

(11) Número de Publicação: **PT 1418905 E**

(51) Classificação Internacional:  
**A61K 31/401** (2006.01) **A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2002.07.29</b>	(73) Titular(es): <b>PENTRAXIN THERAPEUTICS LIMITED</b> <b>UNIVERSITY COLLEGE LONDON, GROWER</b> <b>STREET LONDON WC1E 6BT</b> <b>GB</b>
(30) Prioridade(s): <b>2001.08.08 GB 0119370</b> <b>2001.11.05 US 985699</b>	(72) Inventor(es): <b>MARK B. PEPYS</b> <b>GB</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2004.05.19</b>	(74) Mandatário: <b>PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA</b> <b>RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA</b> <b>PT</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2007.05.02</b> <b>005/2007</b>	

(54) Epígrafe: **AGENTE TERAPÊUTICO PARA A REMOÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE PROTEÍNAS INDESEJADA DO PLASMA**

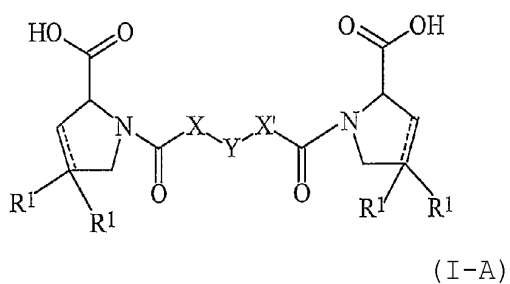
(57) Resumo:

## RESUMO

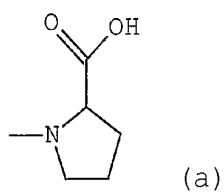
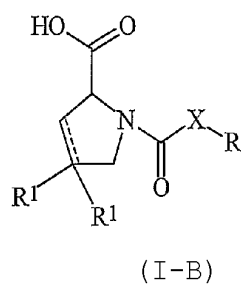
### **"AGENTE TERAPÊUTICO PARA A REMOÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE PROTEÍNAS INDESEJADA DO PLASMA"**

Agente para a eliminação de uma população de proteínas indesejada do plasma de um indivíduo, cujo agente compreende vários ligandos, covalentemente co-ligados, de modo a formar um complexo com várias proteínas na sua presença; em que, pelo menos, dois dos ligandos são iguais ou diferentes e são capazes de estar ligados através dos locais de ligação do ligando presentes nas proteínas, em que o agente é um agente não proteínico que não uma D-prolina de fórmula (I-A) ou (I-B), em que R é fórmula (a) o grupo; R<sup>1</sup> é hidrogénio ou halogéneo; X é (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; -CH(R<sup>2</sup>)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; -CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; -CH<sub>2</sub>NH-; benzilo, -C(R<sup>2</sup>)=CH-; -CH<sub>2</sub>CH(OH)-; ou tiazol-2,5-diilo; Y é S-S-; -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; -O-; -NH-; -N(R<sup>2</sup>)-; -CH=CH-; -NHC(O)NH-; -N(R<sup>2</sup>)C(O)N(R<sup>2</sup>)-; -N[CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-; -N(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)-; -N(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)C(O)N(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)-; -N(alcoxilalquilo)-; N(cicloalquil-metil)-; 2,6-piridilo; 2,5-furanilo; 2,5-tienilo; 1,2-ciclo-hexilo; 1,3-ciclo-hexilo; 1,4-ciclo-hexilo; 1,2-naftilo; 1,4-naftilo; 1,5-naftilo; 1,6-naftilo; bifenileno; ou 1,2-fenileno, 1,3-fenileno e 1,4-fenileno, em que os grupos fenileno são opcionalmente substituídos por 1-4 substituintes, seleccionados de halogéneo, alquilo inferior, alcóxido inferior, hidroxilo, carboxilo, -COO-alquilo inferior, nitrilo, 5-tetrazole, (2-ácido carboxílico pirrolidin-1-il)-2-oxo-etoxilo, N-hidroxicarbamimidoílo, 5-oxo[1,2,4]oxadiazolilo, 2-oxo[1,2,3,5]oxatiadiazolilo, 5-tioxo[1,2,4]oxadiazolilo e 5-terc-butilsulfanil[1,2,4] oxadiazolilo; X' é -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH(R)-; -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>2</sub>-; -NHCH<sub>2</sub>-; benzilo, -CH=C(R<sup>2</sup>)-;

-CH(OH)CH<sub>2</sub>; ou tiazol-2,5-diilo; R<sup>2</sup> é alquilo inferior, alcoxilo inferior ou benzilo e n é 0-3, ou um seu sal ou mono- ou diéster farmacologicamente aceitável.



ou



## DESCRIÇÃO

### "AGENTE TERAPÊUTICO PARA A REMOÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE PROTEÍNAS INDESEJADA DO PLASMA"

#### Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um agente para a remoção de uma população de proteínas indesejada do plasma de um indivíduo e a um método para tratar um indivíduo com um tal agente.

#### Antecedentes da Invenção

As proteínas do plasma sanguíneo, na matriz extracelular dos tecidos e nas células são essenciais para todas as funções fisiológicas vitais. No entanto, muitas proteínas diferentes também contribuem para doenças. Os mecanismos patogénicos subjacentes incluem produção excessiva de proteínas normais com efeitos excessivos correspondentes, a produção de proteínas anormais com efeitos prejudiciais e a subversão acidental da função da proteína normal conduzindo a efeitos prejudiciais durante processos patológicos intercorrentes, tais como inflamação e infecção microbiana. Existe, por esse motivo, necessidade de eliminar várias proteínas normais e anormais do corpo para proporcionar tratamento para muitas doenças humanas. As proteínas plasmáticas que contribuem para a patogénese da doença incluem citocinas, lipoproteínas, auto-anticorpos, componentes das vias de complemento e coagulação, proteínas amiloidogénicas, incluindo cadeias leves de imunoglobulina

monoclonal, transtiretina, lisozima e  $\beta_2$ -microglobulina, proteínas de fase aguda, em particular, proteína A amilóide do soro (SAA) e pentraxinas, tal como componente P amilóide do soro (SAP). Todas estas proteínas diferentes, produzidas por células diferentes, são alvos potencialmente atractivos para eliminação terapêutica em várias doenças. No entanto, existem poucos métodos eficazes para reduzir de um modo selectivo a concentração em circulação de proteínas específicas e essas abordagens que estão disponíveis ou foram tentadas, são complexas, difíceis e alvo de muitos problemas extremamente desafiantes.

As citocinas são hormonas proteicas produzidas e actuantes em vários tipos de células diferentes e são mediadores criticamente importantes na defesa do hospedeiro, por resposta imunológica e inflamatória, mas a sua produção excessiva em algumas doenças contribui para patologias graves, morbidade e mortalidade. Os anticorpos e proteínas de ligação recombinante têm sido utilizados recentemente com sucesso para direccionar uma citocina em particular, o factor de necrose tumoral (TNF), e o bloqueio do TNF é terapêuticamente benéfico na artrite reumatóide e doença de Crohn, mas existem poucos métodos eficazes para reduzir os níveis prejudiciais elevados de outras citocinas.

A produção excessiva patogénica de outras proteínas normais, tais como proteínas plasmáticas de fase aguda, pode ser reduzida por supressão da actividade de uma doença primária subjacente, mas, excepto no caso de infecção crónica tratável, é, normalmente, extremamente difícil de alcançar. Não existe cura para doenças inflamatórias idiopáticas crónicas, tais como artrite reumatóide ou doença de Crohn ou para a maioria dos

neoplasmas malignos. O tratamento destas doenças e a supressão da sua actividade requer regimes incluindo anti-inflamatórios altamente tóxicos, fármacos citotóxicos e imunossuppressores e, frequentemente, também cirurgia e/ou radioterapia.

A produção de proteínas anormais, quer herdada ou adquirida como uma complicação de outra doença primária, é também extremamente difícil de controlar. Por exemplo, as moléculas variantes da transtiretina e fibrinogénio, responsáveis pelas formas de amiloidose sistémica hereditária, apenas podem ser eliminadas do plasma por transplante do fígado. Tal abordagem não é possível com muitas outras doenças hereditárias provocadas por proteínas variantes patogénicas. A produção adquirida de proteínas anormais e patogénicas, como em gamopatias monoclonais, apenas pode ser tratada com fármacos citotóxicos potentes ou transplante da medula óssea. Estes processos incorrem em taxas universais de morbidade e, mesmo, mortalidade até 50%, sem apresentar sucesso uniforme.

Outra abordagem tem sido remover as proteínas prejudiciais por absorção extracorporal, passando o sangue sobre um meio de fase sólida mais ou menos selectivo, para remover a proteína alvo. Isto pode ser uma contribuição útil para a remoção de elevadas concentrações de lipoproteínas de baixa densidade pró-aterogénicas em hipercolesterolemia familiar. Foi também tentado, até ao momento sem sucesso, a remoção de duas proteínas amiloidogénicas diferentes:  $\beta_2$ -microglobulina em doentes em hemodiálise crónica para insuficiência renal em fase terminal e a variante transtiretina em doentes com polineuropatia amilóide familiar.

