

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 96.283

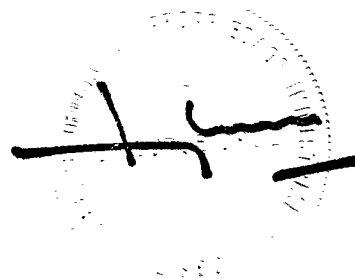
REQUERENTE: G.D.SEARLE & CO., norte-americana, industrial, com sede em P.O.Box 5110, Chicago, IL 60680, Estados Unidos da América do Norte

EPÍGRAFE: "MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DE 2-ISOPROPIL-2-FENILAMINOVALERONITRILOS COMO IMUNOSSUPRESSORES E VASODILATADORES"

INVENTORES: CHI-DEAN LIANG; RICHARD AUGUST MUELLER;
JOHN P.McKEARN; TERRY B.STROM e KENNETH J.WIEDER

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

21 de Dezembro de 1989 sob o No.07/456,007, nos Estados Unidos da América do Norte



G.D. SEARLE & CO.

"MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DE 2-ISOPROPIL-2-FENILAMINOVALERONITRILOS
COMO IMUNOSSUPRESSORES E VASODILATADORES"

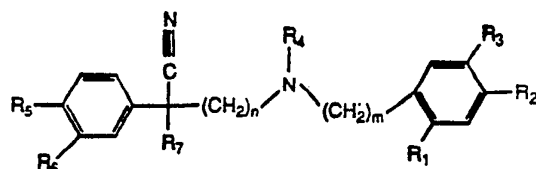
=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a utilização de 2-isopropil-2-fenil-5-(fenetilamino)valeronitrilos substituídos como imunossupressores num método de tratamento da rejeição ao transplante de órgão, quer isolada quer em colaboração com a administração de ciclosporina de uma maneira sinérgica que permite o uso de dosagens mais baixas de ciclosporina do que as usadas se a ciclosporina for administrada isoladamente. O mecanismo de acção é pensado no sentido de ser independente da actividade de bloqueamento do canal de cálcio cardiovascular dos compostos.

Os compostos agora utilizados apresentam a fórmula:



e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis, em que R_1 representa hidróxi; alquilo, alcenilo ou alcinilo de 1 até 10 átomos de carbono substituído ou não substituído, em que o referido substituinte é hidróxi ou ceto; alquilcarbonilo de 1 até 10 átomos de carbono; alcóxicarbonilo de 1 até 10 átomos de carbono; ou alquilamido de 1 até 10 átomos de carbono; R_2 , R_3 , R_5 e R_6 representam independentemente hidróxi ou alcóxi de 1 até 10 átomos de carbono; e R_4 e R_7 representam independentemente hidrogénio; alquilo, alcenilo ou alcinilo de 1 até 10 átomos de carbono; m é um inteiro desde 1 até 2, inclusive; e n é um inteiro desde 1 até 5, inclusive.

A handwritten signature in black ink is written over a circular stamp. The signature consists of a horizontal line with a vertical stroke crossing it, followed by a stylized 'u' and another horizontal line. The circular stamp is faint and contains some illegible text.

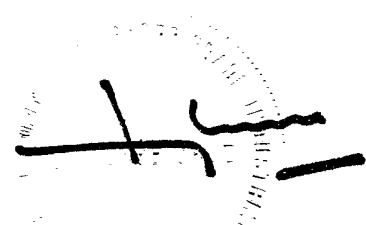
- 3 -

Fundamento do Invento

O presente invento proporciona novos métodos de utilização de novos compostos e composições, sendo estes compostos farmacologicamente úteis como anti-hipertensivos e para a imunossupressão de um mamífero e sendo especialmente úteis para a imunossupressão num mamífero em conjunção com a administração de outros medicamentos de imunossupressão, especialmente a ciclosporina (também conhecida por ciclosporina A).

Mais especificamente, o método do presente invento é causar a imunossupressão pela administração de uma classe de 2-isopropil-2-fenil-5-(fenetilamino)valeronitrilos, sendo substituídos na porção fenetilamino.

Os compostos do presente invento estão estruturalmente relacionados com o verapamil, que é conhecido por ser um bloqueador de canal de ião misto para os canais de cálcio e de potássio.

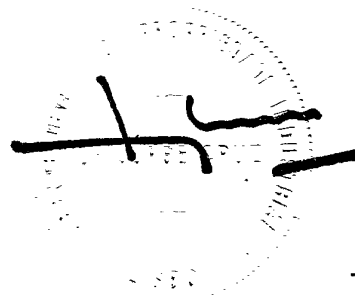


Campo do Invento

A imunossupressão é uma técnica necessária nos campos da transplantação de órgão e de medula óssea. Os agentes de imunossupressão são utilizados para a profilaxia e tratamento da rejeição do órgão em transplantes alogeneicos (transplantes entre indivíduos da mesma espécie, mas não geneticamente idênticos). Uma tal terapia ajuda a prolongar a sobrevivência dos transplantes do rim, fígado e coração, bem como dos transplantes de extensão inferior do pâncreas, transplantes de coração-pulmão e transplantes de medula óssea. Esta imunossupressão é necessária de modo a alterar as reacções do sistema imune à presença do órgão ou do tecido estranho, que resultará normalmente na rejeição e destruição indiscriminada pelo sistema imune do hospedeiro do órgão ou do tecido transplantado.

A ciclosporina A é um agente imunossupressor particularmente eficaz na profilaxia e tratamento da rejeição do órgão. A ciclosporina A é um elemento de uma família de compostos e é um undecapeptídeo hidrofóbico produzido pelo fungo *Tolypocladium inflatum gams*. Outras ciclosporinas incluem a ciclosporina B e a ciclosporina G. A ciclosporina A suprime a imunidade humoral assim como as reacções mediadas por célula. A ciclosporina A está indicada para a rejeição de órgão em transplantes de rim, fígado, coração, pâncreas, medula óssea e coração-pulmão. A ciclosporina A é também útil no tratamento da doença de Crohn, oftalmopatia de Graves, psoríase severa, anemia aplástica, esclerose múltipla, alopecia areata, e pénfigus e penfigóide, dermatomiosite, polimiosite, doença de Bechet, uveíte, sarcocidiose pulmonar, cirrose biliar, miastenia gravis e dermatite atópica.

Infelizmente, a ciclosporina A pode provocar toxicidade renal e hepática, causando significativos danos no rim e fígado

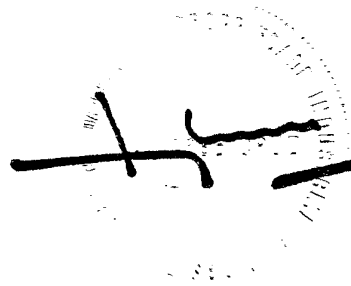


dos pacientes que recebem transplantes de órgãos, incluindo danos para o próprio fígado transplantado se o processo for um transplante de rim. Por conseguinte, é um objectivo do presente invento proporcionar um método de administração de uma classe de compostos que, quando administrados a um mamífero, efectivem a imunossupressão e exibam ainda uma toxicidade significativamente inferior do que a da administração da ciclosporina.

É um outro objectivo do presente invento proporcionar uma classe de compostos que, quando administrados a um mamífero simultaneamente com uma ciclosporina ou outros imunossuppressores, actuem de uma maneira sinérgica para baixar a dosagem de uma ciclosporina ou outro imunossupressor necessária para se alcançar um dado nível de imunossupressão, diminuindo desta maneira a possibilidade de causar toxicidade pela ciclosporina ou outro imunossupressor. Os outros imunossuppressores incluem levamisol, corticosteróides, drogas não-esteróides anti-inflamatórias (NSAIDS), certas prostaglandinas e o macrólido FK-506 (Fujisawa).

O presente invento proporciona um novo método de administração de novos 2-isopropil-2-fenil-5-(fenetilamino)valeronitrilos substituídos, que se mostram eficazes como agentes de imunossupressão em virtude da sua capacidade em inibir a produção de interleucina, inibindo em consequência disso os linfoblastos T e, por conseguinte, a proliferação da célula T. A inibição da proliferação da célula T bloqueará por sua vez a activação dos linfócitos citotóxicos T, um passo chave na resposta imune de um mamífero normal.

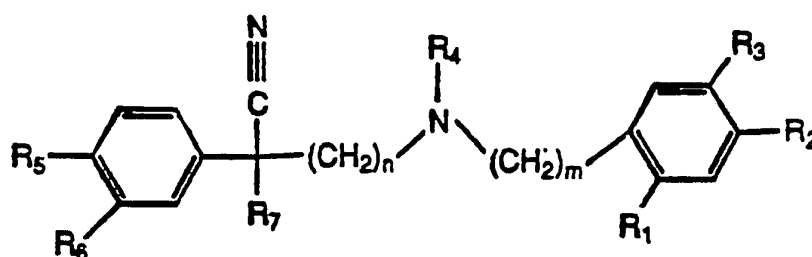
O presente invento ainda proporciona o facto de que os compostos têm aqui actividade e utilidade como anti-hipertensivos sistémicos, actividade vasodilatadora selectiva do local útil no tratamento da isquemia renal e isquemia cerebral. O mecanismo de



acção para as actividades imunológicas dos compostos do presente invento é pensada no sentido de ser independente da actividade de bloqueamento do canal de cálcio dos compostos.

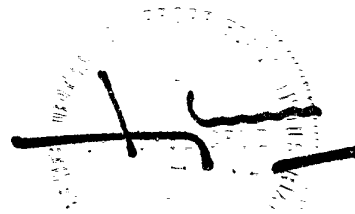
Sumário do Invento

O invento refere-se a um novo método de administração de novos compostos de fórmula de estrutura geral I:

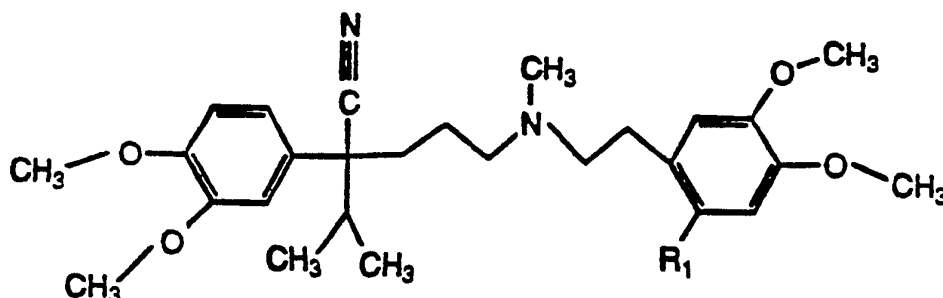


e dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis, em que

- R₁ representa hidrogénio; hidroxi;
alquilo, alcenilo ou alcinilo de 1 até 10 átomos de carbono substituído ou não substituído, em que o referido substituinte é hidroxi ou ceto;
alquilcarbonilo de 1 até 10 átomos de carbono;
alcoxycarbonilo de 1 até 10 átomos de carbono; ou
alquilamido de 1 até 10 átomos de carbono;
- R₂, R₃, R₅ e R₆ representam independentemente hidroxi ou alcoxi de 1 até 10 átomos de carbono; e
- R₄ e R₇ representam independentemente hidrogénio; alquilo, alcenilo ou alcinilo de 1 até 10 átomos de carbono;
- m é um inteiro desde 1 até 2, inclusive; e
- n é um inteiro desde 1 até 5, inclusive.



Um encorporamento mais preferido do presente invento refere-se à administração de novos compostos de fórmula de estrutura geral II:



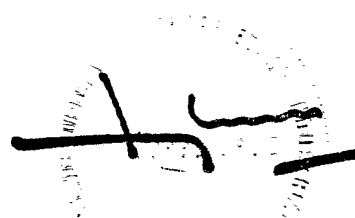
e dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis, em que

R_1 representa hidrogénio; hidroxí;
alquilo, alcenilo ou alcinilo de 1 até 10 átomos de carbono substituído ou não substituído, em que o referido substituinte é ceto ou hidroxí;
alquilcarbonilo de 1 até 10 átomos de carbono; ou
alquilamido de 1 até 10 átomos de carbono.

Os compostos e as suas composições farmacêuticas são úteis nos métodos de imunossupressão do invento. O invento proporciona também para administração formas unitárias de dosagem para administração oral, tópica e parentérica. Ainda proporcionada neste invento é a administração dos sais farmacêuticamente aceitáveis dos compostos, para a imunossupressão.

