

(11) Número de Publicação: **PT 1144011 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 47/48 (2007.10) **A61P 35/00** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1999.12.10	(73) Titular(es): COULTER PHARMACEUTICAL, INC. 600 GATEWAY BOULEVARD AVENUE SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-7014 US
(30) Prioridade(s): 1998.12.11 US 111793 P 1999.02.08 US 119312 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2001.10.17	(72) Inventor(es): GEOFFREY T. YARRANTON US THOMAS J. LOBL US VINCENT DUBOIS BE ANNE-MARIE FERNANDEZ BE SANJEEV GANGWAR US
(45) Data e BPI da concessão: 2010.03.10 114/2010	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS PRÓ-FÁRMACOS E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO**

(57) Resumo:

RESUMO

COMPOSTOS PRÓ-FÁRMACOS E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO

A presente invenção tem por objecto um pró-fármaco que é uma forma modificada de um agente terapêutico e compreende um agente terapêutico, um oligopéptido, um grupo estabilizante e, eventualmente, um grupo ligante. O pró-fármaco é clivável pela enzima trouase. Também tem por objecto processos para produzir os compostos pró-fármacos.

DESCRIÇÃO

COMPOSTOS PRÓ-FÁRMACOS E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO

INTRODUÇÃO

Domínio técnico

A presente invenção tem por objecto novos compostos e processos para a sua produção. Os compostos geralmente funcionam como pró-fármacos e, na maior parte dos casos, são versões modificadas de compostos já existentes, especialmente agentes citotóxicos. Estes pró-fármacos têm uma maior especificidade para os alvos pretendidos e uma especificidade reduzida para alvos que não interessam.

Antecedentes

Muitos agentes terapêuticos, tal como as antraciclinas e os alcalóides de vinca são especialmente eficazes para o tratamento de cancros. Contudo, estas moléculas são muitas vezes caracterizadas *in vivo* por uma toxicidade aguda, especialmente uma toxicidade da medula óssea e das mucosas, assim como uma toxicidade cardíaca crónica no caso das antraciclinas e uma toxicidade neurológica crónica no caso de alcalóides de vinca. Do mesmo modo, pode-se utilizar metotrexato para o tratamento de reacções inflamatórias, tal como doenças reumáticas, mas a sua elevada toxicidade limita as suas aplicações. É desejável o desenvolvimento de agentes anti-tumor mais específicos para uma maior eficácia contra células de tumor e uma diminuição do número e da severidade dos efeitos colaterais destes produtos (toxicidade, destruição de células que não são de tumor,

etc.). Também é desejável o desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios mais específicos.

Para minimizar os problemas de toxicidade, os agentes terapêuticos apresentam-se, com vantagem para os pacientes, sob a forma de pró-fármacos. Os pró-fármacos são moléculas capazes de serem convertidas em fármacos (compostos activos sob o ponto de vista terapêutico) *in vivo* por meio de certas modificações químicas ou enzimáticas da sua estrutura. Com a finalidade de reduzir a toxicidade, esta conversão deve ser confinada ao sítio da acção ou ao tecido-alvo em vez do sistema circulatório ou do tecido que não constitui um alvo. Os pró-fármacos são muitas vezes caracterizados por uma baixa estabilidade no sangue e no soro, contudo, o sangue e o soro contêm enzimas que degradam os pró-fármacos.

Uma classe desejável de pró-fármacos que ultrapassa esses problemas foi descrita na publicação internacional, ao abrigo do Tratado de Cooperação, da patente No. WO 96/05863 e na patente U.S. No. 5.962.216. Contudo, são desejados outros compostos de pró-fármacos e processos úteis para a produção desses pró-fármacos, tal como processos para a produção de pró-fármacos.

Um objecto particular da presente invenção consiste num pró-fármaco que exhibe uma elevada especificidade de acção, uma toxicidade reduzida e uma estabilidade aumentada no sangue, relativamente aos pró-fármacos com uma estrutura semelhante (especialmente as estruturas mais fechadas) que já existiam no domínio público.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O composto da presente invenção, tal como definido nas reivindicações, é uma forma de pró-fármaco de um agente terapêutico ligado directa ou indirectamente a um oligopéptido que, por sua vez, está ligado a um grupo de estabilização.

De uma forma mais geral, a presente invenção pode ser descrita como novos compostos de pró-fármacos de um agente terapêutico, especialmente pró-fármacos que compreendem um agente terapêutico anti-tumor, que exhibe propriedades terapêuticas melhoradas em relação aos produtos da técnica anterior, especialmente propriedades terapêuticas melhoradas no tratamento de tumores cancerosos e/ou no tratamento de reacções inflamatórias tal como doenças reumáticas. As propriedades terapêuticas melhoradas incluem uma diminuição da toxicidade e uma eficácia aumentada. Particularmente desejados são pró-fármacos que exibem uma especificidade de acção elevada, uma toxicidade reduzida, uma maior estabilidade no soro e no sangue e que não se movem para as células-alvo até serem activados por uma enzima associada à célula-alvo. Os compostos de pró-fármacos de um marcador, que permitem caracterizar os tumores (diagnóstico, progressão do tumor, ensaio dos factores segregados pelas células de tumor, etc.) estão também contemplados.

A presente invenção também tem por objecto uma composição farmacêutica que compreende o composto de acordo com a presente invenção e, eventualmente, um adjuvante ou veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico

Também tem por objecto um processo para diminuir a toxicidade modificando um agente terapêutico para criar um pró-fármaco.

Também tem por objecto vários processos para criar um pró-fármaco da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As **figs. IA-ID** são quadros de abreviaturas, nomes e estruturas.

A **fig. 2** é um esquema que exemplifica a clivagem de um pró-fármaco da presente invenção na vizinhança extra celular da célula-alvo.

A **fig. 3** ilustra a síntese de um Fmoc- β Ala-Leu-Ala-Leu, um produto intermédio típico da presente invenção.

A **fig. 4** ilustra a síntese de uma "via de Fmoc", de metil-succinil- β Ala-Leu-Ala-Leu, um produto intermédio típico da presente invenção.

A **fig. 5** ilustra a síntese de uma "via de Fmoc", da forma de sal de succinil- β Ala-Leu-Ala-Leu-DOX, um produto intermédio típico da presente invenção.

A **fig. 6** ilustra a síntese de uma "via de éster de succinilo", da forma de sal de suc- β Ala-Leu-Ala-Leu-DOX, um composto típico da presente invenção.

A **fig. 7** ilustra a síntese de um β Ala-Leu-Ala-Leu-DOX protegido em amino, um produto intermédio típico da presente invenção.

A **fig. 8** ilustra uma síntese de uma "via de éster de alilo", da forma de sal de succinil- β Ala-Leu-Ala-Leu-DOX, um produto intermédio típico da presente invenção.

A **fig. 9** ilustra a síntese de uma "via de resina" de Suc- β Ala-Leu-Ala-Leu-DOX, um produto intermédio típico da presente invenção.

As **figs. 10A-10C** são quadros de oligopéptidos úteis no pró-fármaco da presente invenção.

A **fig. 11** representa um gráfico da sobrevivência de um modelo de xenografia num murganho para um animal a que se deu um veículo com ou sem fármaco.

A **fig. 12** representa um gráfico da sobrevivência de um modelo de xenografia num murganho comparando com um pró-fármaco de doxorubicina e doxorubicina.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Abreviaturas

Aca = ácido 6-aminocapróico

ACN = Acetonitrilo

Aib = Ácido aminoisobutírico

All = Alilo

Aloc = Aliloxicarbonilo

Amb = Ácido 4-(aminometil)benzóico

APP = Ácido 3-amino-3-fenilpropiónico

DCC = N,N'-Diciclo-hexilcarbodi-imida

Boc = t-butiloxicarbonilo

Cap = Ácido capróico

CLAR = Cromatografia líquida de alta pressão

DBN = 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno
DBO = 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]-octano
DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-eno
DCM = Diclorometano
DIC = N,N'-Di-isopropilcarbodi-imida
DIEA = Di-isopropiletilamina
Dg = Ácido diglicólico
DMF = Dimetilformamida
DNR = Daunorubicina
Dox = Doxorubicina
Et₂O = Éter dietílico
Fmoc = 9-Fluorenilmetiloxicarbonilo
Gl = Ácido glutárico
HATU = Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-
1,1,3,3-tetrametilurónio
HBTU = Hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazole-1-il)-
1,1,3,3-tetrametilurónio
HEPES = Hidroxetilpiperidina
HOBt = N-Hidroxibenzotriazole
MeOH = Metanol
NAA = Ácido 3-amino-4,4-difenilbutírico
Nal = 2-Naftilalanina
Naf = Ácido 1,8-naftaleno-dicarboxílico
Nle = Norleucina
NMP = N-metilpirrolidina
Nva = Norvalina
Fg = Fenilglicina
Pig = Ácido piroglutâmico
Pir = 3-Piridilalanina
Resina FAM = 4-hidroximetilfenilacetamidometilo
Suc = Ácido succínico
TA, ta = Temperatura ambiente
TCE = tricloroetilo
TFA = Ácido trifluoroacético

THF = Tetra-hidrofurano

Ti = 2-Tienilalanina

Tz = Ácido tiazolidino-4-carboxílico

Tic = Ácido tetra-hidroisoquinolino-3-carboxílico

O composto da presente invenção, tal como definido nas reivindicações, é uma forma de pró-fármaco de um agente terapêutico ligado directa ou indirectamente a um oligopéptido que, por sua vez, está ligado ao um grupo de estabilização.

De uma forma mais geral, a presente invenção pode ser descrita como novos compostos de pró-fármacos de um agente terapêutico, especialmente pró-fármacos que compreendem um agente terapêutico anti-tumor, que exhibe propriedades terapêuticas melhoradas em relação aos produtos da técnica anterior, especialmente propriedades terapêutica melhoradas no tratamento de tumores cancerosos e/ou no tratamento de reacções inflamatórias tal como doenças reumáticas. As propriedades terapêuticas melhoradas incluem uma diminuição da toxicidade e um aumento da eficácia. Particularmente desejados são os pró-fármacos que exibem uma especificidade de acção elevada, uma toxicidade reduzida, uma maior estabilidade no soro e no sangue e que não se movem para as células-alvo até serem activados por uma enzima associada à célula-alvo. Estão também contemplados os compostos de pró-fármacos de um marcador, que permitem caracterizar os tumores (diagnóstico, progressão do tumor, ensaio dos factores segregados pelas células de tumor, etc.).

A presente invenção também tem por objecto uma composição farmacêutica que compreende o composto de acordo com a presente invenção e, eventualmente, um adjuvante ou veículo aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico

Também tem por objecto um processo para diminuir a toxicidade, por meio da modificação de um agente terapêutico para criar um pró-fármaco.

Também tem por objecto vários processos para criar um pró-fármaco da presente invenção.

Pró-fármaco

O pró-fármaco reivindicado na presente invenção é uma forma modificada de um agente terapêutico e compreende várias porções, incluindo:

- (1) um agente terapêutico,
- (2) um oligopéptido e
- (3) um grupo de estabilização e
- (4) eventualmente, um grupo ligante.

Cada uma das porções do pró-fármaco está discutida com mais detalhe a seguir. A orientação típica destas porções do pró-fármaco é a seguinte:

(grupo de estabilização)-(oligopéptido)-(grupo ligante opcional)-(agente terapêutico).

O grupo de estabilização está directamente ligado ao oligopéptido num primeiro sítio de ligação do oligopéptido. O oligopéptido está directa ou indirectamente ligado ao agente terapêutico num segundo sítio de ligação do oligopéptido. Se o oligopéptido e o agente terapêutico estão indirectamente ligados, então está presente um grupo ligante.

A ligação directa de duas porções do pró-fármaco significa uma ligação covalente entre as duas porções. O

grupo de estabilização e o oligopéptido estão por isso ligados directamente por via de uma ligação covalente no primeiro sítio de ligação do oligopéptido, normalmente o terminal N do oligopéptido. Quando o oligopéptido e os agentes terapêuticos estão directamente ligados, então estão ligados covalentemente um ao outro no segundo sítio de ligação do oligopéptido. O segundo sítio de ligação do oligopéptido é normalmente o terminal C do oligopéptido, mas pode estar em qualquer parte do oligopéptido.

A ligação indirecta de duas porções do pró-fármaco significa que cada uma das duas porções está ligada covalentemente a um grupo ligante. Num enquadramento alternativo, o pró-fármaco tem uma ligação indirecta entre o oligopéptido e o agente terapêutico. Assim, normalmente, o oligopéptido está ligado covalentemente ao grupo ligante que, por sua vez, está ligado covalentemente ao agente terapêutico.

O pró-fármaco da presente invenção pode ser clivado dentro do oligopéptido ligado directa ou indirectamente ao agente terapêutico. Para que o pró-fármaco seja eficaz, o oligopéptido ligado ao agente terapêutico ou é a porção activa do próprio pró-fármaco ou pode-se converter facilmente na porção activa do pró-fármaco normalmente por meio de uma ou mais exopeptidases. A porção activa do pró-fármaco é a parte do pró-fármaco que, após libertação a partir da porção remanescente do composto de pró-fármaco entra na célula-alvo e exerce o efeito terapêutico directamente ou muitas vezes convertendo-se dentro da célula-alvo.

As estruturas do grupo de estabilização e do oligopéptido são ainda seleccionadas para limitar a

purificação do oligopéptido pelas enzimas para além das que estão presente no sangue ou em tecidos que não constituem um alvo. O grupo de estabilização bloqueia a degradação do pró-fármaco e pode actuar de modo a providenciar uma carga preferencial ou outras características físicas do pró-fármaco por meio de exopeptidases. A sequência de aminoácidos do oligopéptido é concebida para assegurar a especificidade para a trouase.

É desejável produzir um agente terapêutico, especialmente um agente terapêutico anti-tumor e/ou anti-inflamatório, inactivos por modificação do agente terapêutico para uma forma de pró-fármaco. De acordo com a presente invenção, as células-alvo são normalmente células de tumor ou células que participam em reacção anti-inflamatórias, especialmente as associadas a doenças reumáticas, tal como macrófagos e monócitos. A modificação do agente terapêutico para uma forma de pró-fármaco também tende a reduzir alguns dos efeitos colaterais dos agentes terapêuticos.

Na célula-alvo, o agente terapêutico (eventualmente ligado a um ou a dois aminoácidos e possivelmente também a um grupo ligante) actua quer directamente no sítio específico da acção intracelular ou, depois de uma modificação sob a acção das proteases intracelulares, mata a célula-alvo ou bloqueia a sua proliferação. Dado que as células normais libertam pouca ou nenhuma trouase *in vivo*, o composto de acordo com a presente invenção mantém-se inactivo e não entra nas células normais ou fá-lo numa quantidade relativamente menor.

O pró-fármaco administra-se ao paciente, através da corrente sanguínea, de uma forma estável e, quando está na

vizinhança de uma célula-alvo, sofre a acção da trouase. Dado que a enzima está apenas minimamente presente na vizinhança extracelular das células normais, mantém-se o pró-fármaco e a sua porção activa (incluindo o agente terapêutico) e, no máximo, entra apenas minimamente nas células normais. Na vizinhança do tumor ou de outras células-alvo, contudo, a presença relevante de enzima no ambiente local causa a clivagem do pró-fármaco. O exemplo que se mostra na fig. 2 descreve um pró-fármaco de tetrapéptido bloqueado em N a ser clivado a partir da parte remanescente do pró-fármaco fora das células e conseguindo entrar na célula-alvo. Uma vez dentro da célula-alvo, pode ainda ser modificado para providenciar o efeito terapêutico. Embora a porção activa do pró-fármaco possa, em certa medida, também entrar nas células normais, a porção activa é libertada da parte remanescente do pró-fármaco, principalmente na vizinhança das células-alvo. Assim, minimiza-se a toxicidade para as células normais.

A libertação da porção activa do pró-fármaco, incluindo o agente terapêutico, ocorre preferencialmente no ambiente imediatamente a seguir à célula-alvo. Na célula-alvo, o agente terapêutico actua quer directamente no seu sítio específico de acção intracelular ou, depois de uma modificação, sob a acção de proteases intracelulares ou de outras enzimas, pode ser modificado para outra forma sob a qual se mata a célula-alvo ou bloqueia a sua proliferação. Na fig. 2 mostra-se um diagrama esquemático desta acção para um exemplo de um pró-fármaco da presente invenção.

Este processo é particularmente útil para a destruição das células-alvo e é concebido para tal quando o tecido-alvo excreta uma enzima ou outro factor que não é segregado pelas células normais. Aqui "células normais" significa

células que não são células-alvo que seriam encontradas pelo pró-fármaco após a administração do pró-fármaco de uma forma apropriada para a finalidade pretendida. Dado que as células normais (isto é, as que não são alvo) libertam pouca ou nenhuma das enzimas das células-alvo que são responsáveis pela clivagem da ligação que liga a porção activa (incluindo o agente terapêutico) do pró-fármaco da parte remanescente do pró-fármaco *in vivo*, o composto da presente invenção mantém-se inactivo e não entra nas células normais.

Num ambiente alternativo, a orientação do pró-fármaco pode ser revertida de modo a que o bloco do terminal C está ligado ao oligopéptido e o agente terapêutico está directamente ou indirectamente ligado ao terminal N do oligopéptido.

Trouase

A trouase é a enzima que se pensa que seja crítica para a activação específica do pró-fármaco no tecido-alvo. A trouase é uma endopeptidase que exhibe um grau notável de discriminação entre leucina e isoleucina no lado do carboxilo do sítio de clivagem do oligopéptido. Uma característica de definição, que se obtém em condições de ensaio apropriadas, é que a trouase cliva facilmente succinil- β AlaLeuAlaLeu-Daunorubicina embora seja pelo menos vinte vezes menos activa com succinil- β AlaIleAlaLeu-Daunorubicina.

Crê-se que a trouase esteja associada a células-alvo. Muito provavelmente é gerada quer por células-alvo, quer por células normais que estão associadas com as células-alvo, tal como tecido do estroma ou macrófagos. Por isso,

por exemplo, a trouase pode ser segregada ou estar presente, de alguma outra forma, na vizinhança extracelular da célula-alvo. Em muitos casos, o pró-fármaco da presente invenção inclui um agente terapêutico para o tratamento de cancro e a célula-alvo é uma célula de tumor. Assim, a trouase pode ser segregada extracelularmente pela célula-alvo ou pode estar presente extracelularmente porque há uma quantidade moderada de lise de células associada, geralmente, com tumores. A lise das células está também associada com tecido inflamatório, outro tecido-alvo.

Contudo, a actividade de trouase é baixa no plasma humano. A actividade da trouase tem sido observada em extractos de células de carcinoma e meio condicionado a partir células de cultura de carcinoma, células de glóbulos vermelhos e vários tecidos humanos, especialmente rim. A trouase de células de carcinoma tem um pI aparente de ~5,1, um peso molecular, determinado por filtração em gel de cerca de 68 kD e uma actividade óptima a pH neutro. É inibida pelos inibidores de metaloproteinase, EDTA e 1,10-fenantrolina mas não por serina, tiol ou inibidores de proteinase ácida, tal como sulfonato de aminoetilbenzeno, E64, pepstatina, leupeptina, aprotinina, CA074 ou fumagilina. Além disso, a trouase inactivada por EDTA pode ser re-activada por catiões de cobalto (50-100 μM) e de manganês (50-1000 μM) mas não de zinco ou catiões cúpricos.

