

MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 95.596 Z

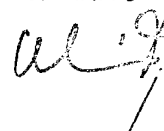
NOME: THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND
norte-americana, industrial, com sede em 1430 Tulane
Avenue, Nova Orleães, Louisiana 70115, Estados Uni-
dos da América

EPIGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DECAPEPTIDOS
TERAPÊUTICOS"

INVENTORES: David H. Coy e Jacques-Pierre Moreau, residen-
tes nos Estados Unidos da América.

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

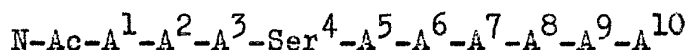
1989/10/13; US; Nº 421,245



- R E S U M O -

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DECAPEPTIDOS TERAPEUTICOS"

A presente invenção refere-se ao processo de preparação de decapeptidos da fórmula geral:



em que cada $\text{A}^1\text{-A}^2$ e A^3 independentemente é D- β -Nal, D-p-X-Phe (em que X é halogéneo, H, NH_2 , OH ou alquilo C_{1-3}); A^5 é p-X-Phe (em que X é halogéneo, H, NH_2 , NO_2 , OH ou alquilo C_{1-3}); A^6 é D-Lys, D-Arg, β -Nal-D- β -Nal, D-Trp, D-p-X-Phe (em que X é halogéneo, H, NH_2 , NO_2 ou alquilo C_{1-3}) ou D-Lys- ϵ -NH-R (em que R é H, uma cadeia linear ou ramificada ou um grupo ciclo-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ ou um grupo arilo); A^7 é p-X-Phe (em que X é halogéneo, H, NH_2 , NO_2 , OH, C_2F_5 ou alquilo C_{1-3}), ciclo-hexilalanina ou Trp; A^8 é Arg, Lys ou Lys- ϵ -NH-R (em que R é H, uma cadeia linear ou ramificada ou um grupo ciclo-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ ou um grupo arilo); A^9 é Pro; e A^{10} é D-Ala- NH_2 , Gly- NH_2 , D-Ser, ou D-Ser- NH_2 ; com a condição de, pelo menos, um de A^2 ou A^3 ser D-Phe ou D-Tyr; e ainda com a condição de, pelo menos, um de A^6 e A^8 ser o seguinte: A^6 ser D-Lys- ϵ -NH-R (em que R é um grupo ciclo-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$); A^8 ser Lys- ϵ -NH-R (em que R é um grupo ciclo-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$) ou um sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico correspondente.

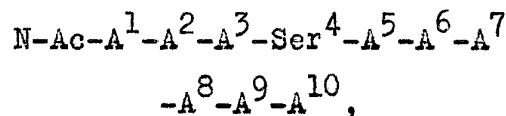
15.04.1990

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a peptídeos terapêuticos. Tem-se descrito um número grande de análogos de hormonas (LH-RH) de libertação de hormona com luteína que inibem a libertação de LH-RH, uma hormona de peptído possuindo a fórmula $p\text{Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$. Estes análogos chamam-se antagonistas de LH-RH. Por exemplo, Coy et al., Patente Americana nº 4 431 635, aqui incorporada por referência, descreve análogos de LH-RH possuindo a fórmula geral $X-R^1-R^2-R^3\text{-Ser-Tyr-R}^4\text{-Leu-Arg-Pro-R}^5\text{-NH}_2$, em que X pode ser Ac; R^1 e R^4 , independentemente, podem ser D-Trp ou D-p-X-Phe; R^3 pode ser D-Trp; e R^5 pode ser Gly ou D-Ala.

RESUMO DA INVENÇÃO

Em geral, a invenção descreve um decapeptído da fórmula:



em que A^1 , A^2 e A^3 , independentemente, é D- β -Nal, D-p-X-Phe (em que X é halogéneo, H, NH_2 , NO_2 , OH ou alquilo C_{1-3} , por exemplo metilo, etilo ou n-propilo); A^5 é p-X-Phe (em que X é halogéneo, H, NH_2 , NO_2 , OH ou alquilo C_{1-3}); A^6 é D-Lys, D-Arg, β -Nal, D- β -Nal, D-Trp, D-p-X-Phe (em que X é halogéneo, H, NH_2 , NO_2 , ou alquilo C_{1-3}) ou D-Lys- ϵ -NH-R (em que R é H, uma cadeia linear ou ramificada ou um grupo ciclo-alquilo C_1C_{10} , por exemplo metilo, etilo, isopropilo, heptilo, butilo ou ciclopentilo ou um grupo arilo, por exemplo benzilo, p-Cl-benzilo ou CH_2 -naftilo); A^7 é p-X-Phe (em que X é halogéneo, H, NH_2 , NO_2 , OH, C_2F_5 ou alquilo C_{1-3}), ciclo-hexil-alanina ou Trp; A^8 é Arg, Lys ou Lys- ϵ -NH-R (em que R é H, uma cadeia linear ou ramificada, ou um grupo ciclo-alquilo C_1C_{10} , por exemplo metilo, etilo, isopropilo, heptilo, butilo ou ciclopentilo ou um grupo arilo, por exem

15 OUT 1990

1 plo, benzilo, p-Cl-benzilo ou CH₂-naftilo); A⁹ é Pro; e A¹⁰
é D-Ala-NH₂, Gly-NH₂, D-Ser ou D-Ser-NH₂; com a condição de,
pelo menos, um de A² ou A³ ser D-Phe ou D-Tyr; e ainda
com a condição de, pelo menos, um de A⁶ e A⁸ ser o seguinte:
5 A⁶ ser D-Lys-ε-NH-R (em que R é um grupo ciclo-alquilo
C₁C₁₀); A⁸ deve ser Lys-ε-NH-R (em que R é um grupo ciclo-
-alquilo C₁C₁₀), ou um sal aceitável sob o ponto de vista
farmacêutico. (β-Nal refere-se a β-naftilalanina; quando
nenhuma designação L- ou D- for proporcionada aqui, preten-
10 de-se o isômero L; N-Ac refere-se ao grupo protector N-ace-
til, isto é um grupo acetilo ligado ao resíduo de aminoáci-
do terminal no azoto da amina; halogéneo refere-se a flúor,
cloro ou bromo).

Os decapeptidos preferidos incluem aqueles em
15 que A⁶ é D-Lys-ε-NH-R (em que R é o grupo ciclo-alquilo C₁
-10);

Os outros decapeptidos preferidos são aqueles
em que A¹-A¹⁰ é N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-(ci-
clopentil)Lys-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂;
20 N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-(ciclopentil)Lys-Phe
-(ciclopentil)Lys-Pro-D-Ala-NH₂.

A invenção também descreve os decapeptidos da
seguinte fórmula:
25 N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Arg-Phe-(isopropil)
D-Lys-Pro-D-Ala-NH₂;
N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-(benzil)Lys-Phe-Arg-
-Pro-D-Ala-NH₂;
N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-(Cl-benzil)Lys-Phe-
30 -Arg-Pro-D-Ala-NH₂;
N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-(heptil)Lys-Phe-Arg-
-Pro-D-Ala-NH₂;
N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Arg-Phe-(t-butilme-
til)Lys-Pro-D-Ala-NH₂;
35 N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Arg-Phe-(4-metilben-

15. OUT 1990



- 1 zil) Lys-Pro-D-Ala-NH₂;
N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Arg-Phe-(benzil) Lys-
-Pro-D-Ala-NH₂;
N-acetil-D-β-Nal-D-p-Cl-Phe-D-Trp-Ser-Tyr-D-p-NH₂-Phe-Phe-
5 (isopropil) Lys-Pro-D-Ala-NH₂;
N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-(heptil) Lys-Phe-(hep-
til) Lys-Pro-D-Ala-NH₂;
N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D(1-butilpentil) Lys-
-Phe-(1-butilpentil) Lys-Pro-D-Ala-NH₂.

10

Noutras formas de realização preferidas, uma
quantidade eficaz de um decapeptido terapêutico da invenção
e uma substância ou sal de veículo aceitável sob o ponto de
vista farmacêutico, por exemplo carbonato de magnésio ou
15 lactose, em conjunto, formam uma composição terapêutica pa-
ra inibição da libertação das hormonas sexuais, particular-
mente LH, induzido por LH-RH.

Esta composição pode estar sob a forma de uma pílula, com-
primido, cápsula, líquido ou comprimido de libertação con-
20 trolada para administração oral; um "spray" líquido para ad-
ministração nasal; ou um líquido para administração parente-
ral, tópica, vaginal, rectal, bucal (incluindo sublingual)
ou intraperitonal.

25

Como se utiliza aqui o termo substância ou sais
"aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico" refere-se a
um veículo ou sal que retém a actividade biológica desejada
do composto principal e não provoca quaisquer efeitos toxi-
cológicos indesejados. Exemplos de sais são (a) sais de adi-
30 ção de ácido formados por ácidos inorgânicos, por exemplo,
ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido
fosfórico, ácido nítrico e análogos; e sais formados por á-
cidos orgânicos tais como, por exemplo, ácido acético, áci-
do oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico,
35 ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tânico, ácido pamo-

15.01.1990


1 co, ácido algínico, ácido poliglutâmico, ácido naftaleno-
-sulfónico, ácido naftaleno-di-sulfónico, ácido poligalactú
rónico; (b) sais de adição de bases formados por catiões de
5 metal polivalente tais como zinco, cálcio, bismuto, bário,
magnésio, alumínio, cobre, cobalto, níquel, cádmio e análo-
gos; ou por catião orgânico formado a partir de N,N'-diben-
ziletileno-diamina ou etilenodiamina; ou (c) combinações de
(a) e (b), por exemplo, um tanato de zinco e análogos. As
vias mais apropriadas dependem da utilização, ingrediente
10 activo particular e assunto envolvido.

Uma outra forma preferida para administração é
uma suspensão injectável do peptido com uma matriz poliméri
bioerosiva, biocompatível capaz de sustentar de modo eficaz a
15 libertação do peptido. Outras formas apropriadas são os pep-
tidos/implantes poliméricos, emplastos transdérmicos, em-
plastros de transmucosas (vaginal) e "spray" nasal e compo-
sições utilizáveis com técnicas intoforéticas.

20 Os decapeptidos da invenção são activos na ini-
bição de LH-RH libertação induzida de LH e exibem uma dura-
ção longa de actividade, minimizando deste modo a quantida-
de e frequência de dosagens. Além do mais, o fabrico é rela-
tivamente simples e económico. Em adição, os peptidos têm a
25 vantagem de serem administrados ovalmente, uma propriedade
devido à sua elevada capacidade de liofilização e à sua ca-
pacidade de resistir à degradação enzimática por peptidase.