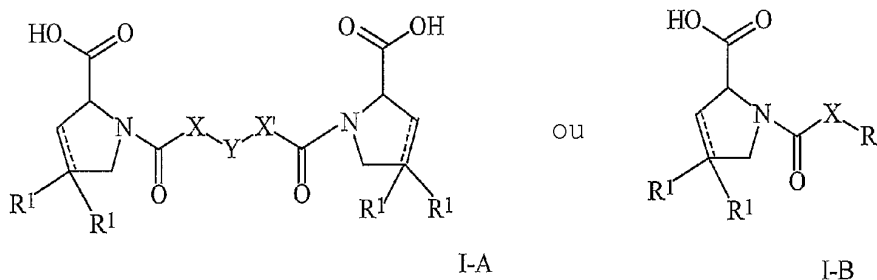
Nos casos onde proteínas particulares produzem os seus efeitos patogénicos por ligação a estruturas do ligando específicas *in vivo*, uma abordagem possível para terapia é o desenvolvimento de fármacos para inibir tal ligação. Por exemplo, o presente requerente propôs tal abordagem para o tratamento de amiloidose e doença de Alzheimer, direccionando a ligação patogénica do componente P amilóide do soro para fibrilas amilóides, por administração de moléculas de baixo peso molecular que bloqueiam tal ligação (1-5) documento US 6126918). É conhecida a ligação específica de SAP a ligandos particulares contendo grupos aniónicos, incluindo carboxilatos e fosfatos (6-10). No complexo de SAP com monosfosfato de desoxiadenosina (dAMP), existe uma molécula de dAMP no local de ligação dependente de cálcio de cada protómero na molécula SAP homopentamérica (10). Como um resultado do empilhamento das bases, dependente da ligação de hidrogénio entre pares de moléculas de dAMP, pares de pentâmeros SAP carregados com dAMP organizam-se frente a frente para formar um complexo proteína ligando decamérico (10).

Os ligandos de baixo peso molecular conhecidos da SAP, tais como fosfoetanolamina e 4,6-O-(1-carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactopiranosido de metilo (MO $\beta$ DG), apenas estão ligados com afinidade moderada de cerca de milimolar. Isto é pouco comparado com as típicas afinidades de nanomolar da maioria das interacções fármaco-proteína e sugere que tais compostos, provavelmente, não serão eficazes como inibidores da ligação patogénica de SAP aos seus ligados *in vivo*. Permanece a necessidade de proporcionar um método eficaz para a remoção direccionada de uma população de proteínas indesejada do plasma.

## Sumário da Invenção

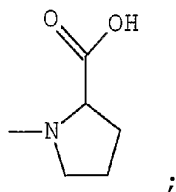
Consequentemente, num primeiro aspecto, a presente invenção proporciona a utilização de um agente para a preparação de uma composição para o tratamento de um indivíduo com um distúrbio provocado por uma proteína patogénica, por remoção terapêutica da proteína patogénica do plasma do indivíduo; em que o tratamento compreende administrar, ao indivíduo, uma dose do agente suficiente para a remoção terapêutica; em que o agente compreende vários ligandos, covalentemente co-ligados, de modo a formar um complexo com várias proteínas na sua presença; em que, pelo menos, dois dos ligandos são iguais ou diferentes e são capazes de estar ligados através dos locais de ligação do ligando presentes nas proteínas; e em que

a proteína patogénica é o componente A amilóide do soro (SAP) e o agente é uma D-prolina de fórmula



em que

R é o grupo



- R<sup>1</sup> é hidrogénio ou halogéneo;
- X é  $-(CH_2)_n-$ ;  $-CH(R^2)(CH_2)_n-$ ;  $-CH_2O(CH_2)_n-$ ;  $-CH_2NH-$ ; benzilo,  $-C(R^2)=CH-$ ;  $-CH_2CH(OH)-$ ; ou tiazol-2,5-dilo;
- Y é  $-S-S-$ ;  $-(CH_2)_n-$ ;  $-O-$ ;  $-NH-$ ;  $-N(R^2)-$ ;  $-CH=CH-$ ;  $-NHC(O)NH-$ ;  $-N(R^2)C(O)N(R^2)-$ ;  $-N[CH_2C_6H_3(OCH_3)_2]-$ ;  $-N(CH_2C_6H_5)-$ ;  $-N(CH_2C_6H_5)C(O)N(CH_2C_6H_5)-$ ;  $-N(\text{alcoxialquilo})-$ ;  $N(\text{cicloalquil-metil})-$ ; 2,6-piridilo; 2,5-furanilo; 2,5-tienilo; 1,2-ciclohexilo; 1,3-ciclohexilo; 1,4-ciclohexilo; 1,2-naftilo; 1,4-naftilo; 1,5-naftilo; 1,6-naftilo; bifenileno; ou 1,2-fenileno, 1,3-fenileno e 1,4-fenileno, em que os grupos fenileno são opcionalmente substituídos com 1-4 substituintes, seleccionados de halogéneo, alquilo inferior, alcoxilo inferior, hidroxilo, carboxilo,  $-COO$ -alquilo inferior, nitrilo, 5-tetrazole, (2-ácido carboxílico pirrolidin-1-il)-2-oxo-etoxilo, N-hidroxicarbamimidoílo, 5-oxo[1,2,4]oxadiazolilo, 2-oxo[1,2,3,5]oxatiadiazolilo, 5-tioxo[1,2,4]oxadiazolilo e 5-terc-butilsulfanil[1,2,4]oxadiazolilo;
- X' é  $-(CH_2)_n-$ ;  $-(CH_2)_nCH(R)-$ ;  $-(CH_2)_nOCH_2-$ ;  $-NHCH_2-$ ; benzilo,  $-CH=C(R^2)-$ ;  $-CH(OH)CH_2$ ; ou tiazol-2,5-diilo;

R<sup>2</sup> é alquilo inferior, alcoxilo inferior ou benzilo e

n é 0-3,

ou um seu sal ou mono- ou diéster farmacologicamente aceitável.

Verificou-se, de um modo surpreendente, que os agentes de acordo com a presente invenção são dramaticamente potentes *in vivo* na remoção da proteína alvo da circulação, ao fazer com que esta seja rapidamente removida. A presente invenção proporciona moléculas de fármaco que se ligam especificamente às proteínas alvo individuais e, depois, sofrem a capacidade normal, extremamente sensível, do corpo para reconhecer e destruir proteínas autólogas que sofreram alterações de conformação ou organização.

A função fisiológica normal de cada proteína depende, criticamente, da sua conformação e/ou organização molecular apropriada e o corpo apresenta mecanismos poderosos para detectar e destruir proteínas que estão danificadas, agregadas ou mal estruturadas. O objectivo da presente invenção é seleccionar, especificamente, proteínas individuais e causar a sua identificação pelos próprios mecanismos fisiológicos do corpo, como necessitando de rápida remoção e destruição. De modo a alcançar este efeito, a invenção utiliza, de um modo vantajoso, agentes palindrómicos que agregam as proteínas como dímeros ou agregados de ordem superior.

A afinidade de cada interacção no local de ligação proteína-ligando individual não necessita de ser particularmente elevada desde que o ligando seja específico para cada proteína alvo. É possível que uma constante de dissociação até

10 milimolar seja suficiente. No entanto, é preferido que a constante de dissociação não seja superior a 1 milimolar, de um modo mais preferido, inferior a 100 micromolar, de um modo muito preferido, inferior a 10 micromolar. A afinidade é, de um modo preferido, da ordem dos micromolar ou superior. Verificou-se que a afinidade em micromolar é suficiente no caso da SAP, embora seja claramente desejável a afinidade mais elevada possível.

Nos agentes da presente invenção, embora os ligandos possam estar directamente ligados entre eles através de uma ligação covalente, os ligandos estão, de um modo preferido, covalentemente co-ligados através de um elemento de ligação. Isto permite que os ligandos estejam suficientemente separados espacialmente, pelo que podem estar ligadas várias proteínas alvo ao agente sem que uma proteína que impeça a ligação da outra proteína ou proteínas. Onde o agente apresente dois ligandos, o elemento de ligação é tipicamente linear, uma estrutura geral preferida é ligando-elemento de ligação-ligando. Isto é convenientemente denominado um "palindroma" para os objectivos do presente pedido.

No caso da SAP, uma classe de agentes compreende as D-prolinas de fórmula apresentada acima, de um modo preferido, ácido  $(R)-1-[6-(R)-2\text{-Carboxi-pirrolidin-1-il}]-6\text{-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico}$  ou um seu sal ou mono- ou diéster farmacologicamente aceitável.

O agente pode ser utilizado para remover populações indesejadas de proteínas do plasma de indivíduos humanos ou animais. Nas razões molares apropriadas de agente para proteína alvo, o agente forma ligações cruzadas com pares de moléculas de proteína para produzir complexos que são reconhecidos no corpo

como anormais e são, depois, rapidamente removidos e catabolisados. Isto conduz à remoção substancial ou completa da proteína alvo e confere benefício terapêutico.