Um esquema de purificação parcial de trouase a partir do sobrenadante da ultracentrifugação (145.000g x 30 min) a partir do produto homogeneizado de células HeLa de carcinoma cervical consiste em quatro etapas, como se segue:

1. Cromatografia de permuta aniónica utilizando uma coluna 15Q (*Pharmacia*) eluída com um gradiente linear de NaCl a 0 até 0,5 M em cloreto de trietilamina 20 mM, a pH 7,2, 0,01 % de Triton X-100,
2. Cromatografia de afinidade utilizando o fluxo rápido de sefarose de quelação (*Pharmacia*) pré-carregada com CoCl_2 e eluída com um gradiente linear de imidazole de 0 a 100 mM em fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,5 M, a pH 7,2, 0,01 % de Triton X-100, 0,02 % de NaN_3 .
3. Electroforese natural preparativa
4. Cromatografia líquida de alta resolução de filtração em gel utilizando TSK Gel G-3000SWXL (TosoHaas) de 7,8 mm X 60 cm eluída com 0,3 mL/min de fosfato de potássio 50 mM, sulfato de potássio 200 mM, a pH 7,2.

Uma clivagem posterior da porção activa do pró-fármaco libertado depois da clivagem de trouase pode ocorrer intracelularmente ou extracelularmente e crê-se que seja catalisado por amino-exopeptidases. Experiências *in vitro* indicam que as amino-exopeptidases com uma vasta gama de especificidades estão presentes no sangue humano assim como no ambiente das células de carcinoma.

Grupo de estabilização

Uma importante porção do pró-fármaco é o grupo de estabilização, que serve para proteger o composto de pró-fármaco da degradação na circulação sanguínea quando administrado ao paciente e permite que o pró-fármaco atinja a vizinhança das células-alvo relativamente intacto. O grupo de estabilização protege o pró-fármaco da degradação por meio das proteinases e peptidases presentes no sangue, no soro sanguíneo e no tecido normal. Particularmente, dado que o grupo de estabilização bloqueia os oligopéptidos do

terminal N e é por isso algumas vezes referido como um bloqueador de N, serve para proteger contra as exopeptidases em relação às quais o pró-fármaco pode, de alguma maneira, ser susceptível.

O composto é menos tóxico *in vivo* do que o agente terapêutico inicial porque o pró-fármaco não é clivado no sangue, coração, cérebro, medula óssea, nas mucosas nem em locais similares. Esta diminuição da toxicidade aplica-se, em particular, a efeitos agudos tal como toxicidade da medula óssea e das mucosas, assim como possível toxicidade cardíaca ou neurológica.

Idealmente, o grupo de estabilização é útil no pró-fármaco da presente invenção se servir para proteger o pró-fármaco da degradação, especialmente de hidrólise, quando analisado por meio da armazenagem do composto pró-fármaco em sangue humano 37 °C durante 2 horas e resulta em menos do que 20 %, preferencialmente menos do que 2 %, a clivagem do pró-fármaco pelas enzimas presentes no sangue humano sob determinadas condições de ensaio.

Os grupos de estabilização da presente invenção são ácido succínico, ácido diglicólico, ácido maleico, ácido piro-glutâmico e ácido glutárico.

Adicionalmente, a administração intravascular de um agregado de pró-fármaco carregado positivamente, em murganhos, resultou numa toxicidade aguda. Contudo, não se observou essa toxicidade quando a carga neste pró-fármaco foi invertida por derivação com um grupo de estabilização carregado negativamente. Este efeito está discutido com mais detalhe a seguir.

Assim, quando a agregação do agente terapêutico é um problema, é preferível que o grupo de estabilização ligado esteja carregado negativamente ou seja neutro.

Toxicidade *in vivo*

Muitos compostos citotóxicos têm uma baixa solubilidade inerente. Por exemplo, as antraciclinas carregadas positivamente formam agregados com uma elevada concentração e estes agregados induzem coagulação intravenosa quando os agregados são administrados intravenosamente. Os requerentes descobriram que a trouase reconhece um conjunto específico de sequências de péptidos hidrofóbicos. Quando uma destas sequências hidrofóbicas (por exemplo, β -Ala-Leu-Ala-Leu) está conjugada com um composto citotóxico (por exemplo: doxorubicina), resulta num composto menos solúvel que forma grandes agregados quando em formulações aquosas para injeção IV (o processo preferido para a libertação de fármacos anti-cancro). Dado que a maior parte dos péptidos estiveram expostos a terminais amino carregados positivamente, a um pH fisiológico, estes agregados formam uma superfície carregada positivamente *in vivo*. Estes agregados, dados intravenosamente, induziram uma cascata de coagulação e a morte em murganhos, em poucos minutos (normalmente menos do que 30 min) após a administração. Isto faz com que qualquer pró-fármaco carregado positivamente, que seja formulado com uma suspensão de agregados, seja impróprio para uso terapêutico.

Várias experiências suportam a hipótese de que os agregados são formados por doxorubicinas conjugadas com péptidos. O exame de soluções formuladas de forma semelhante, feito por meio de dispersão de luz de laser e

ultrafiltração por exclusão de dimensão, demonstraram que apenas uma pequena quantidade do material tinha um peso molecular abaixo de 10 kD. Verificou-se que a dimensão molecular média dos agregados era à volta de 70 kD. Quando se administrou aos animais, concomitantemente (ver exemplo 6) heparina com uma dose IV, a toxicidade aguda foi fortemente reduzida ou eliminada. Quando se administrou aos animais soluções diluídas do mesmo fármaco (a mesma dose total) não houve toxicidade aguda. Estes resultados, considerados em conjunto com os relatórios da literatura, suportam a conclusão de que os pró-fármacos de péptidos dos compostos que formam agregados devido à solubilidade insuficiente não permitem uma terapêutica óptima. Uma solução para este problema do agregado torna estes pró-fármacos de péptidos mais práticos. Quando estes pró-fármacos de péptidos formam agregados por causa da solubilidade insuficiente, nas concentrações desejadas das formulações, o grupo de estabilização na cadeia de péptido deve terminar numa funcionalidade carregada negativamente ou neutra. A utilização de succinilo como grupo de estabilização no pró-fármaco de péptido não torna o pró-fármaco agudamente tóxico (ver exemplo 6). Isto resolve um importante problema na utilização de pró-fármacos de péptidos como uma terapia prática para seres humanos.

Dado que os radicais químicos que têm mais do que dois ácidos carboxílicos são também aceitáveis como parte do pró-fármaco, o grupo terminal com os ácidos dicarboxílicos (ou uma ordem carboxílica superior) é mais geralmente definido como N-cap. N-cap, tal como se utiliza aqui, é um derivado de uma monoamida de um radical químico contendo dois ou mais ácidos carboxílicos em que a amida está ligada no terminal amino do péptido e os restantes ácidos carboxílicos estão livres e não estão acoplados. Com este

fim, o N-cap é preferencialmente ácido succínico ou ácido glutárico, sendo o ácido succínico o mais preferido. Outros exemplos de N-caps úteis no composto pró-fármaco da presente invenção incluem ácido diglicólico e ácido maleico.

Oligopéptido

Os oligopéptidos são definidos, geralmente como polipéptidos curtos, normalmente com vinte aminoácidos ou menos. Contudo, um oligopéptido útil no pró-fármaco da presente invenção tem pelo menos quatro aminoácidos de comprimento. Na extremidade superior, os oligopéptidos com doze ou menos aminoácidos são os mais úteis, embora um oligopéptido possa ter um comprimento de cadeia maior do que doze aminoácidos e estar dentro tanto da definição do termo como é geralmente reconhecido no campo científico. Assim, a porção de oligopéptido do pró-fármaco da presente invenção tem quatro ou mais aminoácidos, inclusive.

Esquema de numeração

O oligopéptido tem uma fórmula ou a sequência $(AA)_n-AA^4-AA^3-AA^2-AA^1$, em que:

cada AA representa, independentemente, qualquer aminoácido codificado sob o ponto de vista genético;

n representa um número inteiro de 0 a 12;

AA^4 representa aminoácido não codificado sob o ponto de vista genético;

AA^3 representa qualquer aminoácido;

AA^2 representa qualquer aminoácido; e

AA^1 representa qualquer aminoácido.

Isto corresponde a uma sequência de posição P(n+2)...P2-P1-P1'-P2'.

Crê-se que a trouxese cliva entre as posições P1 e P1'.

A menos que seja indicado de outra forma, todos os aminoácidos estão na configuração L.

Os aminoácidos preferidos no oligopéptido são os seguintes:

Na posição P2, um dos seguintes: β -alanina, ácido tiazolidino-4-carboxílico, 2-tienilalanina, 2-naftilalanina, D-alanina, D-leucina, D-metionina, D-fenilalanina, ácido 3-amino-3-fenilpropiónico, ácido γ -aminobutírico, ácido 3-amino-4,4-difenilbutírico.

Também são possíveis os ácidos tetra-hidro-isoquinolino-3-carboxílico, ácido 4-aminometilbenzóico, ácido aminoisobutírico na posição P2.

Na posição P1, um dos seguintes: leucina, tirosina, fenilalanina, *p*-Cl-fenilalanina, *p*-nitrofenilalanina, valina, norleucina, norvalina, fenilglicina, triptofano, ácido tetra-hidroisoquinolino-3-carboxílico, 3-piridilalanina, alanina, glicina, tienilalanina.

Também são possíveis metionina, valina ou prolina na posição P1.

Na posição P1', um dos seguintes: alanina, leucina, tirosina, glicina, serina, 3-piridilalanina ou 2-tienilalanina.

Também são possíveis ácido aminoisobutírico, treonina ou fenilalanina.

Na posição P2', um dos seguintes: leucina, fenilalanina, isoleucina, alanina, glicina, tirosina, 2-naftilalanina ou serina.

Também é possível β -alanina na posição P2'.

Os oligopéptidos úteis no pró-fármaco da presente invenção incluem os seguintes: D-AlaTie β Ala β AlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 1) Thi β Ala β AlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 2), β Ala β AlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 3), β AlaAlaAlaIle (SEQ ID NO: 4), β AlaAlaAlaLeu (SEQ ID NO: 5), β AlaFenTirLeu (SEQ ID NO: 6), β AlaFenTreFen (SEQ ID NO: 7), β AlaFenGliIle (SEQ ID NO: 8), β AlaFenGliLeu (SEQ ID NO: 9), β AlaFenFenFen (SEQ ID NO: 10), β AlaFenFenIle (SEQ ID NO: 11), β AlaFenFenLeu (SEQ ID NO: 12), β AlaFenAlaIle (SEQ ID NO: 13), β AlaFenAlaLeu (SEQ ID NO: 14), TieGliAlaLeu (SEQ ID NO: 15), NalGliAlaLeu (SEQ ID NO: 16), β AlaLeuTirLeu (SEQ ID NO: 17), β AlaLeuTieLeu (SEQ ID NO: 18), β AlaLeuTreFen (SEQ ID NO: 19), β AlaLeuTreIle (SEQ ID NO: 20), β AlaLeuTreLeu (SEQ ID NO: 21), β AlaLeu (SerLeu (SEQ ID NO: 22), β AlaLeuPirLeu (SEQ ID NO: 23), β AlaLeuLeu (SEQ ID NO: 24), β AlaLeuGliFen (SEQ ID NO: 25), β AlaLeuGliIle (SEQ ID NO: 26), TieLeuGliLeu (SEQ ID NO: 27), β AlaLeuGliLeu (SEQ ID NO: 28), AibLeuGliLeu (SEQ ID NO: 29), β AlaLeuFenIle (SEQ ID NO: 30), β AlaLeuFenLeu (SEQ ID NO: 31), β AlaLeuAibLeu (SEQ ID NO: 32), β AlaLeuAlaAla (SEQ ID NO: 33), β AlaLeuAla β Ala (SEQ ID NO: 34), β AlaLeuAlaFen (SEQ ID NO: 35), β AlaLeuAlaGli (SEQ ID NO: 36), β AlaLeuAlaIle (SEQ ID NO: 37), β AlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 38), TicLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 39), ThzLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 40), TieLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 41), NalLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 42), NAALeuAlaLeu (SEQ ID NO: 43), D-

LeuLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 44), D-AlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 45), D-MetLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 46), APPLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 47), AmbLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 48), β AlaLeuAlaNal (SEQ ID NO: 49), β AlaLeuAla (Ser (SEQ ID NO: 50), β AlaLeuAlaTir (SEQ ID NO: 51), β AlaMetTirFen (SEQ ID NO: 52), β AlaMetTirLeu (SEQ ID NO: 53), β AlaMetGliIle (SEQ ID NO: 54), TieMetGliLeu (SEQ ID NO: 55), β AlaMetFenFen (SEQ ID NO: 56), β AlaMetFenIle (SEQ ID NO: 57), TicMetAlaLeu (SEQ ID NO: 58), NalMetAlaLeu (SEQ ID NO: 59), NAAMetAlaLeu (SEQ ID NO: 60), β AlaMetAlaLeu (SEQ ID NO: 61), APPMetAlaLeu (SEQ ID NO: 62), β AlaNleTirIle (SEQ ID NO: 63), β AlaNleTirLeu (SEQ ID NO: 64), β AlaNleTreIle (SEQ ID NO: 65), β AlaNleTreLeu (SEQ ID NO: 66), β AlaNleGliFen (SEQ ID NO: 67), β AlaNleGliIle (SEQ ID NO: 68), β AlaNleGliLeu (SEQ ID NO: 69), β AlaNleFenIle (SEQ ID NO: 70), β AlaNleAlaIle (SEQ ID NO: 71), β AlaNleAlaLeu (SEQ ID NO: 72), β AlaNleAlaFen (SEQ ID NO: 73), β AlaNvaAlaLeu (SEQ ID NO: 74), β AlaFenTirIle (SEQ ID NO: 75), TieProGliLeu (SEQ ID NO: 76), TieProAlaLeu (SEQ ID NO: 77), NalProAlaLeu (SEQ ID NO: 78), β AlaProAlaLeu (SEQ ID NO: 79), β AlaFen (Cl), AlaLeu (SEQ ID NO: 80), β AlaFen (NO₂), AlaIle (SEQ ID NO: 81), β AlaFen(NO₂), AlaLeu (SEQ ID NO: 82), β AlaFenAlaLeu (SEQ ID NO: 83), β AlaPirAlaLeu (SEQ ID NO: 84), TicTreGliLeu (SEQ ID NO: 85), β AlaTieGliIle (SEQ ID NO: 86), β AlaTieAlaLeu (SEQ ID NO: 87), β AlaTicAlaIle (SEQ ID NO: 88), β AlaTicAlaLeu (SEQ ID NO: 89), β AlaValAlaLeu (SEQ ID NO: 90), β AlaTrpAlaLeu (SEQ ID NO: 91), β AlaTirTirFen (SEQ ID NO: 92), β AlaTirTirIle (SEQ ID NO: 93), β AlaTirTirLeu (SEQ ID NO: 94), β AlaTirTreLeu (SEQ ID NO: 95), β AlaTirFenLeu (SEQ ID NO: 96), β AlaTirGliIle (SEQ ID NO: 97), TieTirGliLeu (SEQ ID NO: 98), β AlaTirGliLeu (SEQ ID NO: 99), β AlaTirFenIle (SEQ ID NO: 100), β AlaTirAlaIle (SEQ ID NO: 101), TieTirAlaLeu (SEQ ID NO: 102) e β AlaTirAlaLeu (SEQ ID NO: 103).

Bloqueio do aminoácido

A porção do oligopéptido do pró-fármaco inclui um aminoácido de bloqueio como AA⁴ da sequência do oligopéptido, isto é, na posição P2 da sequência de posição, de acordo com o esquema de numeração descrito antes. O aminoácido de bloqueio é um aminoácido não codificado sob o ponto de vista genético.

A função do aminoácido de bloqueio na posição P2 consiste em manter a selectividade para a clivagem do pró-fármaco por meio da trouase e inibir a clivagem do oligopéptido por meio de outras enzimas nessa porção do oligopéptido que está mais fortemente ligada (ligada directamente ou ligada indirectamente) à porção do agente terapêutico do composto pró-fármaco. Mais particularmente, colocando um aminoácido de bloqueio na posição P2, reduz-se a clivagem indesejável dentro das ligações de péptidos dos quatro aminoácidos da sequência de oligopéptido AA⁴-AA³-AA²-AA¹ e a sequência de posição P2-P1-P1'-P2' é reduzida. Crê-se que a trouase cliva entre as posições P1 e P1' do oligopéptido. Dado que se sabe que as células de sangue e as células normais estão associadas com uma variedade de peptidases, colocando um aminoácido de bloqueio na posição P2 serve para proteger a porção de oligopéptido do pró-fármaco *in vivo* até o pró-fármaco estar na vizinhança da célula-alvo. Especificamente, colocando um aminoácido de bloqueio na posição P2, crê-se que o oligopéptido fica protegido de clivagem indesejável entre P2 e P1. Sem o aminoácido de bloqueio, o pró-fármaco pode ficar vulnerável tanto às exopeptidases como às endopeptidases presentes no sangue e no tecido normal, sendo que ambas as classes de enzimas podem, de alguma forma, degradar o pró-fármaco

antes de ele atingir o seu alvo. O exemplo 2 a seguir ilustra esta importante característica do pró-fármaco.

Agentes terapêuticos

Os agentes terapêuticos que são particularmente úteis para a modificação para uma forma de pró-fármaco, de acordo com a presente invenção, são os que têm uma janela terapêutica estreita. Um fármaco ou um agente terapêutico com uma janela terapêutica estreita é aquele em que a dose à qual a toxicidade é evidente, por meio de padrões gerais da medicina, é muito próxima da dose para a qual a eficácia é evidente.

O agente terapêutico conjugado com o grupo de estabilização e o oligopéptido e, eventualmente, o grupo ligante, para formar o pró-fármaco da presente invenção, pode ser útil para o tratamento de cancro, doenças inflamatórias ou alguns outros estados clínicos. Preferencialmente, o agente terapêutico selecciona-se nas seguintes classes de compostos: agentes de alquilação, agentes anti-proliferação, agentes de ligação de tubulina, alcalóides de vinca, enedinas, podofilotoxinas ou derivados de podofilotoxina, a família dos fármacos de pteridina, taxanos, antraciclinas, dolaestatinas, inibidores de topoisomerase, cis-platinas.