Descrição Detalhada do Invento

Quando aqui utilizadas, as expressões "alquilo", "alcenilo" e "alcinilo" são definidas de modo a incluírem ligações



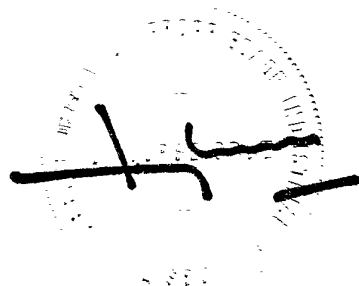
carbono-carbono lineares ou ramificadas de 1 até 10 átomos de carbono com 1 ou mais graus de insaturação.

Os termos "alquilcarbonilo" e "alcoxicarbonilo" são definidos de modo a incluírem porções alquilo, alcenilo e alcinilo como acima se definiram.

O termo "alquilamido" é definido de modo a incluir porções alquilo, alcenilo e alcinilo como acima se definiram.

O termo "sais farmacêuticamente aceitáveis" refere-se a sais não tóxicos dos compostos deste invento que são geralmente preparados pela reacção da base livre com um ácido inorgânico ou orgânico adequado ou pela reacção do ácido com uma base adequada. Os sais representativos incluem os seguintes sais:

Acetato	Lactobionato
Benzenossulfonato	Laurato
Benzoato	Malato
Bicarbonato	Maleato
Bissulfato	Mandelato
Bitartarato	Mesilato
Borato	Metilbrometo
Brometo	Metilnitrato
Edetato de cálcio	Metilsulfato
Camsilato	Mucato
Carbonato	Napsilato
Cloreto	Nitrato
Clavulanato	Oleato
Citrato	Oxalato
Di-hidrocloreto	Pamoato (Embonato)
Edetato	Palmitato
Edisilato	Pantotenato
Esilato	Fosfato/difosfato
Estolato	Poligalacturonato
Fumarato	Salicilato
Gluceptato	Estearato
Gluconato	Subacetato
Glutamato	Succinato
Glicolilarsanilato	Sulfato
Hexilresorcinato	Tanato
Hidrabinina	Tartarato



- 9 -

Hidrobrometo	Teoclato
Hidrocloreto	Tosilato
Hidroxinaftoato	Trietiodeto
Iodeto	Valerato
Isetionato	
Lactato	

Quando aqui utilizado, o termo "imunossupressão" significará a diminuição controlada artificial ou a prevenção da resposta imune de um mamífero.

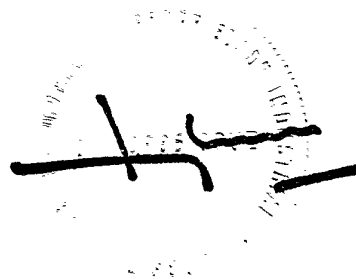
O termo "isquemia" significará deficiência de sangue para uma parte do corpo, devida à consticção de um ou mais vasos sanguíneos.

O termo "hipertensão" significará pressão sanguínea arterial persistentemente elevada.

O termo "quantidade farmacologicamente eficaz" referir-se-á àquela quantidade de droga ou agente farmacêutico que elicitará a resposta biológica ou médica de um tecido, sistema ou animal que está a ser objecto de pesquisa de um investigador ou médico.

O termo "agente imunossupressor" incluirá ciclosporinas A, B e G, corticosteróides, levamisol, drogas não-esteróides anti-inflamatórias e as prostaglandinas que exibem actividade imunossupressora.

Os compostos utilizados na prática do método imunossupressor do invento podem ser prontamente preparados de acordo com os esquemas de reacção seguintes, ou as suas modificações, utilizando processos de síntese convencionais e reagentes e materiais de partida prontamente disponiveis. Nestas reacções, é também

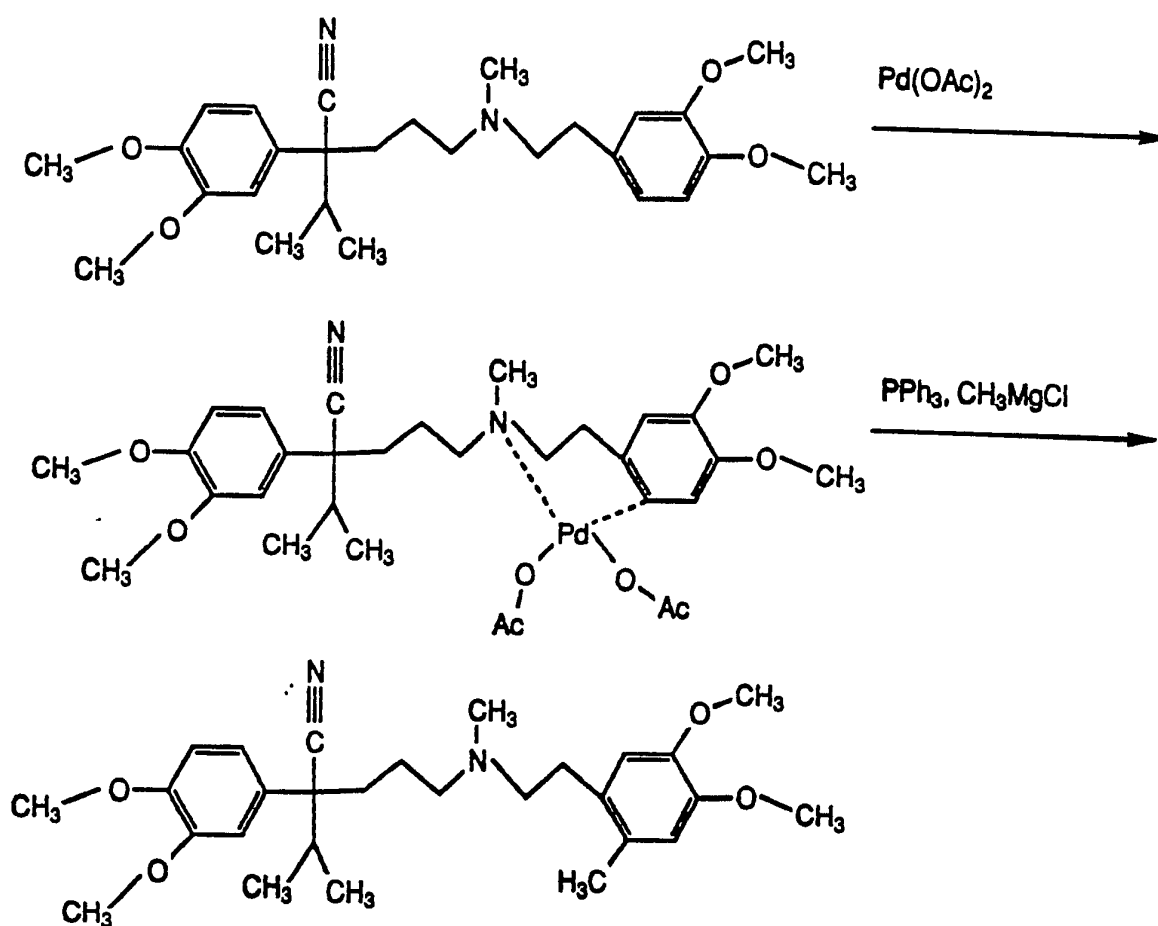


- 10 -

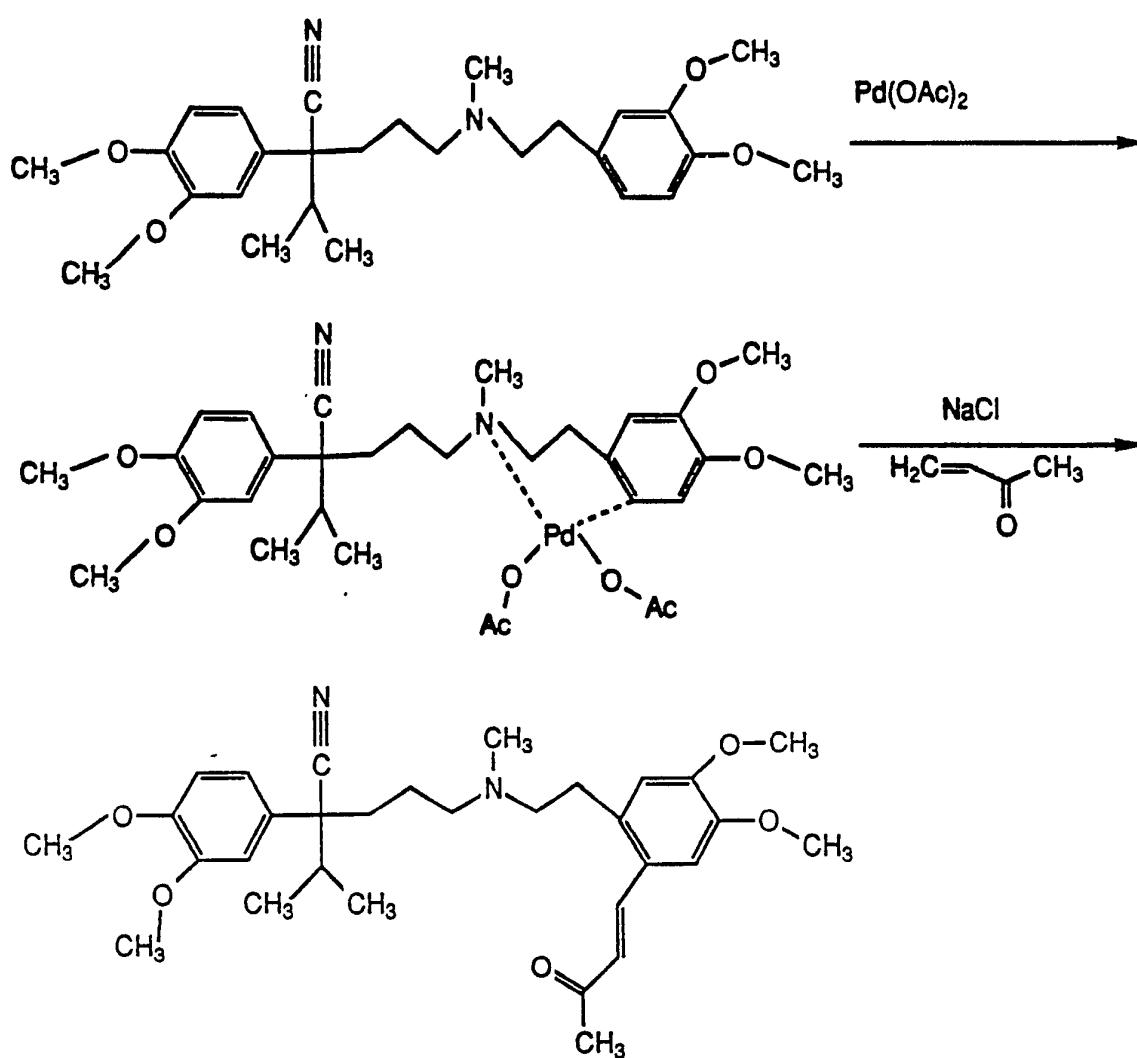
possível fazer uso de variantes que são elas próprias conhecidas,
mas não são mencionadas em maior detalhe.

