contrastando com isto, a espermina bloqueia os canais P selectivamente, mas não com uma potência alta (em comparação com a potência do veneno de aranha ou de bloqueadores dos canais P purificados do veneno).

A espermidina não tem qualquer efeito no canal L até uma concentração de 800 micromolar. A 4-(3-aminopropil)morfolina não bloqueou os canais P até uma concentração de 1 mM. O PHTX433 não bloqueou o canal P das células de Purkinje, até concentrações de 10 mM, mas bloqueou a resposta pós-sináptica na lula (cerca de 300 micromolar).

Contrariamente, os compostos A, B e E foram potentes bloqueadores dos canais P, produzindo um bloqueio total dos canais P a concentrações inferiores a 0,5 mM. Nenhum bloqueou o canal L sensível à di-hidropiridina às concentrações testadas (bastante abaixo de 1 mM). Os outros canais (sódio, potássio) não foram afectados. As concentrações mínimas, eficazes, dos agentes bloqueadores dos canais P deste invento, são micromolares ou inferiores; isto pode ser determinado por experiência de rotina, utilizando diluições em série destes agentes. São preferidas concentrações até 1 mM, mas deve-se ter em consideração que a escolha da concentração de cada agente é sujeita a optimização, como é bem sabido na arte e também depende de se desejar um bloqueio parcial ou total dos



canais P.

Os antibióticos bloqueiam tanto os canais de sódio, em concentrações inferiores a 1 mM bem como o canal L. Nenhum dos antibióticos testados bloqueia os canais P a concentrações inferiores a 1 mM, embora seja observado bloqueio do canal P (assim como, bloqueio do canal L e de sódio) quando a concentração da aliquota introduzida no banho é superior a 10 mM.

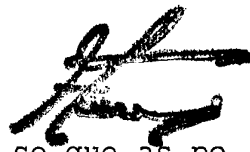
O bloqueio dos canais P pelos antibióticos não foi potente ou específico, em nenhuma circunstância, o que é compatível com a presença de anéis aromáticos em todas as moléculas dos antibióticos testados, apesar da presença na estreptomicina da porção $\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)-\text{NH}-$ possuída pela arginina e em outros antibióticos de vários grupos amino.

Estes resultados indicam que as poliaminas não aromáticas, bloqueadoras, do presente invento, bloqueiam especificamente os canais de cálcio do tipo P (i.e., sem afectar os canais de sódio, potássio, ou os canais de cálcio do tipo L). Em particular, estes agentes bloqueiam os canais de cálcio pré-sinápticos e, deste modo, controlam a libertação de transmissores do neurónio pré-sináptico para o neurónio pós-sináptico. Espera-se uma especificidade análoga dos agentes activadores do presente invento.

Vários outros compostos podem ser obtidos e/ou testados, como foi descrito acima. Prevê-se que os resultados demonstrarão a aplicabilidade geral das seguintes observações:

- A presença de anéis aromáticos (incluindo heterociclos) inibe a capacidade reguladora do canal P por meio de um composto de poliamina relativamente e pode, também, inibir a especificidade.
- A presença de três grupos amina é essencial para a actividade, com a condição da poliamina não ser simétrica na distribuição dos grupos metileno/amina.
- A actividade aumenta com o aumento do teor em azoto de uma poliamina (sendo todo o resto igual).

Os compostos activadores dos canais P do presente invento, diferem dos bloqueadores à base de arginina apenas por a arginina es



tar substituída pela lisina. Pode, portanto, observar-se que as poliaminas podem ter efeitos diferentes, e mesmo opostos, nos canais do tipo P, dependendo da estrutura do grupo R. De facto, prevê-se que alguns activadores (ou bloqueadores) dos canais de cálcio seriam específicos para canais P de células de uma espécie animal particular e poderiam, portanto, servir como marcadores de outras características distintivas de subtipos de canais P.

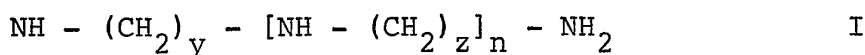
EXEMPLO 6:

O composto BB foi administrado a uma ratazana em quantidades que variam entre 50 e 100 mg/kg. Seguidamente a ratazana foi injectada com 40 mg/kg (volume efectivo: 0,2 ml) de fenobarbital de sódio (NEMBUTAL), uma dose que normalmente produz anestesia total e, em muitos casos, morte. A ratazana injectada com BB, pelo contrário, não ficou inconsciente após a injeção. Foram necessárias duas doses adicionais de nembutal para anestesiá-la esta ratazana. A experiência foi repetida, só que desta vez foram injectadas com o composto BB duas ratazanas, uma com a mesma dose que havia sido administrada, na experiência anterior e outra com o dobro da dose. Imediatamente após a injeção, a observação a primeira ratazana parecia normal e a segunda mostrava diminuição da actividade. Depois, cada uma foi injectada com 40 mg/kg de nembutal, a primeira não mostrou qualquer efeito e a segunda pareceu acordar. As injeções subsequentes de 40 mg/kg de Nembutal provocaram a anestesia da primeira ratazana com a dose total de 160 mg/kg, mas a segunda recebeu um total de 200 mg/kg antes de ser anestesiada, e um total de 240 mg/kg antes de ser morta. A LD-50 normal para o Nembutal, em ratazanas, é de cerca de 60 mg/kg. Assim, esta dose é comparativamente, enorme. A consequência é que o composto BB, que é um activador dos canais de cálcio, causa resistência à acção dos barbitúricos. Além disso, provoca um efeito de serenidade sobre os animais, sem ser tranquilizante, visto que não causa muito relaxamento muscular, e tem uma utilidade potencial como droga protótipo para a ansiedade.