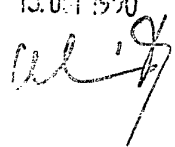
30 Os peptidos da invenção têm D-X-Phe ou D-Tyr em
pelo menos, numa das posições A² ou A³. Tem-se verificado
que, D-X-Phe, D-Trp ou D-Tyr na posição A³ são modificações
de importância particular em termos de actividade, enquanto
D-Phe na posição A² proporciona ainda redução de custos com
35 parado com D-p-X-Phe na posição A² sem perda significativa
comparativa de actividade. A presença de D-Lys-ε-NH-R na

1 posição A⁶ e Lys- ϵ -NH-R na posição A⁸ quando R é um grupo
alquilo ou arilo diminui o efeito irritante do decapeptido.
Presumivelmente isto é devido a uma diminuição observada na
actividade de libertação de histamina. Acredita-se ainda
5 que a presença de Arg na posição A⁵ e D-Tyr na posição A⁶,
conhecida por modificação de Hodgen, também diminui a acti-
vidade de libertação de histamina. A presença de p-X-Phe na
posição A⁷ é também particularmente vantajosa em termos de
actividade.

10

Tem-se verificado que os antagonistas LH-RH, em
geral, e os decapeptidos, em particular, podem ser utiliza-
dos para tratar doentes imuno-repressivos quando administra-
dos como se descreveu atrás. Os antagonistas rejuvenescem o
15 timo, que produz a seguir células T para substituir as célu-
las T perdidas como resultado da imunodeficiência.

Os peptidos antagonistas da invenção podem ser
utilizados para tratar algumas formas de cancros derivados
20 de hormonas incluindo os cancros da mama, próstata e ová-
rios. Algumas condições benignas resultantes de uma super-
produção de hormonas sexuais podem beneficiar do tratamento
com um peptido da invenção, por exemplo, hiperplasia prostá-
tica benigna, endometriose ou liomas. Descobriu-se também
25 que os antagonistas LHRH da invenção podem exibir um efeito
antitumoral directo nas linhas de células cancerosas da ma-
ma (poe exemplo MCF-7). Outras utilizações incluem mas não
se limitam ao seguinte: contracepção feminina; prevenção ou
atraso da ovulação; fim da gravidez em animais domésticos e
30 de estimulação; indução de parto; sincronização da ovulação;
supressão do estro; promoção no desenvolvimento em animais
fêmeas; indução das regras menstruais, luteolise; terapia
do síndrome prémenstrual; terapia da puberdade precoce; te-
rapia do leiomioma uterino; antes do primeiro trimestre a-
35 bortivo; terapia de endometriose; terapia para tumores e

15. OUT 1990


1 quistos mamários; terapia da doença/síndrome do ovário poli-
cístico; terapia do carcinoma uterino; terapia da hipertro-
fia prostática benigna e do carcinoma prostático; contracep-
ção masculina; terapia da doença resultante da hormona gona-
5 dal excessiva em qualquer sexo; castração funcional em ani-
mais macho de produção de alimento; supressão da descarga
sanguínea na fase pro-sio em cães; vantagens de diagnóstico
tais como predisposição para osteoporose; prevenção da hi-
per-estimulação do ovário; preservação da fertilidade em ca-
10 so de quimioterapia ou irradiação; e outras utilizações co-
mo descreve Vickery. B.H., Endocrine Reviews, 7:115 (1986)
que é totalmente incorporado por referência aqui.

15 Outros aspectos e vantagens da invenção apare-
cem na seguinte descrição das formas de realização preferi-
das e nas reivindicações.

Descrição das formas de realização
preferidas

20 Antes de descrever a estrutura, síntese, teste
e utilização das formas de realização preferidas da inven-
ção, descrevem-se primeiro os desenhos.

Desenhos

25 Figura 1 é uma curva de crescimento do tumor ma-
mário do rato MXT em resposta à BIM-21003 agonista e BIM-
-21009 antagonista.

30 Fig.2 é uma curva de crescimento do tumor mamá-
rio do rato MTX em resposta às diferentes doses do BIM-21009
antagonista.

35 Fig.3 é uma curva de crescimento do tumor mamá-
rio do rato MXT em resposta a diferentes doses de BIM-21009.

15.07.1990


1 Fig. 4 é uma curva de crescimento do adenocarci
noma mamário MT/W9A-S em resposta a BIM-21009.

5 Fig. 5 é uma curva de crescimento do tumor da
próstata humano DU145/01 em resposta a BIM-21009.

10 Fig. 6 é uma curva de crescimento do tumor da
próstata R3327 de Dunning em ratasanas em resposta a BIM-
-21009.

15 Fig. 7 é uma curva de crescimento do tumor da
próstata em ratasanas 2PR-121D(1)/S em resposta a BIM-21003
e BIM-21009.

20 Fig. 8 é uma curva de crescimento do adenocarci
noma da próstata em ratasanas 2PR-121D(1)/R em resposta a
BIM-21009.

Estrutura

25 Os decapeptidos da invenção têm a fórmula geral
descrita atrás do Resumo da invenção. Têm todos um grupo a-
cetilo na extremidade amino terminal em adição a Ser na po-
sição 4. A substituição de substituintes não naturais nas
posições outras que não A², A³ e A⁷ pode ser utilizada para
modificar as propriedades do composto e não evita que os
substituintes A², A³ e/ou A⁷ proporcionem os seus efeitos
benéficos.

30 Os decapeptidos proporcionam-se sob a forma de
sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico. Exemplos
de sais preferidos são os que possuem ácidos orgânicos acei-
táveis sob o ponto de vista farmacêutico, por exemplo, áci-
do acético, ácido lático, ácido maleico, ácido cítrico, á-
cido málico, ácido ascórbico, ácido succínico, ácido benzoí

15 JUL 1990



1 co, ácido salicílico, ácido metano-sulfônico, ácido tolueno-
-sulfônico, ácido trifluoro-acético ou ácido pamoico, bem
como, ácidos poliméricos tais como ácido tânico ou carboxi-
metilcelulose e sais com ácidos inorgânicos tais como os á-
5 cidos hidro-hálicos, por exemplo, ácido clorídrico, ácido
sulfúrico ou ácido fosfórico.

Síntese

10 Exemplo 1

A síntese de N-Ac-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-
-D-Arg-Phe-Arg-Pro-D-Ala-descreve-se a seguir.

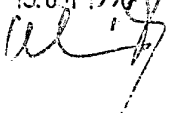
15 Outros decapeptidos da invenção podem ser prepa-
rados fazendo modificações apropriadas do método sintético
seguinte:

20 O primeiro passo é a preparação de resina de N-
-Acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-benzil-Ser-Tyr-D-tosil-Arg-Phe-
-tosil-Arg-Pro-D-Ala-benzidrilamina como se segue.

A resina de benzidrilamina-polistireno (Bachem,
Inc.)(1,00 g, 0,3 mole) sob a forma de ião cloreto é coloca-
25 da no vaso de reação de um sintetizador de Beckman 990B de
peptidos para realizar-se o seguinte ciclo de reação:

(a) CH₂Cl₂; (b) 33% de ácido trifluoro-acético em CH₂Cl₂
(2 vezes de 1 em 1 minuto e 25 em 25 minutos); (c) CH₂Cl₂;
(d) etanol; (e) CH₂Cl₂; (f) trietilamina em CHCl₃; e (g)
30 CH₂Cl₂.

A resina neutralizada é agitada com alfa-t-buto-
xicarbonil (Boc)-D-Ala e diisopropilcarbodiimida (1,5 mmole)
em CH₂Cl₂ durante 1 hora e a resina de aminoácido resultan-
35 te é depois ciclizada através dos passos (a) a (g) no pro-

15 JUL 1990


1 grama de lavagem anterior..Os seguintes aminoácidos (1,5mmole) são depois ligados sucessivamente pelo mesmo processo: Boc-Pro, Boc-Tosil-Arg-, Boc-Phe, Boc-Tosil-D-Arg, Boc-Tyr, Boc-benzil-Ser, Boc-D-Phe e Boc-D- β -Nal.

5

Após remoção do grupo Boc N-terminal, a resina de peptido-benzidrilamina é neutralizada e acetilada pelo tratamento com ácido acético 5% em CH_2Cl_2 . A resina completa é depois lavada com CH_3OH e seca ao ar.

10

A partir da resina anterior prepara-se N-Ac-D- β -Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Arg-Phe-Arg-Pro-D-Ala como se segue.

15

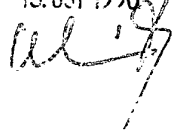
Agita-se a 0°C durante 45 minutos uma mistura da resina de decapeptido anterior (1,85 g, 0,5 mmole) e uma solução de 4 ml de anisol, 100 mg de ditiotreitol e 36 ml de fluoreto de hidrogénio. Evapora-se o excesso de fluoreto de hidrogénio rapidamente sob uma corrente de nitrogénio seco, após o que o peptido livre é precipitado e lavado com éter.

20

O peptido é depois dissolvido num volume mínimo de 50% de ácido acético e elutriado numa coluna (2,5 x 100 mm) de Sefadex G-25. As fracções contendo o componente principal, como determinado pela absorção u.v. e cromatografia de camada fina (tlc) são reunidas e evaporadas até um volume pequeno sob vácuo. Esta solução é aplicada a uma coluna (2,5 x 50 cm) de octadecilsilano-sílica (Whatman LRP-1, 15-20 μm de tamanho malha) que é elutriada com um gradiente linear de 15-50% de acetonitrilo em 20% de ácido acético em água. As fracções são examinadas por tlc e cromatografia líquida analítica de alta resolução (hplc) e reunidas para proporcionar uma pureza máxima. A liofilização repetida da solução a partir da água proporciona 117 mg do produto sob

30

35

15. OUT 1990


1 a forma de um pó branco com penugem.

Verifica-se que este material é homogêneo através de hplc e tlc. A análise de aminoácidos de um hidrolisato ácido confirma a composição do decapeptido.

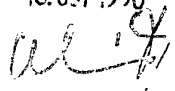
Preparou-se N-Ac-D- β -Nal-D-p-Cl-Phe-D-Trp-Ser-Phe-D-Arg-Leu-Arg-Pro-D-Ala de acordo com a síntese descrita atrás, substituindo Boc-D-p-Cl-Phe por Boc-D-Phe na posição A², Boc-D-Trp por Boc-D-Phe na posição A³, Boc-Phe por Boc-Tyr na posição A⁵ e Boc-Leu por Boc-Phe na posição A⁷.