EXEMPLO 1

Esquema I

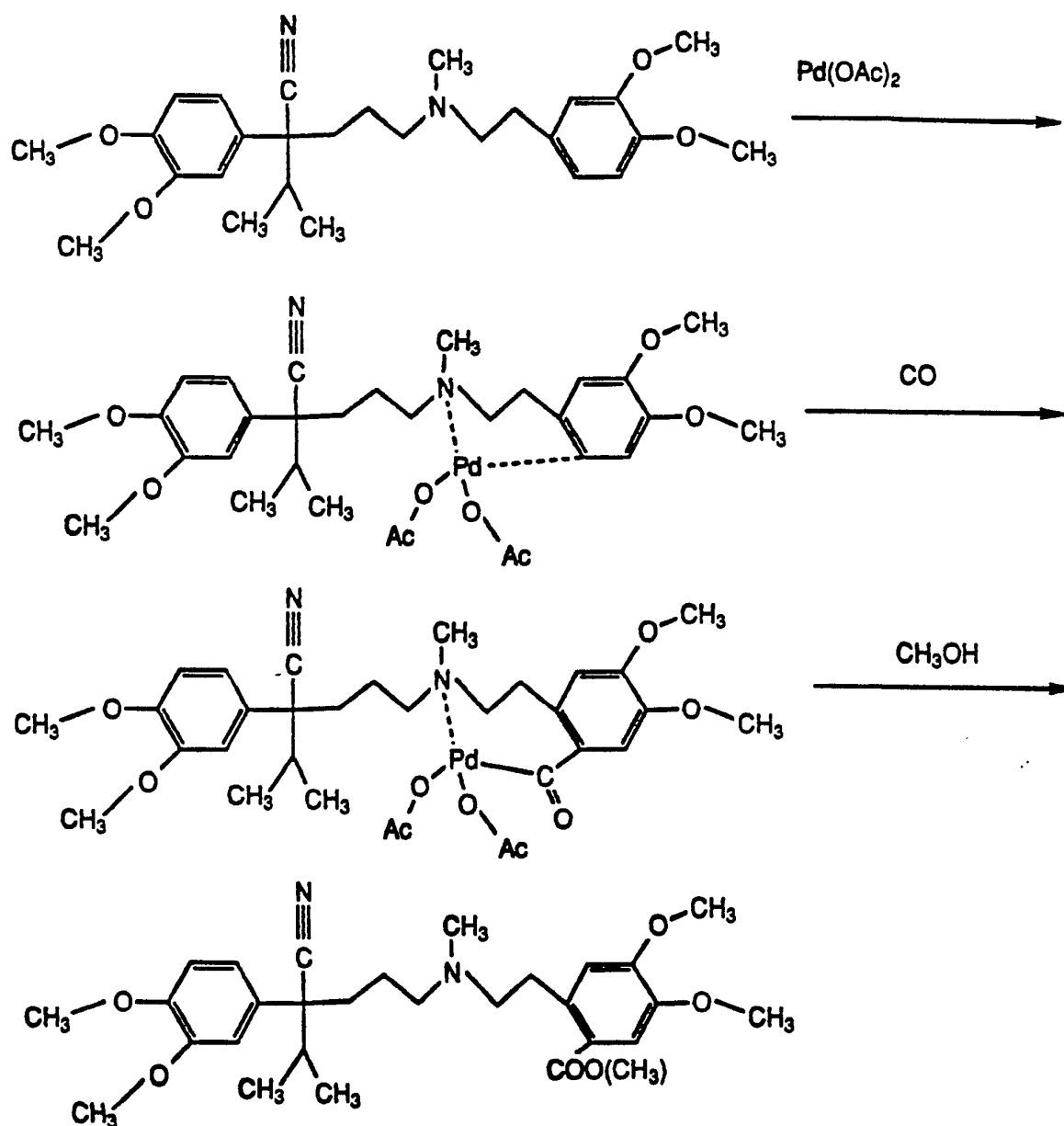


Esquema II

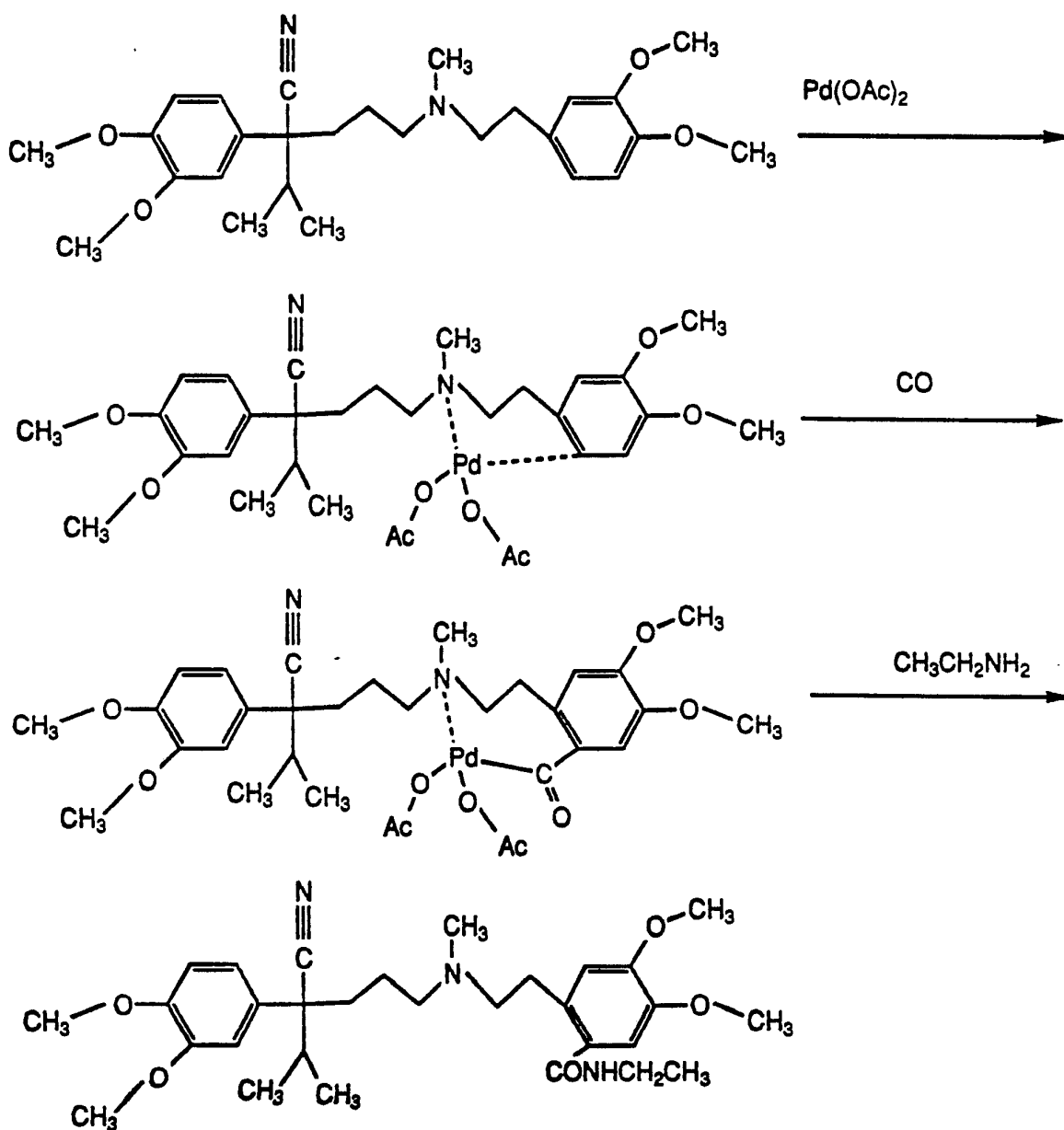


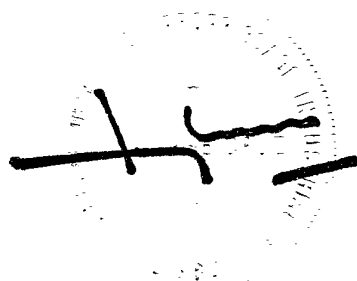
~~CONFIDENTIAL~~

Esquema III



Esquema IV





- 15 -

Nos esquemas anteriores, Ac indica uma porção COCH_3 ; Ph indica uma porção fenilo.

Na realização da imunossupressão, os compostos do presente invento podem ser administrados em formas de dosagem oral como comprimidos, cápsulas, pílulas, pós, grânulos, elixires, tinturas, suspensões, xaropes e emulsões. Semelhantemente, eles também podem ser administrados de forma intravenosa, intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular, todas formas de utilização conhecidas dos peritos habituais nas técnicas farmacêuticas.

Em geral, a forma preferida de administração é a oral. Uma quantidade eficaz mas não tóxica de um dos compostos reivindicados no novo método pode ser empregue como imunossupressora na inibição da resposta imune de um mamífero ou no tratamento da hipertensão, isquemia renal ou isquemia cerebral. Um encorporamento alternativo do presente invento é um novo método de administração de uma quantidade eficaz mas não tóxica de um ou mais dos referidos compostos em colaboração com quantidades eficazes, mas menores do que as previamente descritas, de uma ciclosporina num regime de terapia imunossupressora. O regime de dosagem do presente invento é escolhido de acordo com uma variedade de factores incluindo o tipo, espécie, idade, peso, sexo e condição médica do paciente; a severidade da condição a ser tratada; a via de administração; a função renal e hepática do paciente; e o composto particular ou o seu sal empregue. Um médico ou veterinário com perícia normal pode prontamente determinar e prescrever a quantidade eficaz da droga requerida para se alcançar a imunossupressão.

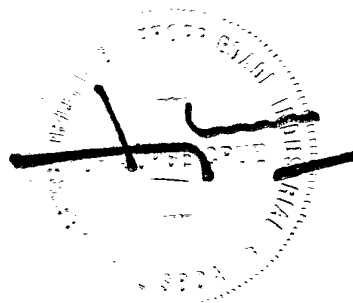
As dosagens dos compostos a utilizar nos métodos do presente invento, quando utilizados para os efeitos indicados, situar-se-ão numa gama desde cerca de 0,1 miligrama por quilograma de peso corporal por dia (mg/kg/dia) até cerca de

1,000 mg/kg/dia e preferivelmente 1,0-100 mg/kg/dia. Vantajosamente, os compostos utilizados no método do presente invento podem ser administrados numa dose única diária ou a dosagem total diária pode ser administrada em doses divididas de 2, 3 ou 4 vezes diárias.

Outrossim, os compostos preferidos utilizados no presente invento podem ser administrados em forma intranasal, via uso tópico de veículos intranasais adequados, ou via transdérmica, utilizando as formas de emplastos para pele transdérmicos bem conhecidas dos peritos habituais nesta técnica. Para serem administrados na forma de um sistema de entrega transdérmico, a administração será, certamente, contínua ao longo de todo o regime de dosagem.

Nos métodos do presente invento, os compostos aqui descritos em detalhe podem formar o ingrediente activo e são tipicamente administrados em mistura com diluentes, excipientes ou agentes de suporte (colectivamente referidos daqui em diante como materiais "agente de suporte") farmacêuticamente adequados, adequadamente escolhidos em relação à forma pretendida de administração, isto é, comprimidos, cápsulas, tinturas, xaropes e semelhantes orais, e consistentes com as práticas farmacêuticas convencionais.

Por exemplo, para administração oral na forma de um comprimido ou cápsula, a componente da droga activa pode ser combinada com um agente de suporte oral, não tóxico, farmacêuticamente aceitável, inerte, tal como lactose, amido, sacarose, glicose, metilcelulose, estearato de magnésio, fosfato de dicálcio, sulfato de cálcio, manitol, sorbitol e semelhantes; para administração oral na forma líquida, as componentes da droga orais podem ser combinados com qualquer agente de suporte oral, não tóxico,



farmaceuticamente aceitável, inerte, tal como etanol, glicerol, água e semelhantes. Além disso, quando desejado ou necessário, podem também ser incorporados na mistura agentes ligantes, lubrificantes, agentes de desintegração e agentes de coloração adequados. Os ligantes adequados incluem amido, gelatina, açúcar natural tal como glicose ou β -lactose, agentes adoçantes de grão de cereal, gomas naturais e sintéticas tais como acácia, tragacanto ou alginato de sódio, carboximetilcelulose, polietileno-glicol, ceras e semelhantes. Os lubrificantes utilizados em tais formas de dosagem incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e semelhantes. Os agentes de desintegração incluem, sem limitação, amido, metilcelulose, ágar, bentonite, goma xantana e semelhantes.

Os compostos utilizados no presente invento podem também ser administrados na forma de sistemas de entrega de lipossoma, tais como vesículas unilamelares pequenas, vesículas unilamelares grandes e vesículas multilamelares. Os lipossomas podem ser formados a partir de uma variedade de fosfolípidos, tais como colesterol, estearilamina ou fosfatidilcolina.

Os compostos utilizados no presente invento podem também ser entregues pela utilização de anticorpos monoclonais como agentes de suporte individuais aos quais as moléculas do composto são acopladas.