REIVINDICAÇÕES

1. - Processo de síntese de um composto de poliamina, caracterizado por compreender:

o contacto de um composto de fórmula:



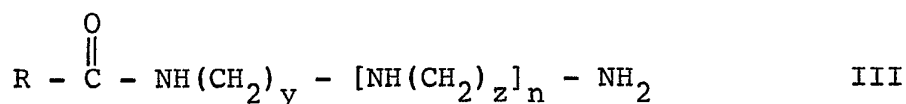
na qual: y e z são números inteiros de 1 a 15

n é um número inteiro de 0 a 2,

com um composto de fórmula:



na qual R é um radical orgânico não aromático contendo, pelo menos, uma porção contendo azoto, seleccionada do grupo consistindo em amino, imino, amido, imido, aminoalquilo, amidoalquilo e imidoalquilo, e na qual R' é um radical alquilo inferior, ocorrendo o referido contacto num solvente possuindo grupos hidroxilo, possuindo o referido solvente um pH alcalino eficaz na manutenção dos grupos amino do composto I na forma não ionizada e obtenção de um composto de poliamina com uma estrutura definida pela fórmula III:



na qual R, y, z e n são definidos como acima, com a condição de que a distribuição de, pelo menos, um dos grupos metileno ou átomos de azoto, em torno da molécula da referida poliamina, seja assimétrica.

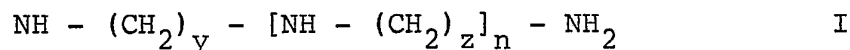
2. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto II, no referido passo de contacto, ser um éster de arginina.

3. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto II, no referido passo de contacto, ser um éster de lisina.

4. - Processo de síntese de um composto de poliamina, caracte

rizado por compreender:

o contacto de um composto de fórmula:



na qual y e z são números inteiros de 1 a 15

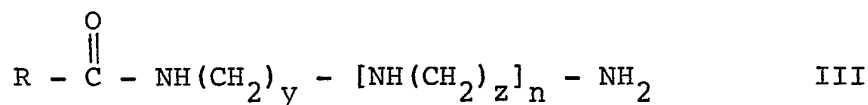
n é um número inteiro de 0 a 2,

com um composto de fórmula:



na qual R é um radical orgânico não aromático contendo, pelo menos, uma porção contendo azoto, seleccionada do grupo consistindo em amino, imino, amido, imido, aminoalquilo, amidoalquilo e imidoalquilo, podendo a referida porção possuir um grupo protector ligado a si,

e com um composto de carbodiimida, e obtenção de um composto com uma estrutura definida pela fórmula III:



na qual R, y, z e n são definidos como acima, com a condição de que a distribuição de, pelo menos, um dos grupos metileno ou átomos de azoto em torno da molécula do referido composto de poliamina, seja assimétrica.

5. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o composto de carbodiimida, usado no referido passo de contacto ser uma carbodiimida solúvel em água.

6. - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a referida carbodiimida ser o N-ciclo-hexil-N'-[(2-morfolinil)-etil]-carbodiimida-metil-p-tolueno-sulfonato.

7. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o composto II, no referido passo de contacto ser arginina, a qual pode ter grupos protectores nas porções amino e guanidino.

8. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado

por o composto II, no referido passo de contacto, ser a lisina, a qual pode ter grupos protectores nas porções amino.

9. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por compreender ainda a remoção do referido grupo protector.

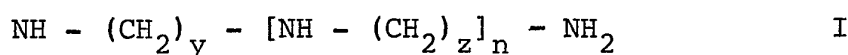
10. - Processo de síntese de um composto de poliamina, caracterizado por compreender:

o contacto de um composto com a seguinte fórmula:



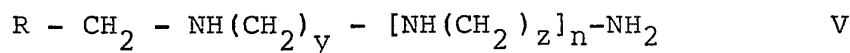
na qual R é um radical orgânico não aromático contendo, pelo menos, uma porção contendo azoto, seleccionado do grupo consistindo em amino, imino, amido, imido, aminoalquilo, amidoalquilo, e imidoalquilo, possuindo a referida porção que contém azoto, um grupo protector ligado a si,

e na qual R' é um radical alquilo inferior, com um hidreto de um metal, obtenção do aldeído correspondente ao composto II, contacto do referido aldeído com um composto de fórmula:

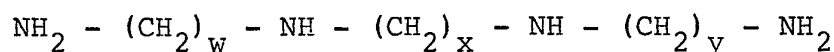


na qual y e z são números inteiros de 1 a 15
n é um número inteiro de 0 a 2,

e com cianoboro-hidreto de sódio e obtenção de um composto com uma estrutura definida pela fórmula V:



na qual R, y, z e n são definidos como acima, com a condição de que, se os referidos grupos protectores são removidos, a distribuição de, pelo menos, um dos grupos metileno ou átomos de azoto, em torno da molécula do referido composto poliamina ser assimétrica, e de o referido composto de poliamina não ser:



na qual w é um número inteiro de 1 a 6,
 x é um número inteiro de 0 a 15 e
 y é definido como acima.

11. - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por o composto II, no referido primeiro passo de contacto, ser a arginina com grupos protectores nas porções amino e guanidino.

12. - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por o composto II, no referido primeiro passo de contacto, ser a lisina com grupo protectores nas porções amino.

13. - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por compreender ainda a remoção dos referidos grupos protectores.

14. - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por, no referido primeiro passo de contacto, o referido hidreto de metal ser o hidreto de di-isobutilalumínio.