Preparou-se N-Ac-D- β -Nal-D-p-Cl-Phe-D-Tyr-Ser-Phe-D-Arg-Leu-Arg-Pro-D-Ala de acordo com a síntese descrita atrás, substituindo Boc-D-p-Cl-Phe por Boc-D-Phe na posição A², Boc-D-Tyr por Boc-D-Phe na posição A³, Boc-Phe por Boc-Tyr na posição A⁵ e Boc-Leu por Boc-Phe na posição A⁷.

Preparou-se N-Ac-D- β -Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Phe-D-Arg-Leu-Arg-Pro-D-Ala de acordo com a síntese descrita atrás substituindo Boc-Phe por Boc-Tyr na posição A⁵ e Boc-Leu por Boc-Phe na posição A⁷.

Exemplo 2

Para sintetizar peptidos possuindo D-Lys- ϵ -NH-R na posição A⁶ ou Lys- ϵ -NH-R na posição A⁸, onde R é um grupo alquilo ou arilo, utiliza-se o método descrito em Coy et al., Patente Americana S.N. 879 348 pedida em 27 de Junho de 1986 incorporada aqui como referência. Em geral, a síntese envolve a reacção de um composto contendo um grupo carbonilo por exemplo, acetona ou formaldeído com um polipeptido ligado a resina possuindo uma subunidade Lys ou D-Lys na presença de cianoboro-hidreto de sódio. O composto contendo carbonilo reage com um grupo livre ϵ -NH₂ na cadeia

15.07.1990


1 lateral da subunidade Lys ou D-Lys; a reacção com acetona produz uma porção ϵ -N-isopropilo em que a reacção com formaldeído produz uma porção ϵ -N-metil.

5 A síntese de Ac-D- β -Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-(isopropil)Lys-Phe-(isopropil)Lys-Pro-D-Ala-NH₂ está descrita a seguir.

10 A resina de Ac-D- β -Nal-D-Phe-D-Phe-Ser(Bzl)-Tyr-D-Lys(FMOC)-Phe-D-Lys(FMOC)-Pro-D-Ala-benzidrilamina(Bzl = benzil; FMOC = fluorenilmetiloxicarbonil) preparou-se por métodos padrão num sintetizador de Beckman 990B automático de peptidos utilizando TFA a 33% (ácido trifluoroacético) para remoção dos grupos protectores α -Boc. Os grupos protectores ϵ -FMOC nos resíduos Lys são completamente estáveis para estas condições ácidas e para os passos de neutralização subsequentes com 10% de trietilamina em clorofórmio. A resina foi depois tratada com 50 ml de uma solução a 50% de piperidina DMF (dimetilformamida) durante cerca de 12 horas para remover os grupos protectores FMOC dos resíduos Lys.

25 Para se fazer reagir os grupos livres ϵ -amino dos resíduos Lys, a resina (0,25 mmole) foi misturada com 5 ml de acetona e 1 mmole de cianoboro-hidreto de sódio em DMF/1% de ácido acético adicionado. A mistura de resina foi depois agitada até se tornar negativa para a reacção de ninidrina (cerca de 3 horas); a reacção de ninidrina negativa indicou que os grupos ϵ -amino livres se converteram em grupos N-isopropil amino.

30 A resina foi depois clivada a partir do suporte por tratamento com HF/anisol e purificada sob condições padrão para produzir o polipeptido desejado.

35 Ac-D-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Lys(isopropil)-

15.05.1990

al. 9

- 1 Phe-Arg-Pro-D-Ala-amida; N-acetil-D- -Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-
Tyr-D-(ciclopentil)Lys-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂; e N-acD-(ci-
clopentil)Lys-Phe-(ciclopentil)Lys-Pro-D-Ala-NH₂ são prepa-
5 rados de um modo análogo utilizando modificações apropria-
das do processo descrito atrás.

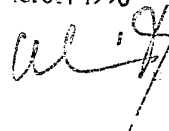
Teste

- 10 Um decapeptido da invenção pode ser testado pe-
la sua capacidade de reduzir o tamanho de um ou mais dos se-
guintes tumores dependentes de hormonas: o tumor da mama hu-
mano MCF-7, o tumor ductal papilar de murina MXT ou ratasa-
na MT/W9A-S e o adenocarcinoma da próstata R3327 de Dunning
de ratasana ou DU/145 humano. Os números de código BIM-2000
15 utilizados nas Tabelas e Figuras referem-se aos seguintes
decapeptidos:

- 20 BIM-21003: p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg
-Pro-Gly-NH₂
BIM-21006: p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Phe-Leu-Arg
-Pro-Gly-NH₂
BIM-21009: N-Ac-D-β-Nal-D-P-Cl-Phe-D-Phe-Ser-
-Tyr-D-Arg-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂
BIM-21011: N-Ac-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-
25 -Arg-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂
BIM-21023: N-Ac-D-β-Nal-D-p-Cl-Phe-D-Trp-Ser-
-Tyr-D-Arg-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂
BIM-21024: N-Ac-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Phe-D-
-Arg-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂
BIM-21025: N-Ac-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-
30 -Lys(benzil)-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂
BIM 21026: N-Ac-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-
-D-Lys(ciclopentil)-Phe-Lys(ciclo-
pentil)-Pro-D-Ala-NH₂

35

15.01.1990



1 BIM-230140: D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-
-Thr-NH₂
BIM-21032: N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-
-Tyr-D-(ciclopentil)Lys-Phe-Arg-Pro
5 -D-Ala-NH₂;

Tumor Mamário Humano MCF-7

10 Os ratinhos fêmea CDF-1 foram implantados com o tumor mamário humano (MCF-7) sob as cápsulas dos rins no dia 0. No dia 1, os animais foram injectados por via subcutânea com BIM-21009 uma vez por dia durante 6 dias. O grupo de controle negativo recebeu veículo apenas e o de controle positivo foi ovariectomizado no dia 0.

15 O Quadro 1 apresenta os resultados da experiência 1, em que as injeções subcutâneas diárias de BIM-21009 (25µg) durante um período de 6 dias decresceram o tamanho do tumor para 28% (a menos que se estabeleça de outro modo, os resultados em percentagem são relativos ao controle tratado com veículo). Este efeito foi semelhante ao obtido por ovariectomia (-33%).

25 O Quadro 2 apresenta os resultados da experiência 2, em que as injeções subcutâneas diárias de BIM-21009 (10 µg) durante um período de 6 dias diminui o tamanho do tumor para 28% do tamanho do tumor de controle tratado com o veículo. Mesmo para uma dose de 1 µg, BIM-21009 reduziu o tamanho do tumor para 53% do tamanho do tumor de controle. Estes efeitos foram mais fracos do que os efeitos de ovariectomia sobre o tamanho do tumor (redução do tumor para 5% do tamanho de controle).

30 O Quadro 2 também mostra que, para uma dosagem elevada os superagonistas LHRH BIM-21003 e BIM-21006 não insensibilizam os receptores LHRH da pituitária do rato.
35

15.03.1979



O Quadro 3 apresenta os resultados da experiência 3 em que as injeções subcutâneas diárias (25 µg) dos antagonistas LHRH BIM-21023, BIM-21024, BIM-21025 e BIM-21026 durante um período de 6 dias dão origem a um decréscimo da gama do tamanho do tumor de 29%, 11%, 12% e 8%, respectivamente, do tamanho de controle.

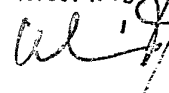
Um peptídeo de controle que é uma somatostatina octapeptídeo análogo, Somatuline (BIM-23014C), para doses de 2 µg, 10 µg ou 50 µg reduziu o tamanho do tumor para 45%, 32% e 10%, respectivamente. O peptídeo BIM-21032 pode também ser tratado no sistema como se mostrou atrás.

Carcinoma Ductal Papilário Mamário de
Murina MXT ou Adenocarcinoma de Rata-
sana MT/W9A-S

Os ratinhos fêmea ou ratasanas foram implantados por via subcutânea com carcinoma papilário ductal mamário de murina MXT ou com adenocarcinoma mamário de ratasana MT/W9A-S, respectivamente, no dia 0 e injectou-se uma vez diariamente por via subcutânea com várias doses de BIM-21009 do dia 1 ao dia 37. Os grupos de controle negativo receberam o veículo apenas e os de controle positivo foram ovariectomizados 5 dias antes de implantação do tumor.

O Quadro 4 e a Fig. 1 mostram que BIM-21009 induziu um efeito inibitório de crescimento de tumor altamente significativo (-95%) sobre o carcinoma mamário sensível ao estrogênio MXT no ratinho que foi melhor do que o efeito de ovariectomia sobre o crescimento do tumor (-84%). A Fig. 1 também mostra o efeito estimulante do agonista BIM-21003 sobre o crescimento do tumor visto que os receptores LHRH da pituitária do ratinho não são insensibilizados pelo superagonista LHRH quando em oposição para ratasanas ou humanos.

15. OUT 1990



O Quadro 5 mostra que BIM-21009 induziu uma redução considerável no peso do útero (-27%) comparável à dos animais ovariectomizados (-85%). Os pesos dos ovários e da pituitária foram também significativamente reduzidos (-47% e -35%, respectivamente). A Fig. 2 mostra que BIM-21009 para uma dose de 25 µg reduziu de modo significativo o tamanho do tumor mas não a extensão de controle de castração e mostra que a dose de BIM-21009 é proporcional ao tamanho de redução do tumor. A Fig. 3 mostra que o tumor mamário de murina MXT sensível ao estrogênio escapa aos efeitos inibitórios de crescimento de castração e que BIM-21009 para uma dose de 50 µg reduz o tamanho de tumor e retarda deste modo o escape. A Fig. 4 mostra que o adenocarcinoma mamário de ratasana sensível ao estrogênio MT/W9A escapa aos efeitos de ovariectomia e que uma dose muito elevada de BIM-21009 (250 µg) reduz o tamanho de tumor e retarda deste modo o escape.