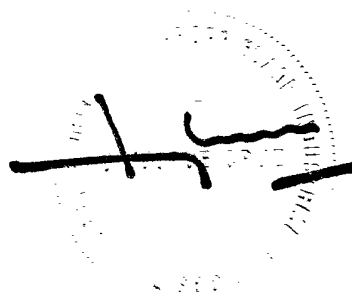
Os compostos utilizados no presente invento podem também ser acoplados com polímeros solúveis na forma de agentes de suporte de drogas rotuláveis. Tais polímeros podem incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, poli-hidroxipropilmetacrilamida-fenol, poli-hidroxietilaspirtimida-fenol ou óxido de polietileno-polilisina substituída com resíduos de palmitoílo.



- 18 -

Além disso, os compostos podem ser acoplados a uma classe de polímeros biodegradáveis úteis para se alcançar a libertação controlada de uma droga, por exemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico e ácido poliglicólico, poli-ε-caprolactona, ácido poli-hidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetais, polidi-hidropiranos, policianoacrilatos e copolímeros de bloco anfipáticos ou de ligação cruzada de hidrogéis.

Os compostos utilizados no método deste invento exibem actividade de imunossupressão útil no tratamento da rejeição de órgãos transplantados. Os processos de teste empregues para medir esta actividade dos compostos são descritos a seguir.



- 19 -

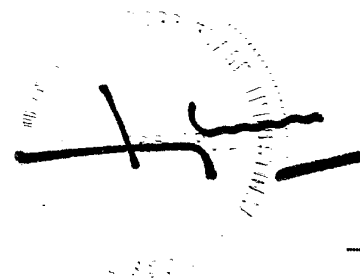
EXEMPLO 2

Os espectros de RMN foram obtidos quer num espectrómetro Varian XL-200 quer num GTE-QE 300 num solvente conforme o indicado com $(CH_3)_4Si$ como padrão interno. Os espectros de infravermelho foram registados num espectrómetro Perkin-Elmer 685 em $CHCl_3$.

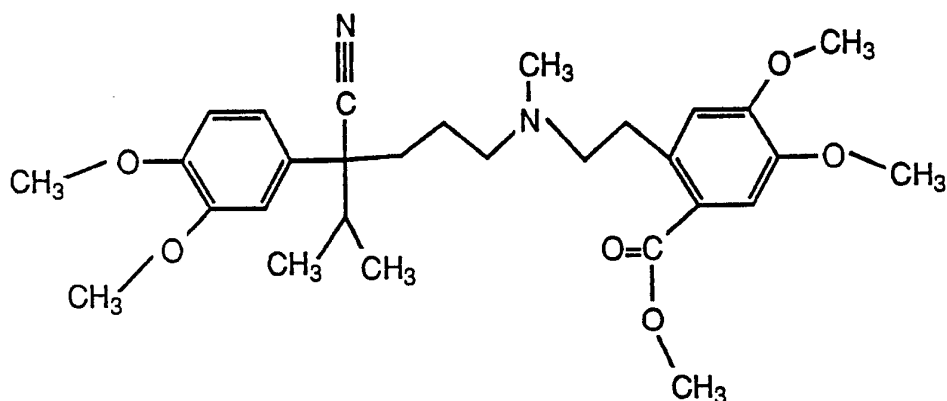
Processo geral para a preparação de:

2-(3,4-dimetoxifenil)-2-isopropil-5-[3,4-dimetoxi-(6-fenetil substituído)metilaminolvaleronitrilo

A uma solução agitada de 2,5 mmol de verapamil em 250 ml de benzeno foi adicionado 30 mmol de acetato de paládio (II) e a mistura de reacção foi agitada durante quatro dias. Esta foi em seguida transferida para um aparelho gasométrico [R. F. Heck, J. A. C. S., 83, 1097 (1961)], borbulhada com monóxido de carbono (CO) e, à temperatura ambiente, com a adição de nucleófilos (álcool, amina, reagentes de Grignard). Após quatro horas, a mistura de reacção foi filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi cromatografado sobre gel de sílica.



EXEMPLO 3



Pela adição de CH_3OH ao complexo de paládio carbonilado obteve-se o composto em título.

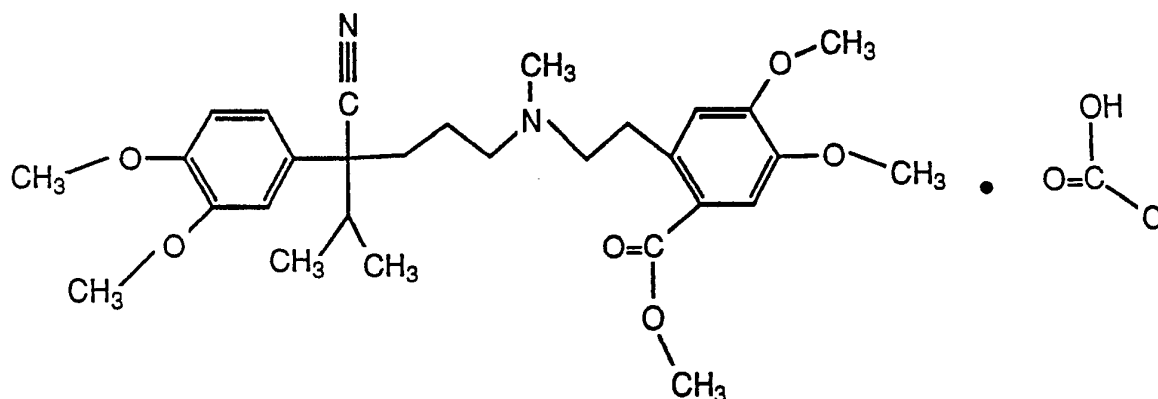
Encontrado: C - 67,01; H - 8,12; N - 5,24;

$\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6$ requer: C - 67,95; H - 7,86; N - 5,46.

R.M.N. δ 0,79 (3H, d, $J=6,6$ Hz); 1,18 (3H, d, $J=6,6$ Hz); 1,19 (1H, m); 1,55-2,05 (3H, m); 2,23 (3H, s); 2,25-2,75 (7H, m); 6,5-6,8 (4H, m); 7,35 (1H, s); 3,80 (3H, s); 3,78 (3H, s); 3,88 (3H, s); 3,89 (3H, s).

IV 1718 cm^{-1} 41 %.

EXEMPLO 4

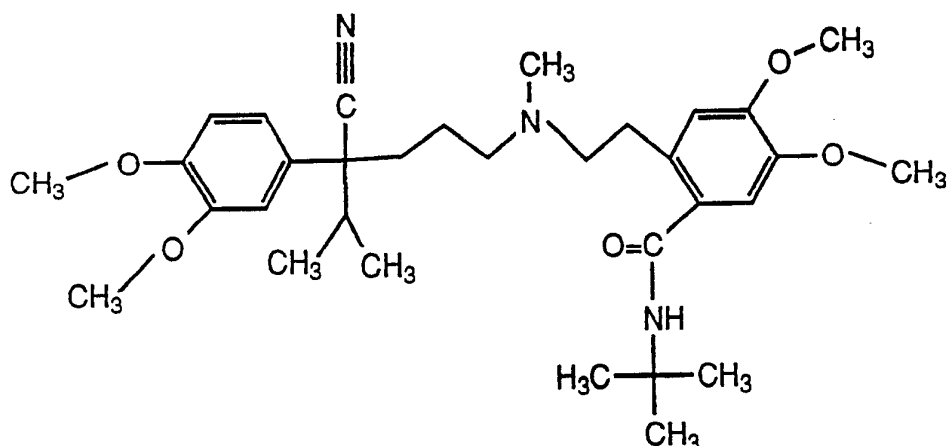


O composto em título foi preparado a partir da adição de ácido cítrico em éter à solução etérea do produto do Exemplo 3 em éter. O precipitado foi filtrado e seco.

Encontrado: C - 60,11; H - 7,10; N - 3,99;
 $C_{35}H_{48}N_2O_{13}$ requer: C - 59,65; H - 6,86; N - 3,97.

Pelo caminho do método acima descrito, um perito vulgar na técnica pode obter o sal do ácido 1,2,3-propanotricarboxílico ou o sal do ácido 2,3-di-hidroxibutanodióico.

EXEMPLO 5



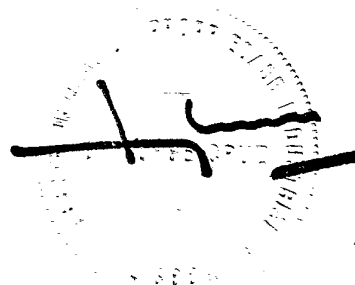
Pela adição de t-butilamina ao complexo de paládio carbonilado obteve-se o composto em título. O sal do ácido cítrico do composto em título foi obtido a partir da adição ácido cítrico saturado à solução etérea da base livre. O precipitado recolhido foi seco. Obtido: 32 %.

Alternativamente, a adição de metilamina em vez de t-butilamina produzirá a correspondente metilamida.

Encontrado: C - 62,72; H - 7,46; N - 6,08;
 $C_{38}H_{55}N_3O_{12}$ requer: C - 62,03; H - 6,16; N - 5,71.

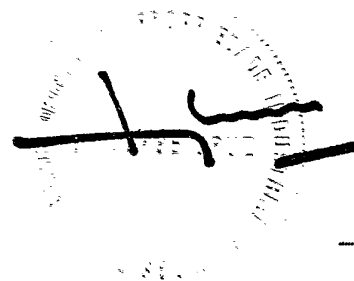
R.M.N. δ 0,75 (3H, d, J=6,6 Hz); 1,16 (3H, d, J=6,6 Hz); 1,46 (9H, s); 2,8 (3H, s, N-me); 3,81 (3H, s); 3,83 (9H, s); 6,97-7,03 (4H, m); 7,36 (1H, s) ppm.

IV 1715 (citrato), 1640, 2210 cm^{-1} .

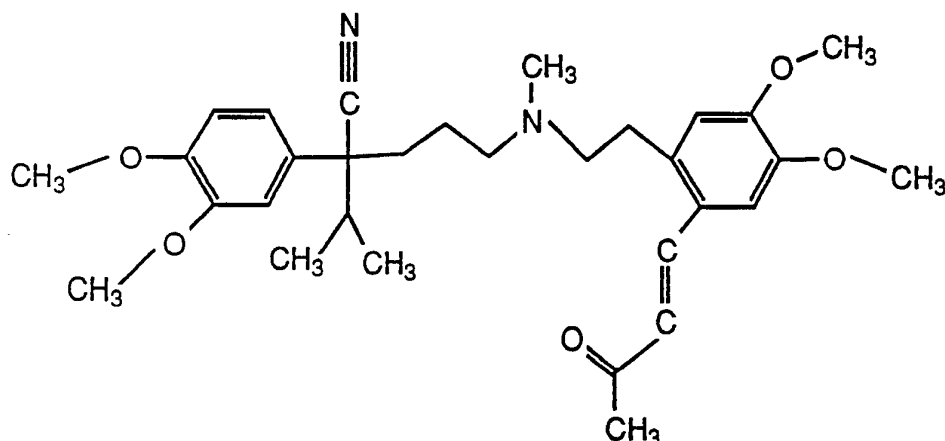


- 23 -

Pelo método do Exemplo 4, pode ser obtido o sal do ácido cítrico, o sal do ácido 1,2,3-tricarboxílico ou o sal do ácido 2,3-di-hidroxibutanodióico.



EXEMPLO 6

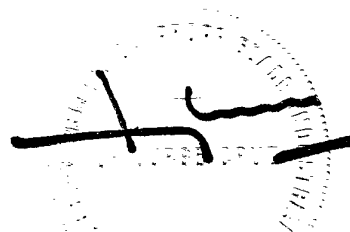


Foi adicionado 4 g de verapamil (8,8 mmol) em 100 ml de benzeno a 2,2 g de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ e a mistura de reacção foi agitada durante quatro dias à temperatura ambiente. Uma solução saturada de NaCl em 100 ml de CH_2 e 96 ml de acetona foi adicionado à solução resultante, que foi agitada à temperatura ambiente durante 15 minutos. O solvente foi em seguida removido sob pressão reduzida.

Em seguida foi adicionado 100 ml de tolueno e 25 ml de trietilamina e a mistura foi aquecida a 120 °C durante 2 horas e, em seguida, deixada arrefecer até à temperatura ambiente. A fase orgânica foi filtrada, lavada com água, seca, novamente filtrada e o solvente foi removido.