Particularmente, o agente terapêutico selecciona-se, com vantagem, nos seguintes compostos: doxorubicina, daunorubicina, vinblastina, vincristina, calicheamicina, etopósido, fosfato de etopósido, CC-1065, duocarmicina, KW-2189, metotrexato, metopterina, aminopterina, dicloro-metotrexato, docetaxel, paclitaxel, epitiolona, combretaestatina, fosfato de combretaestatin A4,

dolaestatina 10, dolaestatina 11, dola-estatina 15, topotecano, camptotecina, mitomicina C, porfiromicina, 5-flurouracilo, 6-mercaptopurina, fludarabina, tamoxifeno, arabinósido de citosina, arabinósido de adenosina, colchicina, carboplatina, mitomicina C, bleomicina, melfalano ou um seu derivado ou um seu análogo.

Grupos ligantes

Um grupo ligante entre o oligopéptido e o agente terapêutico pode ser vantajoso por razões como as que se seguem:

1. Como um espaçador para considerações espaciais de modo a facilitar a libertação enzimática do aminoácido AA¹.
2. Para providenciar uma ligação química apropriada entre o agente terapêutico e o oligopéptido.
3. Para melhorar o processo de síntese para a produção do conjugado de pró-fármaco (por exemplo, fazendo uma pré-derivação do agente terapêutico ou do oligopéptido com o grupo ligante antes da conjugação para aumentar o rendimento ou a especificidade).
4. Para melhorar as propriedades físicas do pró-fármaco.
5. Para providenciar um mecanismo adicional para a libertação intracelular do fármaco.

As estruturas do ligante são ditadas pela funcionalidade requerida. Exemplos de produtos químicos que sejam ligantes potenciais são hidrazida, éster, éter e sulfidriilo. O ácido amino-capróico é um exemplo de um grupo ligante bifuncional. Quando o ácido amino-capróico é

utilizado no grupo ligante, não é contado como um aminoácido no esquema de numeração do oligopéptido.

Composições farmacêuticas

A presente invenção também inclui uma composição farmacêutica que compreende um composto, particularmente um composto pró-fármaco, de acordo com a presente invenção e, eventualmente, um adjuvante ou um veículo aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.

A presente invenção também tem por objecto a utilização da composição farmacêutica para a preparação de um produto medicinal que se destine ao tratamento de um estado clínico.

A composição farmacêutica pode ser administrada, por exemplo, administrando-a ao paciente parentericamente, especialmente intravenosamente, intramuscularmente ou intra-peritonealmente. As composições farmacêuticas da presente invenção, para administração parentérica, compreendem soluções, suspensões ou emulsões esterilizadas, aquosas ou não aquosas. Como dissolvente ou veículo aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico, pode-se utilizar propileno-glicol, polietileno-glicol, ésteres orgânicos injectáveis, por exemplo oleato de etilo ou ciclodextrinas. Estas composições podem também compreender agentes de molhagem, de emulsão e/ou dispersantes.

A esterilização pode ser realizada de diversas maneiras, por exemplo, utilizando um filtro bacteriológico, incorporando agentes de esterilização na composição ou por irradiação. Também podem ser preparadas sob a forma de composições sólidas esterilizadas em que se podem

dissolver, no momento da utilização, em água esterilizada ou qualquer outro meio injectável esterilizado.

A composição farmacêutica pode também compreender adjuvantes que são bem conhecidos na técnica (por exemplo, vitamina C, agentes antioxidantes, etc.) e que são capazes de ser utilizados em combinação com o composto da presente invenção de modo a melhorar e a prolongar o tratamento de um estado clínico para o qual foram administradas.

As doses para administração dos compostos da presente invenção a um paciente são geralmente pelo menos as doses usuais dos agentes terapêuticos conhecidos neste campo, descritos em Bruce A. Chabner e Jerry M. Collins, *Cancer Chemotherapy*, Lippincott Ed., ISBN 0-397-50900-6 (1990) ou podem ser ajustadas, dentro da decisão de tratamento decidida pelo médico, para acomodar a eficácia superior das formulações de pró-fármaco ou as circunstâncias particulares de que o paciente está a ser tratado. As doses administradas a partir daqui variam de acordo com o agente terapêutico utilizado para a preparação do composto de acordo com a presente invenção.

Tratamento com o composto pró-fármaco

Também dentro do âmbito da presente invenção um processo para o tratamento terapêutico de um estado clínico compreende a administração ao paciente de uma dose efectiva sob o ponto de vista terapêutico, especialmente parentericamente ou intravenosamente.

O composto pró-fármaco é útil para o tratamento de muitos estados clínicos incluindo cancro, doenças neoplásicas, tumores, doenças inflamatórias e doenças

infecciosas. Exemplos das doenças preferidas são cancro da mama, cancro colorectal, cancro do fígado, cancro do pulmão, cancro da próstata, cancro dos ovários, cancro do cérebro e cancro pancreático. Formulados em veículos aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico (tal como uma solução salina isotónica), o composto pró-fármaco pode ser administrado a animais ou a seres humanos em doses intravenosas variando de 0,05 mg/kg/dose/dia até 300 mg/kg/dose/dia. Também pode ser administrado gota a gota intravenosamente ou por outro processo de infusão lenta.

Os pacientes humanos são os receptores usuais do pró-fármaco da presente invenção, embora também esteja contemplada uma utilização veterinária.

PROCEDIMENTOS GERAIS DA QUÍMICA DO PROCESSO

Oligopéptido: Processo geral da síntese de péptidos

Pode-se sintetizar péptidos ou oligopéptidos, sequências nos conjugados de pró-fármacos da presente invenção por meio de processos de sínteses em fase sólida (utilizando quer a química de Boc ou de Fmoc) ou por sínteses em fase líquida. Os processos gerais de Boc e Fmoc são amplamente utilizados e estão descritos nas seguintes referências: Merrifield, J. A. Chem. Soc., 88: 2149 (1963); Bodanszky e Bodanszky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin, 7-161 (1994); Stewart, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical. Rockford, (1984).

Processo geral de Fmoc em fase sólida

Utilizando o processo de síntese em fase sólida preferido, quer automático, quer manual, sintetiza-se um

péptido com o comprimento desejado e sintetiza-se a sequência através da adição, em etapas, de aminoácidos a uma cadeia em crescimento que está ligada a uma resina sólida. Exemplos de resinas de Fmoc compatíveis e úteis, embora não se limitando a estas, são resina Wang, resina HMPA-PEGA, resina ácida de Rink ou uma resina de hidroxietil-fotoligante. O terminal C da cadeia de péptido está ligado covalentemente a uma resina polimérica e adicionaram-se α -aminoácidos protegidos, em etapas, com um reagente de acoplamento. Um grupo de protecção de α -amino preferido é o grupo Fmoc, que é estável nas condições de acoplamento e pode facilmente ser eliminado em condições de alcalinidade moderada. Os dissolventes da reacção são, preferencialmente, mas não se limitam a DMF, NMP, DCM, MeOH e EtOH. Exemplos de agentes de acoplamento são: DCC, DIC, HATU, HBTU. A clivagem do grupo de protecção do terminal N faz-se em piperidina a 10-100 % em DMF a 0-40 °C, sendo a temperatura ambiente a preferida. No fim da síntese o grupo final de protecção Fmoc é eliminado utilizando o processo anterior de clivagem do terminal N. O péptido remanescente na resina é clivado a partir da resina em conjunto com os grupos de protecção de cadeia lateral sensíveis a ácidos, por meio do tratamento da resina em condições ácidas. Por exemplo, uma condição de clivagem ácida é uma mistura de ácido trifluoroacético (TFA) em diclorometano. Se se utiliza a resina de hidroxietil-fotoligante, o comprimento de onda apropriado para induzir a clivagem é de λ 365 nm da luz ultravioleta. Uma representação diagramática deste processo está dada na fig. 3.

Processo geral de N-cap por via da síntese em fase sólida

A preparação dos péptidos derivados de terminal N consegue-se, convencionalmente, em fase sólida. Quando a

síntese do péptido está completa o Fmoc do terminal é eliminado enquanto o péptido está ainda no suporte sólido. O N-cap escolhido é em seguida acoplado utilizando as condições de acoplamento padrão dos péptidos no terminal N do péptido. Quando está completo o acoplamento de N-cap o péptido é clivado a partir da resina utilizando o processo descrito antes.

Processo geral de Boc em fase sólida

Para o processo em fase sólida utilizando a química de Boc, é útil quer a resina de Merrifield quer a resina PAM. Os aminoácidos são acoplados à cadeia em crescimento em fase sólida por meio de adições sucessivas dos aminoácidos protegidos por Boc, activados por agentes de acoplamento. Exemplos de agentes de acoplamento são: DCC, DIC, HATU, HBTU. Os dissolventes de reacção podem ser DMF, DCM, MeOH e NMP. A clivagem do grupo de protecção Boc faz-se em TFA a 10-100 % em DCM a 0-40 °C, sendo a temperatura ambiente a preferida. Quando está completa a junção da cadeia de péptidos elimina-se o grupo de protecção do terminal N (normalmente Boc) tal como descrito antes. O péptido é removido da resina utilizando HF líquido ou ácido trifluorometano-sulfónico em diclorometano.

Processo geral para a preparação do oligopéptido FMOC por meio de síntese em fase sólida

Alternativamente, o produto intermédio do péptido pró-fármaco pode ser preparado por via de uma síntese em fase sólida, utilizando quer a química de Boc ou de Fmoc. Na apresentação diagramática dos processos (fig. 4), o tetrapéptido Leu do terminal C é geralmente utilizado como um exemplo, mas deve entender-se que se podem realizar

também reacções semelhantes com outros tetrapéptidos de terminal C. O péptido pode ser construído por meio da junção, passo a passo, em analogia com o processo em fase sólida (na direcção do terminal N ou na direcção do terminal C) ou através do acoplamento de dois dipéptidos ou de um tripéptido, apropriadamente protegidos, com um único aminoácido.

Um processo de síntese em fase sólida é uma construção por etapas do produto intermédio de péptido pró-fármaco utilizando a química de Fmoc, ilustrado na fig. 4. O terminal C deve estar protegido para reduzir a formação de produtos secundários. O grupo R do terminal C na fig. 4 é Me, tBu, benzilo ou TCE. (Note-se que quando N-cap é metil-succinilo, o grupo R do terminal C não pode ser metilo) Embora DMF seja dado como o dissolvente, outros dissolventes tais como DMSO, CH₃CN ou NMP (ou as suas misturas) podem substituí-lo. A piridina, Et₃N ou outras bases podem ser substituídas por piperidina na desprotecção do terminal amino protegido pela cadeia de péptidos em crescimento. Do mesmo modo, embora HBTU seja dado no diagrama anterior como agente de activação, pode-se utilizar outros agentes de activação tais como DCC, DIC, DCC + HOBT, OSu, ésteres activados, azida ou azida de trifenil-fosforilo. Adicionalmente, o cloreto de ácido ou o brometo de ácido do péptido protegido podem ser utilizados para acoplar directamente ao aminoácido ou a um fragmento de péptido. Quando a junção do oligopéptido está concluída, o péptido com o terminal N desprotegido e com o terminal C protegido está pronto para aceitar o desejado N-cap.

Processo geral para a preparação do oligopéptido de N-cap por via da síntese em fase de solução

Quando se prepara o oligopéptido de N-cap por meio de uma síntese em fase de solução, é necessário sintetizar N-cap por meio de um processo ligeiramente modificado (fig. 4). Primeiro é preciso proteger o terminal C do oligopéptido de Fmoc com um ácido lábil ou com um grupo de protecção sensível a hidrogenação compatível com a desprotecção selectiva do terminal C em relação a N-cap. Depois, o grupo de protecção de Fmoc necessita de ser eliminado do oligopéptido para revelar o terminal N. Com o terminal N desprotegido e o terminal C protegido, faz-se reagir o oligopéptido com o semi-éster activado do N-cap desejado. O N-cap pode ser activado utilizando processos para a activação de aminoácidos tal como DCC ou HATU numa base e num dissolvente apropriado. Alternativamente, quando se utiliza o metil-hemisuccinato, o acoplamento pode ser feito por via de cloreto de metilo e hemisuccinilo (ou outro halogeneto de ácido) (fig. 4) utilizando um dissolvente inerte na presença de uma base orgânica ou inorgânica, tal como DIEA, trietilamina ou Cs_2CO_3 . Um exemplo dessa síntese pode ser a reacção de hemisuccinato de metilo e éster benzílico do oligopéptido 38 (ver figura 10). O processo de acoplamento pode ser qualquer um dos processos geralmente utilizados na técnica (ver por exemplo: Bodanszky, M., *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, 185 (1984); Bodanszky, M., *Principes of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, 159 (1984). O grupo benzilo pode então ser eliminado por hidrogenação catalítica que providencia a forma desejada de metil-succinilo de N-cap do oligopéptido 38. Outros exemplos, embora não limitativos são os grupos apropriados de protecção do terminal C que são elimináveis e que podem ser tBu, alcoxi-metilo e TCE. Outros processos para realizar esta etapa estão descritos na literatura.

Pode-se considerar qualquer combinação do processo anterior, tal como "condensação do fragmento" de di- ou tripéptidos. As condições de reacção são bem conhecidas na técnica e estão detalhadas nas citações indicadas. A vantagem dos processos descritos antes é a fácil purificação do produto produzido por sínteses em fase de solução.

CONJUGADO DE PRÓ-FÁRMACO

Processos gerais para as etapas de conjugação e de desprotecção

A forma de N-cap do agente terapêutico de oligopéptido (conjugados de pró-fármaco), descrita na presente invenção, pode ser sintetizada por acoplamento de uma forma de Fmoc (significa que Fmoc está ligado ao terminal N do oligopéptido) do oligopéptido com daunorubicina ou qualquer agente terapêutico apropriado utilizando qualquer um dos reagentes-padrão de activação utilizados na síntese dos péptidos (fig. 6). O dissolvente pode ser tolueno, acetato de etilo, DMF, DMSO, CH₃CN, NMP, THF, DCM ou qualquer outro dissolvente inerte apropriado, como é conhecido da técnica e os reagentes são solúveis neles. Os dissolventes preferidos são DMF e NMP. A temperatura apropriada varia entre -25 e +25 °C, sendo preferida a temperatura ambiente. O agente de activação pode ser seleccionado entre um dos seguintes: PiBOP, HBTU, HATU, EDC, DIC, DCC, DCC+HOBT, ésteres activados de OSu, azida ou trifenilfosforilazida. Os agentes de activação preferidos são HBTU ou HATU. Alternativamente, o cloreto de ácido ou o brometo de ácido do péptido protegido podem também ser utilizados para esta reacção de acoplamento. Para a reacção de acoplamento são necessários 2-4 equivalentes, com vantagem 2-2,5

equivalentes de uma base. A base pode ser seleccionada entre bases inorgânicas tais como CsCO_3 , Na- ou K_2CO_3 ou bases orgânicas, tais como TEA, DIEA, DBU, DBN, DBO, piridina, piridinas substituídas, N-metil-morfolina etc., preferencialmente TEA ou DIEA. A reacção pode ser realizada a temperaturas entre $-15\text{ }^\circ\text{C}$ e $50\text{ }^\circ\text{C}$, com vantagem entre $-10\text{ }^\circ\text{C}$ e $10\text{ }^\circ\text{C}$. O tempo de reacção está entre 5-90 minutos, com vantagem entre 20-40 minutos. Isola-se o produto vertendo a mistura reaccional em água e filtrando o precipitado que se forma. O produto impuro ainda pode ser mais purificado por meio de recristalização em DCM, THF, acetato de etilo ou acetonitrilo, preferencialmente em diclorometano ou acetonitrilo. A forma de Fmoc isolada do agente terapêutico de oligopéptido é então desprotegida durante 2-90 minutos preferencialmente 3-8 minutos utilizando um excesso de dez a cem vezes de base a uma temperatura entre $-10\text{ }^\circ\text{C}$ e $50\text{ }^\circ\text{C}$. Idealmente prefere-se utilizar 5-60 equivalentes da base. A piperidina é a base preferida para desproteger os grupos Fmoc. O terminal amino desprotegido do conjugado de agente terapêutico e oligopéptido é acilado por meio de anidrido de diácido como um hemi-éster activado para se obter a forma final de N-cap do agente terapêutico de oligopéptido (pró-fármaco).

Alternativamente, o pró-fármaco final pode ser preparado de um modo semelhante a partir da forma de N-cap protegida do oligopéptido tal como a forma de hemi-éster de metilo de succinil-N-cap de oligopéptido conjugado com um agente terapêutico. Este processo está ilustrado na fig. 6.

O agente terapêutico de N-Cap-oligopéptido protegido é então desprotegido por processos compatíveis com a estabilidade do agente terapêutico. Por exemplo, para as antraciclinas protegeram-se com um grupo metilo e

desprotegeram-se com uma esterase. Para outros agentes terapêuticos pode-se seleccionar grupos de protecção de benzilo e a hidrogenação catalítica para a desprotecção.

A forma de sal do agente terapêutico de N-Cap-oligopéptido carregado negativamente produz-se com um dissolvente seleccionado no grupo que se segue: álcool (incluindo metanol, etanol ou isopropanol), água, acetonitrilo, tetra-hidrofurano, diglima ou outros dissolventes polares. A fonte de sódio é um equivalente molar de NaHCO_3 , NaOH , Na_2CO_3 , NaOAc , NaOCH_3 (em geral alcóxido de sódio) ou NaH . Uma coluna permutadora de iões carregada com Na^+ (tal como permutadores de iões fortes ou fracos) é também útil para esta última etapa de preparação da forma de sal do agente terapêutico de N-Cap-oligopéptido, quando apropriado. O sódio está descrito no presente pedido de patente apenas como um exemplo. Pode-se utilizar qualquer sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico para N-caps carregados negativamente.

Geralmente, o pró-fármaco pode ser convertido numa forma de sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico para melhorar a solubilidade do pró-fármaco. O agente terapêutico de N-cap-oligopéptido é neutralizado com um sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, por exemplo, NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaOH tris(hidroximetil)aminometano, KHCO_3 , K_2CO_3 , CaCO_3 , NH_4OH , CH_3NH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{NH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{N}$, acetiltriethylamónio. A forma de sal preferida do pró-fármaco é a de sódio e o sal de neutralização preferido é o NaHCO_3 .

Está bem documentado, que as moléculas do tipo da antracilina, incluindo a doxorubicina e a daunorubicina formam géis em dissolventes orgânicos em concentrações

muito baixas (Matzanke, B. F., et al., Eur. J. Biochem., 207: 747-55 (1992); Chaires, J. B., et al., Biochemistry, 21: 3927-32 (1982); Hayakawa, E., et al., Chem. Pharm. Bull., 39: 1282-6 (1991). Os requerentes verificaram que há um enorme obstáculo para obter rendimentos elevados de produto puro quando de produzem conjugados de péptido e antraciclina. A formação do gel contribui para a formação de reacções secundárias indesejáveis. Uma maneira de minimizar este problema consiste em utilizar soluções muito diluídas (1-2 %) para a reacção de acoplamento, contudo, não é prático em ambiente de processo (grandes quantidades de resíduos, isolamento complicado). Para ultrapassar este problema os requerentes inventaram um processo em que se utiliza ureia e outros agentes caotrópicos para quebrar as fortes forças de ligação hidrofóbicas e de hidrogénio que formam o gel. Assim, se a reacção de acoplamento se realiza num dissolvente contendo ureia, com vantagem uma solução de ureia a 20 % até saturada em DMF ou NMP, mantêm-se as reacções secundárias abaixo de 2 % mesmo se a concentração dos reagentes exceder 10 %. A presente invenção torna prática a etapa de conjugação a concentrações elevadas e produz bons rendimentos e um aumento de pureza em relação aos procedimentos que não utilizam ureia como outros agentes isotópicos.