As composições farmacêuticas podem ser formuladas compreendendo um agente de acordo com a presente invenção incorporando, opcionalmente, um excipiente, diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável. As composições farmacêuticas podem estar na forma de um pró-fármaco compreendendo o agente ou um seu derivado que se torna activo apenas quando metabolizado pelo receptor. A natureza e quantidades exactas dos componentes de tais composições farmacêuticas podem ser determinadas empiricamente e estarão dependentes, em parte, da via de administração da composição. As vias de administração ao receptor incluem oral, bucal, sublingual, por inalação, tópica (incluindo oftálmica), rectal, vaginal, nasal e parentérica (incluindo intravenosa, intra-arterial, intramuscular, subcutânea e intraarticular). Para conveniência de utilização, as dosagens de acordo com a presente invenção são, de um modo preferido, administradas oralmente mas isto irá depender do fármaco presente e da sua biodisponibilidade. Uma dosagem típica será de 50 a 500 mg por dia oralmente ou por infusão intravenosa contínua ou injeção subcutânea intermitente, por exemplo, de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico.

### **Breve Descrição da Figuras**

A presente invenção será agora descrita em maior detalhe, apenas por meio de exemplo, com referência aos seguintes Exemplos e às Figuras que os acompanham, nas quais:

A Figura 1 apresenta a estrutura tridimensional cristalina por raio-X da SAP complexada com um agente da presente invenção;

A Figura 2A apresenta uma vista detalhada da Figura 1 e a Figura 2B apresenta uma representação alternativa detalhada de parte da Figura 1;

A Figura 3 apresenta o efeito de um agente da presente invenção na SAP em murganhos *in vivo*;

A Figura 4 apresenta o efeito da infusão de um agente da invenção nos valores da SAP plasmática em doentes com amiloidose sistémica;

A Figura 5 apresenta o efeito do agente ao longo de seis horas utilizando cintigrafia com  $^{123}\text{I}$ -SAP;

A Figura 6 apresenta o efeito do agente até 48 horas utilizando cintigrafia com  $^{123}\text{I}$ -SAP;

A Figura 7 apresenta a concentração plasmática do agente e o seu efeito na SAP durante infusão intravenosa; e

A Figura 8 apresenta o efeito da injeção subcutânea do agente em doentes com amiloidose sistémica.

## Descrição Detalhada da Invenção

### EXEMPLOS

#### **COMPONENTE P AMILÓIDE DO SORO E ÁCIDO (R)-1-[6-(R)-2-CARBOXI-PIRROLIDIN-1-IL]-6-OXO-HEXANOIL]PIRROLIDINA-2-CARBOXÍLICO**

Foi idealizado um método para avaliar e testar a ligação de inibidores do componente P amilóide do soro (SAP) a fibrilas amilóides *in vitro* e utilizado em colaboração com F Hoffmann-La Roche Ltd para identificar uma molécula principal adequada para o desenvolvimento de fármaco. Conseqüentemente, foram avaliadas bibliotecas de compostos candidatos. O programa de colaboração de química médica subsequente conduziu à síntese de uma família de moléculas de ácido dicarboxílico contendo anel pirrolidona, das quais a mais estudada é o ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico. Esta molécula e compostos relacionados (documento EP-A-0915088) são inibidores moderadamente potentes da ligação da SAP às fibrilas amilóides *in vitro*, com valores IC<sub>50</sub> de cerca de 0,5-1,0 µM. No entanto, são todos inibidores mais potentes que o composto principal original, que foi 1-(3-Mercapto-2-metil-1-oxopropil)-D-prolina, contendo apenas um anel D-prolina e carboxilato.

A SAP é um pentâmero com 5 protómeros idênticos associados não covalentemente, cada um suportando um único local de ligação de ligando dependente de cálcio numa face planar, a face de ligação (B) da molécula (9). Na ausência de cálcio, a SAP humana forma dímeros decaméricos estáveis, provavelmente, via interações face A para face A (11). Na presença de cálcio, a SAP humana isolada agrega rapidamente e precipita, como um

resultado da formação de malha molecular devido à ligação do carboxilato exposto do resíduo Glu167 numa molécula SAP, pelo local de ligação do ligando dependente de cálcio de outra molécula de SAP (12, 13). Esta autoagregação da SAP é inibida por outros ligandos aos quais a SAP se liga e, neste aspecto, todos os presentes inibidores da ligação da SAP a fibrilas amilóides foram activos. No entanto, verificou-se aqui que a potência superior do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico e compostos relacionados, como inibidores da ligação da SAP a fibrilas amilóides *in vitro*, resulta da sua capacidade para reticular pares de moléculas SAP. A estrutura palindrómica do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico permite-lhe não só bloquear os locais de ligação do ligando em protómeros SAP individuais, mas também podem reticular pares de moléculas SAP pentaméricas para formar dímeros decaméricos B-B frente a frente. A análise por filtração gel de misturas de SAP isolado com ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico, em razões entre equimolar e 100 vezes excesso molar de fármaco (peso molecular de 340 Da) para protómeros de SAP (25462 Da), mostra que toda a SAP é decamérica (Tabela 1). No entanto, a 128 vezes ou maior excesso molar de fármaco, toda a SAP é eluída num volume correspondendo à sua forma pentamérica isolada, porque cada local de ligação está, então, ocupado por uma molécula de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico diferente, impedindo a reticulação e dimerização.

**Tabela 1. Organização molecular de SAP pura isolada na presença de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico *in vitro***

Razão molar fármaco:proteína	Cálcio presente	Proteína	Volume de eluição (mL)	Organização molecular
Sem fármaco	-	CRP	12,28	Pentâmero
Sem fármaco	+	CRP	12,81	Pentâmero
1:1	+	CRP	12,58	Pentâmero
10:1	+	CRP	11,96	Pentâmero
Sem fármaco	-	SAP	10,93	Decâmero
1:1	+	SAP	10,97	Decâmero
10:1	+	SAP	10,97	Decâmero
128:1	+	SAP	12,55	Pentâmero

A proteína C reactiva (CRP) é uma pentraxina muito relacionada com a SAP. Amostras de SAP ou CRP humana pura isoladas foram misturadas com ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico nas proporções molares apresentadas, no que se refere ao protómero pentraxina, em solução salina tamponada com Tris pH 8,0 de força iónica fisiológica e analisadas por cromatografia de exclusão molecular precisamente como descrito anteriormente (14). As misturas e os eluidos da coluna continham cálcio 2 mM ou não continham cálcio e as concentrações de fármaco apropriadas para manter as proporções molares acima indicadas. Na ausência de um ligando específico ao qual se possa ligar, a SAP humana purificada é insolúvel na presença de cálcio e é eluída como

agregados de elevado peso molecular no volume vazio da coluna (14). No entanto, na ausência de cálcio e ligando, a SAP isolada sozinha forma decámeros estáveis, proporcionando um excelente marcador para o volume de eluição desta organização molecular (14). A CRP humana é uma pentâmero estável na presença ou ausência de cálcio e, assim, proporciona um potente marcador para a posição de eluição dessa forma molecular (14).

O modelo molecular de duas moléculas de SAP pentaméricas nativas reticuladas por ligação entre elas da molécula de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico palindrômico é confirmado pela estrutura tridimensional cristalina por raio-X do complexo de SAP com o fármaco na presença de cálcio, como apresentado nas vistas representativas abaixo (Figs 1 & 2). Estas observações são consistentes com as observações publicadas sobre o complexo SAP-dAMP (10) e a análise cromatográfica (Tabela 1).

**Estudos experimentais do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico *in vivo***

Os estudos *in vivo* da 1-(3-Mercapto-2-metil-1-oxopropil)-D-prolina, o composto principal original, mostram que inibe a ligação da SAP a depósitos de amilóide induzidos experimentalmente em murganhos e dissociam a SAP que já está ligada nos depósitos. Estudos com o ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico confirmaram que é mais activo, nestas situações, do que a 1-(3-Mercapto-2-metil-1-oxopropil)-D-prolina. A potência do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-

hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico *in vivo* foi inicialmente considerada como sendo consistente com o seu valor IC<sub>50</sub> mais baixo *in vitro*. No entanto, a organização decamérica de moléculas de SAP pentamérica, induzida pela capacidade de reticulação do fármaco palindrômico, é uma configuração molecular anormal que, de acordo com a presente invenção, será reconhecida *in vivo* e rapidamente removida de circulação. Esta acção do fármaco, conduzindo à eliminação massiva da SAP do plasma, faz uma contribuição crítica para a remoção da SAP dos depósitos de amilóide porque a SAP no amilóide é derivada de, e está em equilíbrio com o conjunto de SAP no plasma.

O ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico não foi metabolizado em murganho e foi muito rapidamente excretado, predominantemente, na urina, com uma pequena quantidade na bÍlis. No entanto, mesmo a injecco intraperitoneal ou subcutânea intermitente de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico inibe a absorcco de marcador de SAP humana marcada com radioactividade em depósitos de amilóide AA induzidos experimentalmente em murganhos. Quando o ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico foi administrado por infusão contÍnua durante 5 dias através uma bomba osmótica interior, dissocia o marcador de SAP humana marcada com radioactividade, com o qual os depósitos de amilóide foram anteriormente carregados, e toda a SAP endógena do murganho nos depósitos (Fig. 3). Mesmo 50 µg/kg/dia de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico dissociou, significativamente, a SAP humana dos depósitos (não apresentado), mas foi necessário 1,5 mg/kg/dia para dissociar, significativamente, qualquer SAP de murganho endógena e existiu

um evidente efeito de resposta à dose até 15 mg/kg/dia, que removeu toda a SAP do murganho. (Fig. 3). Uma única injeção intraperitoneal de 5 mg de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico acelerou a remoção plasmática de marcador de SAP humana marcada com radioatividade em murganhos normais, mas não teve efeito significativo na remoção de SAP de murganho marcada com radioatividade (Fig. 3). No entanto, quando a SAP humana ou de murganho, marcada com radioatividade foi pré-incubada com ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico *in vitro*, antes de injeção intravenosa em murganhos normais, ambos os marcadores foram removidos de um modo extremamente rápido (Fig. 3). O complexo SAP-ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico é evidentemente reconhecido como anormal *in vivo* e rapidamente removido da circulação, mas é, aparentemente, formado e/ou removido de um modo menos eficaz *in vivo* com SAP de murganho em comparação com SAP humana. De um modo notável, apesar da biodisponibilidade oral muito limitada, a administração de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico na água de beber de murganhos transgênicos para SAP humana, que apresentam valores plasmáticos médios de cerca de 80 mg/L de SAP humana, elimina rapidamente a sua SAP humana em circulação (Fig. 3). Os animais transgênicos para a SAP humana não apresentam qualquer SAP de murganho em circulação, mas nem a administração oral nem a injeção intermitente ou infusão contínua de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico, a murganhos normais do tipo selvagem, provocaram a eliminação da sua SAP em circulação.

**Estudos clínicos do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico na amiloidose humana**

O ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico foi administrado durante 48 h por infusão intravenosa a 8 doentes com amiloidose sistémica (7 com tipo AL e um com tipo AA), um doente com pouca amiloidose AL localizada e um que é portador da variante Ala60 transtiretina amiloidogénica, mas sem amiloidose clínica. Ocorreu a eliminação dramática, rápida e consistente de SAP em circulação em todos os indivíduos. Em estudos iniciais com infusão contínua lenta, a concentração de SAP começou a diminuir quando foram administradas cerca de 2 mg de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico e em estudos subsequentes esta quantidade foi, por esse motivo, injectada como um bolus no início, seguida por infusão nas taxas apresentadas (Fig. 4). Numa taxa de infusão de 0,1 mg/kg/dia, a eliminação de SAP foi mais lenta e menos completa, mas a 0,25 mg/kg/dia e todas as taxas superiores até um máximo de 6 mg/kg/dia, a SAP foi quase completamente removida do plasma no fim da infusão, independentemente da carga amilóide (Fig. 4). No entanto, após a conclusão da infusão do fármaco, a concentração plasmática de SAP regressou, rapidamente, ao normal nos indivíduos com pouca ou nenhuma amilóide, enquanto esta recuperação foi retardada de um modo acentuado em indivíduos com amiloidose significativa. No doente com uma carga amilóide muito forte, a concentração plasmática de SAP permaneceu abaixo de 25% do seu valor inicial, 20 dias após a infusão. A maior parte da produção diária de SAP, que é de cerca de 50-100 mg por dia (15), foi, evidentemente, distribuída nos depósitos de amilóide antes de se tornar disponível para

encher o conjunto plasmático. Isto é uma prova indirecta muito forte que mesmo uma breve infusão de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico eliminou, substancialmente, a SAP associada à amilóide.

A prova directa da eliminação de SAP da amilóide nos órgãos e para o mecanismo de acção do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico foi obtida por cintigrafia quantitativa de corpo inteiro utilizando  $^{123}\text{I}$ -SAP como um marcador. Cada doente recebeu uma dose convencional de  $^{123}\text{I}$ -SAP 24 h antes do início da infusão do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico e foi analisado imediatamente antes do tratamento para proporcionar uma imagem de linha de base e valores da localização do marcador para os depósitos de amilóide. Foram, depois, analisados em intervalos depois disso, até ao fim de 48 h de infusão. O ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico provocou a remoção dramática de marcador do plasma, paralelamente de modo exacto em ambas as imagens de cintigrafia e nas contagens das amostras de sangue, a eliminação de SAP monitorizada por ensaio imunitário do soro. 6 h após o início do tratamento e, persistindo depois disso, o sinal do conjunto de sangue virtualmente desapareceu (Figs. 5, 6) e ocorreu uma evidente acumulação de marcador no fígado, identificando este órgão como o local para o qual a ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico provoca a remoção de SAP em circulação. Simultaneamente, verificou-se uma diminuição acentuada na retenção de marcador nos depósitos de amilóide em todos os outros locais, exemplificados pelos baço e rins, em contraste com a situação

normal em doentes de controlo com amiloidose não tratados (Tabela 2; Fig. 6).

**Tabela 2. Ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico remove, rapidamente, a SAP em circulação para o fígado e elimina a SAP de depósitos de amilóide viscerais**

	Retenção de I-SAP [média (SD)%]					
	Fígado			Baço		
Tratamento	Tempo antes da injeção de marcador		Nº de doentes	Tempo depois da injeção de marcador		Nº de doentes
	24 h	48 h		24 h	48 h	
<b>Nenhum</b>	100	78 (8)	12	100	86 (25)	14
<b>Fármaco</b>	100	125 (10)	7	100	54 (18)	7
		P<0,0001			P=0,008	

Todos os doentes apresentavam amiloidose AL sistémica e receberam uma dose de marcador intravenosa convencional de <sup>123</sup>I-SAP ao tempo zero. Após obtenção de imagens por cintigrafia quantitativa do corpo total às 24 h, a absorção no fígado e baço foram consideradas como 100% para cada indivíduo. A infusão intravenosa do fármaco ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico foi, depois, iniciada e a cintigrafia com as contagens dos órgãos foi repetida às 48 h. Os controlos não receberam tratamento. A significância das diferenças entre os dois grupos foi avaliada pelo teste de *t*.

Foi demonstrado, anteriormente, em murganhos que o fígado e, especialmente, o hepatócito é o único local significativo de remoção e catabolismo de SAP humana e de murganho *in vivo* (16). Além disso, a SAP asialo-humana é removida, instantaneamente, pelo fígado no homem, via o receptor asialoglicoproteico do hepatócito e este processo foi analisado por imagens, utilizando  $^{123}\text{I}$ -SAP asialo-SAP (17). Evidentemente, o ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico desencadeia, de um modo semelhante, a rápida absorção hepática de SAP *in vivo*, conduzindo à eliminação virtualmente total da SAP em circulação. Isto promove a redistribuição de SAP dos tecidos para o plasma e suplementa o efeito do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico como um inibidor competitivo da ligação da SAP às fibrilas amilóides, conduzindo, deste modo, à remoção altamente eficaz d SAP dos depósitos de amilóide.

A potência do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico na eliminação da SAP em circulação foi notável, com os valores de SAP diminuindo quando a proporção de concentração de fármaco para pentâmero SAP no plasma se aproximou de equimolar (Fig. 7). Estudos de filtração em gel *in vitro* mostraram que mesmo esta concentração muito baixa de fármaco é suficiente para produzir alguns diméros de SAP (Tabela 3), isto é pares de moléculas de SAP pentaméricas reticuladas por moléculas de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico para formar a organização decamérica observada na estrutura de cristal (Figs. 1, 2). Esta é, evidentemente, a espécie reconhecida como anormal e rapidamente removida pelo fígado.

**Tabela 3. Organização molecular de SAP em soro humano total na presença de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico *in vitro***

Razão molar fármaco:proteína	Cálcio presente	Proteína	Volume de eluição (mL)	Organização molecular
Sem fármaco	-	CRP	12,0-12,5	Pentâmero
Sem fármaco	+	CRP	12,0-12,5	Pentâmero
1:1	+	CRP	12,0-12,5	Pentâmero
10:1	+	CRP	12,0-12,5	Pentâmero
100:1	+	CRP	12,0-12,5	Pentâmero
Sem fármaco	-	SAP	10,5-11,5	Decâmero
Sem fármaco	+	SAP	7,0-8,0	Agregados de elevado PM
1:1	+	SAP	7,0-8,0 & 10,0-10,5	Agregados de elevado PM
10:1	+	SAP	7,0-8,0 & 10,0-10,5	Agregados de elevado PM
100:1	+	SAP	10,0-10,5	Decâmero

Aliquotas de um único conjunto de soro humano normal, contendo SAP e CRP, foram misturadas com ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico nas proporções molares apresentadas, no que se refere ao protômero pentraxina e analisadas por cromatografia de exclusão molecular, precisamente como descrito anteriormente (14). As misturas e os eluidos da coluna continham quer iões de cálcio 2 mM ou não continham iões de cálcio e as concentrações de fármaco apropriadas para manter as proporções molares acima indicadas. A SAP no soro total é uma organização pentamérica solúvel estável

de protómeros, estabilizada pela presença da concentração de albumina no soro normal, elevada. No entanto, como a SAP é separada da albumina do soro durante a filtração em gel com um eluente contendo cálcio, a SAP autoagrega-se e é eluída inteiramente como polímeros de elevado peso molecular no volume vazio da coluna. Isto ocorre porque, na ausência de um ligando específico ao qual se possa ligar, a SAP humana isolada é insolúvel na presença de cálcio (14). No entanto, na ausência de cálcio, onde não pode ocorrer ligação de ligando ou autoagregação, a SAP forma decámeros estáveis, proporcionando um excelente marcador para o volume de eluição desta organização molecular (14). A CRP humana é um pentâmero estável quer na presença ou ausência de cálcio e, assim, proporciona um potente marcador para a posição de eluição dessa forma molecular (14). Mesmo numa concentração equimolar do fármaco, alguma da SAP foi solubilizada como complexos fármaco-decámero estáveis e a 100 vezes de excesso molar de fármaco, toda a SAP estava nesta forma.