Depois de uma cromatografia, foi obtido o composto em título (3,2 g; 80 %); p.f. 119-121 °C (a partir de éter).

Encontrado:	C - 71,57; H - 8,30; N - 5,25;
Calculado:	C - 71,24; H - 8,10; N - 5,36.

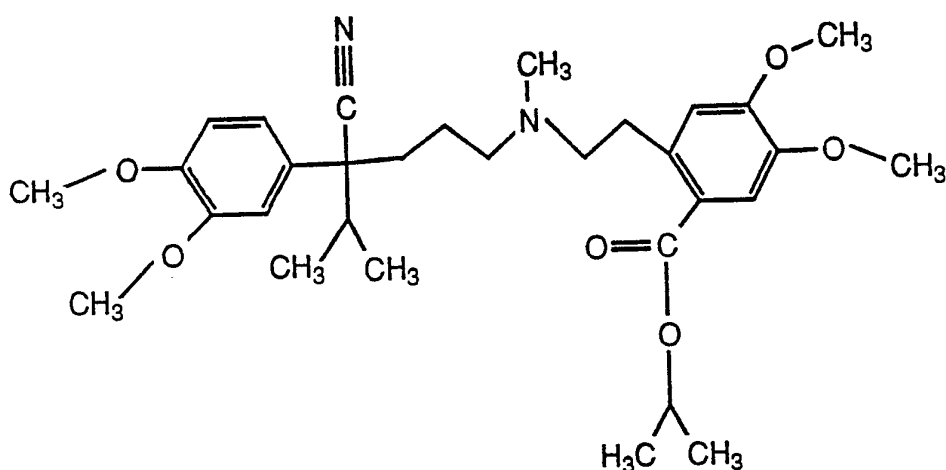


- 25 -

R.M.N. δ 0,79 (3H, d, $J=6,6$ Hz); 1,18 (3H, d, $J=6,6$ Hz); 2,22 (3H, s); 2,36 (3H, s); 6,56 (1H, d, $J=15$ Hz); 6,68 (1H, s); 6,80-6,92 (2H, m); 6,86 (1H, s); 7,08 (1H, s); 7,76 (1H, d, $J=15$ Hz); 3,87 (3H, s); 3,88 (3H, s); 4,00 (3H, s); 4,01 (3H, s) ppm.

IV 3410 cm^{-1} , 2150 cm^{-1} , 1659 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} ,
1593 cm^{-1} , 1509 cm^{-1} .

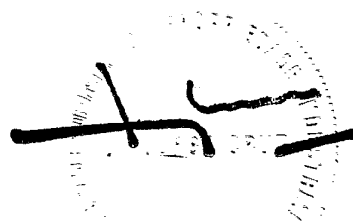
EXEMPLO 7



Foi adicionado isopropanol ao complexo de paládio carbonilado. Obt.: 40 %.

Encontrado:	C - 68,34; H - 8,32; N - 4,92;
Calculado:	C - 68,86; H - 8,20; N - 5,18.

R.M.N. δ 0,79 (3H, d, $J=6,6$ Hz); 1,18 (3H, d, $J=6,6$ Hz); 1,38 (6H, d, $J=6,6$ Hz); 2,24 (3H, s); 3,80 (3H, s); 3,82 (3H, s); 3,85 (3H, s); 3,90



(3H, s); 5,24 (1H, septeto $J=6,6$ Hz); 6,73 (1H, s); 6,90 (3H, m); 7,05 (1H, s) ppm.

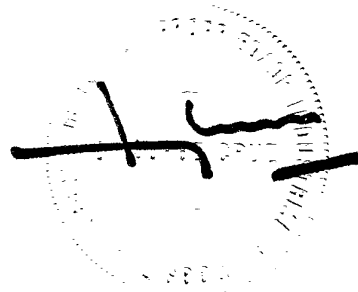
IV (CuCl_3) 1714 cm^{-1} .

EXEMPLO 8

A. Efeitos sobre a proliferação da célula T induzida por mitogêneo.

Utilizando métodos bem conhecidos pelos peritos normais na técnica, verificou-se que os compostos utilizados no presente invento inibem a proliferação da célula T induzida por fito-hemaglutinina (PHA) num modelo referido à dose, que cobre uma gama desde 10 até 100 μM . A ordem relativa de potência testada foi o composto do Exemplo 4 (o sal do ácido 1,2,3-propanotricarboxílico) > o composto do Exemplo 5 (o sal do ácido 1,2,3-propanotricarboxílico) > o composto do Exemplo 5 (o sal do ácido 2,3-di-hidroxi-butanodiácido).

Uma semelhante relação dependente da dose e ordem de potência relativa na inibição da proliferação da célula T pôde ser observada utilizando células linfoblasto T induzidas por PHA dependente de interleucina-2 como rótulos dos vários compostos. A adição de IL-2 recombinante humana exógena quer a células blasto induzidas por PHA quer a culturas recentes de PHA e leucócitos mononucleares do sangue periférico (PBMC) não supera os efeitos antiproliferativos dos compostos.

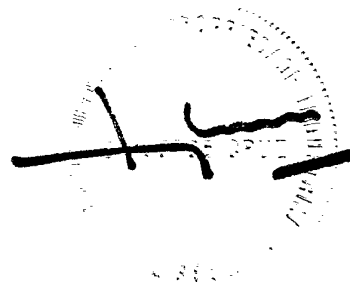


B. Sinergismo dos compostos utilizados no presente invento com a ciclosporina A (CsA) na inibição da proliferação da célula T induzida por mitogéneo.

Os compostos utilizados no presente invento sinergizam com a CsA no bloqueamento da proliferação da célula T in vitro. Utilizando métodos bem conhecidos pelos peritos normais na técnica, foram feitas culturas de PBMC estimulados por PHA numa dose constante de cada composto testado e com doses decrescentes de CsA, partindo com a dose mínima de CsA que bloqueia totalmente a proliferação (125 ng/ml). Foram utilizadas doses de CsA tão pequenas como 6 ng/ml. A concentração do composto do Exemplo 4 (o sal do ácido 1,2,3-propanotricarboxílico) foi mantida constante a 5 μ M, enquanto as concentrações do composto do Exemplo 5 (o sal do ácido 1,2,3-propanotricarboxílico) e do composto do Exemplo 5 (o sal do ácido 2,3-di-hidroxibutanodióico) foram mantidas a 25 μ M. O sinergismo foi evidenciado por uma inibição superaditiva da proliferação da célula T induzida por mitogéneo, pelos efeitos antiproliferativos mediados pela CsA e compostos testados. A adição dos compostos utilizados no presente invento fez variar a IC₅₀ da CsA de 3 a 4 vezes.

C. Efeitos dos compostos utilizados no presente invento sobre a expressão do gene de activação da célula T

A CsA tem vários efeitos característicos sobre a expressão de vários eventos transcricionais de novo em culturas estimuladas por PHA. A transcrição do RNA mensageiro (mRNA) da interleucina-2 (IL-2), mas não do mRNA receptor de IL-2, é bloqueada nos PBMCs humanos estimulados por mitogéneo. O RNA total foi extraído de PBMCs humanos a partir de culturas tratadas (100 μ M) de droga estimulada por mitogéneo e não estimuladas. A

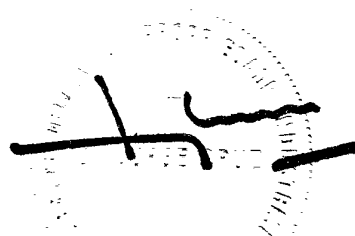


transcrição foi analisada por técnicas de mancha de Northern; o RNA foi hibridizado para sondas de cDNA radiorrotulado para IL-2 e mRNA receptor de IL-2 p55 (TAC, CD25). O composto do Exemplo 4 (o sal do ácido 1,2,3-propanotricarboxílico) e o composto do Exemplo 5 (o sal do ácido 1,2,3-propanotricarboxílico) a 100 μ M aboliram a acumulação de mRNA de IL-2, enquanto o mRNA receptor de IL-2 foi, no máximo, ligeiramente diminuído. A expressão de superfície e translação da proteína do receptor de IL-2 p55 (CD25) foi apenas ligeiramente inibida por qualquer dos compostos. Apesar da expressão de CD25 ter sido ligeiramente reduzida por concentrações elevadas dos dois compostos, a expressão de superfície da proteína TAC (CD25) foi nitidamente detectável pela análise FACS utilizando anticorpos antimonoclonais CD25. Em aditamento, a expressão de superfície induzida por activação de antígenos HLA-DR não foi inibida por estes agentes. Em contraste, mantendo a ausência de mRNA de IL-2, a proteína da IL-2 não pôde ser detectada nos sobrenadantes da cultura pelo uso de um sistema ELISA.

Os compostos utilizados no método do presente invento têm uma inesperada, surpreendente e não óbvia actividade como imunossuppressores. Do mesmo modo, o seu efeito sinérgico com a CsA foi inesperado e não óbvio. O seu sinérgismo que diminui a dose com a CsA significa que na imunossupressão terapêutica pode esperar-se que eles evitem efeitos laterais de hipotensão, bradicardia e nefrotoxicidade.

EXEMPLO 9

Verificou-se que o composto produto do Exemplo 1, esquema 1, era selectivo do local para o tecido cerebral e renal ao causar decréscimo na resistência vascular através da actividade de bloqueio do canal de cálcio.

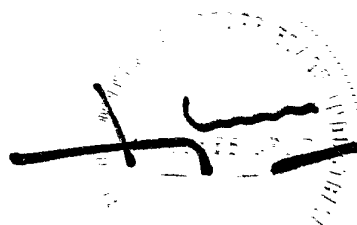


Sob anestesia de éter, foram canulados a veia jugular, a artéria femoral e o ventrículo esquerdo de um SHR macho adulto. Após um período de recuperação de 3-5 horas, os animais foram tratados quer com o composto de teste quer com o placebo. Foram concedidos dez minutos para se alcançarem as condições de estado uniforme. A pressão arterial foi em seguida acompanhada via cânula femoral. Imediatamente depois desta medição, foi tomada a amostra de sangue de referência e foram injectadas no ventrículo esquerdo microesferas rotuladas radioactivamente. Foram em seguida sacrificadas ratas; foram removidos os órgãos, pesados e contados. O sinal de saída cardíaco foi computado. A distribuição do sinal de saída cardíaco percentual por grama de tecido, fluxo por grama de tecido e resistência vezes grama de tecido foram calculados para os seguintes órgãos: cérebro, coração, rins, órgãos esplâncnicos (fígado mais pâncreas, baço e tracto G.I.), músculo esquelético e pele. O composto testado foi administrado na forma de bolus I.V. de 1,0 mg/kg. As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento e de controlo foram analisadas por análise de uma variável de via única e teste de diferença significativa mínima. O composto sujeito causou uma diminuição da resistência vascular ao cérebro:

Exemplo 1, Esquema 1	149 mmHg min g/ml
Controlo, DMSO	240 mmHg min g/ml
$p < 0,05$	

a aos rins:

Exemplo 1, Esquema 1	22,4 mmHg min g/ml
Controlo, DMSO	37,6 mmHg min g/ml
$p < 0,05$	



A utilidade terapêutica de uma tal selectividade do local reside no tratamento da isquemia cerebral ou renal.

EXEMPLO 10

A actividade antagonista do cálcio é medida in vitro medindo o PA_2 (o logaritmo negativo da constante de dissociação aparente da molécula da droga para o seu receptor) no músculo liso aórtico isolado da ratazana espontaneamente hipertensa. Quanto maior o PA_2 , maior o antagonismo do cálcio. Um composto é considerado activo como antagonista do cálcio se o PA_2 for 6,0 ou maior.

O ião Ca^{++} desempenha um papel essencial na redução e manutenção da contractilidade do músculo liso vascular. No músculo liso vascular despolarizado com K^+ , os antagonistas de cálcio bloqueiam a entrada de Ca^{++} na célula, inibindo em consequência disso as contracções induzidas pelo Ca^{++} . A inibição da contracção induzida pelo Ca^{++} do músculo liso vascular é utilizada como modelo para testar os compostos em relação ao antagonismo do cálcio vascular.