Processo geral da enzima

As hidrólises de agentes terapêuticos de N-cap-oligo-péptido, com o composto completo de N-cap, catalisadas por ácidos ou bases levam a misturas reaccionais complexas devido à instabilidade de muitos agentes terapêuticos mesmo em condições moderadamente ácidas ou básicas. Os requerentes verificaram que as enzimas podem promover a hidrólise sem destruir o substrato ou o produto. As enzimas

apropriadas para esta reacção podem ser seleccionadas entre esterases, lipases e podem estar nas suas formas naturais, solúveis em água ou immobilizadas por acoplamento cruzado ou ligação a materiais de suporte sólido disponíveis no mercado. Das enzimas solúveis avaliadas, é especialmente útil a lipase "B" de *Candida Antarctica* (Altus Biologics). Exemplos de enzimas immobilizadas por acoplamento cruzado são ChiroCLEC-PC™ (Altus Biologics). A lipase "B" de *Candida Antarctica* (Altus Biologics) pode ser immobilizada por reacção com fluxo rápido de sefarose 4 activada por NHS (American Pharmacia Biotech). O pH da mistura reaccional durante a hidrólise é controlado cuidadosamente e mantido por um pH entre 5,5 e 7,5, com vantagem entre 5,7 e 6,5, por via da adição controlada de uma solução de NaHCO₃. Quando a reacção está completa, isola-se o produto por liofilização da mistura reaccional filtrada. As enzimas immobilizadas permanecem no bolo do filtro e podem ser reutilizadas se desejado.

Processo geral do éster de alilo

O pró-fármaco também pode ser preparado por via do acoplamento da forma dos hemi-ésteres de alilo do N-cap-oligopéptido com um agente terapêutico e depois fazendo libertar o ácido livre do conjugado. A fig. 8 ilustra este processo com succinil-β-Ala-Leu-Ala-Leu e doxorubicina.

O acoplamento de alil-succinil-β-Ala-Leu-Ala-Leu com doxorubicina pode ser realizado por via de qualquer um dos processos de conjugação de oligopéptidos.

Também se pode sintetizar alil-succinil-β-Ala-Leu-Ala-Leu-doxorubicina fazendo reagir o hemisuccinato de alilo, que foi preparado por via de processos conhecidos (Casimir.

J. R., et. al., Tet. Lett. 36/19 3409 (1995)), com β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorubicina do mesmo modo que o acoplamento dos precursores de tetrapéptidos protegidos com doxorubicina que está descrito nos processos anteriores. Os solventes inertes apropriados são THF, diclorometano, acetato de etilo, tolueno, preferencialmente THF, a partir do qual a forma ácida precipita à medida que a reacção progride. O ácido isolado é convertido no seu sal de sódio, tal como foi descrito antes. Os tempos de reacção variam entre 10-180 minutos, com vantagem 10-60 minutos, a temperaturas entre 0-60 °C, preferencialmente 15-30 °C.

A eliminação do grupo alilo pode ser feita com Pd(0) ou Ni(0), com vantagem Pd(0) com a transferência promovida do grupo alilo para as moléculas receptoras, como é bem conhecido na técnica e está documentado na literatura profissional (Genet, J-P, et al., Tet. Lett., 50, 497, 1994; Bricout, H., et. al. Tet. Lett., 54: 1073 (1998), Genet, J-P. et. al. Synlett, 680 (1993); Waldmann, H., et. al., Bioorg. Med. Chem., 7: 749 (1998); Shaphiro, G., Buechler, D., Tet. Lett., 35: 5421 (1994)). A quantidade de catalisador pode ser de 0,5-25 % mole em relação ao substrato.

Processo geral de tritilo ou tritilo substituído

O pró-fármaco pode também ser sintetizado por via do processo conhecido ilustrado na fig. 7. Esta abordagem utiliza um R'-tetrapéptido, em que R' representa tritilo ou tritilo substituído. O acoplamento de R'-tetrapéptido com um agente terapêutico pode ser feito por via de qualquer um dos processos descritos antes para a conjugação de um oligopéptido protegido com um agente terapêutico durante 30-120 minutos a 0-20 °C.

A eliminação do grupo tritilo ou tritilo substituído pode ser feita em condições ácidas para se obter o pró-fármaco carregado positivamente. Este pró-fármaco carregado positivamente está bloqueado em N tal como ilustrado na fig. 4 e já foi descrito antes. A desprotecção de tritilo pode ser conseguida com ácido acético, ácido fórmico e ácido clorídrico diluído.

O pró-fármaco pode ser convertido no agente terapêutico de oligopéptido 38 de succinilo ou glutarilo por meio da reacção com anidrido succínico. O agente terapêutico de oligopéptido 38 de succinilo ou glutarilo pode ser convertido em qualquer sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. O dissolvente para a etapa de acoplamento é DMF, DMSO, CH₃CN, NMP ou qualquer outro dissolvente apropriado conhecido da técnica.

Processo geral de conjugação em fase sólida de direcção inversa

O composto pró-fármaco da presente invenção pode ser sintetizado utilizando a química em fase sólida por via de processos de direcção inversa "em etapas" (do terminal N para o terminal C).

Uma das maneiras consiste em utilizar resinas para imobilizar um hemi-éster de succinilo, por exemplo, éster succinil-mono-benzílico ou éster de alilo. Exemplos de resinas que podem ser seleccionadas são as "resinas de Wang" (Wang, S. S., J. Am. Chem. Soc., 95: 1328 (1973); Zhang, C., Mjaili, A. M. M., Tet. Lett., 37: 5457 (1996)), "resinas de Rink" (Rink, H., Tet. Lett., 28: 3787 (1987)), "resinas de tritilo ou tritilo substituído" (Chen, C., et. al., J. Am. Chem. Soc., 116: 2661 (1994); Bartos, K. et. al., Peptides. Proc. 22nd European Peptide Symposium

(1992); Schneider, C. H.; Eberle, A. N. (Eds.), ESCOM. Leiden, pp. 281 (1993). O éster imobilizado é então desprotegido e reage do mesmo modo com β -alanina protegida no terminal C. Estas etapas repetem-se então com leucina, alanina e finalmente ésteres de leucina, seguidas do acoplamento de doxorubicina com tetrapéptido de succinilo imobilizado. A molécula é então libertada a partir da resina utilizando condições moderadamente ácidas para formar succ-oligopéptido 38-doxorubicina livre. Esta metodologia está representada no esquema da fig. 9. Uma outra versão das sínteses em fase sólida seria aquela em que o éster do tetrapéptido de succinilo estivesse imobilizado. O terminal C ficaria então desprotegido, a que se seguiria a etapa de acoplamento com a doxorubicina e finalmente a libertação da resina conforme representado no esquema da fig. 9. A forma ácida da molécula de pró-fármaco é convertida finalmente no seu sal de sódio, tal como descrito antes.

Compostos específicos

Os compostos da presente invenção incluem os pró-fármacos Suc- β Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc- β Ala-Leu-Ala-Leu-Dnr e Glutaril- β Ala-Leu-Ala-Leu-Dox.

Adicionalmente, reivindicam-se os compostos intermédios que se seguem, importantes para o processo de preparação dos pró-fármacos da presente invenção.

Produtos intermédios:

β Ala-Leu-Ala-Leu-Dox

Tritil- β Ala-Leu-Ala-Leu-Dox

Difenilmetil- β Ala-Leu-Ala-Leu-Dox

Benziloxicarbonil- β Ala-Leu-Ala-Leu-Dox
Fmoc- β Ala-Leu-Ala-Leu-OBn
 β Ala-Leu-Ala-Leu-OBn
Metil-succinil- β Ala-Leu-Ala-Leu-OBn
Metil-succinil- β Ala-Leu-Ala-Leu
Fmoc- β Ala-Leu-Ala-Leu
Fmoc-Tio-Tir-Gli-Leu
Fmoc- β Ala-Leu-Ala-Leu-Dnr
Fmoc-Tio-Tir-Gli-Leu-Dnr
Suc-Tio-Tir-Gli-Leu-Dnr
Gl- β Ala-Leu-Ala-Leu-Dox
Lactato de β Ala-Leu-Ala-Leu-Dox
Alil-succinil- β Ala-Leu-Ala-Leu-Dox
Suc- β Ala-Leu-Ala-Leu
Ésteres metílicos de Suc- β Ala-Leu-Ala-Leu
Fmoc- β Ala-Leu-Ala-Leu-Dox
Metil-succinil- β Ala-Leu-Ala-Leu-Dox e
Hemi-succinato de alilo.

EXEMPLOS

Exemplo 1:

Rastreo de pró-fármacos potenciais com trouase e sangue humano

Com base na análise por CLAR dos produtos de digestão, a activação da toxina de peptidilo com toxina livre ocorre por via de uma série de reacções de clivagem catalisadas por enzimas. Por exemplo, a toxina de tetrapeptidilo do N-cap, succinil- β alanil-leucil-alanil-leucil-doxorubicina converte-se em leucil-doxorubicina em extractos de células de carcinoma ou meio condicionado de células de carcinoma, em duas etapas catalisadas pelo menos por meio de duas

enzimas. A clivagem inicial de endopeptidase ocorre entre os aminoácidos AA³ (P1) e AA² (P1') para se obter alanil-leucil-doxorubicina. Em seguida, a exopeptidase elimina a alanina para se obter leucil-doxorubicina que é conhecida por ser absorvida nas células em que se liberta a toxina activa, a doxorubicina.

Um bom candidato para um pró-fármaco da toxina de N-cap-peptidilo, com um índice terapêutico mais elevado, deve ser activado por células de cancro mas deve ser relativamente estável em sangue humano completo. Utilizaram-se três preparações diferentes de carcinoma para rastrear várias toxinas de N-cap-peptidilo. Estas três preparações foram as seguintes:

- (a) Homogeneizado de células MCF 7/6 (carcinoma da mama)
- (b) Meio condicionado de MCF 7/6 (carcinoma da mama) e
- (c) Junção das fracções de permutadores de aniões de extractos de células HeLa (carcinoma cervical).

Os compostos que podem ser hidrolisados com um único conjugado de aminoácido e toxina foram ainda analisados quanto à estabilidade em sangue humano completo.

As amostras de ensaio foram incubadas a 37 °C durante 2 h com as três preparações diferentes de enzima de carcinoma e com sangue completo, foram extraídas com acetonitrilo e foram analisadas por CLAR utilizando detecção de fluorescência. Com poucas excepções, os resultados para a clivagem de enzimas de carcinoma foram os mesmos para uma fracção parcialmente purificada de células HeLa, homogenizado de células MFC 7/6 ou meio condicionado de MCF 7/6.

Preparação de soluções de enzimas de células de carcinoma:

(a) Homogeneizado de células MCF 7/6:

As células MCF 7/6 cresceram até à confluência num meio isento de soro contendo DMEM: F12 (1:1), 50 mg/L de albumina de soro bovino, ITS-X, e concentrado de lípidos. Colheram-se 100 mL de células por centrifugação a 4 °C (10.000xg), durante 20 min e decantou-se o sobrenadante. Fez-se uma nova suspensão dos péletes em 2 mL de uma solução salina tamponada com fosfato (*Gibco*) e centrifugou-se a 18.000 x g durante 10 min. Depois da decantação do sobrenadante, homogeneizaram-se as células (aproximadamente 300 µl, húmidas) por moagem em 1,7 mL de tampão HEPES 10 mM a pH 7,2 (sal de sódio). Centrifugou-se o homogeneizado a 18.000 x g a 4 °C durante 5 min e prepararam-se alíquotas do sobrenadante e armazenaram-se a ≤ -20 °C para utilização subsequente no rastreio do composto.

(b) Meio condicionado de MCF 7/6:

As células MCF 7/6 cresceram até à confluência em meio DMEM/F 12 (1:1), contendo soro bovino fetal a 10 %, L-glutamina a 0,05 % (p/v), 250 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Lavaram-se então as células duas vezes com solução salina tamponada com fosfato e incubaram-se 24 h com CO₂ a 5 %, a 37 °C, em DMEM/F 12 (1:1), ASB a 0,02 %, ITS- X. Depois decantou-se o meio condicionado e, utilizando um aparelho de agitação de células com uma membrana de ultrafiltração YM10 (corte a 10.000 de PM) (*Millipore*), permutou-se uma vez com tampão de HEPES 10 mM, a pH 7,2 e concentrou-se vinte vezes. Esta solução foi armazenada em alíquotas a -20 °C para serem utilizadas no rastreio do composto.

(c) Conjunto de fracções da permuta de aniões de células HeLa:

Homogeneizou-se trinta biliões de células HeLa produzidas comercialmente (carcinoma cervical humano, *Computer Cell Culture Center*, Seneffe, Bélgica) com um equipamento de ultra-sons e com um homogeneizador Dounce em 108 mL de uma solução aquosa de lise. A solução de lise continha 0,02 % p/v de Triton X-100, 0,04 % p/v de azida de sódio e um cocktail de inibidores de protease (2 comprimidos/50 mL de Complete™, comprimidos isentos de EDTA, *Roche Molecular Biochemicals*). Centrifugou-se o homogeneizado de células 30 minutos a 4 °C a 5000xg e homogeneizaram-se os péletes em 108 ml de uma segunda solução de lise utilizando um homogeneizador Dounce e centrifugou-se como antes. Os sobrenadantes foram combinados e centrifugados durante 90 min a 60.000xg a 4 °C.

Cromatografia

Diluiu-se 2 vezes uma porção de sobrenadante da ultracentrifugação com tampão de trietanolamina-HCl 20 mM a pH 7,2 contendo 0,01 % (p/v) de Triton X-100 e 0,02 % (p/v) de azida de sódio (tampão de equilíbrio). Carregou-se trinta mL da solução resultante, correspondendo a aproximadamente 180 mg de proteína, a 4 °C numa coluna de cromatografia de permuta de aniões a baixa pressão de 2,6 x 9,4 cm Source™ 15Q (*Amersham Pharmacia Biotech*) (1 ml/minuto). Lavou-se então a coluna com 250 ml de tampão de equilíbrio a uma velocidade de fluxo de 1 mL/minuto. Eluíram-se as proteínas num gradiente de concentração linear de NaCl (tampão de equilíbrio 0-0,5 M, o volume total do gradiente foi de 1000 ml) a uma velocidade de

fluxo de 3 ml/minuto. Recolheram-se fracções aos dois minutos e utilizaram-se para a determinação da actividade das enzimas utilizando como substrato β -alanil-leucil-alanil-leucil-doxorubicina. Quantificou-se a sua transformação em L-alanil-L-leucil-doxorubicina por cromatografia líquida de alta resolução de fase inversa utilizando a detecção de fluorescência da parte de antraciclina. As fracções contendo os níveis mais elevados de actividade foram reunidas (fracções #43-46; NaCl ~0,13 M), complementadas com inibidores de protease (CompleteTM, comprimidos isentos de EDTA, Roche Molecular Biochemicals) e armazenaram-se como alíquotas a -80 °C.

Sangue humano completo

Recolheu-se sangue humano utilizando tubos de recolha de sangue total com citrato tamponado com ácido, disponível no mercado.

Rastreo de compostos

Incubaram-se os compostos de ensaio durante 2 h a 37 °C a uma concentração de 12,5 μ g/mL com as soluções de enzima que se seguem:

- (a) Homogeneizado de células MCF 7/6 diluído a 1:27 em HEPES 10 mM , CoCl₂ 1 mM, a pH 7,2
- b) meio condicionado de MFC 7/6
- c) conjunto 1 de fracções de permuta de aniões de células Hela diluídas a 1:57 em HEPES 10 mM, CoCl₂ 1 mM, a pH 7,2.
- d) Sangue total humano contendo CoCl₂ 1 mM

No seguimento da incubação, adicionou-se três volumes de acetonitrilo para parar a reacção e eliminar a proteína da mistura. Centrifugou-se a amostra a 18.000g durante 5 minutos e misturou-se 100 µL de sobrenadante com 300 µL de água antes da análise por CLAR.

Para a análise por CLAR injectou-se 50 µL da amostra numa coluna de cromatografia TSK Super-ODS de 2µ e 4,6 x 50 mm a 40 °C e eluíu-se, durante 3 minutos com um gradiente linear de tampão de acetonitrilo de 26 % a 68 % em acetato de amónio aquoso 20 mM, a pH 4,5 a 2 mL/min. Fez-se a detecção por fluorescência utilizando um comprimento de onda de excitação de 235 nm e um comprimento de onda de emissão de 560 nm.

Os oligopéptidos que foram clivados pela trouase, nas condições indicadas, foram estáveis no sangue humano como se mostras nas figs. 10A-10C.

Exemplo 2:

A especificidade para a trouase é conferida por um aminoácido codificado não geneticamente na posição P2.

A especificidade é conferida pela incorporação de um aminoácido, na posição P2, não codificado sob o ponto de vista genético, em vez de codificado sob o ponto de vista genético. Especificamente, incubou-se (succinil-N-cap)-(Oligopéptido 38)-daunorubicina, que contém o aminoácido β-alanina, na posição P2, não codificado geneticamente, durante 2 h a 37 °C com as preparações de cada enzima preparadas como descrito no exemplo 1. Estimou-se então a extensão da clivagem por análise por CLAR das misturas resultantes. Estes resultados foram comparados com os

resultados para a mesma incubação realizada com o mesmo composto excepto para uma substituição do aminoácido L alanina, codificado geneticamente, na posição P2. A extensão (taxa) de clivagem por meio do homogeneizado de células foi 1,3 vezes maior para o composto de L-alanina na posição P2 versus o composto de β -alanina na P2. A extensão da clivagem pelo meio condicionado foi mais ou menos a mesma para os dois compostos. Contudo, com a preparação de trouase parcialmente purificada, a extensão da clivagem do composto de L-alanina de P2 foi apenas 0,6 vezes a do composto β -alanina da P2. Estes resultados sugerem que a presença de L-alanina em P2 pode ter providenciado um segundo sítio de clivagem para as misturas mais impuras de enzimas; reduzindo assim a probabilidade de que a libertação, *in vivo*, do fármaco activo estará localizada no tecido do tumor.