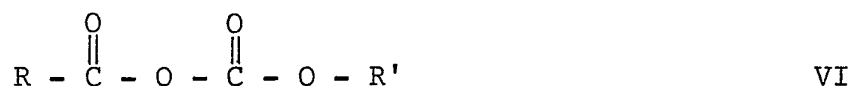
15. - Processo de síntese de um composto de poliamina, caracterizado por compreender:

o contacto de um composto de fórmula:



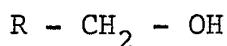
na qual R é um radical orgânico não aromático contendo, pelo menos, uma porção contendo azoto, seleccionado do grupo consistindo em amino, imino, amido, imido, aminoalquilo, amidoalquilo e imidoalquilo, possuindo a referida porção um grupo protector a si ligado,

com um halogeneto de alcóxicarbonilo inferior, na presença de um composto amino terciário, obtenção de um composto de anidrido misto com a seguinte fórmula:



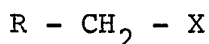
na qual R é definido como acima e R' é um alquilo inferior,

contacto do referido anidrido com o cianoboro-hidreto de sódio, obtendo-se o seguinte álcool:

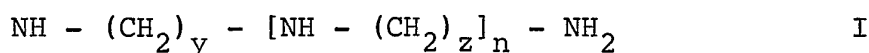



VII

na qual R é definido como acima, substituição do radical OH da fórmula VII com um halogéneo para obter o seguinte composto halogenado:



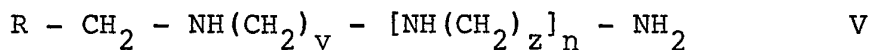
na qual R é definido como acima e X é um halogéneo, contacto do referido composto halogenado com um composto de fórmula:



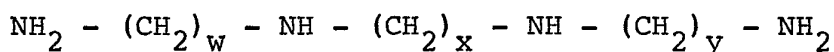
na qual y e z são números inteiros de 1 a 15
n é um número inteiro de 0 a 2,

e

obtenção de um composto com uma estrutura definida pela fórmula V:



onde R, y, z e n são definidos como acima, com a condição de que, se os referidos grupos protectores são removidos, a distribuição de, pelo menos, um dos grupos metileno ou átomos de azoto, em torno da molécula do referido composto de poliamina é assimétrica e o referido composto de poliamina não ser:



na qual w é um número inteiro de 1 a 6,
x é um número inteiro de 0 a 15 e
y é definido como acima.

16. - Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por a referida substituição do radical OH compreender o contacto do referido composto VII com HX e a obtenção do composto VIII.

17. - Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por a referida substituição do radical OH compreender o contacto do referido composto VII com PX_3 e a obtenção do composto VIII.

18. - Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por o composto IV, no referido primeiro passo de contacto ser a

arginina com grupos protectores nas porções amino e guanidino.

19. - Processo de acordo com a reivindicação 15, caracteriza-do por o composto IV, no referido primeiro passo de contacto ser a lisina com grupos protectores nas porções amino.

20. - Processo de acordo com a reivindicação 15, caracteriza-do por compreender ainda a remoção dos referidos grupos protecto-res.

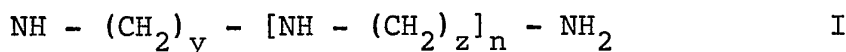
21. - Processo de síntese de um composto de poliamina, carac-terizado por compreender:

o contacto de um composto de fórmula:



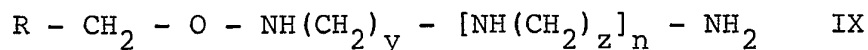
na qual R é um radical orgânico não aromático contendo, pelo menos, uma porção contendo azoto, seleccionada do grupo consistindo em amino, imino, amido, imido, aminoalquilo, amidoalquilo e imidoalquilo, podendo a referida porção possuir um grupo protector ligado a si,

com um composto de fórmula:



na qual y e z são números inteiros de 1 a 15
n é um número inteiro de 0 a 2,

e com um ácido e um peróxido e obtenção de um composto com uma estrutura definida por fórmula IX:



na qual R, y, z e n são definidos como acima, com a condição de que, se os referidos grupos protectores são removidos, a distribuição de, pelo menos, um dos grupos metileno ou átomos de azoto, em torno da molécula do referido composto de poliamina, é assimétrica.

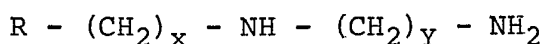
22. - Processo de acordo com a reivindicação 21, caracteriza-do por o referido ácido ser ácido acético e o referido peróxido ser peróxido de hidrogénio.

23 - Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por o composto IV, no referido passo de contacto, ser arginina com grupos protectores nas porções amino e guanidino.

24 - Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por o composto II, no referido passo de contacto, ser a lisina com grupos protectores nas porções amino. .

25 - Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por compreender ainda a remoção dos referidos grupos protectores

26 - Processo para regular o transporte de iões cálcio através das membranas celulares possuindo canais de cálcio que são resistentes à di-hidropiridina, resistentes à conotoxina e resistentes a octanol, caracterizado por compreender a exposição in vitro de uma membrana celular possuindo os referidos canais a um composto de poliamina, não aromático, bloqueador dos canais de cálcio, de fórmula (I):



na qual Y é um número inteiro de 1 a 15

x é um número inteiro de 0 a 15

R é um grupo orgânico não aromático, contendo pelo menos um grupo amino, imino, amido, imido e/ou pode ser ligado ao resto do composto através de $-CX_2-O-NH$ no qual X é hidrogénio e um de X é NH_2 com a condição da distribuição de pelo menos um dos grupos metileno ou átomos de azoto em torno da molécula da referida poliamina ser assimétrica e de o composto conter pelo menos três átomos de azoto;

estando a referida poliamina presente numa quantidade eficaz para regular a condutância atribuível aos referidos canais.

27 - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por o referido composto de poliamina ter a fórmula I na qual x é de 1 a 6 e Y é de 1 a 6.

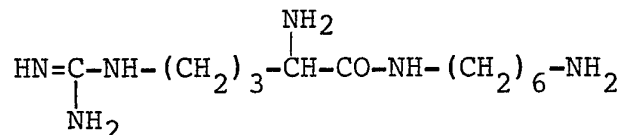
28 - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por os referidos canais serem canais de P.

29 - Processo de acordo com a reivindicação 27, caracteriza-

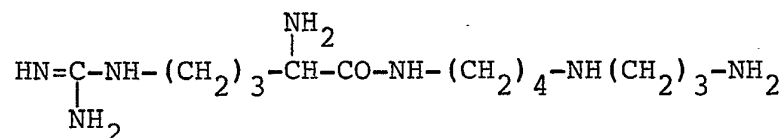


do por os referidos canais serem canais de P e as referidas células serem neurônios centrais de mamíferos.