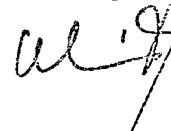
Adenocarcinoma da Próstata R3327 de
Dunning da Ratasana ou Humano DU/145

Implantaram-se ratinhos machos nús atímicos por via supercutânea com xeno-enxertos do tumor da próstata humana DU/145 e ratasanas de Copenhaga masculinas por via subcutânea com o tumor da próstata da ratasana de Dunning R3327. Os grupos de controle negativos receberam apenas veículos e os de controle positivo foram castrados no 3º dia ou 99º dia pós-implante, para o tumor humano ou de ratasana, respectivamente.

Os níveis de testosterona de plasma foram determinados nos animais na altura do sacrifício. Os resultados na Fig. 5 mostram que, no dia 33 pós-implante, BIM-21009 para uma dose de 12,5 µg diariamente durante 30 dias reduziu de modo significativo o tamanho médio do tumor da próstata humana, mesmo embora o tumor não seja sensível a castração.

Os resultados no Quadro 6 e Fig. 6 mostram que BIM-21009

15.03.1990



1 administrado primeiro no 99º dia pós-implante e depois dia-
riamente, por via subcutânea, durante 68 dias a animais to-
lerando bem, estabeleceu o desenvolvimento dos tumores da
próstata de Dunning R3327, inibiu o crescimento de tumor em
5 41% na dose mais elevada testada (20 µg/ratasana).

Os níveis de testosterona de plasma neste dois grupos foram
nulos enquanto que para uma dose mais baixa (5 µg/ratasana)
os níveis de hormona foram semelhantes aos observados nos
grupos tratados com veículo (0,87 µg/ml e 0,71 µg/ml, res-
pectivamente); não se verifica nenhum efeito significativo
10 no crescimento do tumor para esta dose.

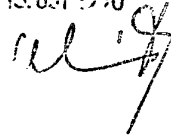
Os resultados no Quadro 7 mostram que BIM-21009
para uma dose de 20 µg reduziu o peso de toda a próstata,
15 da próstata ventral e dos testes (-85%, -53% e -68%, respec-
tivamente).

Os resultados no Quadro 8 mostram que , quando
BIM-21009 foi em primeiro lugar administrado mais cedo às
20 ratasanas de Copenhaga tolerando o tumor da próstata R3327,
isto é, em 15 dias em vez de 99 dias pós-implante (a castra-
ção de controle foi também realizada 15 dias pós-implante)
o tamanho do tumor foi reduzido até uma extensão maior do
que o do grupo de controle de castração 96 dias pós-implan-
te.
25

Nas Figs. 7 e 8, administrou-se BIM-21009 diariamente duran-
te 10 a 30 dias pós-implante do tumor.

Os resultados mostram que os tumores da próstata da ratasa-
na sensível ao androgeno (2PR-121D(1)/S) e resistente ao an-
drogeno (2PR-121D(1)/R) respondem a BIM-21009 para uma dose
30 de 50 µg por redução no tamanho do tumor. Esta redução é de
um grau maior do que o observado para o grupo de controle
de castração.

35

15 JUN 1970


1

Utilização

5

Quando administrados a um mamífero (por exemplo por via oral, intravenosa, parenteral, nasal ou através de supositório) os decapeptidos são eficazes na inibição da liberação de LH induzido por LH-RH.

10

Os decapeptidos da invenção podem ser utilizados para o tratamento da puberdade precoce, de tumores dependentes de hormona (por exemplo, tumores nos testículos, nos ovários, na mama, prostáticos malignos e benignos), hirsutismo, acne, amenorreia (por exemplo, amenorreia secundária), endometriose e doenças císticas mamárias e de ovários; o decapeptido particular descrito atrás é particularmente eficaz na prevenção do crescimento de tumores mamários. Os decapeptidos podem também ser utilizados para regular a hormona (LH) de luteinização de gonadotropina da menopausa humana e hormona estimuladora de folículo (FSH) durante os períodos de perimenopausa e pós-menopausa na mulher.

20

Os decapeptidos podem também ser utilizados como contraceptivos em fêmeas e como um abortivo.

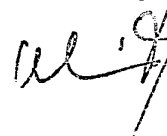
25

Em geral, para as utilizações descritas atrás, os decapeptidos podem estar em quantidades compreendidas entre 0,001 e 5 mg/Kg de peso de corpo. De preferência, para terapia humana, o ingrediente activo será administrado na gama compreendida entre cerca de 0,01 e 1 mg/Kg/dia, de preferência 25-250 mcg/Kg/dia; e para terapia animal, o ingrediente activo será administrado na gama compreendida entre 0,1 e 1 mg/Kg/dia. Esta administração pode ser acompanhada por uma simples administração, por distribuição durante várias aplicações ou por libertação lenta com vista a atingir os resultados mais eficazes. De preferência, para a interrupção do calor ou prevenção da gravidez em animais, a dose está compreendida entre cerca de 1 a 10 mg/Kg, administrada

30

35

15 JUN 1970



1 como uma única dose.

5 A dose exacta e o regimen de administração destes compostos e composições dependem necessariamente das necessidades do assunto individual a ser tratado, tipo de tratamento, e grau de aflição ou necessidade. Em geral, a administração parenteral necessita de dosagem inferior à dos outros métodos de administração que são mais dependentes da absorção.

10

Os decapeptidos e os antagonistas LH-RH em geral, podem também ser utilizados para tratar doentes imuno-deprimidos visto que a castração química pode restaurar o timo e depois estimular o sistema imune. Exemplos de antagonistas adicionais LH-RH são descritos em Coy, U.S. Pat. nº 4 647 653, incorporada aqui por referência e Coy et al., U.S. Pat. nº 4 431 635, previamente incorporada por referência. Os antagonistas LH-RH rejuvenescem o timo quando administrados como se descreveu atrás.

20

As composições podem ser administradas convenientemente sob a forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer dos métodos bem conhecidos na técnica farmacêutica, por exemplo, como se descreveu em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA., 1970. As formulações para administração parenteral podem conter como excipientes comuns água esterilizada ou soluções salina, alquileno glicóis tais como propileno glicol, polialquileno glicóis tais como polietileno glicol, óleos de origem vegetal, naftalenos hidrogenados, e análogos. Formulações para administração vaginal ou rectal por exemplo, supositórios, podem conter como excipientes, por exemplo, polialquileno glicóis, vaselina, manteiga de cacau e análogos. As formulações para administração nasal podem ser sólidas e conter como excipientes, por exemplo, lactose ou dex-

35

1 trano ou podem ser aquosas ou soluções oleosas para adminis-
tração sob a forma de gotas nasais ou "spray" com contador.
Para administração bucal os excipientes típicos incluem açú-
cares, estearato de cálcio, estearato de magnésio, amido
5 prégelatinado e análogos.

É particularmente preferido a administração na-
sal dos nona-decapeptidos. A absorção através da membrana
da mucosa nasal é aumentada através de ácidos tensioactivos
10 tais como por exemplo, ácido glicocólico, ácido cólico, áci-
do taurocólico, ácido colânico, ácido etocólico, ácido deso-
xicólico, ácido chenodesoxicólico, ácido de-hidrocólico e á-
cido glicodeoxi-cólico.

15 Um ou mais dos ácidos ou sais tensioactivos,
mas de preferência, um único sal ácido aceitável sob o pon-
to de vista farmacêutico pode ser adicionado ao antagonista
LHRH em solução ou pó. Sais tensioactivos aceitáveis sob o
ponto de vista farmacêutico são os sais que retêm o fenóme-
20 no do aumento de absorção do peptido, bem como das caracte-
rísticas tensioactivas dos compostos e que não são pernicio-
sas para o assunto em questão ou por outro lado contra-indi-
cadas. A quantidade de agentes tensioactivos utilizados pa-
ra a prática desta invenção serão algumas quantidades que
25 aumentam a absorção dos peptidos LHRH acima dos outros agen-
tes tensioactivos que também podem aumentar a absorção dos
peptidos até um certo grau. Verificou-se que essa quantida-
de está muitas vezes compreendida na gama entre 0,2 e 15%,
muitas vezes entre 0,2 e 5% em peso/volume, da solução. Pre-
30 fere-se que o agente tensioactivo esteja presente numa quan-
tidade compreendida entre cerca de 0,5 e 4% em peso/volume,
de modo conveniente 1% em peso/volume, de preferência 2% em
peso/volume.

35 Outras formas de realização encontram-se nas se-
guintes reivindicações.

QUADRO IEFEITO DE BIM-21009 SOBRE O CRESCIMENTO
DO CARCINOMA MAMARIO HUMANO MCF-7 EM RA
TOS

<u>Grupo</u>	<u>Dose Diária</u> <u>por Rato</u>	<u>Variacão no Ta-</u> <u>manho do Tumor (mm)</u>	<u>% Variacão</u>
Veículo	--	0.60 ± 0.54	--
Ovariecto- mizado	--	$-0.20 \pm 0.46^{**}$	-33.33
BIM-21009	25ug	$-0.17 \pm 0.75^{*}$	-28.33

* P < 0.05

** P < 0.01

15.04.1990
TESTE DOS AGONISTAS E ANTAGONISTAS LH-RH EM FUNÇÃO DA TRANSPLANTAÇÃO DO TUMOR
DO SEIO HUMANO MCF-7 ESTABELECIDO NO 6º DIA DO ENSAIO DA CÁPSULA SUBRENALQUADRO 2

<u>Grupo</u> <u>Nº</u>	<u>Nº de</u> <u>Animais</u>	<u>Tratamento</u> ¹	<u>Variação Média</u> <u>do Tamanho do tu</u> <u>mor (média ± S.D.)</u>	<u>%Teste/</u> <u>controle</u> <u>le</u>	<u>FBW3</u> <u>IBW</u>
1	10	Controle intacto, 0,2ml/inj.	2.00 ± 1.47	--	0.97
2.	9	OVEXED(dia 0) controle do veiculo	0.10 ± 0.80	5	0.99
3.	10	BIM-21003, 100 ng/inj.	2.44 ± 0.98	122	1.04
4.	10	BIM-21006, 100 ng/inj.	1.25 ± 1.39	63	0.99
5.	10	BIM-21009, 10 ng/inj.	0.56 ± 0.85*	28	0.99
6.	10	BIM-21009, 1 ng/inj.	1.06 ± 0.83*	53	0.98
7.	10	BIM-21011, 15 ng/inj.	0.069 ± 0.61*	34	0.99
8.	10	BIM-21011, 10 ng/inj.	1.44 ± 1.21	72	0.99
9.	10	BIM-21011, 1 ng/inj.	1.65 ± 0.71	83	0.98