A potência do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico foi confirmada pela observação que a injeção subcutânea de apenas 0,25 mg/kg/dia, administrada em doses divididas por 12 horas, proporcionou o mesmo efeito na SAP plasmática (Fig. 8) que a infusão intravenosa do fármaco.

### **Conclusão**

O ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico direcciona especificamente a SAP *in vivo*, através da capacidade de ligação a ligando

específico da SAP, mas, adicionalmente, como uma consequência da estrutura palindrômica do fármaco, de acordo com a presente invenção, provoca a agregação das moléculas de SAP pentaméricas nativas em complexos decaméricos de fármaco-SAP que são rapidamente removidos pelo fígado. Este novo efeito não era pretendido durante o desenvolvimento do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico como um inibidor da ligação da SAP a fibrilas amilóides e não foi procurado ou esperado. Representa um exemplo bem documentado da presente invenção e potencia, dramaticamente, a dissociação da SAP dos depósitos de amilóide, que é o objectivo terapêutico na amiloidose. Tal eliminação farmacológica direccionada de uma proteína plasmática em circulação representa um mecanismo novo, anteriormente não descrito, da acção do fármaco com ampla aplicabilidade para muitas proteínas e processos de doença diferentes.

### **Legendas das Figuras**

**Figura 1.** Estrutura tridimensional cristalina por raio-X de SAP complexada com ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico.

Vista lateral mostrando duas moléculas pentaméricas de SAP semelhantes a disco (9, 10), reticuladas por cinco moléculas de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico, os resíduos de D-prolina terminais de cada uma assentando na bolsa de ligação do ligando dependente de cálcio dos protómeros apostos.

**Figura 2.** Estrutura tridimensional cristalina por raio-X de SAP complexada com ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico.

Vistas detalhadas mostrando duas representações diferentes dos resíduos de ligação do ligando nas bolsas de ligação de ligando dependentes de cálcio, de dois protómeros apostos de moléculas de SAP diferentes e a densidade electrónica e/ou estrutura molecular do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico assente entre eles.

**Figura 3.** Efeitos do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico sobre a SAP em murganhos *in vivo*. Painel superior: a grupos de 10 murganhos de idade, sexo e peso coincidentes com amiloidose AA sistémica reactiva induzida experimentalmente, foi administrado uma dose de carregamento isolada de SAP humana marcada com  $^{125}\text{I}$  no dia 1 e receberam minibombas osmóticas implantadas que distribuem as doses apresentadas do ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (designado nas figuras como "desapina" por conveniência). A remoção dos depósitos de amilóide, catabolismo e excreção do marcador de SAP humana foram monitorizados, globalmente, pela contagem do corpo todo dos murganhos (esquerda) e foi determinada a quantidade total da SAP de murganho nos órgãos amiloidóticos após o sacrifício dos animais no dia 5 (direita). Painel central, esquerda: 4 grupos, cada um, com 10 murganhos de idade, sexo e peso coincidente, com amiloidose AA sistémica reactiva induzida experimentalmente, receberam uma injeção intravenosa de SAP de murganho ou humana pura marcada com  $^{125}\text{I}$  ao tempo zero e foram, depois, sangrados após 15 minutos e aos

outros tempos apresentados. Imediatamente após os 15 minutos de sangramento, dois grupos, um que recebeu SAP humana e o outro SAP de murganho, receberam uma injeção intraperitoneal isolada de 5 mg de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (desapina). O marcador que permaneceu em circulação é expresso como a percentagem média (SD) da quantidade ao ponto de tempo 15 minutos para cada grupo.

Painel central, direita: grupos, cada um, de 10 murganhos de idade, sexo e peso coincidentes, com amiloidose AA sistêmica reactiva induzida experimentalmente, receberam uma injeção intravenosa de SAP de murganho ou humana pura marcada com <sup>125</sup>I ao tempo zero e foram, depois, sangrados após 15 minutos e aos outros tempos apresentados. Num de cada um dos pares dos grupos que receberam SAP de murganho ou humana respectivamente, o marcador tinha sido misturado com ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (desapina) e incubado *in vitro* antes da injeção nos animais. O marcador que permaneceu em circulação é expresso como a média (SD) da radioactividade total por grama de sangue em cada grupo.

Painel inferior: efeito da administração de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (desapina) na água de beber às concentrações apresentadas, nos valores de SAP humana em circulação em murganhos transgênicos para a SAP humana. Murganhos com, aproximadamente, 20 g de peso corporal consomem cerca de 3 mL de água por dia.

**Figura 4:** Efeito da infusão intravenosa de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico nos valores de SAP no plasma em doentes com amiloidose sistêmica. Os doentes com formas diferentes de amiloidose sistêmica e com cargas amilóides variadas receberam

as doses do fármaco apresentada durante um período de 48 h. Os valores de SAP em circulação foram determinados por ensaio electroimunitário (18) em amostras recolhidas durante e após a infusão, nos tempos apresentados. Cada linha representa um doente individual diferente.

**Figura 5.** Cintigrafia com  $^{123}\text{I}$ -SAP de corpo inteiro, antes e 6 h depois do início da infusão de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico. Este doente, com uma carga moderada de amilóide AL no baço e rins, apresentava um ruído de fundo considerável no conjunto do sangue de marcador no coração e em circulação antes da administração do fármaco. Às 6 h, o ruído de fundo no conjunto do sangue está completamente ausente e o fígado, que é o único local de catabolismo da SAP *in vivo* (16, 17), tinha capturado o marcador embora a intensidade do sinal da SAP do baço e rins amiloidóticos seja significativamente reduzido (contagens dos órgãos não apresentadas).

**Figura 6.** Cintigrafia com  $^{123}\text{I}$ -SAP de corpo inteiro, antes, 24 h e 48 h depois do início da infusão de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico. Este doente, com uma carga moderada de amilóide AL no baço e rins, apresentava um ruído de fundo considerável do conjunto do sangue do marcador no coração e em circulação antes da administração do fármaco. Às 24 h e 48 h, o ruído de fundo no conjunto do sangue está completamente ausente e o fígado, que é o único local de catabolismo da SAP *in vivo* (16, 17), tinha capturado o marcador e os produtos do catabólicos estão a ser excretados na urina, como apresentado pelo sinal na bexiga. A intensidade do sinal da SAP do baço e rins amiloidóticos é significativamente reduzida: às 24 h as contagens no baço são

85% em relação ao tempo 0, rins 77%; às 48 h, baço 54%, rins 50%.

**Figura 7.** Concentração plasmática de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico e da SAP durante 48 h de infusão.

Dois doentes individuais com amiloidose sistémica e cargas de amilóide moderada receberam ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (desapina) por infusão intravenosa às taxas constantes apresentadas. As concentrações de SAP em circulação começaram a diminuir quase imediatamente e atingiram metade do valor quando as concentrações de fármaco e protómero SAP foram equimolares.

**Figura 8.** Efeito da administração de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico, por injeção subcutânea, nos valores de SAP em circulação e retenção de marcador  $^{123}\text{I}$ -SAP nos órgãos viscerais.

As doses de ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (desapina) apresentadas foram administradas por injeções subcutâneas com intervalos de 12 horas a dois doentes individuais com amiloidose sistémica e com cargas de amilóide pequena e moderada, respectivamente. O desaparecimento da SAP em circulação foi efectivamente igual ao observado durante a infusão intravenosa do fármaco e no doente ilustrado no painel direito, que recebeu uma dose de marcador de  $^{123}\text{I}$ -SAP, foi observada uma acumulação de SAP no fígado e remoção acelerada do baço.

## REFERÊNCIAS

1. Hind, C.R.K., Collins, P.M., Caspi, D., Baltz, M.L. e Pepys, M.B. (1984) Specific chemical dissociation of fibrillar and non-fibrillar components of amyloid deposits. *Lancet*, **ii**: 376-378.
2. Tennent, G.A., Lovat, L.B. e Pepys, M.B. (1995) Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer's disease and systemic amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 4299-4303.
3. Pepys, M.B., Tennent, G.A. , Booth, D.R. , Bellotti, V., Lovat, L.B., Tan, S.Y., Persey, M.R., Hutchinson, W.L., Booth, S.E., Madhoo, S., Soutar, A.K., Hawkins, P.N., Van Zyl-Smit, R., Campistol, J.M., Fraser, P.E., Radford, S.E., Robinson, C.V., Sunde, M., Serpell, L.C. e Blake, C.C.F. (1996) Molecular mechanisms of fibrillogenesis and the protective role of amyloid P component: two possible avenues for therapy. Em: *The nature and origin of amyloid fibrils*, (Bock, G.R. e Goode, J.A., eds.), Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 199), pp. 73-89.
4. Pepys, M.B., Booth, D.R., Hutchinson, W.L., Gallimore, J.R., Collins, P.M. e Hohenester, E. (1997) Amyloid P component. A critical review. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.*, **4**: 274-295.
5. Pepys, M.B. (1999) The Lumleian Lecture. C-reactive protein and amyloidosis: from proteins to drugs? Em: *Horizons in Medicine, Vol. 10* (Williams, G., eds.), Royal College of Physicians, Londres, pp. 397-414.