Exemplo 3:

O pró-fármaco é eficaz e bem tolerado em modelos de xenoenxerto de tumor

O agente terapêutico (Succinil-N-Cap)-(Oligopéptido 38)-Dox provou ser eficaz a inibir o crescimento de tumores humanos em vários modelos de xenoenxertos de tumores em ratos pelados, incluindo o tumor mamário de MCF-7/6 dependente de estrogénios e os carcinomas coloreticais CXF280/10 e LS-174T resistentes a adriamicina. Por exemplo, quando se trataram grupos de 10 murganhos, a que se tinha implantado, subcutaneamente, tumores LS 174T, com doses intravenosas, dadas cinco vezes por semana, do agente terapêutico (succinil-N-Cap)-(Oligopéptido 38)-Dox, observou-se uma significativa extensão replicável, dependente da dose, no dia médio de sobrevivência (DMS), assim como na

diminuição da dimensão do tumor (volume do tumor) comparada com controlos tratados com veículo (grupo 1) em doses de 57 (grupo 2), 64 (grupo 3) e 71 (grupo 4) mg/kg de agente terapêutico (Succinil-N-Cap)-(Oligopéptide 38)-Dox, com a dose mais elevada a ser equivalente a 40 mg/kg de doxorubicina (ver fig. 11). O fármaco era seguro e bem tolerado para níveis repetidos da dose e para frequências de dosagem que demonstraram eficácia anti-tumor. Observou-se alguma perda de peso dependente da dose. Em estudos de apoio, não se observou toxicidade do rim e mielo-supressão para doses até 106,8 mg/kg de agente terapêutico (succinil-N-cap)-(oligopéptide 38)-Dox.

Exemplo 4

O pró-fármaco é mais seguro e mais eficaz do que aqueles com que se compararam

Podem-se administrar doses significativamente mais elevadas do agente terapêutico (succinil-N-cap)-(Oligopéptido 38)-Dox, comparadas com doxorubicina, atingindo-se eficácia sem toxicidade significativa no modelo de xeno-enxerto de carcinoma coloretal humano LS-174T. O agente terapêutico (succinil-N-Cap)-(oligopéptide 38)-Dox, em doses eficazes de 49 (grupo 3), 57 (grupo 4) e 64 mg/kg (grupo 5) mostrou uma eficácia superior comparado com a doxorubicina a 3,0 mg/kg (grupo 2) e solução salina (grupo 1), na inibição do crescimento rápido do tumor LS-174T resistente a adriamicina (fig. 12). Observou-se a dose que limita a toxicidade (cardiotoxicidade e mielo-supressão) com a administração repetida de doxorubicina a 3 mg/kg ou mais (grupo 2). Assim, os requerentes demonstraram que se pode administrar doses mais elevadas do agente terapêutico de (succinil-N-Cap)-(Oligopéptide 38)-Dox do

que as de doxorubicina, favorecendo a inibição do tumor além da toxicidade sistêmica.

Exemplo 5

Agregação de β AlaLeuAlaLeu-Dox

Fármacos de antraciclina, pouco solúveis, têm demonstrado que formam agregados quando preparados em tampões aquosos. Menozzi, et al., Self-association of doxorubicin and related compounds in aqueous solutions, *J. Pharmaceut. Sci.*, 73 (6): 766-770 (1984). Confalonieri, C. et al., The use of new laser particle sizer and shape analyser to detect and evaluate gelatinous microparticles suspended in reconstituted anthracycline infusion solutions, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 9 (1): 1-8 (1991). Uma estimativa da dimensão do agregado de β AlaLeuAlaLeu-Dox numa solução aquosa 17,4 μ mole/ml tentando filtrar estas soluções através de unidades de filtração da Amicon Centricon™. Dissolveu-se doxorubicina (17,4 μ mole/ml) e β AlaLeuAlaLeu-Dox (17,4 μ mole/ml) em água destilada e colocou-se em filtros da Centricon com cortes nos pesos moleculares (COPM) de 3.000, 10.000, 30.000 e 50.000. Centrifugou-se cada unidade de filtro durante 2 h a uma força de 1500 g. Quantificou-se a quantidade de fármaco retida e que passou através do filtro a λ 475 nm e converteu-se numa certa percentagem. O quadro 1 a seguir mostra que 81 % da doxorubicina que passou através do filtro de COPM de 3.000 enquanto apenas 5 % do conjugado, β AlaLeuAlaLeu-Dox que passou através do filtro de COPM de 3.000. Os dados também mostram que a unidade de COPM de 50.000 retém mais de 40 % de β AlaLeuAlaLeu-Dox. Estes dados demonstram que uma percentagem significativa dos agregados de β AlaLeuAlaLeu-Dox era maior do que 50 kD (> 50

moléculas/agregado). Isto demonstra que, na dose especificada do exemplo 6, a seguir, o conjugado estava num estado de agregado. Por isso estes dados suportam a hipótese de os agregados de o agente terapêutico de Oligopéptido 38-Doxorubicina contribuírem para a toxicidade aguda verificada nestes agregados moleculares carregados positivamente.

Quadro 1

	COPM 3000		COPM 10000		COPM 30000		COPM 50000	
	Filt.	Ret.	Filt.	Ret.	Filt.	Ret.	Filt.	Ret.
Dox	81 %	10 %	82 %	2 %	n.d.	n.d.	93 %	0,5 %
Conj.	4,9 %	89 %	10 %	76 %	36 %	64 %	53 %	43 %
<i>Dox:</i>	<i>Doxorubicina; Conj:N-β-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-Doxorubicina;</i>							

Exemplo 6

Injeção intravenosa de βAlaLeuAlaLeu-Dox em murganhos

Sabe-se que a toxicidade aguda ocorre, provavelmente através da interacção entre polímeros carregados positivamente, tal como protaminas, polilisina ou os seus agregados e a superfície luminal dos vasos sanguíneos. De Lucia III, A., et al., Efficacy and toxicity of differently charged polycationic protamine-like peptides for heparin anticoagulation reversal, *J. Vasc. Surg.* 18: 49-60 (1993). Ekrami, H. M. e Shen, W. C., Carbamylation decreases the cytotoxicity but not the drug-carrier properties of polylysines, *J. Drug Targ.*, 2: 469-475 (1995). Também se demonstrou ainda que a heparina reduz os efeitos tóxicos do sulfato de protamina no miocárdio de coelhos. Wakefield, T. W., et al., Heparin-mediated reductions of the toxic effects of protamine sulfate on rabbit myocardium, *J. Vasc. Surg.*, 16: 47-53 (1992). Para testar a hipótese de que a

toxicidade aguda verificada aqui foi devida a agregados de pró-fármaco carregados positivamente, deu-se β AlaLeuAlaLeu-Dox (174 μ mole/ml) a murganhos no seguimento de um pré-tratamento de 1 h quer com 4.000 U.I. de heparina iv e comparou-se com o controlo (iv). O quadro 2 mostra que, no seguimento da heparina, uma dose anterior, agudamente letal de β AlaLeuAlaLeu-Dox foi significativamente menos tóxica.

Estes dados suportam a hipótese de que a toxicidade aguda é devida a um agregado carregado positivamente que causa um efeito similar ao verificado para protaminas ou polilisina. Os pró-fármacos da presente invenção, carregados negativamente e neutralmente, ultrapassam este efeito colateral indesejável.

Quadro 2

VIA DE pré-tratamento	NÍVEL DA DOSE DE HEPARINA (U.I.)	Tempo de sobrevivência (dias) [Proporção]	Toxicidade aguda (proporção)
Controlo (iv)	0	0	5/5
i.p.	4000	>9 [5/8]	3/8 0/3
	8000	>11 [3/3]	
i.v.	4000	>11 [2/3]	1/3

De acordo com a hipótese mencionada antes, o bloqueio do grupo amino do terminal de β AlaLeuAlaLeu-Dox com uma parte carregada negativamente resultou no desaparecimento completo do efeito de toxicidade aguda em níveis de dose tão altos quanto 250 mg de doxorubicina, HCl eq./Kg.

Como evidência disto, numa experiência relacionada, todos os animais sobreviveram até 8 dias quando três em cinco murganhos por grupo foram tratados com um bólus iv de 250 mg/kg (Dox-HCl eq.) de succinil- β AlaLeuAlaLeu-Dox e glutaril- β AlaLeuAlaLeu-Dox.

Processos analíticos para os exemplos remanescentes

As sequências de péptidos, sintetizadas utilizando quer abordagens em fase sólida ou em solução, foram utilizadas sem mais purificação se a CLAR analítica (processos A, B & D) mostrasse que o produto impuro era mais do que 80 % puro. Caso contrário, o material foi purificado utilizando o processo C da CLAR preparativa.

Processo A de CLAR

As análises analíticas por CLAR foram realizadas numa Waters 2690 utilizando uma coluna C-18 (4 μ m, 3,9 x 150mm DI, velocidade de fluxo 1 mL/min) eluindo-se com um gradiente de dissolvente A (TFA/H₂O a 0,1 %) e dissolvente B (TFA/ACN a 0,1 %) e os dados foram tratados a λ 254 nm utilizando o sistema Waters Millennium. O gradiente analítico de CLAR começou com 90 % do dissolvente A e terminou com 100 % do dissolvente B ao longo de um período de 14 minutos (linear). A pureza dos compostos para este processo e para os que se seguem foi avaliada como a área percentual relativa sob a curva dos picos.

Processo B de CLAR

As análises analíticas por CLAR foram realizadas em Waters 2690 utilizando uma coluna C-8 (3,5 μ m, 4,6 x 150mm DI, velocidade de fluxo 1 mL/min) eluindo-se com um gradiente de dissolvente A (formiato de amónio 20 mM a 80 % e acetonitrilo a 20 %) e dissolvente B (formiato de amónio 20 mM a 20 % e acetonitrilo a 80 %) e os dados foram tratados a λ 254 nm utilizando o sistema Waters Millennium. O gradiente analítico de CLAR começou com 100 % do

dissolvente A até 100 % do dissolvente B ao longo de um período de 30 minutos (linear).

Processo C de CLAR

A purificação preparativa de produtos impuros conseguiu-se utilizando o sistema Waters Delta Prep 4000 utilizando uma coluna C-4 (15 μ m, 40 x 100mm DI, velocidade de fluxo 30 mL/min) eluindo-se com um gradiente de dissolvente A (H₂O) e dissolvente B (MeOH). O gradiente de CLAR preparatória começou com 80 % do dissolvente A e continuou até 100 % do dissolvente B ao longo de um período de 70 minutos (linear). Os dados foram tratados a λ 254 nm utilizando o sistema Waters Millennium.

Processo D de CLAR

A CLAR analítica foi realizada num equipamento da Hewlett Packard: Coluna: TSK superODS (TosoHaas); dissolvente A (TFA a 0,1 % em água) dissolvente B (TFA a 0,1 % em acetonitrilo); gradiente: 30 a 36 % de B em 2 minutos, 36 a 41 % de B em 10 minutos, 41 a 90 % de B em 3 minutos, 5 minutos a 90 % de B, comprimento de onda de detecção λ 254 nm.

RMN e EM

As determinações adicionais das estruturas foram feitas por técnicas de RMN e EM e os resultaram suportaram os compostos reivindicados.

Processo de CCF

A análise por CCF foi realizada em gel de sílica, placas de 60F-254nm-0,25mm (Merck) com DCM/MeOH/H₂O/ácido fórmico a 88 %, 85/15/1/2 para a eluição.

Ensaio com ninidrina

Introduziu-se alguns miligramas de produto num tubo de ensaio e adicionou-se duas gotas da solução A (50 mg/ml de ninidrina em etanol), duas gotas da solução B (4 mg/ml de fenol em etanol), depois duas gotas da solução C (2 ml, KSCN aquoso 0,01 M em 100 ml de piridina). Deixou-se a mistura num banho de água a ferver durante cinco minutos. Na presença de uma amina livre, a solução tornou-se de cor púrpura.

Exemplos específicos de oligopéptidos sintéticos

Fontes de reagentes disponíveis no mercado

A doxorubicina e a daunorubicina foram fornecidas por Meiji (Japão), Pd(PPh₃)₄ pela Stremchem (Newburyport, MA), PEG pela Shearwater (Huntsville, Alabama), dissolventes, HATU pela Aldrich (Milwaukee, WI); todas as resinas e aminoácidos foram fornecidos por uma das empresas ABI (Foster City, CA), Novabiochem (San Diego, CA), Advanced ChemTech (Louisville, KY), Peptide International (Louisville, KY), SynPep (Dublin, CA).

Exemplo 7

Forma de Fmoc do éster benzílico do oligopéptido 38 [Fmoc-β-Ala-Leu-Ala-Leu-OBn]

Adicionou-se a forma de Fmoc do oligopéptido 38 (24,34 g, 0,04 mole) a um frasco de fundo redondo com DMF (350 mL) e um agitador magnético. Depois de o tetrapéptido estar dissolvido, adicionou-se à solução brometo de benzilo (4,76 mL, 0,04 mole), seguido de carbonato de cézio (13,04 g, 0,04 mole), com agitação. Agitou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 1,5 horas. Depois, verteu-se lentamente a mistura reaccional, lentamente, num frasco com 450 mL de água gelada. Recolheu-se, por filtração por sucção, uma grande quantidade do sólido branco precipitado. Lavou-se o produto com água (2x200 mL) e colocou-se num exsiccador sob vácuo. Identificou-se o produto (24,2 g, 87 %) por CLAR (pureza: 95 %). EM *m/z* calcd. para C₄₀H₅₀N₄O₇ 698,4, encontrado 699,5.

Exemplo 8

Éster benzílico de oligopéptido 38 [β -Ala-Leu-Ala-Leu-OBn]

Num frasco de fundo redondo (25 mL), dissolveu-se a forma de Fmoc do éster benzílico de oligopéptido 38 (0,7 g, 1,0 mmole) em 5 mL de DMF anidro. Adicionou-se piperidina (1,2 mL, 12,1 mmole) à solução e agitou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 25 minutos. Parou-se a reacção com água (6 mL) e extraíu-se com acetato de etilo (2x10 mL). As camadas orgânicas combinadas foram depois lavadas com água (2x5 mL), salmoura (5 mL) e secou-se sobre sulfato de sódio. Obteve-se um sólido branco (0,8 g) depois da eliminação do dissolvente. A pureza do produto foi apenas de 67 %. EM *m/z* calcd. para C₂₅H₄₀N₄O₅ 476,3 encontrado 477,2.

Exemplo 9

Forma de succinil-N-cap metílico do éster benzílico do oligopéptido 38 [mono-metil-succinil- β -Ala-Leu-Ala-Leu-OBn]

Num frasco de fundo redondo (250 mL), dissolveu-se hemisuccinato de metilo (3,19 g, 24,2 mmole) em DMF anidro (50 mL). Adicionou-se à solução DIEA (4,22 mL, 24,2 mmole) seguida de HBTU (9,17 g, 24,2 mmole). Agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante 45 minutos. Adicionou-se a esta mistura uma solução de éster benzílico do oligopéptido 38 (impuro, contendo 10,14 g, 21,3 mmole) em DMF anidro (150 mL). Agitou-se a mistura, continuamente, à temperatura ambiente durante 2,5 horas. Depois, verteu-se lentamente a mistura reaccional num frasco com 200 mL de água gelada, enquanto se agitava. Extraíu-se uma grande quantidade do sólido branco precipitado por meio de acetato de etilo (3x200 mL). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água (2x200 mL), salmoura (200 mL) e secou-se sobre sulfato de sódio. Obteve-se um sólido branco depois da eliminação do dissolvente. A recristalização deste produto impuro em acetato de etilo originou 7,53 g de produto (60 %) com uma pureza de 80 %. EM m/z calcd. para $C_{30}H_{46}N_4O_8$ 591,4 encontrado 590,33.

Exemplo 10

Forma de succinil-N-cap metílico do oligopéptido 38 (Metil-succinil- β -Ala-Leu-Ala-Leu]

Adicionou-se a forma de metil-succinil-N-cap do éster benzílico do oligopéptido 38 (1,0 g, 86 % de pureza; 1,46 mmole) a um frasco de Erlenmeyer com 100 mL de metanol. A solução ficou turva depois de ser agitada durante alguns

minutos. Adicionou-se 50 mL de metanol, mas a solução não ficou logo clara. Transferiu-se a solução para um reactor de hidrogenação. Adicionou-se, a este reactor, Pd-C (90 mg, humidade de 10 %, 50 % de água; 0,042 mmole). Depois da hidrogenação, durante 2 horas, à temperatura ambiente, parou-se a reacção e filtrou-se o catalisador. Obteve-se um sólido branco (0,77 g, 78 %) depois da eliminação dos dissolventes. EM m/z calcd. para $C_{23}H_{40}N_4O_8$ 501,2 encontrado 500,3.

Exemplo 11

Síntese do hemi-succinato de N-cap-alilo

Preparou-se esta molécula de acordo com o processo de Casimir, J. R., et. al. Tet. Lett. 36 (19): 3409, (1995). Fez-se o refluxo de 10,07 g (0,1 mole) de anidrido succínico e 5,808 g (0,1 mole) de álcool de alilo em 100 mL de tolueno durante 6 horas. Concentra-se a mistura reaccional a pressão reduzida. 15,5 g; 98 %. O material resultante estava suficientemente puro para ser utilizado nas reacções subsequentes. A pureza e a identidade do produto semi-sólido foram confirmadas por RMN do 1H e RMN do ^{13}C e por CL/EM.

Exemplo 12

Síntese de alil-succinil-oligopéptido 38-Dox.

Num frasco de fundo redondo (50 ml) dissolveu-se a forma de N-cap-alil-hemisuccinilo do oligopéptido 38 (1 g, 1,9 mmole) e doxorubicina (1,1 g, 1,9 mmole) em DMF anidro (50 ml). Depois de se agitar a mistura durante 5 minutos, adicionou-se DIEA (0,66 ml, 3,8 mmole) seguida de HATU

(0,76g, 1,9 mmole) à mistura reaccional, à temperatura ambiente, durante 2 horas. Eliminou-se DMF por meio de um evaporador rotativo e recolheu-se o resíduo em 4,0 ml de DCM : MeOH a 1:1. A esta solução, adicionou-se lentamente 100 ml de éter, enquanto se agitava. Formou-se um precipitado vermelho e recolheu-se por filtração por sucção. Lavou-se a solução com éter (2x2 ml) e secou-se num exsiccador de vácuo para se obter o agente terapêutico alil-succinil-oligopéptido 38-Dox com uma pureza de 90 % confirmada por CLAR pelo processo B.

Exemplo 13

Preparação de SSLD a partir de alil-succinil- β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorubicina

A uma solução agitada de 0,1 g (0,095 mmole) de alil-succinil- β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorubicina em 2 mL de THF, em atmosfera de azoto, adicionou-se 0,05 g (0,095 mmole) de tetraquis(trifenilfosfina)paládio sob a forma de um sólido. Passados 10 minutos filtra-se o precipitado formado durante a reacção, lava-se com THF. Peso anidro: 0,1g. Os sólidos foram identificados por CLAR, RMN do ^1H , CL/EM como sendo succinil- β -Ala-Leu-Ala-Leu-Dox.