1. Administraram-se compostos de teste e de controle s.c. no conjunto QD0-5

2. Variação no tamanho do tumor (dia 0-dia 6) em unidades micrométricas oculares (omu). Significado da diferença do controle intacto: * p < 0.05

3. FBW/IBW = peso do corpo final/peso do corpo inicial

35 30 25 20 15 10 5 1

ACTIVIDADE COMPARATIVA DA SOMATULINA (BIM-230140) E ANTAGONISTAS LH-RH (BIM-21000) TESTADOS EM FUNÇÃO DA TRANSPLANTAÇÃO DO TUMOR DO SEIO HUMANO ESTABELECIDO MCF-7 NO 6º DIA DO ENSAIO DA CÁPSULA SUB-RENAL

Grupo Nº	Nº de Animais	Tratamento ¹	Variação Média do Tamanho do tu- mor (média ± S.D.)	%Teste/ Contro- le	FBW3 IBW
-------------	------------------	-------------------------	---	--------------------------	-------------

Grupo Nº	Nº de Animais	Tratamento ¹	Variação Média do Tamanho do tu- mor (média ± S.D.)	%Teste/ Contro- le	FBW3 IBW
1	10	Controle intacto, 0.2ml/inj.	3.65 ± 2.06	--	1.02
2	9	Ovexed (Dia 0)-controle, 0.2ml/inj.	1.44 ± 0.55 ^{***}	40	0.99
3	10	BIM-230140, 50 ug/inj.	0.35 ± 0.78 ^{***}	10	0.98
4	10	BIM-230140, 10 ug/inj.	1.15 ± 0.95 ^{***}	32	0.99
5	10	BIM-230140, 2 ug/inj.	1.65 ± 1.00 ^{***}	45	1.00
6	10	BIM-21023, 25 ug/inj.	1.05 ± 1.13 ^{***}	29	1.01
7	10	BIM-21024, 25 ug/inj.	0.04 ± 0.77 ^{***}	11	1.00
8	10	BIM-21025, 25 ug/inj.	0.45 ± 0.76 ^{***}	12	0.97
9	10	BIM-21026, 25 ug/inj.	0.30 ± 0.46 ^{***}	8	1.01

QUADRO 3

1 Administrou-se veículo de controle e grupos BIM-230140 s.c. sobre o conjunto b.i.d. QD0-5. Todos os materiais de teste foram administrados s.c. sobre o conjunto QD0-5

2 Variação do tamanho do tumor(dia 0 - dia 6) em unidades micrométricas oculares(omu). Significado da diferença entre o controle intacto: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

3 FBW/IBW = Peso do corpo final/Peso do corpo inicial

62768

Ref: Biomeasure-LHRH Antagonist II CIP 4
(00537/019006)

15.03.1990
ulig

15.09.1960

*al*1
5
10
15
20
25
30
35EFEITO DE BIM-21009 SOBRE O CRESCIMENTO
DO CARCINOMA MAMÁRIO MIXT NOS RATOS

Grupo	Dose Diária por Rato	Tamanho do Tumor (mm)		Aumento do Tumor	% Variação
		Dia 14	Dia 38		
Veículo	--	2.2 [±] 0.64	10.9 [±] 1.63	8.7	--
Ovariecto- mizado	--	0	1.4 [±] 0.70 ^{***}	1.4	-83.91
BIM-21009	25 ug	1.8 [±] 0.66	2.2 [±] 0.64 ^{***}	0.4	-95.40

QUADRO 4

*** p < 0.001

15.04.1990
*W*1
5
10
15
20
25
30
35EFEITO DE BIM-21009 SOBRE OS ÓRGÃOS ENDOCRINOS DOS RATOS
TRANSPORTADORES DE TUMOR MXTPesos dos Órgãos (mg)OváriosÚteroGlândulas Su-
pra-renaisPituitáriaGrupo15.46[±]0.7476.97[±]11.408.10[±]0.542.31[±]0.23

Veículo

--

11.25[±]0.67^{***}6.78[±]0.15^{*}2.13[±]0.14Ovariecto-
mizado

-85.38

-16.30

-7.79

% Variação

BIM-210098.14[±]0.58^{***}17.69[±]1.00^{***}8.90[±]0.271.50[±]0.08

25 ug/dia

-47.35

-77.02

0

-35.06

% Variação

^{*} p < 0.05^{**} p < 0.01^{***} p < 0.001

15.08.1990

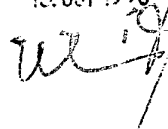
Handwritten signature

QUADRO 6

EFEITO DE BIM-21009 SOBRE O CRESCIMENTO DO ADENOCARCINOMA
DA PRÓSTATA R3327 EM RATOS

<u>Grupo</u>	<u>Dose Diária</u> <u>por Ratasana</u>	<u>Tamanho do Tumor (mm)</u> <u>Dia 99</u>	<u>Tamanho do Tumor (mm)</u> <u>Dia 165</u>	<u>Aumento do</u> <u>Tumor</u>	<u>% Variação</u>
Veículo	--	11.80 [±] 2.33	34.00 [±] 5.05	22.20	--
Castrado	--	15.40 [±] 1.66	21.80 [±] 2.09	6.40	-71.17
BIM-21009	20 ug	11.00 [±] 2.51	24.10 [±] 2.22	13.100	-40.99
	5 ug	11.20 [±] 1.29	28.90 [±] 3.48	17.70	-20.27

15. OUT 1990

QUADRO 7EFEITO DE BIM-21009 SOBRE ORGÃOS ENDOCRINOS EM RATAS ANAS
TRANSPORTADORAS DO TUMOR DA PRÓSTATA R3327Grupos Tratados

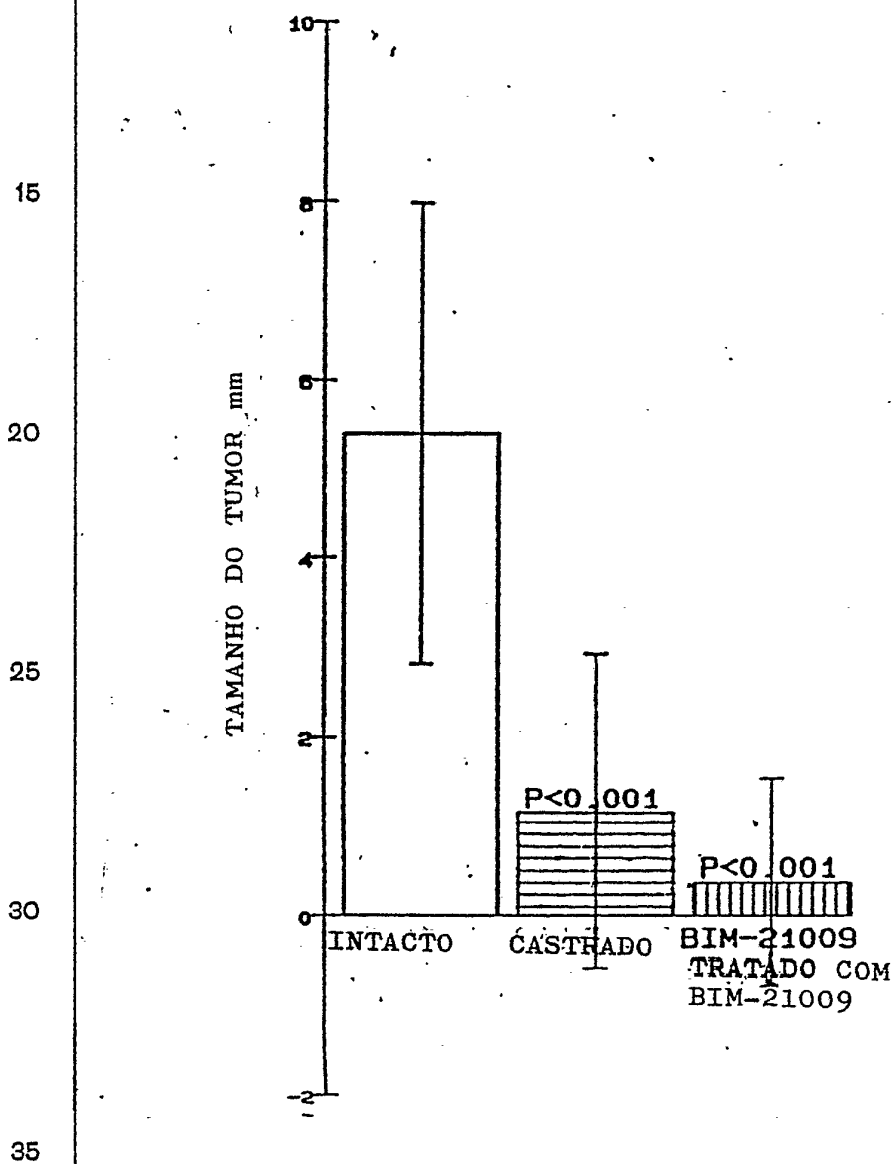
<u>Pesos dos órgãos</u>	<u>Veículo</u>	<u>Castrado</u>	<u>BIM-21009 20 ug</u>	<u>BIM-21009 5 ug</u>
<u>Próstata Total (mg)</u>	265 [±] 48	29 [±] 4	41 [±] 19	245 [±] 31
<u>% de Variação</u>	--	-89.06	-84.53	-7.55
<u>Próstata Ventral (mg)</u>	55 [±] 17	15 [±] 3	26 [±] 8	64 [±] 9
<u>% de Variação</u>	--	-72.73	-52.73	+16.36
<u>Testes (g)</u>	2.03 [±] 0.17	--	0.65 [±] 0.43	1.8 [±] 0.1
<u>% de Variação</u>	--	--	-67.98	-11.33
<u>Glândulas Supra- -Renais (mg)</u>	34 [±] 2	29 [±] 4	33 [±] 1	32 [±] 2
<u>% de Variação</u>	--	-14.71	-2.94	-5.88
<u>Pituitária (mg)</u>	7.3 [±] 0.6	7.2 [±] 0.9	6.5 [±] 0.2	7.0 [±] 0.8
<u>% de Variação</u>	--	-1.37	-10.96	-4.11

15 JUL 1990

*mlg*QUADRO 8

TUMOR DA PRÓSTATA

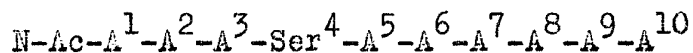
TAMANHO DO TUMOR 96 DIAS APÓS A IMPLANTAÇÃO DO TUMOR
AX-BIM-21009 INICIADO 15 DIAS APÓS A IMPLANTAÇÃO
CASTRAÇÃO NO 15º DIA APÓS A IMPLANTAÇÃO