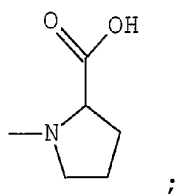
6. Pepys, M.B., Dash, A.C., Munn, E.A., Feinstein, A., Skinner, M., Cohen, A.S., Gewurz, H., Osmand, A.P. e Painter, R.H. (1977) Isolation of amyloid P component (protein AP) from normal serum as a calcium-dependent binding protein. *Lancet*, **i**: 1029-1031.
7. Pontet, M., Engler, R. e Jayle, M.F. (1978) One step preparation of both human C-reactive protein and Clt. *Fed. Bur. Biol. Soc. Lett.*, **88**: 172-178.
8. Hind, C.R.K., Collins, P.M., Renn, D., Cook, R.B., Caspi, D., Baltz, M.L. e Pepys, M.B. (1984) Binding specificity of serum amyloid P component for the pyruvate acetal of galactose. *J. Exp. Med.*, **159**: 1058-1069.
9. Emsley, J., White, H.E., O'Hara, B.P., Oliva, G., Srinivasan, N., Tickle, I.J., Blundell, T.L., Pepys, M.B. e Wood, S.P. (1994) Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature*, **367**: 338-345.
10. Hohenester, E., Hutchinson, W.L., Pepys, M.B. e Wood, S.P. (1997) Crystal structure of a decameric complex of human serum amyloid P component with bound dAMP. *J. Mol. Biol.*, **269**: 570-578.
11. Ashton, A.W., Boehm, M.K., Gallimore, J.R., Pepys, M.B. e Perkins, S.J. (1997) Pentameric and decameric structures in solution of serum amyloid P component by X-ray and neutron scattering and molecular modelling analyses. *J. Mol. Biol.*, **272**: 408-422.

12. Baltz, M.L., de Beer, F.C., Feinsten, A. e Pepys, M.B. (1982) Calcium- dependent aggregation of human serum amyloid P component. *Biochim. Biophys. Acta*, **701**: 229-236.
13. Booth, D.R., Gallimore, J.R., Hutchinson, W.L., Hohenester, E., Thompson, D., Wood, S. e Pepys, M.B. (1999) Analysis of autoaggregation and ligand binding sites of serum amyloid P component by *in vitro* mutagenesis. Em: *Amyloid and Amyloidosis 1998*, (Kyle, R.A. e Gertz, M.A., eds.), Parthenon Publishing, Pearl River, Nova Iorque, pp. 23-25.
14. Hutchinson, W.L., Hohenester, E. e Pepys, M.B. (2000) Human serum amyloid P component is a single uncomplexed pentamer in whole serum. *Mol. Med.*, **6**: 82-493.
15. Hawkins, P.N., Wootton, R. e Pepys, M.B. (1990) Metabolic studies of radioiodinated serum amyloid P component in normal subjects and patients with systemic amyloidosis. *J. Clin. Invest.*, **86**: 1862-1869.
16. Hutchinson, W.L., Noble, G.E., Hawkins, P.N. e Pepys, M.B. (1994) The pentraxins, C-reactive protein and serum amyloid P component, are cleared and catabolized by hepatocytes *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, **94**: 1390-1396.
17. Pepys, M.B., Rademacher, T.W., Amatayakul-Chantler, S., Williams, P., Noble, G.E. , Hutchinson, W.L., Hawkins, P.N., Nelson, S.R., Gallimore, J.R., Herbert, J., Hutton, T. e Dwek, R.A. (1994) Human serum amyloid P component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 5602-5606.

18. Nelson, S.R., Tennent, G.A., Sethi, D., Gower, P.E., Ballardie, F.W., Amatayakul-Chantler, S. e Pepys, M.B. (1991) Serum amyloid P component in chronic renal failure and dialysis. *Clin. Chim. Acta*, **200**: 191-200.

Lisboa, 17 de Maio de 2007





- $R^1$  é hidrogénio ou halogéneo;
- X é  $-(CH_2)_n-$ ;  $-CH(R^2)(CH_2)_n-$ ;  $-CH_2O(CH_2)_n-$ ;  $-CH_2NH-$ ; benzilo,  $-C(R^2)=CH-$ ;  $-CH_2CH(OH)-$ ; ou tiazol-2,5-dilo;
- Y é  $-S-S-$ ;  $-(CH_2)_n-$ ;  $-O-$ ;  $-NH-$ ;  $-N(R^2)-$ ;  $-CH=CH-$ ;  $-NHC(O)NH-$ ;  $-N(R^2)C(O)N(R^2)-$ ;  $-N[CH_2C_6H_3(OCH_3)_2]-$ ;  $-N(CH_2C_6H_5)-$ ;  $-N(CH_2C_6H_5)C(O)N(CH_2C_6H_5)-$ ;  $-N(\text{alcoxialquilo})-$ ;  $N(\text{cicloalquil-metil})-$ ; 2,6-piridilo; 2,5-furanilo; 2,5-tienilo; 1,2-ciclo-hexilo; 1,3-ciclo-hexilo; 1,4-ciclo-hexilo; 1,2-naftilo; 1,4-naftilo; 1,5-naftilo; 1,6-naftilo; bifenileno; ou 1,2-fenileno, 1,3-fenileno e 1,4-fenileno, em que os grupos fenileno são opcionalmente substituídos com 1-4 substituintes, seleccionados de halogéneo, alquilo inferior, alcoxilo inferior, hidroxilo, carboxilo,  $-COO$ -alquilo inferior, nitrilo, 5-tetrazole, (2-ácido carboxílico pirrolidin-1-il)-2-oxo-etoxilo, N-hidroxicarbamimidoílo, 5-oxo[1,2,4]oxadiazolilo, 2-oxo[1,2,3,5]oxatiadiazolilo, 5-tioxo[1,2,4]oxadiazolilo e 5-terc-butilsulfanil[1,2,4] oxadiazolilo;

X' é  $-(\text{CH}_2)_n-$ ;  $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{R})-$ ;  $-(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_2-$ ;  $-\text{NHCH}_2-$ ; benzilo,  $-\text{CH}=\text{C}(\text{R}^2)-$ ;  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$ ; ou tiazol-2,5-diilo;

R<sup>2</sup> é alquilo inferior, alcoxilo inferior ou benzilo e

n é 0-3,

ou um seu sal ou mono- ou diéster farmacêuticamente aceitável.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que cada ligando é seleccionado para ser ligado pela proteína com uma constante de dissociação que não é superior a 1 milimolar.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a D-prolina é o ácido (R)-1-[6-(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico ou um seu sal mono- ou diéster farmacêuticamente aceitável.
4. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a dosagem está na gama desde 0,1 a 6 mg/kg por indivíduo/dia.