As doenças cardiovasculares tais como arritmias, angina-pectoris, hipertensão, doença vascular periférica podem ser causalmente relacionadas com anormalidades no manuseamento celular dos iões Ca^{++} . O segmento aórtico excisado é montado num banho de tecido que contém solução de Krebs modificada. Após despolarização do tecido com K^+ (100 mM), Ca^{++} , em concentrações cumulativas de 10^{-3} M, $3,2 \times 10^{-3}$ M e 10^{-2} M, é injectado no banho para produzir a contracção do músculo liso vascular. A tensão desenvolvida (g) é medida e obtém-se os valores de resposta à dose de controlo. Após uma hora de incubação com um composto de teste em



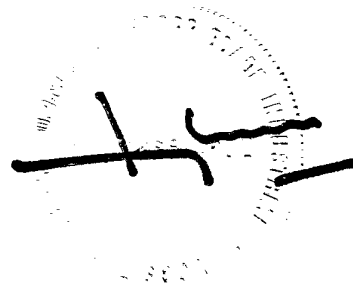
concentração 10^{-6} M, são repetidas as mesmas doses de Ca^{++} . As curvas de resposta à dose de controlo, log, e após o tratamento são analisadas por regressão linear.

Exemplo	PA_2
3	6,81
5	6,56
5 (sal do ácido 1,2,3-propano- tricarboxílico)	6,57

EXEMPLO 11

Os efeitos da pressão sanguínea sistémica são determinados in vivo numa ratazana espontaneamente hipertensa anestesiada. O composto de teste é administrado intragastricamente a 10^{-3} M.

A média inicial da pressão sanguínea arterial (MAP) é medida directamente via um cateter arterial previamente implantado imediatamente antes da administração do composto. As leituras das pressões sanguíneas são normalmente feitas 1, 2, 3 e 4 horas depois da administração do composto de teste. Esta tabela de leituras pode variar a pedido. Uma dose do composto de teste é classificada como activa se a média da pressão sanguínea post-tratamento das ratazanas tratadas é significativamente diferente ($p \leq 0,05$) da do grupo de controlo placebo concorrente. São feitas comparações estatísticas utilizando o teste do t de Student não emparelhado relativo ao controlo tratado pelo veículo (placebo).



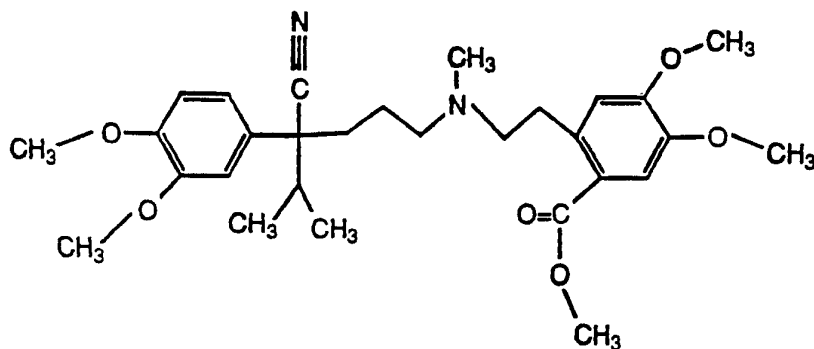
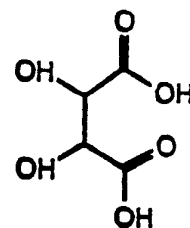
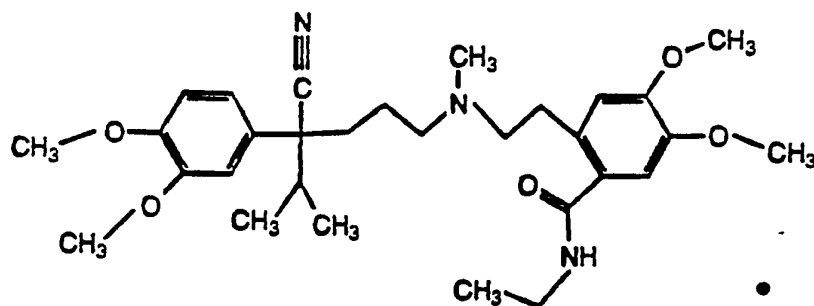
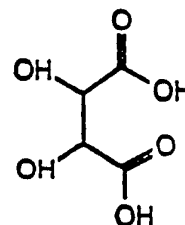
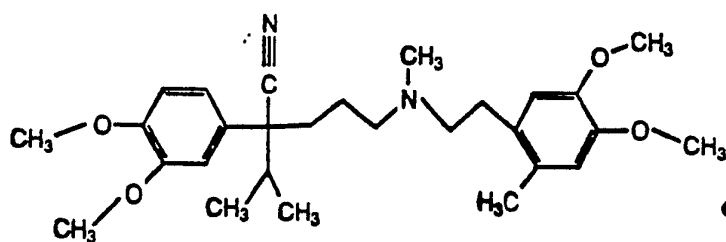
- 32 -

Exemplo	Diminuição na MAP (mm Hg)
5	18
5 (sal do ácido 1,2,3-propano- tricarboxílico)	22



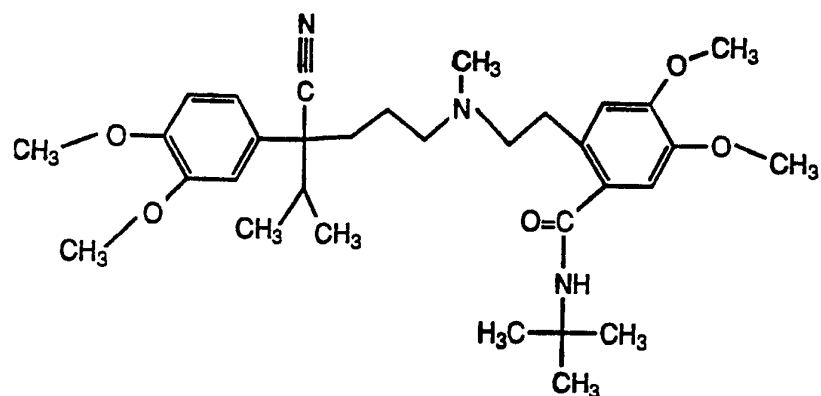
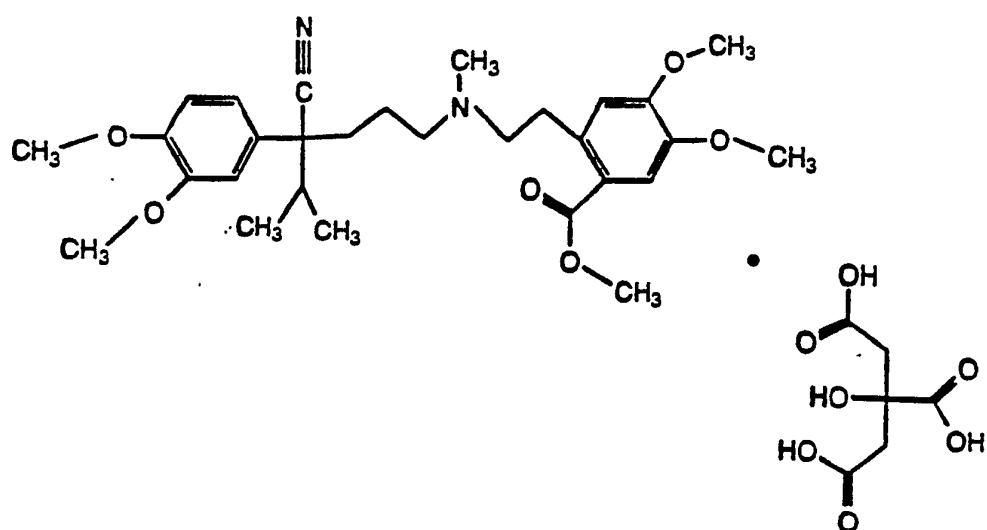
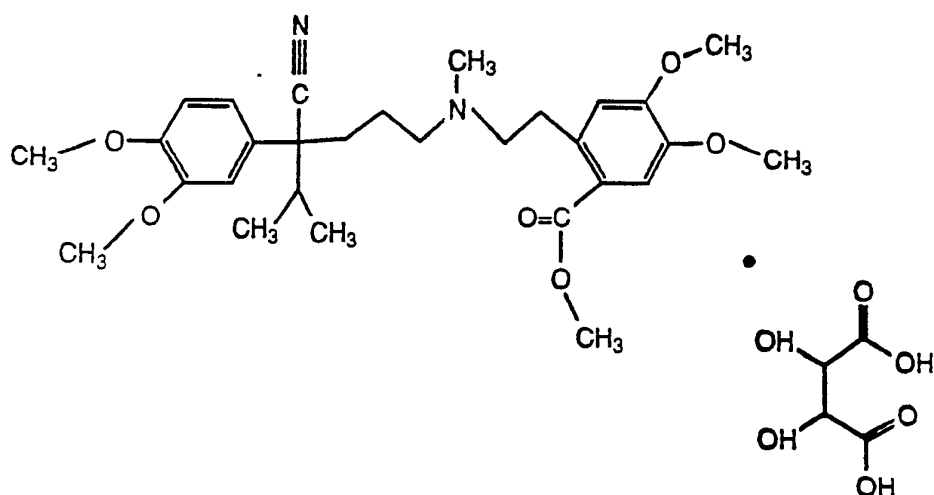
- 33 -

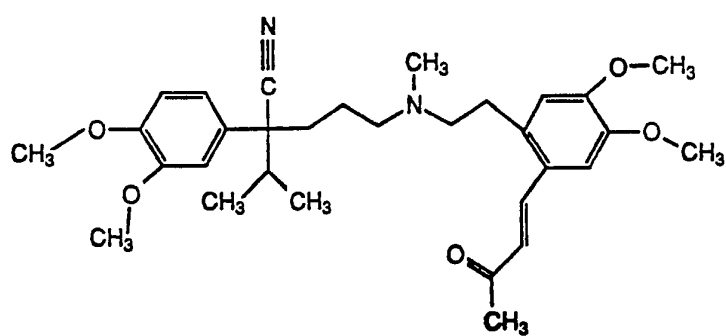
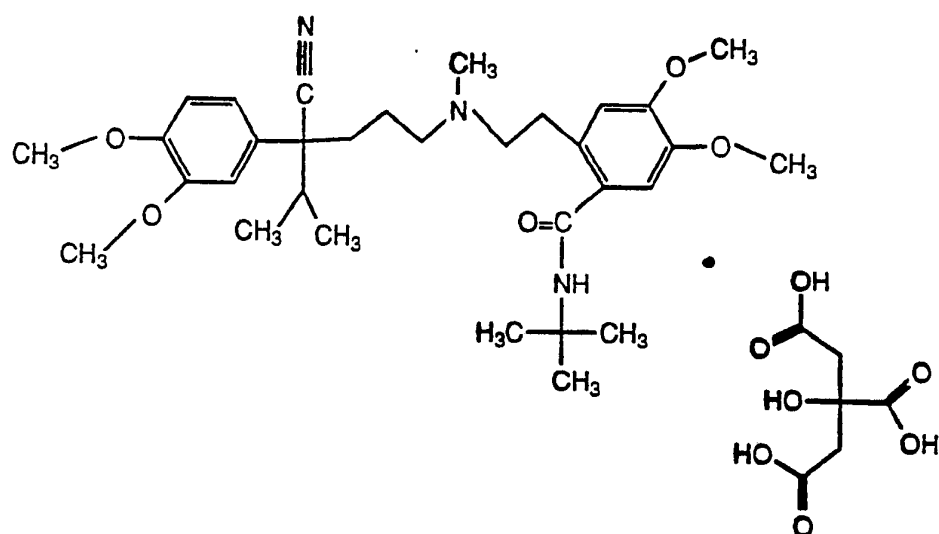
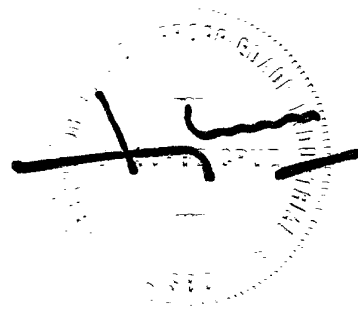
Um grupo mais preferido de compostos utilizados nos novos métodos do invento é constituído por qualquer, ou todos, dos seguintes compostos:

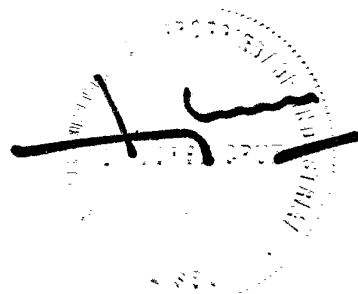


~~CONFIDENTIAL~~

- 34 -

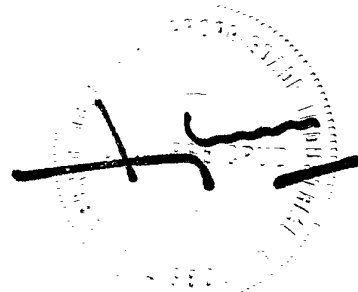






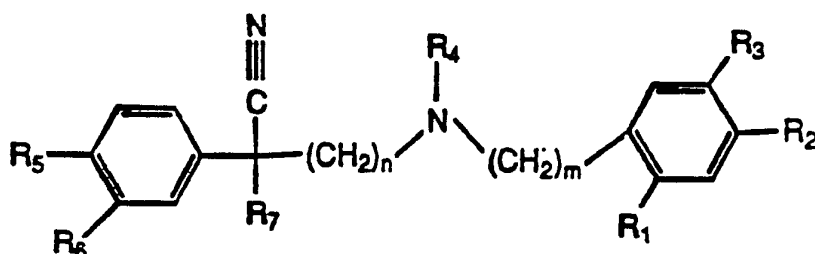
Estes compostos não são, contudo, para serem considerados como constituindo o único agrupamento que é considerado útil no invento e qualquer combinação de tais compostos pode, ela própria, formar um agrupamento.