15 OUT 1980

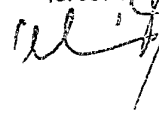
- R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

1ª. - Processo para a preparação de decapeptí-
dos da fórmula:



em que cada A^1 , A^2 e A^3 independentemente é D- β -Nal, D-p-X-
-Phe (em que X é halogéneo, H, NH_2 , OH ou alquilo C_{1-3}); A^5
é p-X-Phe (em que X é halogéneo, H, NH_2 , NO_2 , OH ou alquilo
 C_{1-3}); A^6 é D-Lys, D-Arg, β -Nal, D- β -Nal, D-Trp, D-p-X-Phe
(em que X é halogéneo, H, NH_2 , NO_2 ou alquilo C_{1-3}) ou D-
-Lys- ϵ -NH-R (em que R é H, uma cadeia linear ou ramificada
ou um grupo ciclo-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ ou um grupo arilo); A^7 é
p-X-Phe (em que X é halogéneo, H, NH_2 , NO_2 , OH, C_2F_5 ou al-
quilo C_{1-3}), ciclo-hexilalanina ou Trp; A^8 é Arg, Lys ou
Lys- ϵ -NH-R (em que R é H, uma cadeia linear ou ramificada
ou um grupo ciclo-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ ou um grupo arilo); A^9 é
Pro; e A^{10} é D-Ala- NH_2 , Gly- NH_2 , D-Ser, ou D-Ser- NH_2 ; com a
condição de , pelo menos, um de A^2 ou A^3 ser D-Phe ou D-Tyr;
e ainda com a condição de , pelo menos, um de A^6 e A^8 ser o
seguinte: A^6 ser D-Lys- ϵ -NH-R (em que R é um grupo ciclo-
-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$); A^8 ser Lys- ϵ -NH-R (em que R é um grupo ci-
clo-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$) ou um sal aceitável sob o ponto de vis-
ta farmacêutico correspondente, caracterizado por se fazer
as modificações apropriadas do seguinte método sintético pa-
ra a preparação de N-Ac-D- β -Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Arg-
-Phe-Arg-Pro-D-Ala:

1- preparação da resina N-acetil-D- β -Nal-D-Phe-D-
-Phe-benzil-Ser-Tyr-D-tosil-Arg-Phe-Tosil-Arg-Pro-D-Ala-ben-
zidrilamina colocando num vaso da reacção a resina benzidra-
lamina-polistireno sob a forma de ião cloreto para se obter
o seguinte ciclo de reacção: (a) CH_2Cl_2 ; (b) 33% de ácido
trifluoroacético em CH_2Cl_2 (2 vezes durante 1 a 25 minutos
cada); (c) CH_2Cl_2 ; (d) etanol; (e) CH_2Cl_2 ; (f) trietilamina



1 em CHCl_3 ; e (g) CH_2Cl_2 .

2- agitação da resina neutralizada com alfa-t-butoxicarbonil (Boc)-D-Ala e diisopropilcarbodiimida em CH_2Cl_2 durante 1 hora sendo a resina do aminoácido resultante ciclizada através dos passos (a) a (g) descritos atrás,

3- após remoção do grupo N-terminal Boc, a resina peptido benzidrilamina é neutralizada e acetilada mediante tratamento com 5% de ácido acético em CH_2Cl_2 . A resina é depois lavada com CH_3OH e seca ao ar.

10

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se misturar a resina de decapeptido preparada com uma solução de anisol, ditiotreitol e fluoreto de hidrogénio e se agitar a 0°C durante 45 minutos.

15

3ª. - Processo de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por se evaporar o fluoreto de hidrogénio sob corrente de nitrogénio, se precipitar o peptido lavando-o de seguida com éter.

20

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um peptido em que A^6 é D-Lys- ϵ -NH-R (em que R é um grupo ciclo-alquilo C_1 - C_{10}).

25

5ª. - Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 4, caracterizado por se preparar um peptido em que A^8 é Lys- ϵ -NH-R (em que R é um grupo ciclo-alquilo C_1 - C_{10}).

30

6ª. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por A^1 - A^{10} ser N-acetil-D- β -Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Lys (ciclopentil)-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂.

35

7ª. - Processo de acordo com as reivindicações 4 ou 5, caracterizado por A^1 - A^{10} ser N-acetil-D- β -Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Lys(ciclopentil)-Phe-Lys(ciclopentil)-

15 OCT 1970

1 -Pro-D-Ala-NH₂.

8^a. - Processo de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por se preparar N-Acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-
5 -Ser-Tyr-D-Arg-Phe-(isopropil)-D-Lys-Pro-D-Ala-NH₂.

9^a. - Processo de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por se preparar N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-
-Ser-Tyr-D-Lys(benzil)-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂.

10^a. - Processo de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por se preparar N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-
Ser-Tyr-D-Lys(clorobenzil)-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂.

11^a. - Processo de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por se N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-
-D-Lys(heptil)-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂.

12^a. - Processo de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por se preparar N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-
20 -Ser-Tyr-D-Arg-Phe-Lys(t-butilmetil)-Pro-D-Ala-NH₂.

13^a. - Processo de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por se preparar N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-D-Phe-
25 -Ser-Tyr-D-Arg-Phe-Lys(4-metil-benzil)-Pro-D-Ala-NH₂.

14^a. - Processo de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por se preparar N-acetil-D-β-Nal-D-Phe-Ser-
-Tyr-D-Arg-Phe-Lys(benzil)-Pro-D-Ala-NH₂.

15^a. - Processo de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por se preparar N-acetil-D-β-Nal-D-p-Dl-Phe-
-D-Trp-Ser-Tyr-D-NH₂-Phe-Phe-(isopropil)Lys-Pro-D-Ala-NH₂.

16^a. - Processo de acordo com a reivindicação 1,

1 caracterizado por se preparar N-acetil-D- β -Nal-D-Phe-D-Phe-
-Ser-Tyr-D-Lys(heptil)-Phe-Lys(heptil)-Pro-D-Ala-NH₂.

5 17ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por se preparar N-acetil-D- β -Nal-D-Phe-D-Phe-
-Ser-Tyr-D-Lys(1-butilpentil)-Phe-Lys(1-butilpentil)-Arg-
-Pro-D-Ala-NH₂.

10 18ª. - Processo para a preparação de uma composi-
ção terapêutica para inibir a libertação induzida de LH-RH
de hormonas sexuais, caracterizado por se misturar uma quan-
tidade eficaz do decapeptido preparado de acordo com a rei-
vindicação 1 com um veículo aceitável sob o ponto de vista
farmacêutico.

15 19ª. - Processo de acordo com a reivindicação 18,
caracterizado por se utilizar uma quantidade eficaz de deca-
peptido compreendida entre 0,001 e 5 mg/Kg de peso corporal
de preferência entre 0,01 e 1 mg/Kg/dia para terapia humana
20 e 0,1 a 1 mg/kg/dia para terapia animal.

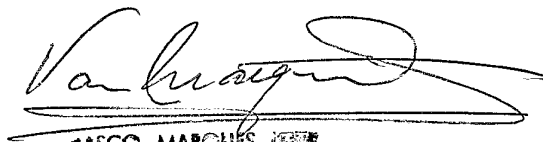
25 20ª. - Processo de acordo com a reivindicação an-
terior, caracterizado por a administração do composto acti-
vo poder ser uma única administração, uma distribuição du-
rante várias aplicações e uma administração de libertação
lenta com vista a obter os resultados mais eficazes.