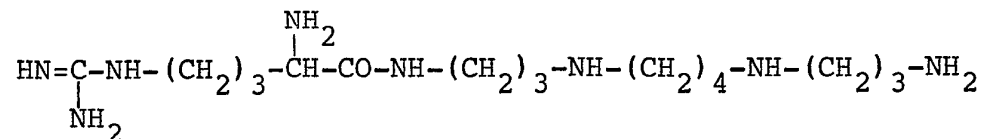
30. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a fórmula



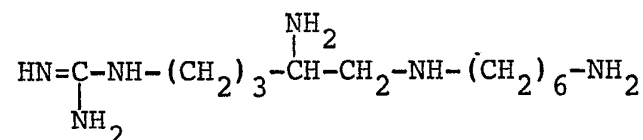
31. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a fórmula



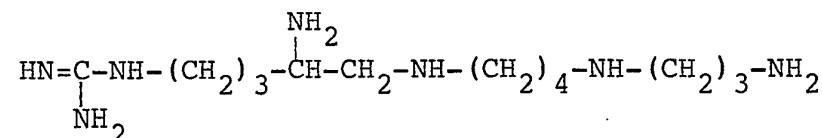
32. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a fórmula



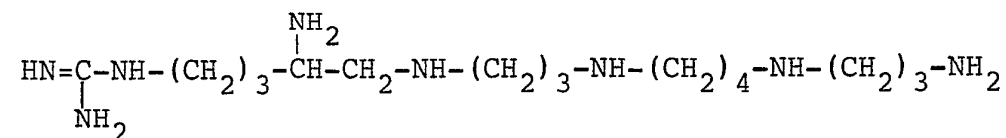
33. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a fórmula



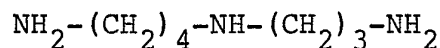
34. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a formula



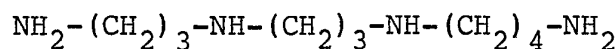
35. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a formula



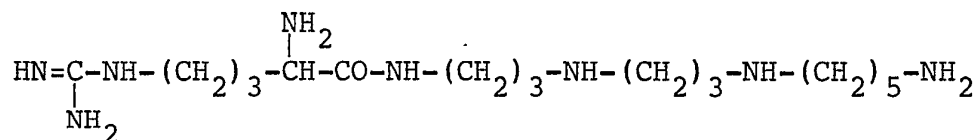
36. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-
do por a referida poliamina ter a fórmula



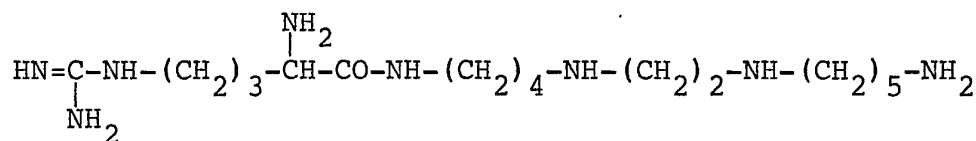
37. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-
do por a referida poliamina ter a fórmula



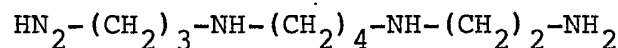
38. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-
do por a referida poliamina ter a fórmula



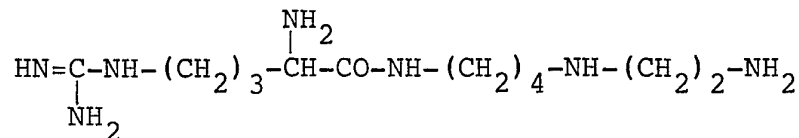
39. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-
do por a referida poliamina ter a fórmula



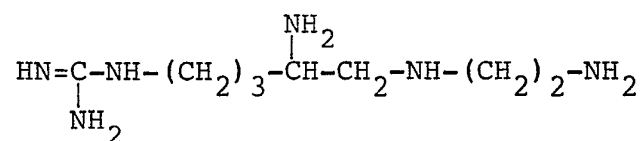
40. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-
do por a referida poliamina ter a fórmula



41. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-
do por a referida poliamina ter a fórmula

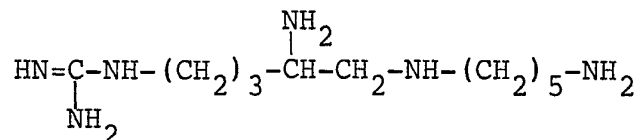


42. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-
do por a referida poliamina ter a fórmula

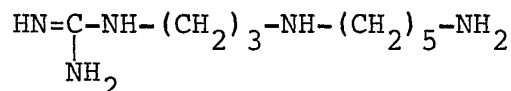




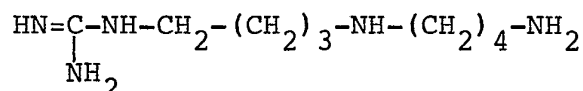
43. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a fórmula



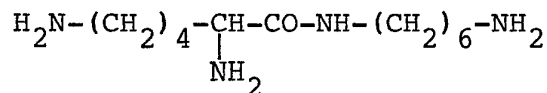
44. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a fórmula



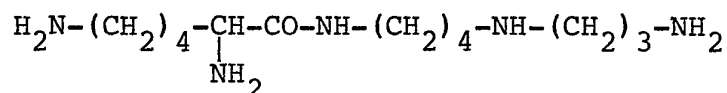
45. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a fórmula



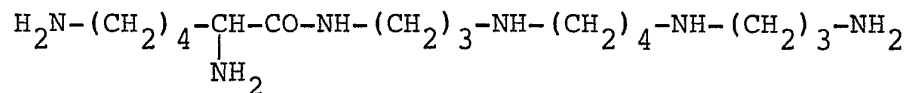
46. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a fórmula



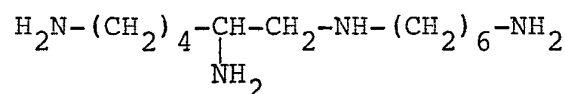
47. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a fórmula



48. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a fórmula



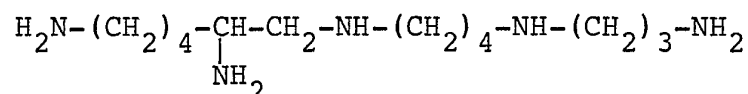
49. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por a referida poliamina ter a fórmula



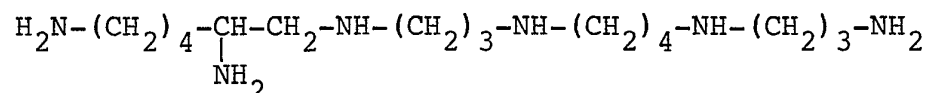
50. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-



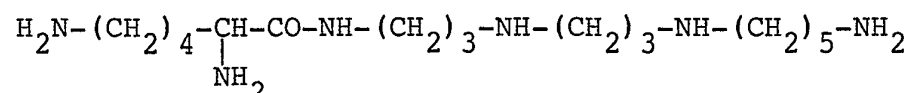
do por a referida poliamina ter a fórmula



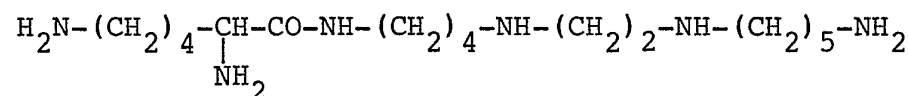
51. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-do por a referida poliamina ter a fórmula



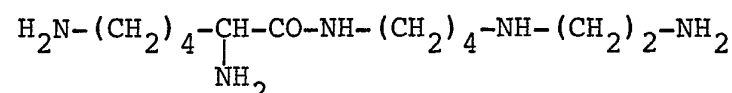
52. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-do por a referida poliamina ter a fórmula



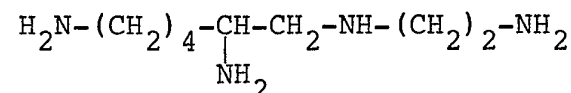
53. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-do por a referida poliamina ter a fórmula



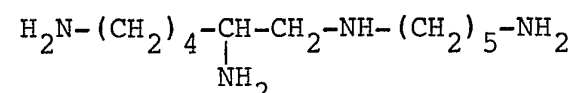
54. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-do por a referida poliamina ter a fórmula



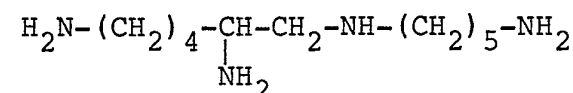
55. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-do por a referida poliamina ter a fórmula



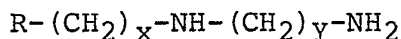
56. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-do por a referida poliamina ter a fórmula



57. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracteriza-do por a referida poliamina ter a fórmula



58 - Processo para bloquear canais de cálcio resistentes ao bloqueio pelas di-hidropiridinas, álcoois e conotoxina, caracterizado por compreender expôr in vitro uma membrana celular possuindo os referidos canais a um composto de poliamina, não aromático, bloqueador dos canais de cálcio, de fórmula (I):



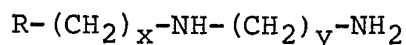
na qual Y é um número inteiro de 1 a 15,

x é um número inteiro de 0 a 15,

R é um grupo orgânico não aromático, contendo pelo menos, um grupo amino, imino, amido, imido e/ou pode ser ligado ao resto do composto através de $-CX_2-O-NH-$ no qual X é hidrogênio e um de X é NH_2 , com a condição da distribuição de pelo menos um dos grupos metileno ou átomos de azoto em torno da molécula da referida poliamina ser assimétrica e de o composto conter pelo menos três átomos de azoto;

estando a referida poliamina presente numa quantidade eficaz para bloquear a condutância atribuível aos referidos canais.

59 - Processo para evitar a ocorrência ou diminuir a grandeza da libertação de transmissor, resultante da activação dos canais de cálcio neuronais, numa sinapse, sendo os referidos canais resistentes à di-hidropiridina, resistentes a álcoois e resistentes à conotoxina, caracterizado por compreender expôr in vitro a referida sinapse a um composto de poliamina, não aromático, bloqueador dos canais de cálcio, de fórmula (I):



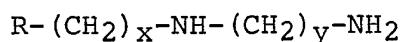
na qual y é um numero inteiro de 1 a 15,

x é um número inteiro de 0 a 15,

R é um grupo orgânico não aromático, contendo pelo menos um grupo amino, imino, amido, imido, e/ou pode ser ligado ao resto do composto através de $-CH_2-O-NH-$ no qual X é hidrogêneo e um de X é NH_2 , com a condição da distribuição de pelo menos um dos grupos metileno ou átomos de azoto em torno da molécula da referida poliamida ser assimétrica e de o composto conter pelo menos três átomos de azoto;

estando a referida poliamida presente numa quantidade eficaz para bloquear a condutância atribuível aos referidos canais.

60 - Processo para activar canais de cálcio resistentes ao bloqueio por di-hidropiridinas, álcoois e conotoxina, caracteriza do por compreender expôr in vitro uma membrana celular possuindo os referidos canais a um composto de poliamina, não aromático, activador dos canais de fórmula (I):



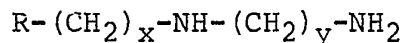
na qual y é um número inteiro de 1 a 15,

x é um número inteiro de 0 a 15,

R é um grupo orgânico não aromático, contendo pelo menos um grupo amino, imino, amido, imido e/ou pode ser ligado ao resto do composto através de $-CX_2-O-NH-$ no qual X é hidrogênio e um de X é NH_2 , com a condição da distribuição de pelo menos um dos grupos metileno ou átomos de azoto em torno da molécula da referida poliamina ser assimétrica e de o composto conter pelo menos três átomos de azoto;

estando a referida poliamina presente numa quantidade eficaz para aumentar a condutância atribuível aos referidos canais.