Exemplo 14

Síntese da forma de Fmoc do oligopéptido 38 [Fmoc- β -Ala-Leu-Ala-Leu]

Sintetizou-se a forma de Fmoc do oligopéptido 38 utilizando a abordagem de fase sólida com a química-padrão de Fmoc. Uma síntese típica utilizou resina alcoxilada de Wang (carga de 0,60 mmole/g). Utilizaram-se aminoácidos

protegidos por Fmoc para a síntese de péptidos em fase sólida. Para uma escala de péptido de 1 mM na resina, pré-activou-se 3 equivalentes de aminoácidos com HBTU como agente de activação, durante 5 minutos, antes de se adicionar à resina, em conjunto com 2 equivalentes de DIEA. Realizou-se a reacção de acoplamento durante 2 h e depois lavou-se com DMF (25 mL x 3) e DCM (25 mL x 3). Repetiu-se a reacção de acoplamento utilizando 2 equivalentes de aminoácidos utilizando condições similares. Monitorizou-se o progresso da reacção utilizando o ensaio de ninidrina e se o teste com a ninidrina indicar uma reacção incompleta, passadas 2 h, então a etapa de acoplamento foi repetida uma terceira vez. A desprotecção foi conseguida utilizando piperidina a 20 % em DMF durante 15-20 minutos. A etapa de acoplamento foi repetida com o aminoácido seguinte até à desejada junção do péptido à resina. A clivagem final do péptido a partir da resina foi realizada por tratamento da resina com uma solução com 95 % de TFA e 5 % de água. Depois de se agitar a mistura reaccional durante 2 h à ta, filtrou-se a resina a pressão reduzida e lavou-se duas vezes com TFA. Combinaram-se os filtrados e o péptido precipitou por adição de 400 mL de éter frio. O péptido foi filtrado a pressão reduzida e secou-se para se obter a forma de Fmoc do oligopéptido 38 (94 % de pureza pelo método A de CLAR). Utilizou-se o péptido impuro na etapa seguinte sem mais purificação.

Exemplo 15

Síntese da forma de Fmoc do oligopéptido 98 [Fmoc-Tie-Tir-Gli-Leu]

Sintetizou-se a forma de Fmoc do oligopéptido 98 utilizando a abordagem em fase sólida com a química-padrão

de Fmoc e a resina alcoxilada de Wang (carga de 0,60 mmole/gm). Utilizaram-se aminoácidos protegidos por Fmoc e Fmoc-Tie-OH para a síntese de péptidos em fase sólida. Para uma escala de péptido 1 mM na resina, pré-activou-se 3 equivalentes de aminoácidos com HBTU como agente de activação, durante 5 minutos, antes de se adicionar à resina, em conjunto com 2 equivalentes de DIEA. Realizou-se a reacção de acoplamento durante 2 h e depois lavou-se com DMF (25 mL x 3) e DCM (25 mL x 3). Repetiu-se a reacção de acoplamento utilizando 2 equivalentes de aminoácidos utilizando condições similares. Monitorizou-se o progresso da reacção utilizando o ensaio de ninidrina e se o teste com a ninidrina indicar uma reacção incompleta, passadas 2 h, então a etapa de acoplamento foi repetida uma terceira vez. A desprotecção foi conseguida utilizando piperidina a 20 % em DMF durante 15-20 minutos. A etapa de acoplamento foi repetida com o aminoácido seguinte até à junção do péptido desejado à resina. A clivagem final do péptido, a partir da resina, foi realizada por tratamento da resina com uma solução com 95 % de TFA e 5 % de água. Depois de se agitar a mistura reaccional durante 2 h à ta, filtrou-se a resina a pressão reduzida e lavou-se duas vezes com TFA. Combinaram-se os filtrados e o péptido precipitou por adição de 400 mL de éter frio. O péptido foi filtrado a pressão reduzida e secou-se para se obter a forma de Fmoc do oligopéptido 98 (88% de pureza pelo método A de CLAR). Utilizou-se a forma de Fmoc do oligopéptido 98 na etapa seguinte sem mais purificação.

Exemplo 16

Síntese do agente terapêutico da forma de Fmoc do oligopéptido 98-Dnr [Fmoc- β -Ala-Leu-Ala-Leu-Dnr]

Dissolveu-se daunorubicina.HCl (185 mg, 0,329 mmole) e a forma de Fmoc do oligopéptido 38 (200 mg, 0,329mmole) à temperatura ambiente em DMF anidro (15 mL). A esta solução, agitada rapidamente, adicionou-se DIEA (0,115 mL, 0,658 mmole), numa só porção e agitou-se a mistura reaccional durante 15 minutos à temperatura ambiente. Arrefeceu-se a mistura reaccional para 0 °C utilizando um banho de gelo e adicionou-se, lentamente, 138 mg (0,362 mmole) de HATU ao longo de 10 minutos. Agitou-se a mistura reaccional durante mais 90 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se água arrefecida com gelo (200 mL) à mistura reaccional que resultou na formação de um precipitado vermelho. Recolheu-se o precipitado numa placa vítrea, lavou-se com 3 x 50 ml de água e 3 x 50 ml de éter de dietilo e secou-se a pressão reduzida para se obter o agente terapêutico da forma de Fmoc do oligopéptido 98-Dnr (rendimento de 94 %, pureza de 95 % verificada pelo processo A de CLAR).

Exemplo 17

Síntese do agente terapêutico da forma de Fmoc do oligopéptido 98-Daunorubicina (Fmoc-Tie-Tir-Gli-Leu-Dnr)

Dissolveu-se daunorubicina.HCl (90 mg, 0,16 mmole) e a forma de Fmoc do oligopéptido 98 (120 mg, 0,16 mmole), à temperatura ambiente, em DMF anidro (15 mL). A esta solução, agitada rapidamente, adicionou-se DIEA (0,56 mL, 0,16 mmole), numa só porção e agitou-se a mistura reaccional durante 15 minutos à temperatura ambiente. Arrefeceu-se a mistura reaccional para 0 °C utilizando um banho de gelo e adicionou-se, lentamente, 61 mg (0,16 mmole) de HATU ao longo de 10 minutos. Agitou-se a mistura reaccional durante mais 90 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se água arrefecida com gelo (150 mL) à mistura

reaccional o que resultou na formação de um precipitado vermelho. Recolheu-se o precipitado numa placa vítrea, lavou-se com 3 x 50 mL de água e 3 x 50 ml de éter de dietilo a pressão reduzida para se obter o agente terapêutico da forma de Fmoc do oligopéptido 98-Daunorubicina (rendimento de 94 %, 91 % de pureza verificada pelo método A de CLAR). Utilizou-se este produto na etapa seguinte sem mais purificação.

Exemplo 18

Preparação de Fmoc- β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorubicina

Dissolveu-se 3,0g (5,17 mmole) de cloridrato de doxorubicina e 3,15 g (5,17 mmole) de Fmoc- β Ala-Leu-Ala-Leu, à temperatura ambiente, em 230 mL de DMF anidra, em atmosfera de azoto. A esta solução agitada com rapidez, adicionou-se 1,798 mL (10,34 mmole) de DIEA, numa só porção e agitou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 15 min. Arrefeceu-se a mistura reaccional para ~ -2 ° C num banho de gelo/salmoura e adicionou-se, gota a gota, 2,56 g (6,73 mmole) de HATU em 58 mL de DMF, ao longo de 12 minutos, com uma agitação rápida. Agitou-se a mistura reaccional mais 30 minutos a -2 °C, depois adicionou-se 0,285 mL (1,64 mmole) de DIEA, numa só porção. Adicionou-se 580 mL de água a 0 °C resultando imediatamente na formação de um precipitado vermelho flocoso. O precipitado foi recolhido num prato vítrea, lavou-se com 3 x 50 de água e 3 x 50 mL de éter de dietilo em água e secou-se ao ar, durante 16 horas para se obter 5,21 g de Fmoc- β -Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, 89,7 % de rendimento físico, 90,23 % de pureza confirmada pelo método B de CLAR.

Exemplo 19

Preparação de succinil- β -Ala-Leu-Ala-Leu-Dox a partir de Fmoc- β -Ala-Leu-Ala-Leu-dox

A uma solução de 5,0 g (4,41 mmole) de Fmoc- β -Ala-Leu-Ala-Leu em 230 mL de DMF anidro, em atmosfera de azoto, à temperatura ambiente, adicionou-se 21,8 mL (220 mmole) de piperidina, numa só porção, resultando numa alteração de cor de vermelho para púrpura. Agitou-se a mistura reaccional 5 minutos à temperatura ambiente e depois arrefeceu-se para aproximadamente -20 °C num banho de gelo seco/acetona. Adicionou-se então 22,5 g (0,225 mole) de anidrido succínico, numa só porção, mantendo-se a temperatura da reacção abaixo de -5 °C. Depois de aproximadamente 2 minutos de agitação a -10 °C até -5 °C a cor mudou de cor púrpura para vermelho/laranja. Retirou-se o banho de arrefecimento e agitou-se a mistura reaccional durante 10 minutos. Reduziu-se depois o volume da mistura reaccional para aproximadamente 100 mL por meio de evaporação rotativa e depois diluiu-se com 125 mL de clorofórmio. A esta solução, adicionou-se rapidamente 1400 mL de éter de dietilo resultando na formação de um precipitado vermelho. Isolou-se este precipitado num prato vítreo do meio e triturou-se com 5 X 200 mL de éter de dietilo para se obter o material com uma pureza de 89,13 % confirmada por CLAR. Lavou-se novamente o precipitado com 1 x 20 mL de éter de dietilo e secou-se ao ar para se obter 3,62 g de succinil- β -Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, com um rendimento físico de 81 %, pureza de 88,2 % confirmada por CLAR). Agitou-se este material em 30 mL de água a 0 °C e adicionou-se 33,98 mL (0,95 eq.) de NaHCO₃ 0,1 M aq. e agitou-se a suspensão resultante até todos os sólidos se dissolverem. Liofilizou-se esta solução para se obter 3,77

g de succinil- β -Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, 99 % de rendimento físico (89,06 % de pureza confirmada pelo método B de CLAR).

Exemplo 20

Síntese do agente terapêutico da forma de N-cap-succinilo do oligopéptido 38-Dnr [Suc- β -Ala-Leu-Ata-Leu-Dnr]

Adicionou-se piperidina (0,442 mL, 4,48 mmole) a uma solução do agente terapêutico de uma forma de Fmoc Oligopéptido 38-Dnr (100 mg, 0,089 mmole) em 5 mL de DMF anidra. Agitou-se a mistura reaccional durante 5 minutos à temperatura ambiente e depois arrefeceu-se para -20 °C

utilizando um banho de gelo seco/acetona. Adicionou-se então anidrido succínico (458 mg, 4,54 mmole), numa só porção, à mistura reaccional arrefecida. Agitou-se a mistura reaccional rapidamente a -5 °C durante 5 minutos e depois à temperatura ambiente durante mais 90 minutos. Adicionou-se 250 ml de éter de dietilo anidro à mistura reaccional e isolou-se o precipitado vermelho resultante numa frita vítrea com o meio. Lavou-se o bolo do filtro com duas porções sucessivas de 50 mL de éter de dietilo e secou-se a pressão reduzida para se obter a forma de agente terapêutico de N-cap-succinilo do Oligopéptido 38-Dnr (rendimento de 80 %, pureza de 88 % avaliada pelo método B de CLAR). A CL/EM indicaram um peso molecular de 995 (peso molecular esperado 996).

Exemplo 21

Síntese do agente terapêutico da forma de N-cap-succinilo do oligopéptido 98-daunorubicina [Suc-Tie-Tir-Gli-Leu-Dnr]

A uma solução do agente terapêutico da forma de Fmoc de Oligopéptido 38-Daunorubicina (100 mg, 0,079 mmole) em 5 mL de DMF anidro, adicionou-se piperidina (0,391 mL, 3,95 mmole), numa só porção, resultando numa alteração de cor de vermelho para púrpura. Agitou-se a mistura reaccional durante 5 minutos à temperatura ambiente e depois arrefeceu-se para -20 °C utilizando um banho de gelo

seco/acetona. Adicionou-se então 407 mg (4,02 mmole), de anidrido succínico, numa só porção, à mistura reaccional arrefecida. Agitou-se a mistura reaccional rapidamente a -5 °C durante 5 minutos e depois à temperatura ambiente durante mais 90 minutos. Adicionou-se éter de dietilo anidro, 200 mL, à mistura reaccional o que resultou na formação de um precipitado vermelho. Isolou-se este precipitado em frita de vidro média, lavou-se com 3 x 50 mL de éter de dietilo, a pressão reduzida, para se obter o agente terapêutico da forma de N-cap-succinilo do oligopéptido 98-Dnr (rendimento de 80 %, 81 % de pureza verificada pelo método A de CLAR). A CL/EM indicou um peso molecular de 1141 (peso molecular esperado 1142).

Exemplo 22

Síntese do agente terapêutico do sal de sódio da forma de N-cap-glutarilo de oligopéptido 38-Dox [Gl-β-Ala-Leu-Ala-Leu-Dox]

Adicionou-se piperidina (436 μ L, 4,413 mmole) a uma solução do agente terapêutico da forma de Fmoc do oligopéptido 38-Dox (100 mg, 0,088 mmole) em DMF (4,5 mL). Depois de se agitar durante 5 minutos à temperatura ambiente, arrefeceu-se a mistura reaccional para -5 °C e adicionou-se, rapidamente, anidrido glutárico (624 mg, 5,472 mmole). Retirou-se o banho frio logo que a cor mudou e agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante mais 10 min. Eliminou-se o DMF por evaporação rotativa e dissolveu-se o resíduo em clorofórmio (2,5 mL). Adicionou-se éter de dietilo (14 mL) e filtrou-se o precipitado resultante. Lavou-se o bolo do filtro com éter de dietilo, secou-se ao ar e depois suspendeu-se novamente em água (14 mL). O sal de sódio formou-se por adição, gota a gota, à suspensão, de NaOH 0,025 M (4 mL, 0,10 mmole) até à dissolução completa do sólido. Esta solução foi então liofilizada para se obter do agente terapêutico de sal de sódio da forma de N-cap-glutarilo do oligopéptido 38-Dox com um rendimento de 97 % com uma pureza de 87 % avaliada pelo método D de CLAR.

Exemplo 23

"Processo da ureia" para a preparação do conjugado, isto é, o precursor para o acoplamento da forma de metil-succinil-N-cap de oligopéptido 38 e doxorubicina, pela via enzimática

Em atmosfera de azoto anidro, suspendeu-se/dissolveu-se 26,04 g (52,0 mmole) da forma de metil-succinil-N-cap de oligopéptido 38, 23,26g (40,2mmol) de cloridrato de doxorubicina em 800 mL de ureia anidra - DMF saturada (~30 % p/v) e 19,948 mL, 114. 16 mmole de DIEA. Arrefeceu-se esta

mistura para 0-3 °C durante ~25 minutos. Nesse momento adicionou-se 21,2 g (56,0 mmole) de HATU sob a forma de uma solução em ~100 mL de ureia saturada em DMF, durante 10 minutos (o volume desta solução deve manter-se mínimo). Agitou-se a mistura reaccional durante 10 minutos a -2 até 2 °C e verteu-se em 4000 mL de salmoura arrefecida com gelo, contendo ácido acético a 2 % v/v durante aproximadamente cinco minutos com agitação vigorosa. Filtrou-se o produto num filtro de frita de vidro com uma porosidade média, lavou-se generosamente com água e secou-se a pressão reduzida. 43 g com um rendimento físico: 104,47 %, 93,45 % puro avaliado pelo método B de CLAR.

Exemplo 24

Síntese do agente terapêutico da forma de metil-succinil-N-Cap de oligopéptido 38-Dox [metil-succinil-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox]

Num frasco de fundo redondo (50 mL), dissolveu-se a forma de hemisuccinilo de N-cap-metilo do oligopéptido 38 (0,25 g, 0,5 mmole) e doxorubicina (0,29 g, 0,5 mmole) em DMF anidro (20 mL). Depois de se agitar a mistura durante 5 minutos, adicionou-se à solução DIEA (0,17 mL, 1,0 mmole) seguida de HBTU (0,19 g, 0,5 mmole). Agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante 4 h. Eliminou-se a DMF por meio de um evaporador rotativo e recolheu-se o resíduo em 4,0 mL de cloreto de metileno : metanol a 1:1. A esta solução, adicionou-se lentamente 40 ml de éter, enquanto se agitava. Formou-se um precipitado vermelho e recolheu-se por filtração com sucção. Lavou-se o sólido com éter (2x 10 mL) e secou-se num exsiccador de vácuo. Produziu-se 0,50 g de produto (98 %) com uma pureza de 96 %.

Exemplo 25

Hidrólise do agente terapêutico sob a forma de metil-succinil-N-cap de oligopéptido 38-Dox utilizando a via da enzima ligada de forma cruzada

Colocou-se o agente terapêutico sob a forma de metil-succinil-N-cap do oligopéptido 38-Dox (1,0 g, 0,975 mmole) e 100 mL de DMF num frasco de 500 mL. A suspensão foi agitada vigorosamente com um agitador magnético. Quando o agente terapêutico, sob a forma de metil-succinil-N-cap do oligopéptido 38-Dox, estava completamente dissolvido, adicionou-se 400 mL de água desionizada e agitou-se a solução resultante a 35 °C. Lavou-se uma pasta de 1 g de CLEC-PC (Altus Biologics), a enzima imobilizada foi lavada em três alíquotas de água desionizada e depois foi novamente suspensa em 10 mL de DMF aquoso a 20 % antes de ser utilizada. Foi suspensa em 10 mL de DMF aquosa a 20 % foi depois adicionada e agitou-se a suspensão resultante a 35 °C com uma monitorização periódica por CLAR. Quando todo o agente terapêutico sob a forma de metil-succinil-N-cap de oligopéptido 38-Dox tinha sido consumido (~18 horas), filtrou-se a mistura reaccional através de um filtro de membrana de nylon de 0,45 µm para eliminar a enzima CLEC-PC. Lavou-se o bolo de CLEC-PC com 3 X 10 mL de metanol e combinaram-se os líquidos de lavagem com metanol com a mistura reaccional filtrada. Concentrou-se então a mistura reaccional filtrada mais os líquidos de lavagem com metanol até se obter uma goma vermelha num evaporador rotativo equipado com uma bomba de vácuo forte e um banho de água a 30° C. Suspendeu-se então a goma vermelha em 50 mL de água desionizada, à temperatura ambiente e agitou-se rapidamente por meio de um agitador mecânico. A esta suspensão adicionou-se uma solução de 77,8 mg de bicarbonato de sódio

(0,926 mmole, 0,95 eq.) em 100 mL de água desionizada durante 2 minutos. Agitou-se a suspensão à temperatura ambiente durante 20 minutos. Filtrou-se a mistura reaccional através de um filtro de membrana de nylon de 0,45 μM e liofilizou-se. Isolou-se 936 g do agente terapêutico de sal de sódio da forma de succinil-N-cap de oligopéptido 38-Dox, rendimento de cerca de 100 %. 84 % puro confirmado pelo método B de CLAR. Registaram-se os espectros de RMN do ^1H e de ^{13}C em espectrómetros de 600 e 150 MHz respectivamente e a EM por pulverização de electrões foi consistente com a estrutura desejada.