Lisboa, 17 de Maio de 2007

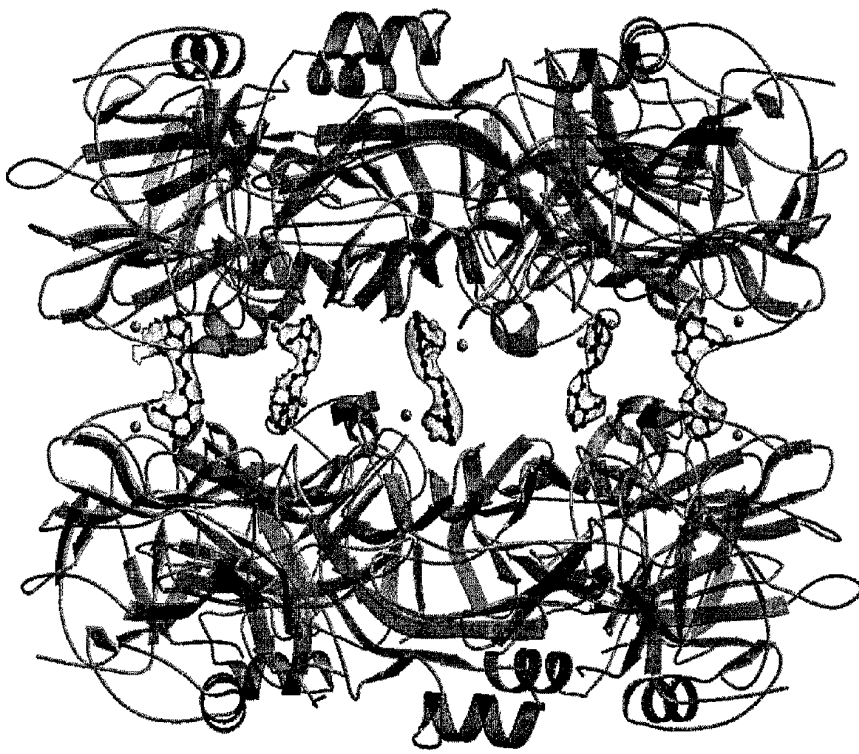


Figura 1

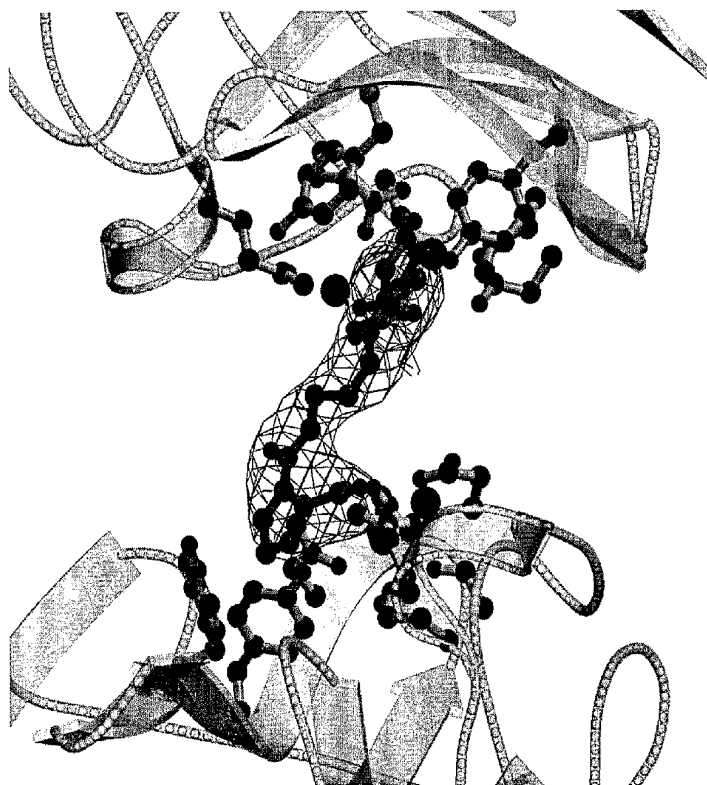


Fig. 2A

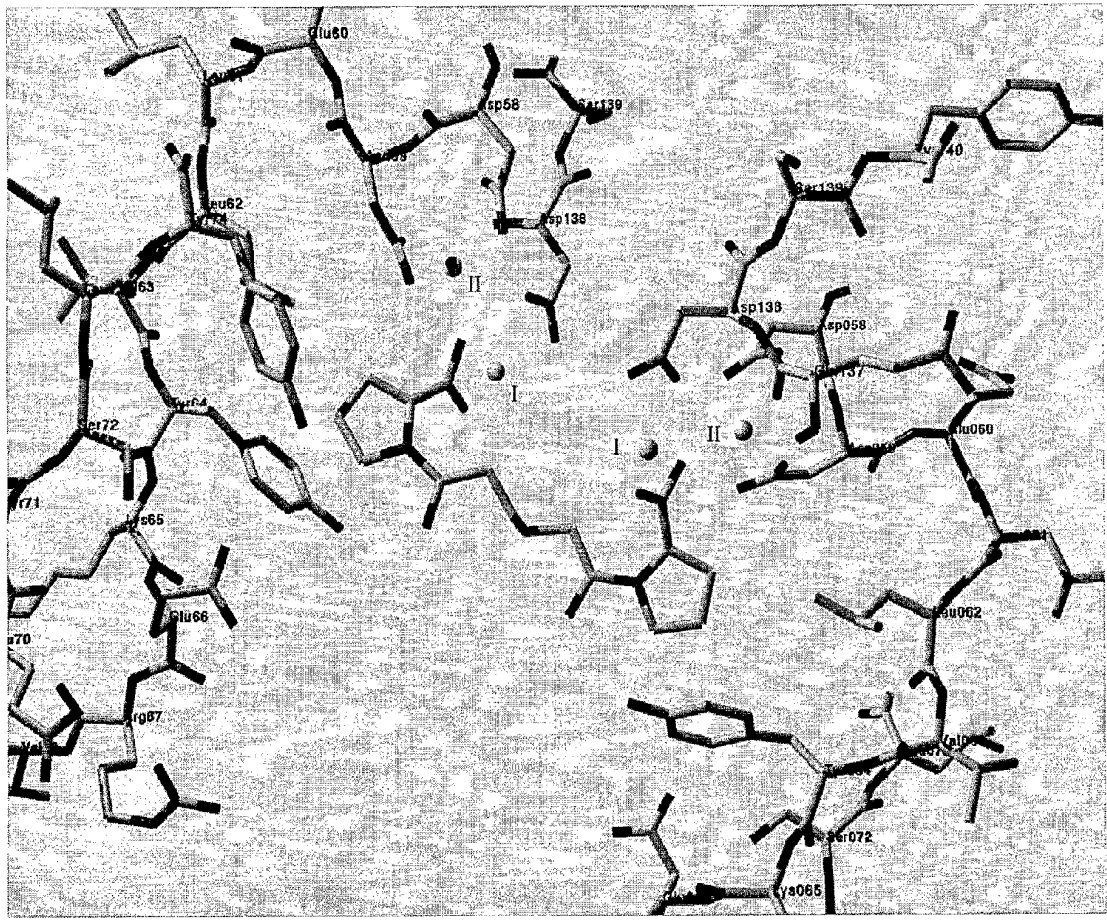


Fig. 2B

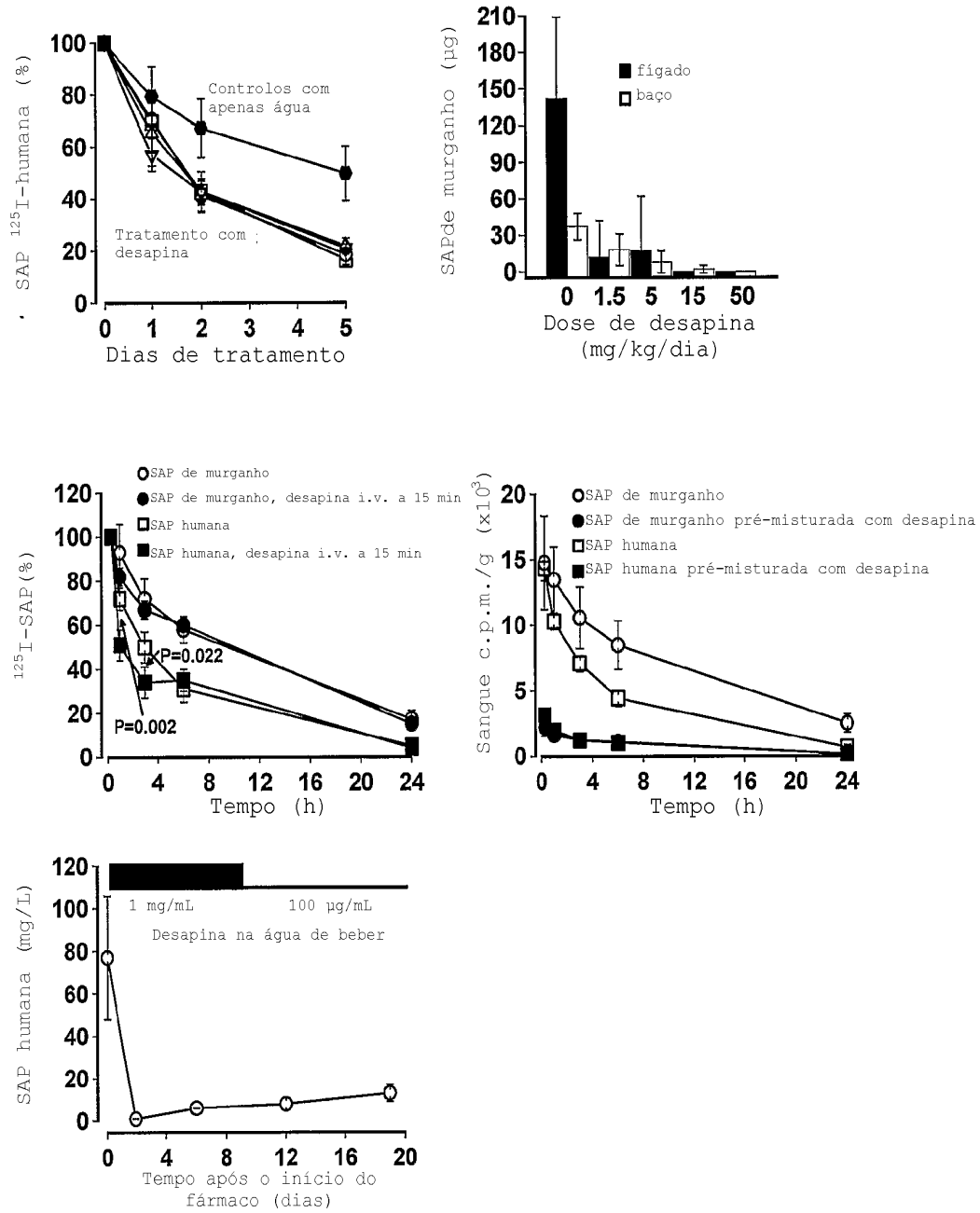


Figura 3

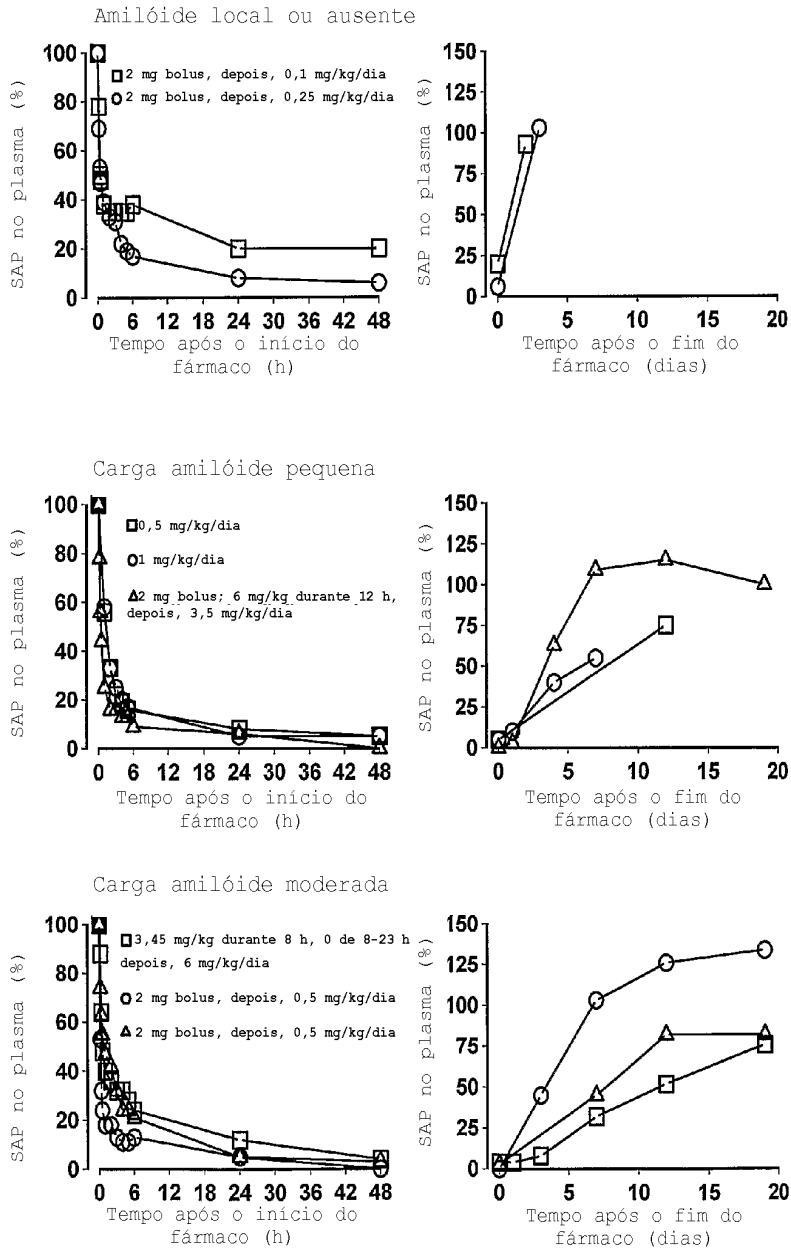