Lisboa, 15 OUT 1990

Por THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCACIONAL FUND

O AGENTE OFICIAL

30



VASCO MARQUES LEITE

Agente Oficial

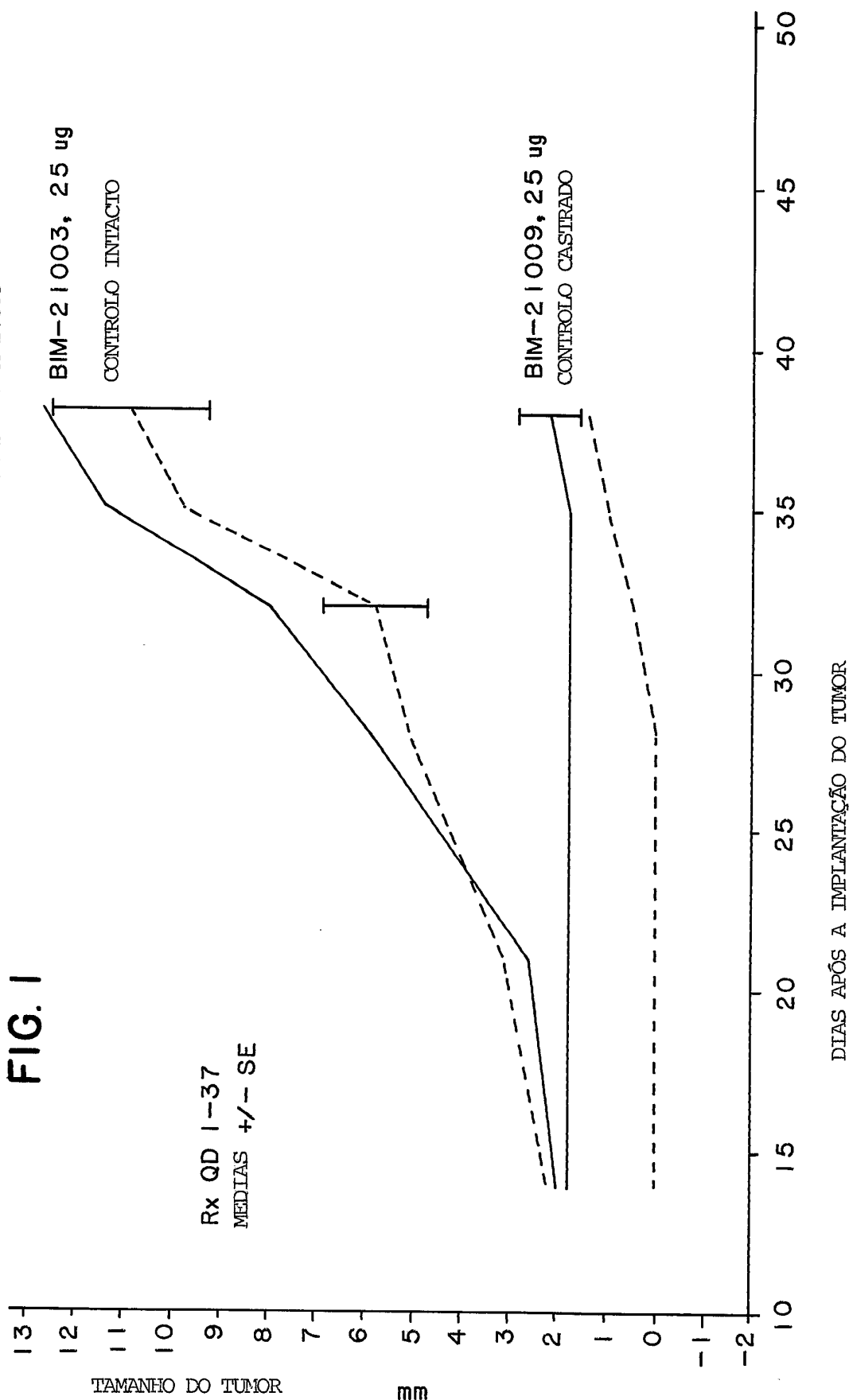
de Propriedade Industrial

Cartório - Arco da Conceição, 3, 1.º-1700 LISBOA

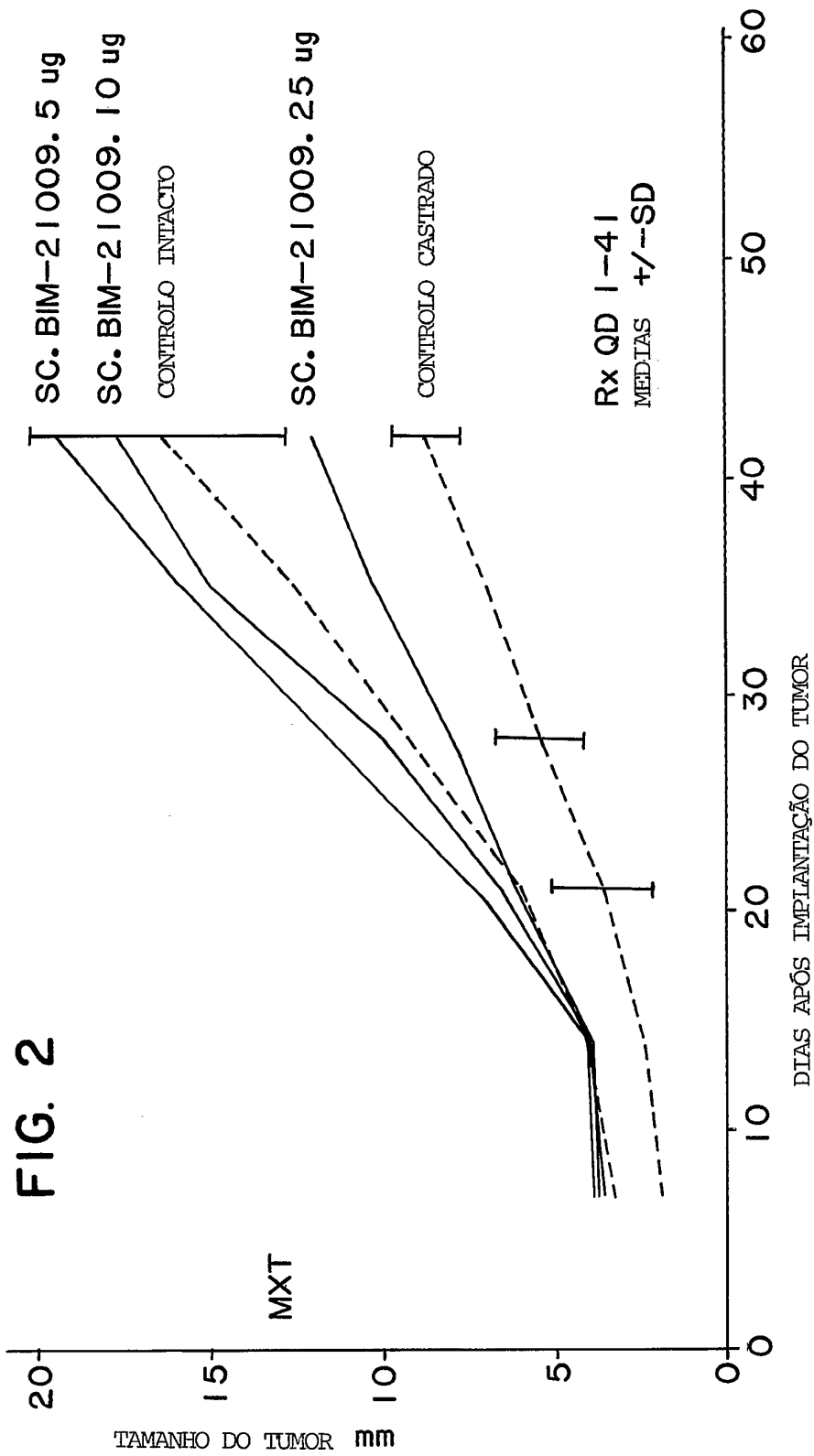
35

RESPOSTA DO TUMOR MAMÁRIO MURINO MX1 SENSÍVEL AOS ESTROGÊNIO