Exemplo 26

Hidrólise do agente terapêutico da forma de metil-succinil-N-cap do oligopéptido 38-Dox [Metil-succinil- β -Ala-Leu-Ala-Leu-dox]

Utilização de enzima solúvel

Fez-se uma suspensão com 11,0 g (10,72 mmole) do agente terapêutico da forma de metil-succinil-N-cap de oligopéptido 38-Dox em 800 mL de água com grau de CLAR e homogeneizou-se durante 60 minutos com um homogeneizador Ultraturrax T8 para se obter uma suspensão finamente dividida. Agitou-se esta suspensão (500 rpm) a 35 ° C e ajustou-se para pH=6,05 com NaHCO_3 aquoso 76 mM. 1. Adicionou-se então 1,0 g de lipase "B" de C. Antarctica (Altus Biologics) e agitou-se a mistura reaccional a 35 ° C durante 48 horas. Durante o tempo de reacção de 48 h, manteve-se o pH entre 5,3 e 6,2 por meio da adição periódica de NaHCO_3 aquoso 76 mM com uma monitorização periódica por CLAR. Passadas 48 horas, a reacção estava aproximadamente 98 % completa, avaliada por meio de CLAR.

Ajustou-se então a mistura reaccional para pH=7 com NaHCO₃ aquoso 76 mM e filtrou-se através de uma almofada de Celite 521. Acidificou-se então a mistura reaccional clarificada para um pH de aproximadamente 3 com 5 mL de ácido acético glacial resultando na formação de um precipitado vermelho gomoso. Isolou-se o precipitado por meio de filtração através de Celite 521, a subsequente lavagem da almofada de Celite com metanol, a filtração da solução de metanol através de um filtro de frita vítrea de 10-20 µM e a evaporação rotativa da solução filtrada originou 7,31 g do produto vermelho gomoso. Converteu-se este produto no sal de sódio por dissolução em 70 mL de NaHCO₃ 76 mM (0,95 eq.) e liofilizou-se para se obter 7,30 g, rendimento físico de 66,1 % do agente terapêutico do sal de sódio da forma de succinil-N-cap de oligopéptido 38-Dox, 84,5 % puro avaliado por CLAR.

O produto era idêntico ao do exemplo anterior.

Exemplo 27

A lipase "B" de *Candida Antarctica* imobilizada hidrolisa o agente terapêutico de metil-succinil-N-cap do oligopéptido 38-Dox

Dissolveu-se 30,0 g de lipase "B" de *Candida Antarctica* (Altus Biologics) em 300 mL de água e fez-se a sua diálise contra 3 x 41 de NaHCO₃ aq. 50 mM (pH=6,4). Depois da diálise, o volume da solução dialisada era de ~300 mL. Colocou-se 360 mL de fluxo rápido de sefarose 4 activada por NHS da Pharmacia num funil de frita vítrea moída e lavou-se com 5 x 450 mL de HCl aq. 1 mM arrefecido com gelo. Combinou-se então a sefarose 4 activada por NHS, lavada, com a solução da enzima dialisada. Agitou-se a

suspensão resultante à temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) durante 2,0 horas. O conjugado de sefarose/enzima foi então isolado num filtro de frita vítrea moída e depois agitou-se em 1000 mL de TRIS aq. 100 mM (pH=7,45) durante 15 minutos. Filtrou-se esta suspensão e incubou-se com mais 1000 mL de tampão de TRIS aquoso 100 mM (pH=7,45) a 4°C, durante a noite. A enzima imobilizada na manhã foi filtrada e, depois da lavagem com água, colocou-se num frasco de fundo redondo de 2000 mL, com três tubuladuras. Adicionou-se 43 g do agente terapêutico de metil-succinil-N-cap de oligopéptido 38-Dox e suspenderam-se nos sólidos em 800 mL de água desionizada. Fixou-se o frasco com um agitador no cimo e fixou-se um pH de saturação para manter o pH da mistura reaccional entre 5,9-6,2 por meio do controlo com uma bomba de seringa. Carregou-se a bomba de seringa com NaHCO₃ 0,1 M. O progresso da reacção foi seguido por CLAR. Depois de 6 dias de imobilização da enzima, filtrou-se e liofilizou-se a fase líquida. Depois fez-se uma suspensão dos sólidos anidros em ~11 ml de THF anidro e filtrou-se. 42,66 g, 98,34 % de rendimento físico, 93,43 % (254 nm), 94,43 % (480 nm) puro confirmado pelo processo B de CLAR.

Exemplo 28

Síntese do agente terapêutico do sal de lactato de oligopéptido 38-Dox [lactato de β-Ala-Leu-Ala-Leu-Dox]

Adicionou-se piperidina (26 mL, 264 mmole) a uma solução do agente terapêutico de uma forma de Fmoc de oligopéptido 38-Dox (6,00 g, 5,3 mmole) em DMF (265 ml). Depois de se agitar durante 5 minutos à temperatura ambiente, colocou-se a mistura reaccional num banho de sal gelado e pré-arrefeceu-se (4°C). Adicionou-se imediatamente

tampão de lactato a 10 % a pH 3 (600 mL). Extraíu-se a solução aquosa com DCM (3x500 mL) e eliminaram-se os sais em excesso por extracção em fase sólida. O gel de sílica de C 18, ODS-A (120 g) foi acondicionado (500 mL de metanol, 2x500mL de água) numa frita de vidro e carregado com a solução aquosa do sal impuro de lactato do produto. Depois de se lavar com água (2x500 mL) e de se secar, dissolveu-se o bolo do filtro em metanol. O metanol evaporou-se e dissolveu-se o resíduo em água. Liofilizou-se a solução resultante para se obter 3,54 g de sal de lactato do agente terapêutico de oligopéptido 38-Dox (rendimento de 67 %, pureza pelo método B de CLAR: 89 %).

Exemplo 29

Síntese do agente terapêutico sob a forma de succinil-N-Cap de oligopéptido 38-Dox [succinil- β -Ala-Leu-Ala-Leu-Dox] partindo do sal de lactato do agente terapêutico de oligopéptido 38-Dox [lactato de β -Ala-Leu-Ala-Leu-Dox].

Adicionou-se DIEA (417 μ L, 2,40 mmole) a uma solução de sal de lactato do agente terapêutico de oligopéptido 38-Dox (1,200 g, 1,20 mmole) em DMF (35 ml). Depois de se agitar durante 15 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se anidrido succínico 97 % (2) (0,144 g, 1,44 mmole). Agitou-se a mistura durante 2 h e eliminou-se o DMF por evaporação rotativa. Dissolveu-se o resíduo numa mistura de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ a 4/1 (6 mL) e adicionou-se 200 mL de uma mistura de Et_2O /hexano a 1/1. Depois de se agitar a mistura durante 30 minutos, filtrou-se o precipitado em papel quantitativo (Whatman 42), lavou-se (Et_2O /hexano: 1/1) e secou-se. O bolo do filtro foi suspenso em água (150 mL) e adicionou-se NaOH 1M (\pm 1,2 eq., 1,5 mL), gota a gota, até a dissolução estar completa (pH=7,2). Liofilizou-

se a solução resultante para se obter 1,218 g da forma de succinil-N-cap do agente terapêutico de oligopéptido 38-Dox (rendimento de 97 %, pureza pelo método B de CLAR: 80,2 %).

Exemplo 30

Síntese da forma de succinil-N-cap do agente terapêutico de oligopéptido 38-Dox (succinil- β -Ala-Leu-Ala-Leu-Dox) partindo da forma de Fmoc do agente terapêutico de oligopéptido 38-Dox [Fmoc- β -Ala-Leu-Ala-Leu-Dox]

Adicionou-se piperidina (2180 μ L, 22,06 mmole) a uma solução da forma de Fmoc do agente terapêutico de oligopéptido 38-Dox (0,50 g, 0,44 mmole) em DMF (21,5 mL). Depois de se agitar durante 5 minutos, à temperatura ambiente, arrefeceu-se rapidamente a mistura reaccional para -5 °C e adicionou-se, imediatamente, anidrido succínico (2,25 g, 22,51 mmole). Retirou-se o banho frio logo que a cor mudou e agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante 10 minutos. Eliminou-se a DMF por evaporação rotativa e dissolveu-se o resíduo em clorofórmio (12,5 mL). Adicionou-se rapidamente éter de dietilo (360 mL). Apareceu imediatamente um precipitado. Filtrou-se o precipitado em papel 42 da Whatman e lavou-se com Et₂O. O sólido foi suspenso em água (120 mL; pH = 4,1) e adicionou-se, gota a gota, NaOH 0,025M (20 mL, 0,53 mmole) até a dissolução estar completa (pH=7,4). Esta solução foi então liofilizada para se obter a forma de succinil-N-cap do agente terapêutico de oligopéptido 38-Dox com um rendimento de 89 % e 91 % de pureza verificada pelo método D de CLAR.

A presente invenção, tal como é reivindicada, tem por objecto um composto pró-fármaco, compreendendo esse composto:

(1) um agente terapêutico capaz de entrar na célula-alvo,

(2) um oligopéptido com uma fórmula $(AA)_n-AA^4-AA^3-AA^2-AA^1$, em que:

cada AA representa, independentemente, qualquer aminoácido codificado sob o ponto de vista genético,

n representa um número inteiro de 0 a 12,

AA^4 representa um aminoácido não codificado sob o ponto de vista genético,

AA^3 representa qualquer aminoácido,

AA^2 representa qualquer aminoácido e

AA^1 representa qualquer aminoácido,

(3) um grupo de estabilização que impede a clivagem do referido oligopéptido pelas enzimas presentes no sangue total e

(4) eventualmente, um grupo ligante que não é clivado pela trouase,

em que o oligopéptido está ligado directamente ao grupo de estabilização num primeiro sítio de ligação do oligopéptido e AA^1 , do oligopéptido, está ligado directamente ao agente terapêutico ou está ligado indirectamente através do grupo ligante ao agente terapêutico num segundo sítio de ligação do oligopéptido; sendo o composto clivado selectivamente por uma enzima associada à célula-alvo.

A presente invenção, tal como é reivindicado, tem ainda por objecto um processo para diminuir a toxicidade de um agente terapêutico em que o agente terapêutico se

destina a ser administrado a um paciente, compreendendo esse processo:

a formação, por via covalente, de um pró-fármaco, por meio da ligação de um oligopéptido clivável por trouase a um grupo de estabilização num primeiro sítio de ligação do oligopéptido e a ligação directa ou indirecta do agente terapêutico num segundo sítio de ligação do oligopéptido, sendo o pró-fármaco clivado selectivamente por trouase, em que o pró-fármaco providencia uma toxicidade diminuída do agente terapêutico quando administrado ao paciente.

A memória descritiva inclui um processo para a produção de um agente de um composto pró-fármaco que compreende as seguintes etapas:

- (1) a activação de um oligopéptido protegido em Fmoc com um agente de activação, na presença de um agente terapêutico para se produzir o conjugado de agente terapêutico de oligopéptido protegido em Fmoc,
- (2) a desprotecção do agente terapêutico de oligopéptido protegido em Fmoc por meio do contacto dele com uma base, (3) a reacção do agente terapêutico de oligopéptido com um grupo de estabilização,
- (4) a neutralização do conjugado do agente terapêutico de oligopéptido do grupo de estabilização com um sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

A presente memória descritiva também inclui um composto pró-fármaco que compreende as seguintes etapas:

- (1) a activação de um oligopéptido do grupo de estabilização protegido em éster de alquilo com um

agente de activação, na presença de um agente terapêutico, para produzir um conjugado de um agente terapêutico de oligopéptido de um grupo de estabilização protegido no éster de alquilo,

(2) a desprotecção do agente terapêutico de oligopéptido de um grupo de estabilização protegido no éster de alquilo e

(3) a neutralização do agente terapêutico de oligopéptido de um grupo de estabilização com um sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

Um outro aspecto da presente invenção consiste num processo para a produção de um compostos pró-fármaco que compreende as etapas seguintes:

(1) a activação de um oligopéptido protegido em tritilo com um agente de activação, na presença de um agente terapêutico, para se produzir um conjugado de agente terapêutico de oligopéptido protegido em tritilo,

(2) a desprotecção do conjugado de agente terapêutico de oligopéptido protegido em tritilo, em condições ácidas, durante 30-120 minutos, a 0 até 25 °C,

(3) a reacção do agente terapêutico de oligopéptido com um grupo de estabilização e

(4) a neutralização do agente terapêutico de oligopéptido do grupo de estabilização com um sal aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

As composições da presente invenção incluem pró-fármacos preparados por meio de todos os processos anteriores.

A presente invenção ficou agora completamente descrita e será evidente, para um especialista nesta matéria, que se

podem fazer muitas alterações e modificações, sem se sair do espírito ou do âmbito das reivindicações em anexo.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Coulter Pharmaceutical, Inc.

<120> COMPOSTOS PRÓ-FÁRMACOS E PROCESSOS PARA A SUA PREPARAÇÃO

<130> COUL- 007/01WO

<140> ainda não disponível

<141> 1999-12-10

<150> 60/119,312

<151> 1999-02-08

<150> 60/111,793

<151> 1998-12-11

<160> 103

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> D- Alanina

<220>

<221> SITE

<222> (2)

<223> 2-Tienilalanina

<220>

<221> SITE

<222> (3)

<223> Beta-Alanina

<220>

<221> SITE

<222> (4)
<223> Beta-Alanina

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ala Leu
1 5

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> 2-Tienilalanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (3)
<223> Beta-Alanina

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Leu Ala Leu
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> Beta-Alanina

<400> 3

Xaa Xaa Leu Ala Leu
1 5

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 4

Xaa Ala Ala Ile
1

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 5

Xaa Ala Ala Leu
1

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 6

Xaa Phe Tyr Leu
1

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 7

Xaa Phe Thr Phe
1

<210> 8
<211> 4

<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 8

Xaa Phe Gly Ile
1

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 9

Xaa Phe Gly Leu
1

<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE

<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 10

Xaa Phe Phe Phe
1

<210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-alanina

<400> 11

Xaa Phe Phe Ile
1

<210> 12
<211> 4
<212> P RT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 12

Xaa Phe Phe Leu
1

<210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 13

Xaa Phe Ala Ile

1

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 14

Xaa Phe Ala Leu

1

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> 2-Tienilalanina

<400> 15

Xaa Gly Ala Leu

1

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> 2-Naftilalanina

<400> 16

Xaa Gly Ala Leu

1

<210> 17
<211> 4
<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<400> 17

Xaa Leu Tyr Leu
1

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<220>

<221> SITE

<222> (3)

<223> 2-Tienilalanina

<400> 18

Xaa Leu Xaa Leu
1

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<400> 19

Xaa Leu Thr Phe
1

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 20

Xaa Leu Thr Ile
1

<210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 21

Xaa Leu Thr Leu
1

<210> 22
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 22

Xaa Leu Ser Leu
1

<210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE

<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (3)
<223> 3-Piridilalanina

<400> 23

Xaa Leu Xaa Leu

1

<210> 24
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética
<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 24

Xaa Leu Leu Leu

1

<210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 25

Xaa Leu Gly Phe

1

<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 26

Xaa Leu Gly Ile

1

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> 2-Tienilalanina

<400> 27

Xaa Leu Gly Leu

1

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<400> 28

Xaa Leu Gly Leu

1

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Ácido aminoisobutírico

<400> 29

Xaa Leu Gly Leu

1

<210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 30

Xaa Leu Phe Ile

1

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 31

Xaa Leu Phe Leu

1

<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (3)
<223> Ácido aminoisobutírico

<400> 32

Xaa Leu Xaa Leu

1

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 33

Xaa Leu Ala Ala
1

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (4)
<223> Beta-Alanina

<400> 34

Xaa Leu Ala Xaa
1

<210> 35
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 35

Xaa Leu Ala Phe
1

<210> 36
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 36

Xaa Leu Ala Gly
1

<210> 37
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 37

Xaa Leu Ala Ile
1

<210> 38
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 38

Xaa Leu Ala Leu
1

<210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Ácido tetra-hidroisoquinolino-3-carboxílico

<400> 39

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Ácido tiazolidino-4-carboxílico

<400> 40

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> 2-Tienilalanina

<400> 41

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE

<222> (1)
<223> 2-Naftilalanina

<400> 42

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Ácido 3-amino-4,4-difenilbutírico

<400> 43

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> D-Leucina

<400> 44

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 45
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> D-Alanina

<400> 45

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> D-Metionina

<400> 46

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 47

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Ácido 3-amino-3-fenilpropiónico

<400> 47

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 48

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Ácido 4- (Aminometil)benzóico

<400> 48

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 49

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (4)
<223> 2-Naftilalanina

<400> 49

Xaa Leu Ala Xaa
1

<210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 50

Xaa Leu Ala Ser
1

<210> 51
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 51

Xaa Leu Ala Tyr
1

<210> 52
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 52

Xaa Met Tyr Phe
1

<210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 53

Xaa Met Tyr Leu
1

<210> 54
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 54

Xaa Met Gly Ile
1

<210> 55
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE
<222> (1)
<223> 2-Tienilalanina

<400> 55

Xaa Met Gly Leu

1

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 56

Xaa Met Phe Phe

1

<210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 57

Xaa Met Phe Ile

1

<210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Ácido tetra-hidroisoquinolino-3-carboxílico

<400> 58

Xaa Met Ala Leu

1

<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> 2-Naftilalanina

<400> 59

Xaa Met Ala Leu
1

<210> 60
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Ácido 3-Amino-4,4-difenilbutírico

<400> 60

Xaa Met Ala Leu
1

<210> 61
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 61

Xaa Met Ala Leu
1

<210> 62
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Ácido 3-amino-3-fenilpropiónico

<400> 62

Xaa Met Ala Leu
1

<210> 63
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> Norleucina

<400> 63

Xaa Xaa Tyr Ile
1

<210> 64
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> NorLeucina

<400> 64

Xaa Xaa Tyr Leu
1

<210> 65
<211> 4

<212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Sintética

 <220>
 <221> SITE
 <222> (1)
 <223> Beta-Alanina

 <220>
 <221> SITE
 <222> (2)
 <223> Norleucina

 <400> 65

Xaa Xaa Thr Ile
1

 <210> 66
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Sintética

 <220>
 <221> SITE
 <222> (1)
 <223> Beta-Alanina

 <220>
 <221> SITE
 <222> (2)
 <223> Norleucina

 <400> 66

Xaa Xaa Thr Leu
1

 <210> 67
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Sintética

 <220>
 <221> SITE
 <222> (1)
 <223> Beta-Alanina

 <220>
 <221> SITE
 <222> (2)

<223> Norleucina

<400> 67

Xaa Xaa Gly Phe

1

<210> 68

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<220>

<221> SITE

<222> (2)

<223> Norleucina

<400> 68

Xaa Xaa Gly Ile

1

<210> 69

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<220>

<221> SITE

<222> (2)

<223> Norleucina

<400> 69

Xaa Xaa Gly Leu

1

<210> 70

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> Norleucina

<400> 70

Xaa Xaa Phe Ile
1

<210> 71
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> Norleucina

<400> 71

Xaa Xaa Ala Ile
1

<210> 72
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> Norleucina

<400> 72

Xaa Xaa Ala Leu
1

<210> 73
<211> 3
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> Norleucina