61 - Processo para melhorar a libertação de transmissor, resultando a grandeza de libertação de transmissor da activação dos canais de cálcio neuronais, sendo os referidos canais resistentes à di-hidropiridina, resistentes ao álcool e resistentes à conotoxina, caracterizado por compreender expôr, in vitro, a referida sinapse a um composto de poliamida, não aromático, activador dos canais de fórmula (I):



na qual y é um número inteiro de 1 a 15,

x é um número inteiro de 0 a 15,

R é um grupo orgânico não aromático, contendo pelo menos um grupo amino, imino, amido, imido e/ou pode ser ligado ao resto do composto através de $-CX_2-O-NH-$ no qual X é hidrogênio e um de X é NH_2 , com a condição da distribuição de pelo menos um dos grupos metileno ou átomos de azoto em torno da molécula da referida poliamina ser assimétrica e de o composto conter pelo menos três átomos de azoto;

estando a referida poliamina presente numa quantidade eficaz para aumentar a condutância atribuível aos referidos canais.

62 - Processo de preparação de uma composição farmacêutica,

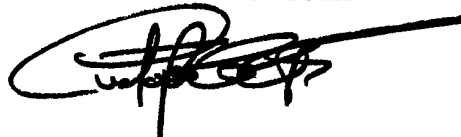
caracterizado por se associar um ou mais compostos de fórmula (I),
definida como na reivindicação 1, com excipientes, transportado-
res, revestimentos, veículos ou sais, farmacologicamente aceitáveis.

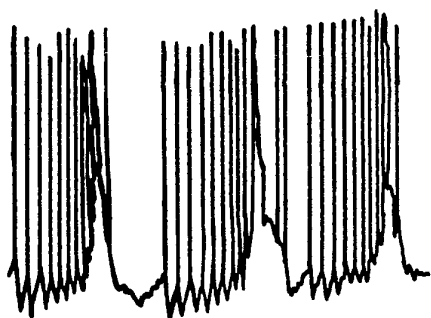
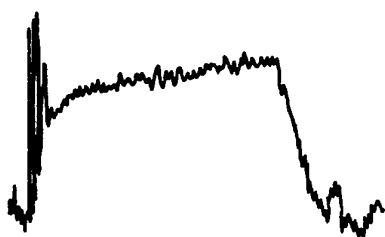
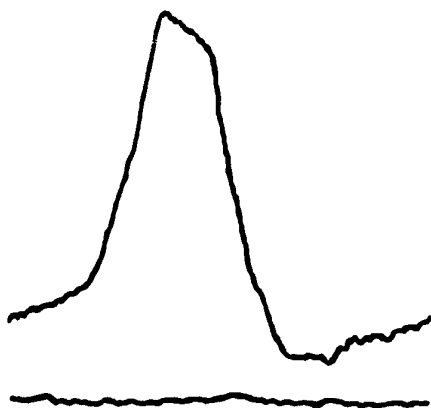
Lisboa,

-3. JUL 1990

Por NEW YORK UNIVERSITY

- O AGENTE OFICIAL -

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. P. K. S.', written over a horizontal line.