AO AGONISTA BIM-21003 E ANTAGONISTA BIM-21009

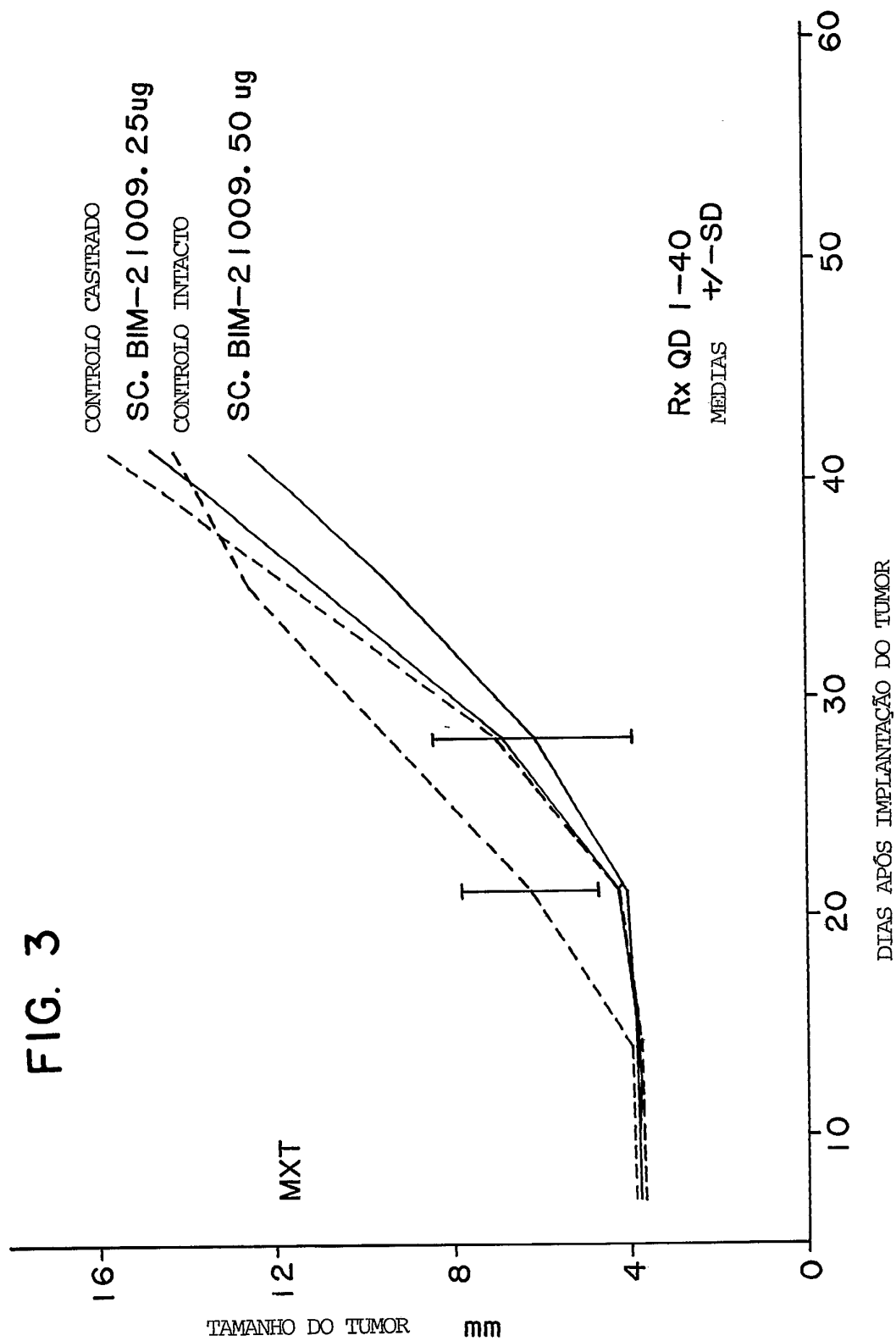
FIG. 1

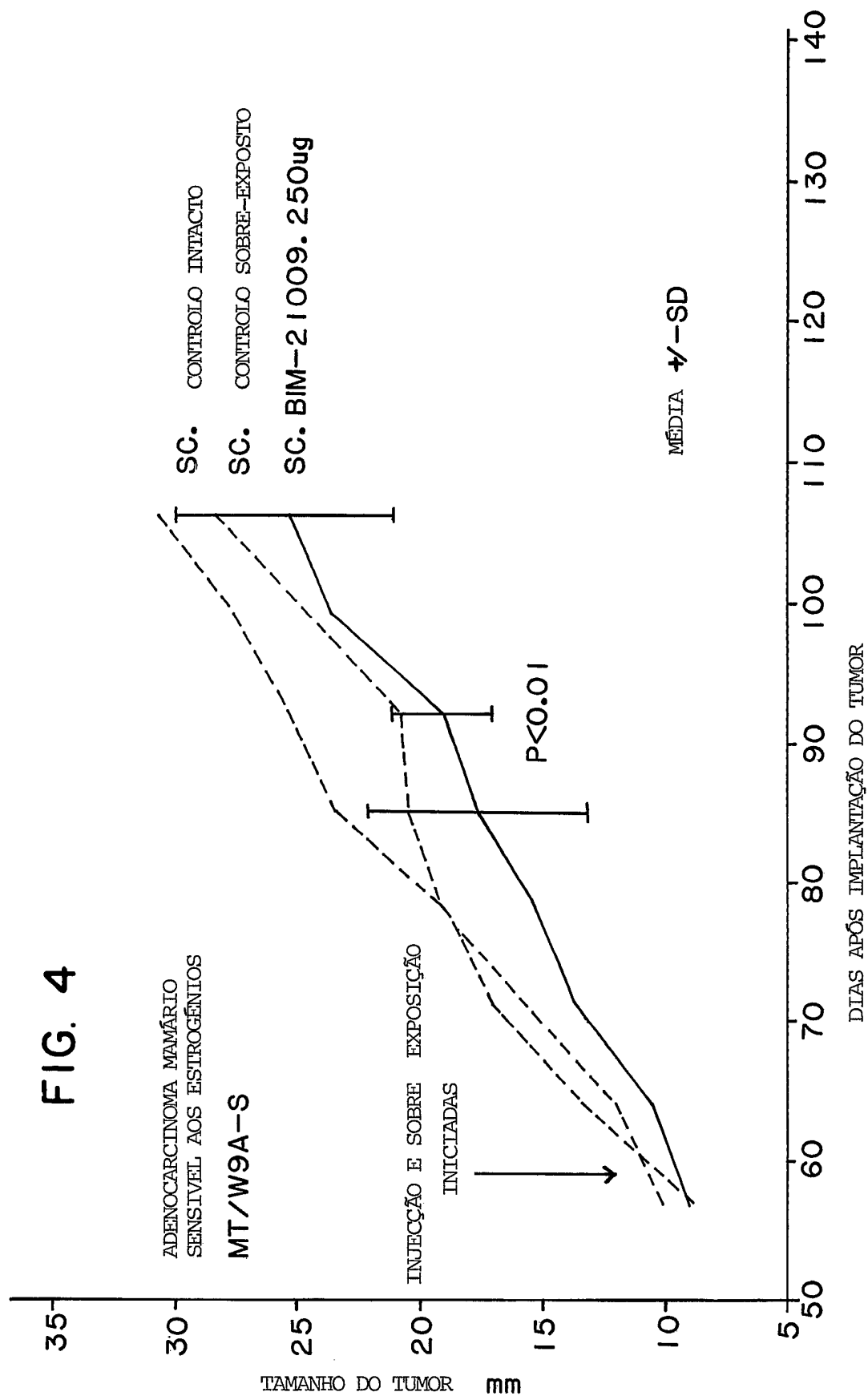


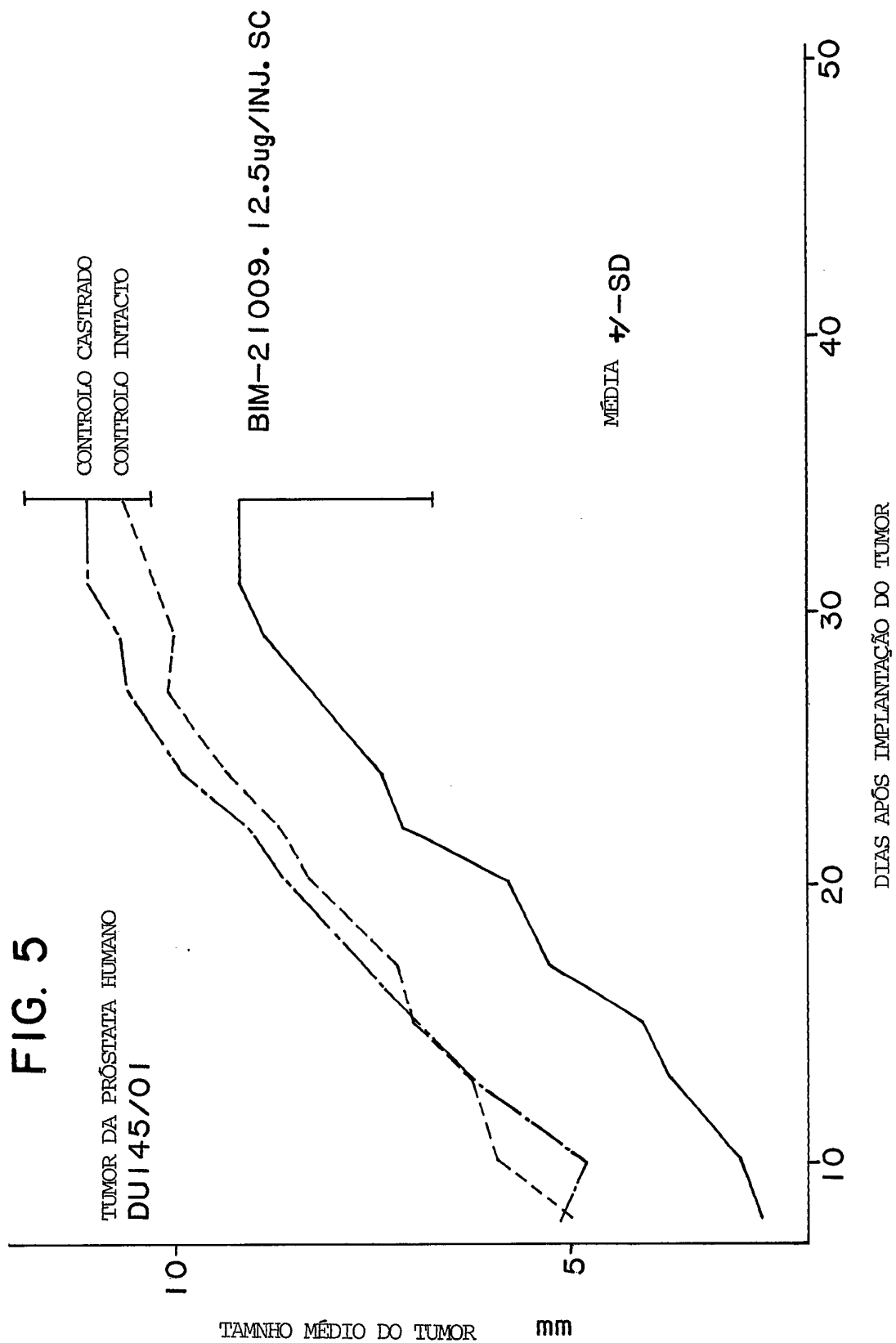
TUMOR MAMÁRIO MURINO RESPONSIVO A ESTROGÊNIO MXT



TUMOR MAMÁRIO MURINO SENSÍVEL A ESTROGÊNIO MXT







EFETTO DO BM-21009 SOBRE O TUMOR DA PROSTATA DUNNING R3327 EM RATOS

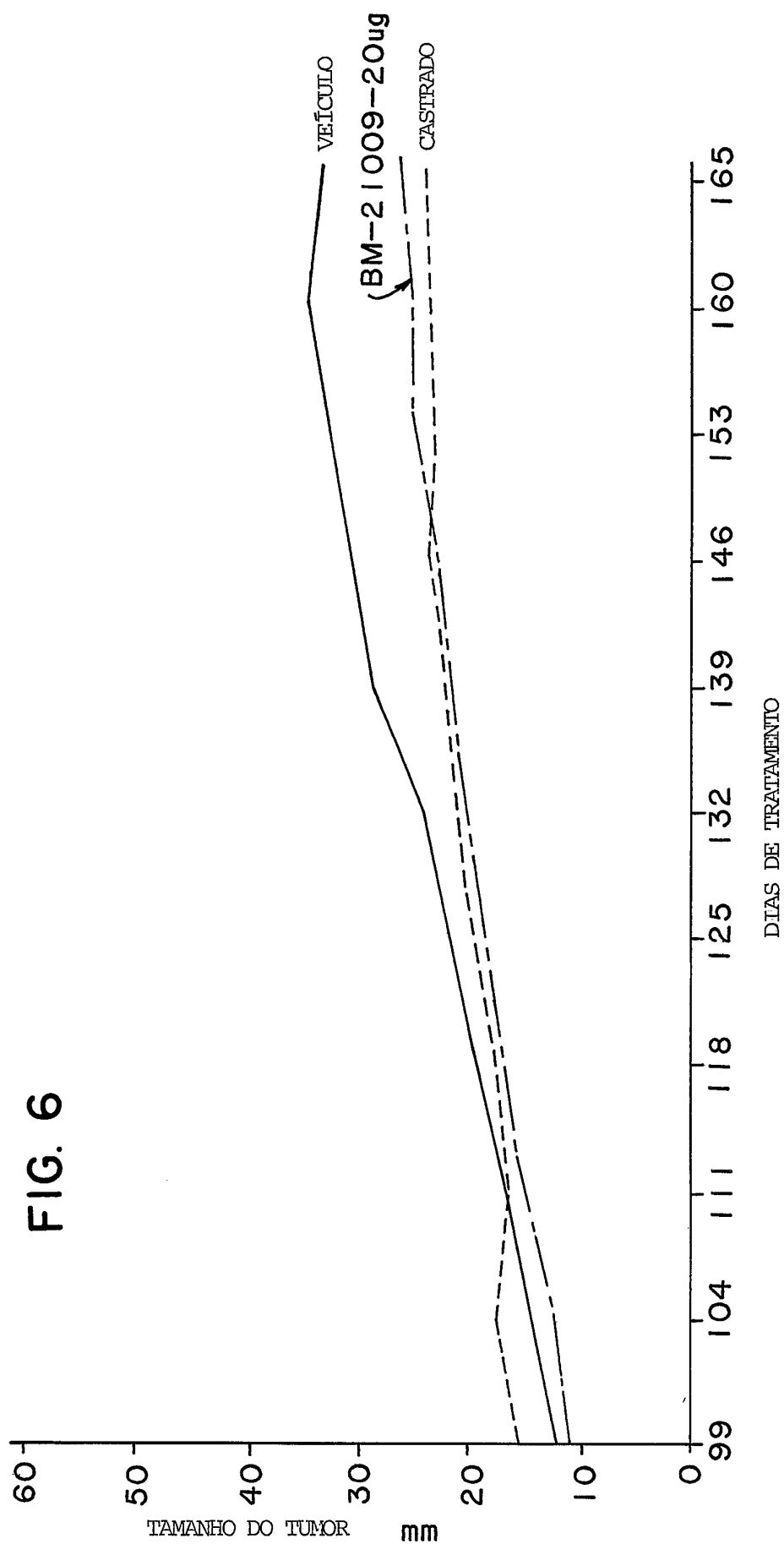


FIG. 7