Ainda que o invento tenha sido descrito e ilustrado com referência a certos encorporamentos dele preferidos, os peritos na técnica apreciarão que várias mudanças, modificações e substituições podem nele ser feitas sem afastamento do espírito e alcance do invento. Por exemplo, dosagens eficazes diferentes das gamas preferidas indicadas anteriormente podem ser aplicáveis, como consequência de variações na susceptibilidade do mamífero a ser tratado à severidade da rejeição ao transplante de órgão, efeitos adversos relacionados com a dosagem, se existirem, e considerações análogas. De modo semelhante, as respostas farmacológicas específicas observadas podem variar de acordo com e dependendo dos compostos activos particulares escolhidos ou de estarem presentes alguns agentes de suporte farmacêuticos, bem como do tipo de formulação e modo de administração empregue, e tais variações e diferenças esperadas nos resultados são contempladas de acordo com os objectivos e práticas do presente invento. Tem-se a intenção, por conseguinte, de que o invento seja apenas limitado pelo âmbito e alcance das suas reivindicações e que essas reivindicações sejam interpretadas tão amplamente quanto seja razoável.



Reivindicações

18. - Método de imunossupressão de um mamífero com necessidade dele, caracterizado por compreender o passo de administração ao referido mamífero de uma quantidade farmacologicamente eficaz de um composto de fórmula de estrutura:



e dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis, em que

R_1 representa hidróxi;
alquilo, alcenilo ou alcínilo de 1 até 10 átomos de carbono substituído ou não substituído, em que o referido substituinte é hidróxi ou ceto;
alquilcarbonilo de 1 até 10 átomos de carbono;
alcoxycarbonilo de 1 até 10 átomos de carbono; ou
alquilamido de 1 até 10 átomos de carbono;

R_2 , R_3 , R_5 e R_6 representam independentemente hidróxi ou alcoxi de 1 até 10 átomos de carbono; e

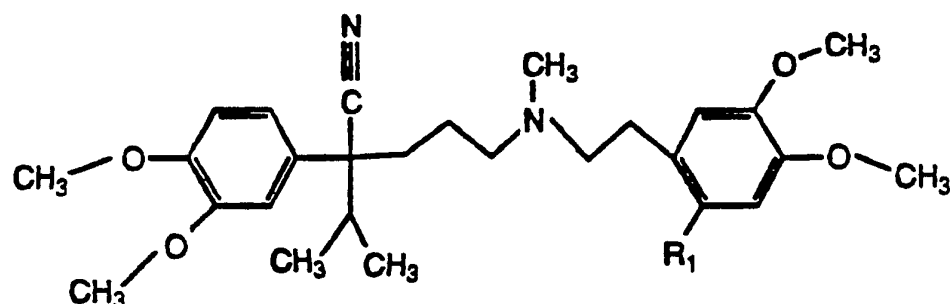
R_4 e R_7 representam independentemente hidrogénio; alquilo, alcenilo ou alcínilo de 1 até 10 átomos de carbono;

m é um inteiro desde 1 até 2, inclusive; e

n é um inteiro desde 1 até 5, inclusive;

sendo a gama de dosagem do composto activo de 0,1 a 1 000 mg por quilograma de peso corporal por dia, de preferência de 1,0 a 100 mg por quilograma de peso corporal por dia.

28. - Método de imunossupressão de um mamífero com necessidade dele, caracterizado por compreender o passo de administração ao referido mamífero de uma quantidade farmacologicamente eficaz de um composto de fórmula de estrutura geral:



e dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis, em que

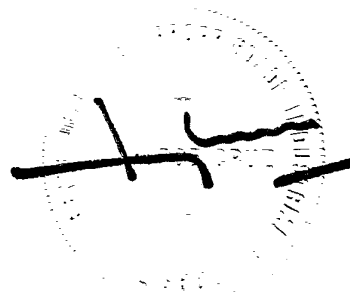
R₁ representa hidróxi;

alquilo, alcenilo ou alcínilo de 1 até 10 átomos de carbono substituído ou não substituído, em que o referido substituinte é ceto ou hidróxi;

alquilcarbonilo de 1 até 10 átomos de carbono;

alcóxicarbonilo de 1 até 10 átomos de carbono; ou

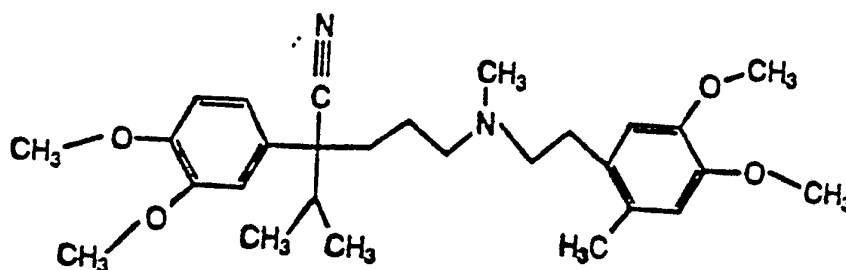
alquilamido de 1 até 10 átomos de carbono;



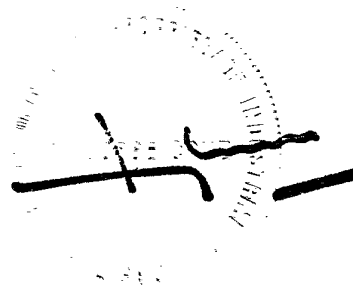
- 39 -

sendo a gama de dosagem do composto activo de 0,1 a 1 000 mg por quilograma de peso corporal por dia, de preferência de 1,0 a 100 mg por quilograma de peso corporal por dia.

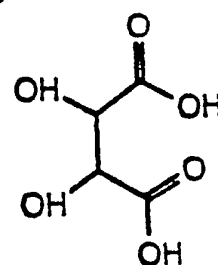
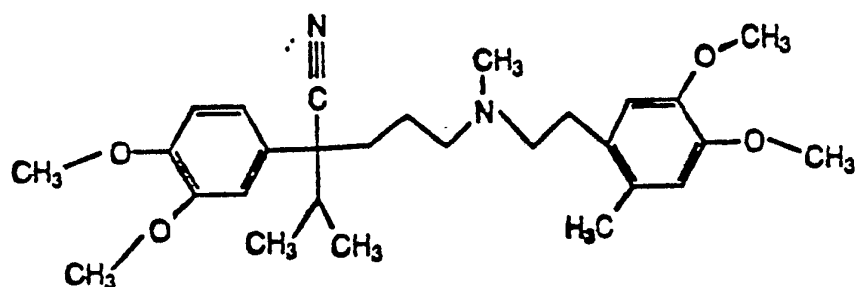
38. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto administrado ter a fórmula de estrutura:



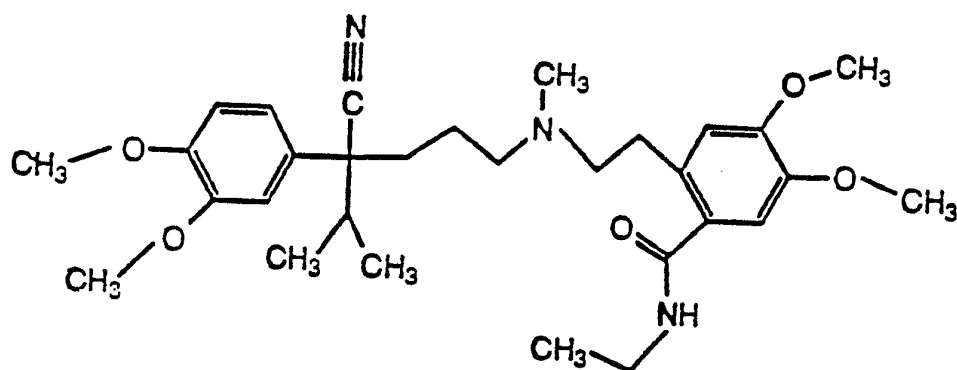
48. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto administrado ter a fórmula de estrutura:



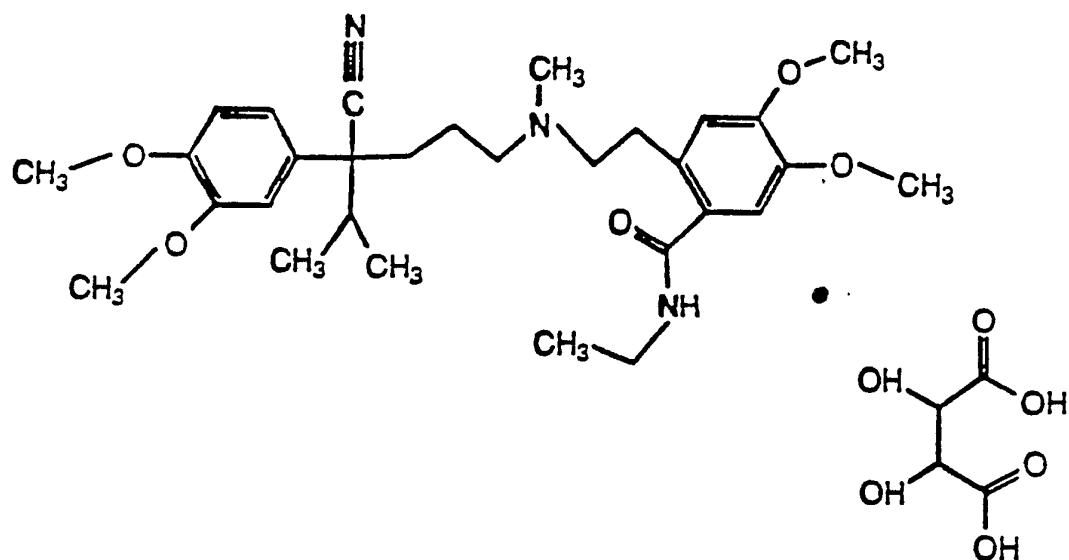
- 40 -



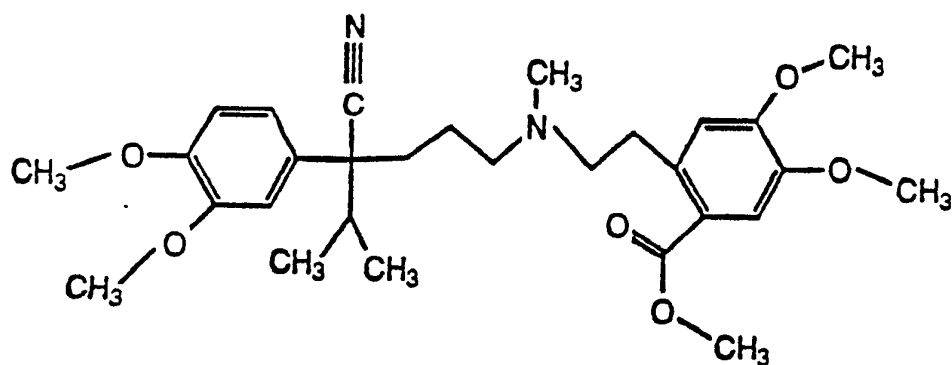
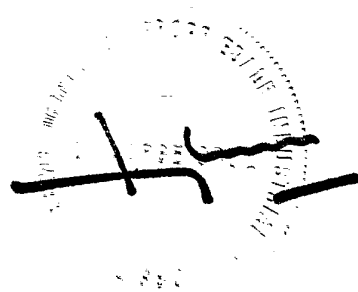
52. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto administrado ter a fórmula de estrutura;