*FIG. 1A**FIG. 1B**FIG. 1C**FIG. 1D*

2/5

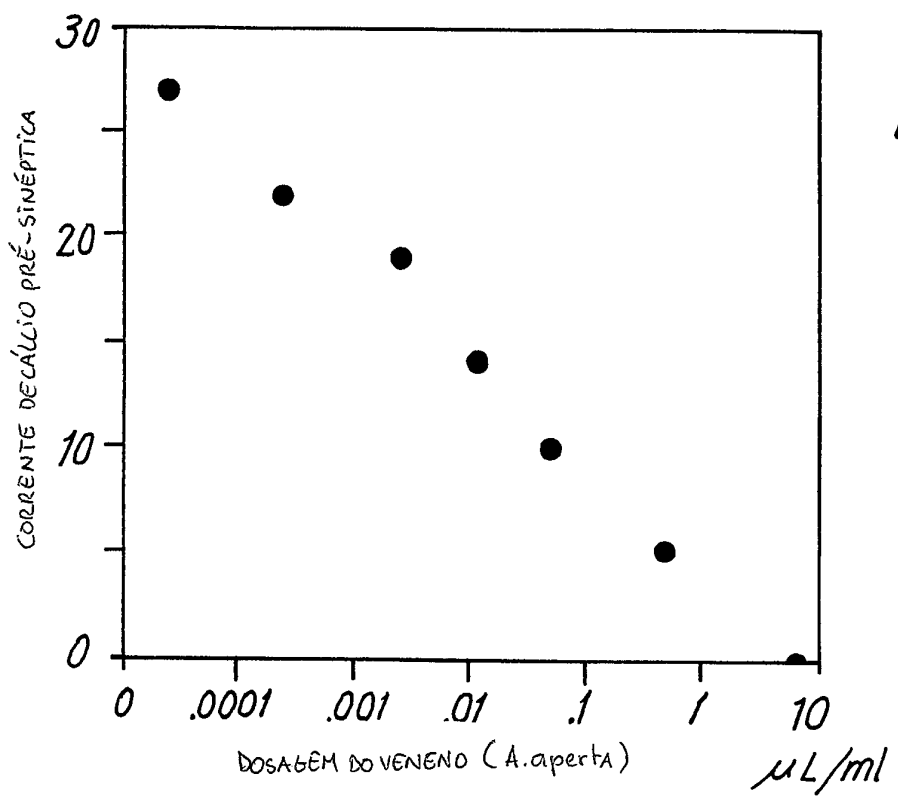


FIG. 2

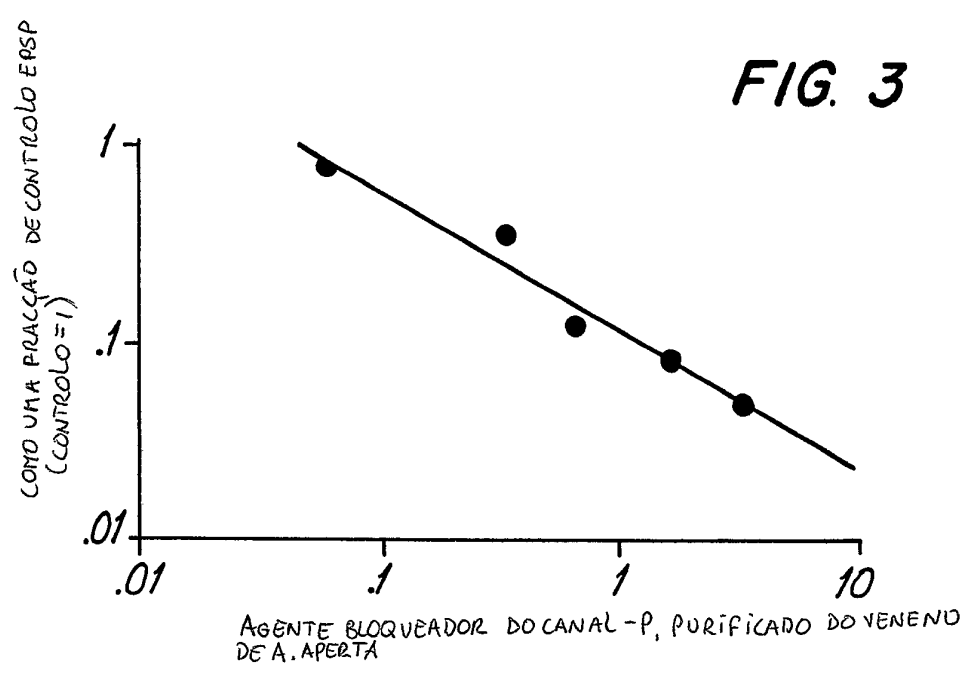
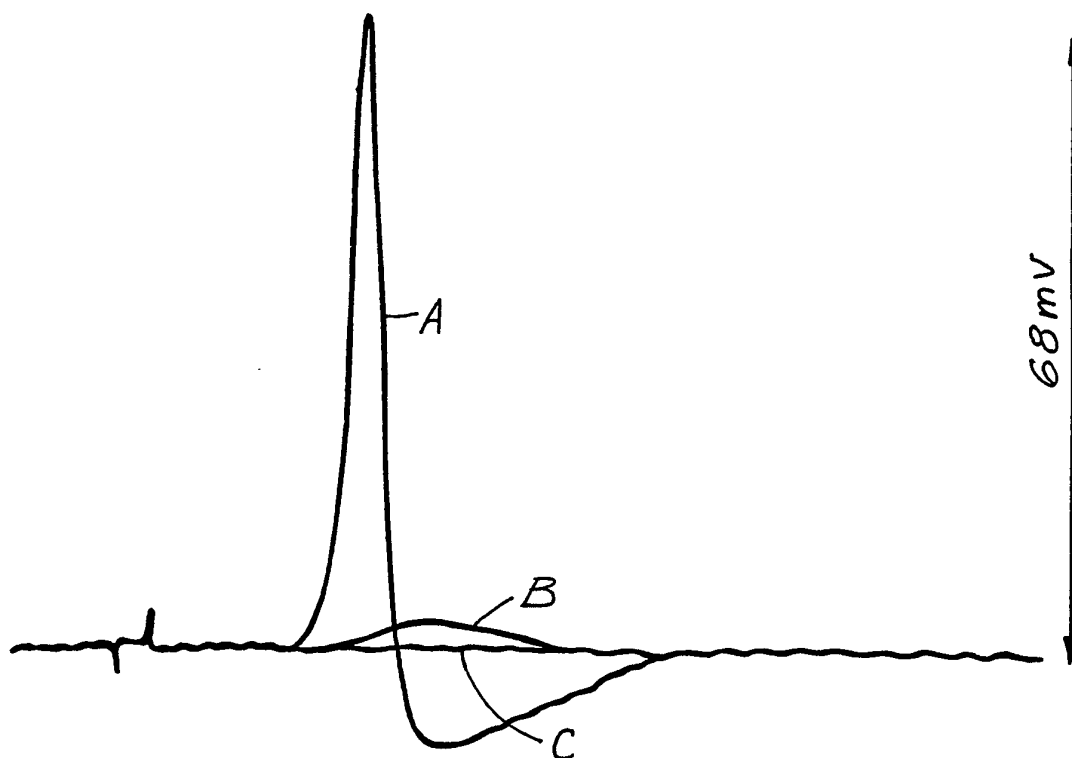
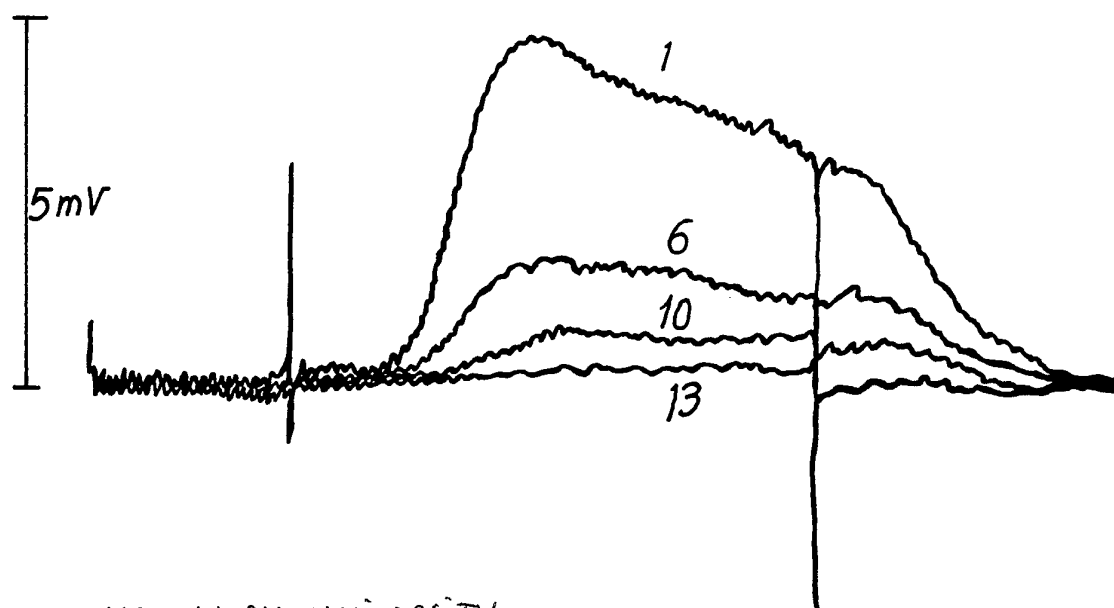