Figura 4

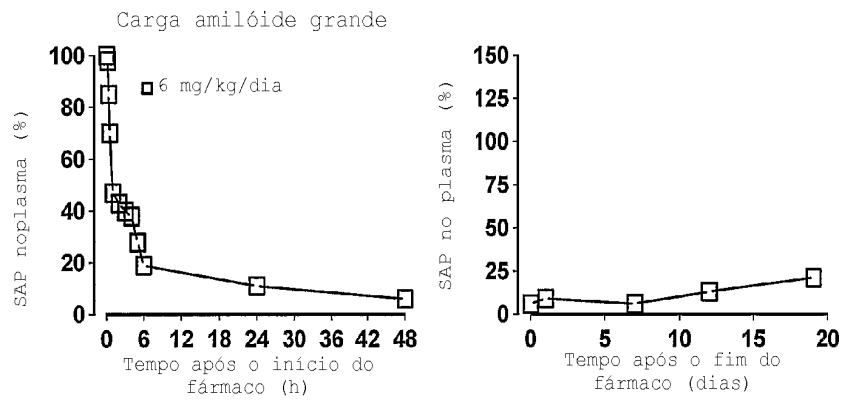


Figura 4 (Cont.)

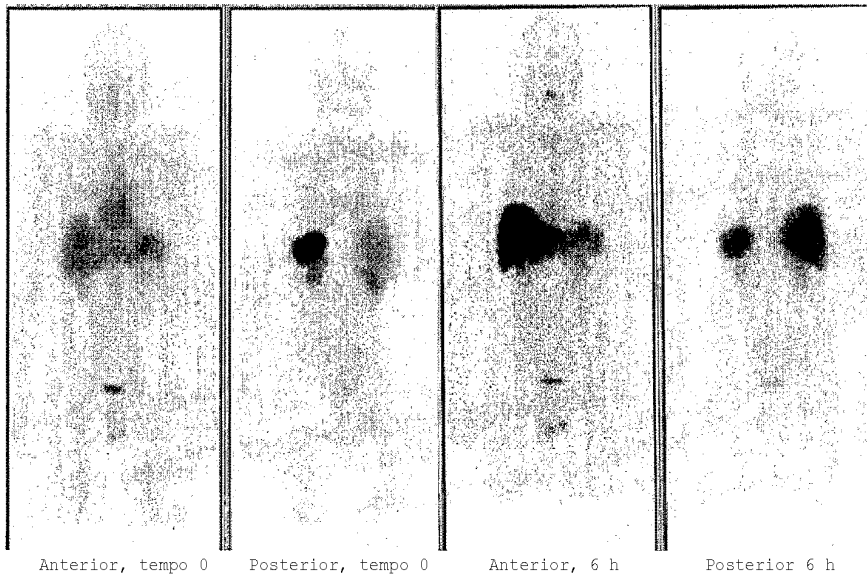


Figura 5

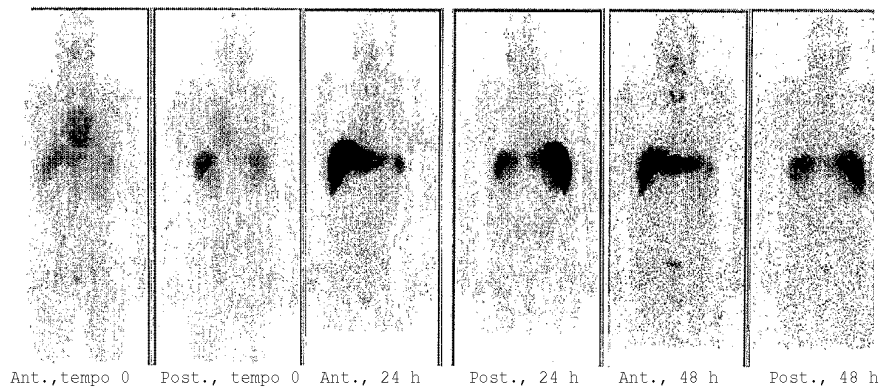


Figura 6

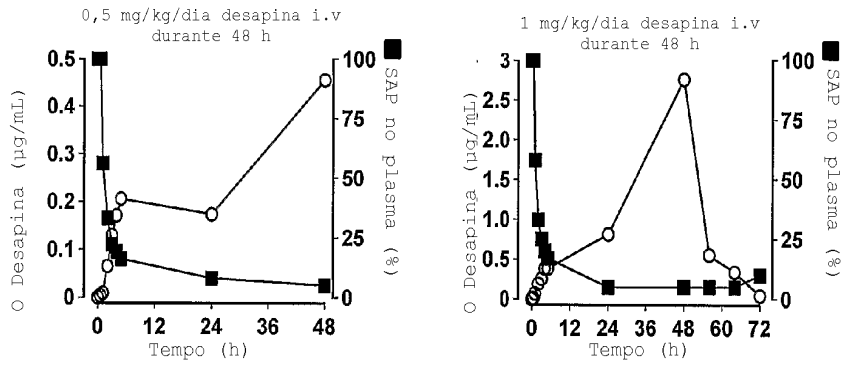


Figura 7

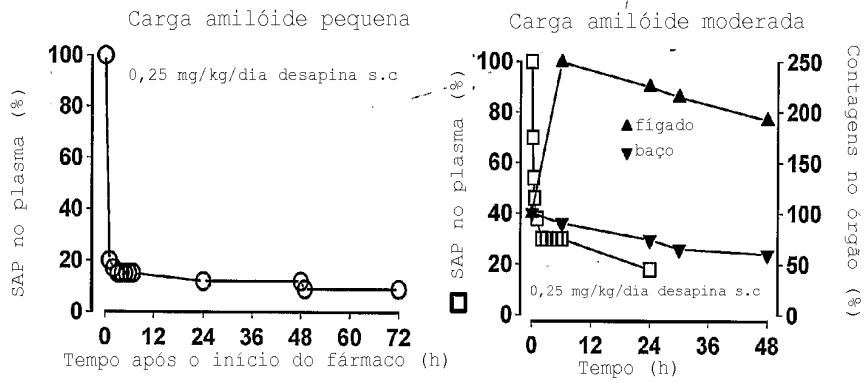


Figura 8