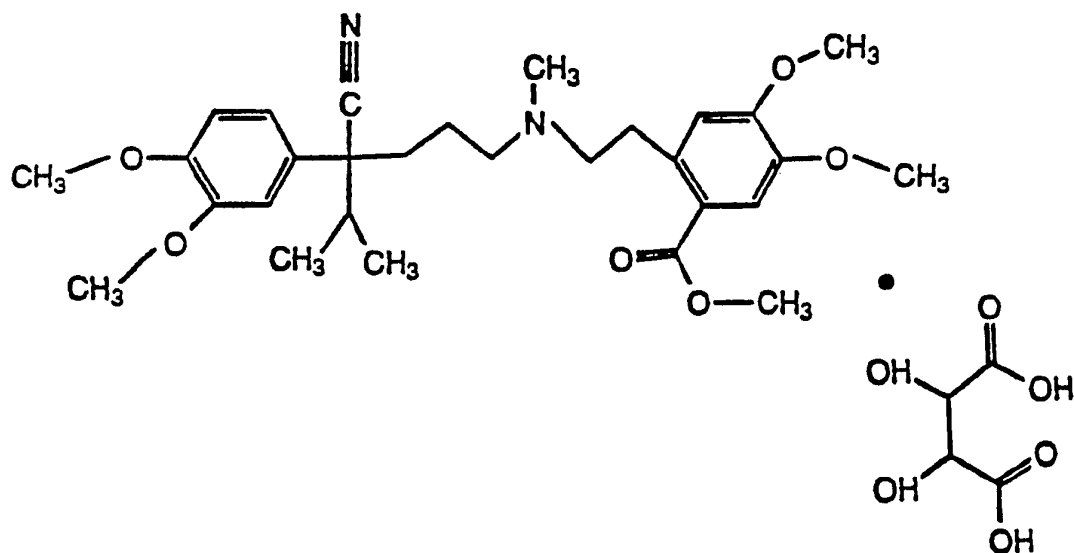
6a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto administrado ter a fórmula de estrutura:



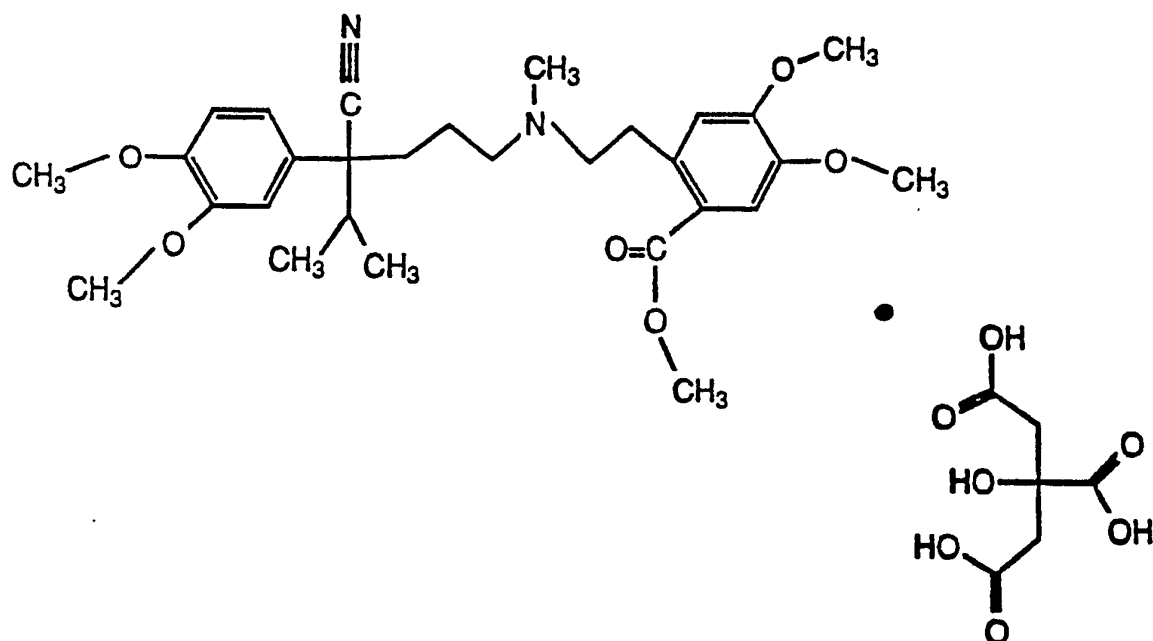
7a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto administrado ter a fórmula de estrutura:



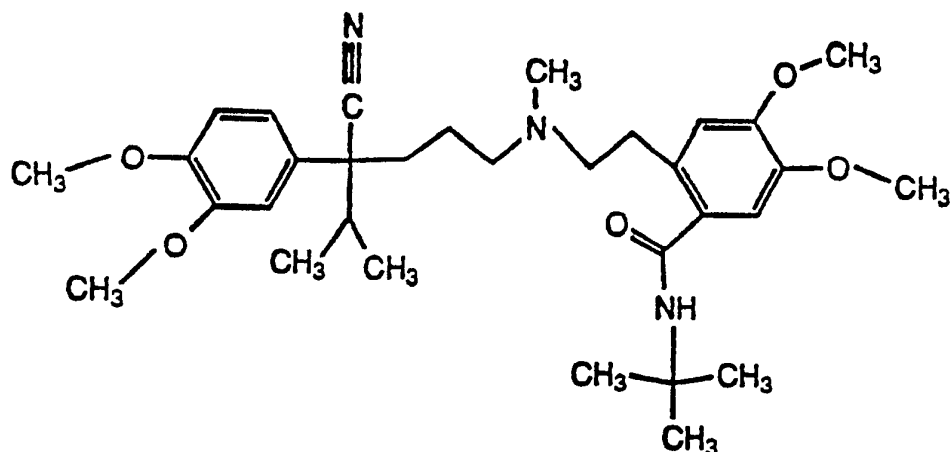
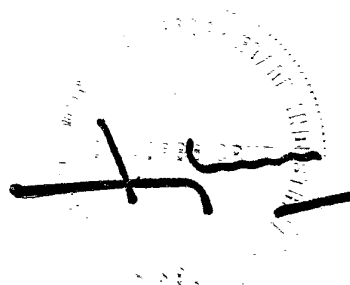
88. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto administrado ter a fórmula de estrutura:



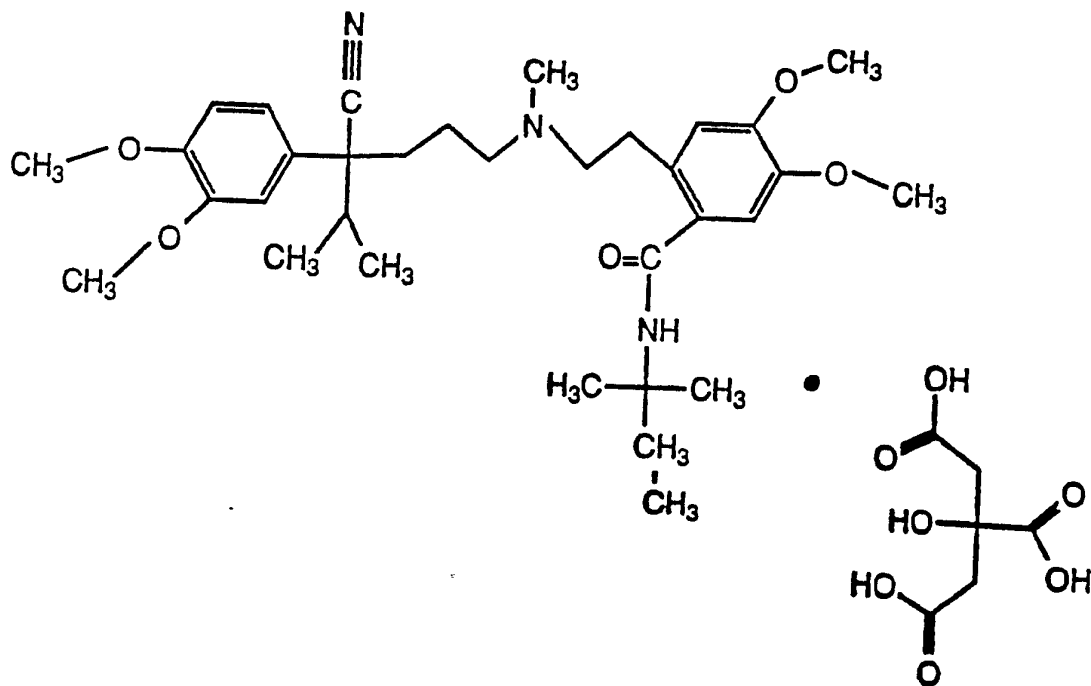
98. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto administrado ter a fórmula de estrutura:



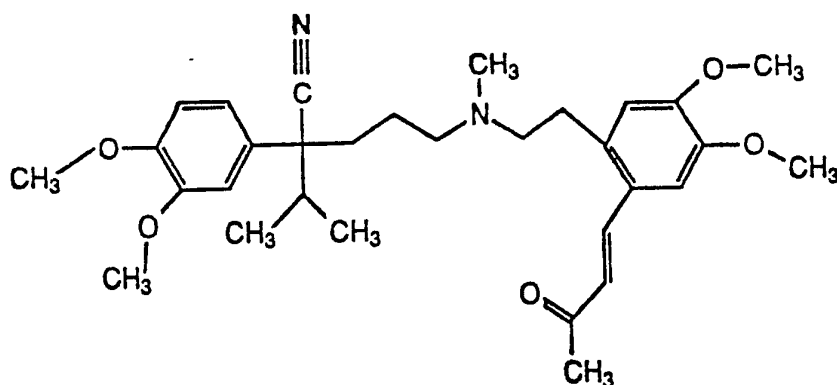
108. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto administrado ter a fórmula de estrutura:



112. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto administrado ter a fórmula de estrutura:

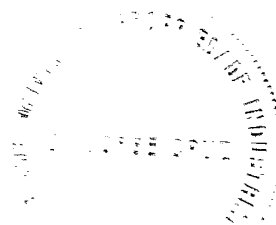


128. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto administrado ter a fórmula de estrutura;



138. - Método de tratamento da hipertensão de um mamífero com necessidade dele, caracterizado por compreender a administração ao referido mamífero de uma quantidade farmacologicamente eficaz de um composto de acordo com a reivindicação 1, sendo a gama de dosagem do composto activo de 0,1 a 1 000 mg por quilograma de peso corporal por dia, de preferência de 1,0 a 100 mg por quilograma de peso corporal por dia.

148. - Método de tratamento de isquemia renal de um mamífero com necessidade dele, caracterizado por compreender a administração ao referido mamífero de uma quantidade farmacologicamente eficaz de um composto de acordo com a reivindicação 1, sendo a gama de dosagem do composto activo de 0,1 a 1 000 mg por quilograma de peso corporal por dia, de preferência de 1,0 a 100 mg por quilograma de peso corporal por dia.



- 46 -

15ª. - Método de tratamento de isquemia cerebral de um mamífero com necessidade dele, caracterizado por compreender a administração ao referido mamífero de uma quantidade farmacologicamente eficaz de um composto de acordo com a reivindicação 1, sendo a gama de dosagem do composto activo de 0,1 a 1 000 mg por quilograma de peso corporal por dia, de preferência de 1,0 a 100 mg por quilograma de peso corporal por dia.

Lisboa, 20 de Dezembro de 1990

J. PEREIRA DA CRUZ

Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.ª
1200 LISBOA