FIG. 3

NEW YORK UNIVERSITY

**FIG. 4****FIG. 6**

4/5

[Handwritten signature]

FIG. 5

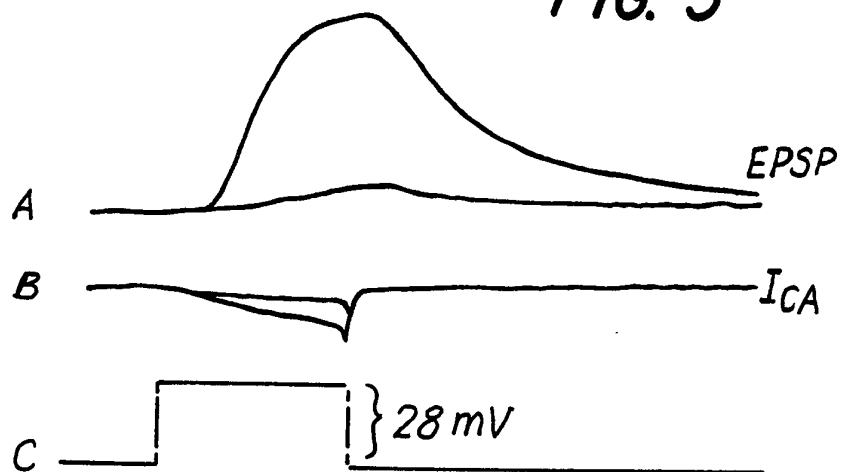


FIG. 7A



FIG. 7B



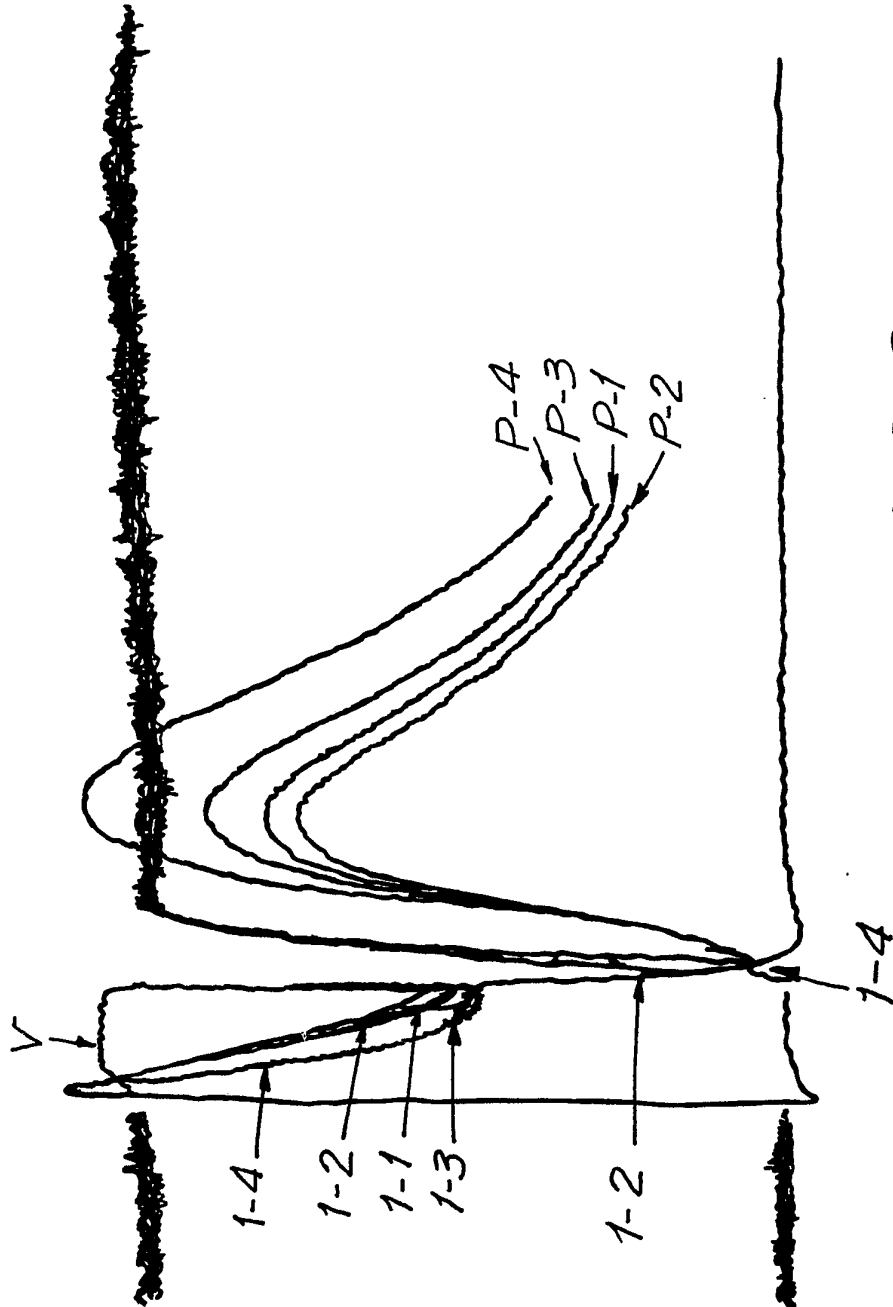


FIG. 8