<400> 73

Xaa Xaa Ala Phe

<210> 74
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

1

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> Norvalina

<400> 74

Xaa Xaa Ala Leu

<210> 75
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

1

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 75

Xaa Phe Tyr Ile

1

<210> 76
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> 2-Tienilalanina

<400> 76

Xaa Pro Gly Leu

1

<210> 77
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> 2-Tienilalanina

<400> 77

Xaa Pro Ala Leu

1

<210> 78
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> 2-Naftilalanina

<400> 78

Xaa Pro Ala Leu

1

<210> 79
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética
<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 79

Xaa Pro Ala Leu

1

<210> 80
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> Fen (C1)
<400> 80

Xaa Xaa Ala Leu

1

<210> 81
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> Fen (NO₂)

<400> 81

Xaa Xaa Ala Ile

1

<210> 82
<211> 4 <212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética
<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> Fen(NO₂)

<400> 82

Xaa Xaa Ala Leu
1

<210> 83
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220> <221> SITE
<222> (2)
<223> Fenilglicina

<400> 83

Xaa Xaa Ala Leu
1

<210> 84
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> 3-Piridilalanina

<400> 84

Xaa Xaa Ala Leu
1

<210> 85
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Ácido tetra-hidroisoquinolino-3-carboxílico

<400> 85

Xaa Thr Gly Leu
1

<210> 86
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> 2-Tienilalanina

<400> 86

Xaa Xaa Gly Ile
1

<210> 87
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<220>
<221> SITE
<222> (2)
<223> 2-Tienilalanina

<400> 87

Xaa Xaa Ala Leu

1

<210> 88

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<220>

<221> SITE

<222> (2)

<223> Ácido tetra-hidroisoquinolino-3-carboxílico

<400> 88

Xaa Xaa Ala Ile

1

<210> 89

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<220>

<221> SITE

<222> (2)

<223> Tetra-hidroisoquinolina

<400> 89

Xaa Xaa Ala Leu

1

<210> 90

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 90

Xaa Val Ala Leu
1

<210> 91
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 91

Xaa Trp Ala Leu
1

<210> 92
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 92

Xaa Tyr Tyr Phe
1

<210> 93
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 93

Xaa Tyr Tyr Ile

1

<210> 94

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<400> 94

Xaa Tyr Tyr Leu

1

<210> 95

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<400> 95

Xaa Tyr Thr Leu

1

<210> 96

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<400> 96

Xaa Tyr Phe Leu

1

<210> 97

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética
<220>
<221> SITE
<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<400> 97

Xaa Tyr Gly Ile
1

<210> 98
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética
<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> 2-Tienilalanina

<400> 98

Xaa Tyr Gly Leu
1

<210> 99
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 99

Xaa Tyr Gly Leu
1

<210> 100
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>
<221> SITE
<222> (1)
<223> Beta-Alanina

<400> 100

Xaa Tyr Phe Ile

1

<210> 101

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<400> 101

Xaa Tyr Ala Ile

1

<210> 102

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SIMILAR

<222> (1)

<223> 2-Tienilalanina

<400> 102

Xaa Tyr Ala Leu

1

<210> 103

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Sintética

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Beta-Alanina

<400> 103

Xaa Tyr Ala Leu

1

Lisboa, 8 de Junho de 2010.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto caracterizado por compreender:

- (1) um agente terapêutico capaz de entrar numa célula-alvo,
- (2) um oligopéptido com uma fórmula $(AA)_n-AA^4-AA^3-AA^2-AA^1$, em que:

cada AA representa, independentemente, qualquer aminoácido codificado sob o ponto de vista genético,

n representa um número inteiro de 0 a 12,

AA^4 representa um aminoácido não codificado sob o ponto de vista genético,

AA^3 representa qualquer aminoácido,

AA^2 representa qualquer aminoácido e

AA^1 representa qualquer aminoácido, em que o oligopéptido se selecciona entre: D-AlaTie β Ala β AlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 1) Tie β Ala β AlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 2), β Ala β AlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 3), β AlaAlaAlaIle (SEQ ID NO: 4), β AlaAlaAlaLeu (SEQ ID NO: 5), β AlaFenTirLeu (SEQ ID NO: 6), β AlaFenTreFen (SEQ ID NO: 7), β AlaFenGliIle (SEQ ID NO: 8), β AlaFenGliLeu (SEQ ID NO: 9), β AlaFenFenFen (SEQ ID NO: 10), β AlaFenFenIle (SEQ ID NO: 11), β AlaFenFenLeu (SEQ ID NO: 12), β AlaFenAlaIle (SEQ ID NO: 13), β AlaFenAlaLeu (SEQ ID NO: 14), TioGliAlaLeu (SEQ ID NO: 15), NalGliAlaLeu (SEQ ID NO: 16), β AlaLeuTirLeu (SEQ ID NO: 17), β AlaLeuTioLeu (SEQ ID NO: 18), β AlaLeuTreFen (SEQ ID NO: 19), β AlaLeuTreIle (SEQ ID NO: 20), β AlaLeuTreLeu (SEQ ID NO: 21), β AlaLeu (SerLeu (SEQ ID NO: 22),

βAlaLeuPirLeu (SEQ ID NO: 23), βAlaLeuLeu (SEQ ID NO: 24), βAlaLeuGliFen (SEQ ID NO: 25), βAlaLeuGliIle (SEQ ID NO: 26), TioLeuGliLeu (SEQ ID NO: 27), βAlaLeuGliLeu (SEQ ID NO: 28), AibLeuGliLeu (SEQ ID NO: 29), βAlaLeuFenIle (SEQ ID NO: 30), βAlaLeuFenLeu (SEQ ID NO: 31), βAlaLeuAibLeu (SEQ ID NO: 32), βAlaLeuAlaAla (SEQ ID NO: 33), βAlaLeuAlaβAla (SEQ ID NO: 34), βAlaLeuAlaFen (SEQ ID NO: 35), βAlaLeuAlaGli (SEQ ID NO: 36), βAlaLeuAlaIle (SEQ ID NO: 37), βAlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 38), TicLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 39), TizLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 40), TieLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 41), NalLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 42), NAALeuAlaLeu (SEQ ID NO: 43), D-LeuLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 44), D-AlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 45), D-MetLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 46), APPLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 47), AmbLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 48), βAlaLeuAlaNal (SEQ ID NO: 49), βAlaLeuAla (Ser (SEQ ID NO: 50), βAlaLeuAlaTir (SEQ ID NO: 51), βAlaMetTirFen (SEQ ID NO: 52), βAlaMetTirLeu (SEQ ID NO: 53), βAlaMetGliIle (SEQ ID NO: 54), TieMetGliLeu (SEQ ID NO: 55), βAlaMetFenFen (SEQ ID NO: 56), βAlaMetFenIle (SEQ ID NO: 57), TicMetAlaLeu (SEQ ID NO: 58), NalMetAlaLeu (SEQ ID NO: 59), NAAMetAlaLeu (SEQ ID NO: 60), βAlaMetAlaLeu (SEQ ID NO: 61), APPMetAlaLeu (SEQ ID NO: 62), βAlaNleTirIle (SEQ ID NO: 63), βAlaNleTirLeu (SEQ ID NO: 64), βAlaNleTreIle (SEQ ID NO: 65), βAlaNleTreLeu (SEQ ID NO: 66), βAlaNleGliFen (SEQ ID NO: 67), βAlaNleGliIle (SEQ ID NO: 68), βAlaNleGliLeu (SEQ ID NO: 69), βAlaNleFenIle (SEQ ID NO: 70), βAlaNleAlaIle (SEQ ID NO: 71), βAlaNleAlaLeu (SEQ ID NO: 72), βAlaNleAlaFen (SEQ ID NO: 73), βAlaNvaAlaLeu (SEQ

ID NO: 74), β AlaFenTirIle (SEQ ID NO: 75), TieProGliLeu (SEQ ID NO: 76), TieProAlaLeu (SEQ ID NO: 77), NalProAlaLeu (SEQ ID NO: 78), β AlaProAlaLeu (SEQ ID NO: 79), β AlaFen (Cl), AlaLeu (SEQ ID NO: 80), β AlaFen (NO₂), AlaIle (SEQ ID NO: 81), β AlaFen(NO₂), AlaLeu (SEQ ID NO: 82), β AlaFenAlaLeu (SEQ ID NO: 83), β AlaPirAlaLeu (SEQ ID NO: 84), TicTreGliLeu (SEQ ID NO: 85), β AlaTieGliIle (SEQ ID NO: 86), β AlaTieAlaLeu (SEQ ID NO: 87), β AlaTicAlaIle (SEQ ID NO: 88), β AlaTicAlaLeu (SEQ ID NO: 89), β AlaValAlaLeu (SEQ ID NO: 90), β AlaTrpAlaLeu (SEQ ID NO: 91), β AlaTirTirFen (SEQ ID NO: 92), β AlaTirTirIle (SEQ ID NO: 93), β AlaTirTirLeu (SEQ ID NO: 94), β AlaTirTreLeu (SEQ ID NO: 95), β AlaTirFenLeu (SEQ ID NO: 96), β AlaTirGliIle (SEQ ID NO: 97), TieTirGliLeu (SEQ ID NO: 98), β AlaTirGliLeu (SEQ ID NO: 99), β AlaTirFenIle (SEQ ID NO: 100), β AlaTirAlaIle (SEQ ID NO: 101), TieTirAlaLeu (SEQ ID NO: 102) e β AlaTirAlaLeu (SEQ ID NO: 103).

(3) eventualmente, um grupo ligante e

(4) um grupo de estabilização carregado negativamente que impede a clivagem do referido oligopéptido por meio das enzimas presentes no sangue total

em que o oligopéptido está ligado directamente ao grupo de estabilização no terminal amino do oligopéptido e AA¹ do oligopéptido está ligado directamente ao agente terapêutico ou está ligado indirectamente através do grupo ligante ao agente terapêutico num segundo sítio de ligação do oligopéptido e em que o composto é clivado selectivamente por uma enzima associada à célula-alvo, em que o grupo de estabilização se

selecciona entre: ácido succínico, ácido diglicólico, ácido piroglutâmico e ácido glutárico.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo facto de n representar um número inteiro de 0 to 8.
3. Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo facto de a célula-alvo ser uma célula de tumor ou uma célula inflamatória.
4. Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo facto de AA¹ do oligopéptido ser seleccionado entre fenilalanina, isoleucina, alanina, glicina, tirosina, 2-naftilalanina, serina e β -alanina.
5. Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo facto de AA² do oligopéptido se seleccionar entre leucina, tirosina, alanina, glicina, serina, 3-piridilalanina, 2-tienilalanina, ácido aminoisobutírico, treonina e fanilalanina.
6. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de AA³ do oligopéptido se seleccionar entre leucina, tirosina, fenilalanina, p-Cl-fenilalanina, p-nitrofenil-alanina, valina, norleucina, norvalina, fenilglicina, triptofano, ácido tetra-hidroisoquinolino-3-carboxílico, 3-piridilalanina, alanina, glicina, tienilalanina, metionina, valina e prolina.
7. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de AA⁴ se seleccionar entre β -alanina, ácido tiazolidino-4-carboxílico, 2-tienilalanina, 2-naftil-

alanina, D-alanina, D-leucina, D-metionina, D-fenilalanina, ácido 3-amino-3-fenilpropiónico, ácido γ -aminobutírico, ácido 3-amino-4,4-difenilbutírico, ácido tetra-hidroiso-quinolino-3-carboxílico, ácido 4-aminoetilbenzóico e ácido aminoisobutírico.

8. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o grupo de estabilização reduzir a interacção entre o composto e as células endoteliais que guarnecem os vasos sanguíneos quando administradas ao paciente.
9. Composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo facto de o agente terapêutico se seleccionar entre agentes de alquilação, agentes anti-proliferativos, agentes de ligação de tubulina, alcalóides de vinca, enediinos, podofilotoxinas ou derivados de podofilotoxinas, a família de fármacos de pteridina, taxanos, antraciclinas, dolastatinas, inibidores de topoisomerase e cis-platinas.
10. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o agente terapêutico se seleccionar entre doxorubicina, daunorubicina, vinblastina, vincristina, calicheamicina, etopósido, fosfato de etopósido, CC-1065, duocarmicina, KW-2189, metotrexato, metopterina, aminopterina, diclorometotrexato, docetaxel, paclitaxel, combretastatina, fosfato de combretastatina A₄, dolastatina 10, dolastatina 11, dolastatina 15, topotecano, camptotecano, mitomicina C, porfiromicina, 5-flurouracilo, 6-mercaptopurina, fludarabina, tamoxifeno, arabinósido de citosina, arabinósido de adenosina, colchicina, carbo-platina, mitomicina C,

bleomicina, melfalano ou os seus derivados e os seus análogos.

11. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o agente terapêutico ter um sítio intracelular activo.
12. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de AA¹ do oligopéptido estar directamente ligado ao agente terapêutico.
13. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de AA¹ da sequência do oligopéptido estar indirectamente ligado ao agente terapêutico no segundo sítio de ligação do oligopéptido por via de um grupo ligante, seleccionando-se o grupo ligante entre ácido amino-capróico, grupo hidrazida, um grupo éster, um grupo éter e um grupo sulfidrilo.
14. Composição farmacêutica caracterizada pelo facto de compreender:
 - (1) um composto de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores e
 - (2) um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.
15. Processo *in vitro* para diminuir a toxicidade de um agente terapêutico em que o agente terapêutico se destina a ser administrado a um paciente, processo esse caracterizado pelo facto de compreender:

a formação de um pró-fármaco por ligações covalentes, por meio da ligação de um oligopéptido com uma fórmula $(AA)_n-AA^4-AA^3-AA^2-AA^1$, em que:

cada AA representa, independentemente, qualquer aminoácido codificado sob o ponto de vista genético,

n representa um número inteiro de 0 a 12,

AA⁴ representa um aminoácido não codificado sob o ponto de vista genético,

e cada AA¹, AA² e AA³ representa qualquer aminoácido,

em que o oligopéptido se selecciona entre: D-AlaTieβAlaβAlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 1) TieβAlaβAlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 2), βAlaβAlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 3), βAlaAlaAlaIle (SEQ ID NO: 4), βAlaAlaAlaLeu (SEQ ID NO: 5), βAlaFenTirLeu (SEQ ID NO: 6), βAlaFenTreFen (SEQ ID NO: 7), βAlaFenGliIle (SEQ ID NO: 8), βAlaFenGliLeu (SEQ ID NO: 9), βAlaFenFenFen (SEQ ID NO: 10), βAlaFenFenIle (SEQ ID NO: 11), βAlaFenFenLeu (SEQ ID NO: 12), βAlaFenAlaIle (SEQ ID NO: 13), βAlaFenAlaLeu (SEQ ID NO: 14), TioGliAlaLeu (SEQ ID NO: 15), NaIgliAlaLeu (SEQ ID NO: 16), βAlaLeuTirLeu (SEQ ID NO: 17), βAlaLeuTioLeu (SEQ ID NO: 18), βAlaLeuTreFen (SEQ ID NO: 19), βAlaLeuTreIle (SEQ ID NO: 20), βAlaLeuTreLeu (SEQ ID NO: 21), βAlaLeu (SerLeu (SEQ ID NO: 22), βAlaLeuPirLeu (SEQ ID NO: 23), βAlaLeuLeu (SEQ ID NO: 24), βAlaLeuGliFen (SEQ ID NO: 25), βAlaLeuGliIle (SEQ ID NO: 26), TioLeuGliLeu (SEQ ID NO: 27), βAlaLeuGliLeu (SEQ ID NO: 28), AibLeuGliLeu (SEQ ID NO: 29), βAlaLeuFenIle (SEQ ID NO: 30), βAlaLeuFenLeu (SEQ ID NO: 31), βAlaLeuAibLeu (SEQ ID

NO: 32), β AlaLeuAlaAla (SEQ ID NO: 33),
 β AlaLeuAla β Ala (SEQ ID NO: 34), β AlaLeuAlaFen (SEQ ID
NO: 35), β AlaLeuAlaGli (SEQ ID NO: 36), β AlaLeuAlaIle
(SEQ ID NO: 37), β AlaLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 38),
TicLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 39), TizLeuAlaLeu (SEQ ID
NO: 40), TieLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 41), NalLeuAlaLeu
(SEQ ID NO: 42), NAALeuAlaLeu (SEQ ID NO: 43), D-
LeuLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 44), D-AlaLeuAlaLeu (SEQ ID
NO: 45), D-MetLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 46), APPLeuAlaLeu
(SEQ ID NO: 47), AmbLeuAlaLeu (SEQ ID NO: 48),
 β AlaLeuAlaNal (SEQ ID NO: 49), β AlaLeuAla (Ser (SEQ
ID NO: 50), β AlaLeuAlaTir (SEQ ID NO: 51),
 β AlaMetTirFen (SEQ ID NO: 52), β AlaMetTirLeu (SEQ ID
NO: 53), β AlaMetGliIle (SEQ ID NO: 54), TieMetGliLeu
(SEQ ID NO: 55), β AlaMetFenFen (SEQ ID NO: 56),
 β AlaMetFenIle (SEQ ID NO: 57), TicMetAlaLeu (SEQ ID
NO: 58), NalMetAlaLeu (SEQ ID NO: 59), NAAMetAlaLeu
(SEQ ID NO: 60), β AlaMetAlaLeu (SEQ ID NO: 61),
APPMetAlaLeu (SEQ ID NO: 62), β AlaNleTirIle (SEQ ID
NO: 63), β AlaNleTirLeu (SEQ ID NO: 64), β AlaNleTreIle
(SEQ ID NO: 65), β AlaNleTreLeu (SEQ ID NO: 66),
 β AlaNleGliFen (SEQ ID NO: 67), β AlaNleGliIle (SEQ ID
NO: 68), β AlaNleGliLeu (SEQ ID NO: 69), β AlaNleFenIle
(SEQ ID NO: 70), β AlaNleAlaIle (SEQ ID NO: 71),
 β AlaNleAlaLeu (SEQ ID NO: 72), β AlaNleAlaFen (SEQ ID
NO: 73), β AlaNvaAlaLeu (SEQ ID NO: 74), β AlaFenTirIle
(SEQ ID NO: 75), TieProGliLeu (SEQ ID NO: 76),
TieProAlaLeu (SEQ ID NO: 77), NalProAlaLeu (SEQ ID
NO: 78), β AlaProAlaLeu (SEQ ID NO: 79), β AlaFen (Cl),
AlaLeu (SEQ ID NO: 80), β AlaFen (NO₂), AlaIle (SEQ ID
NO: 81), β AlaFen(NO₂), AlaLeu (SEQ ID NO: 82),
 β AlaFenAlaLeu (SEQ ID NO: 83), β AlaPirAlaLeu (SEQ ID
NO: 84), TicTreGliLeu (SEQ ID NO: 85), β AlaTieGliIle
(SEQ ID NO: 86), β AlaTieAlaLeu (SEQ ID NO: 87),

β AlaTicAlaIle (SEQ ID NO: 88), β AlaTicAlaLeu (SEQ ID NO: 89), β AlaValAlaLeu (SEQ ID NO: 90), β AlaTrpAlaLeu (SEQ ID NO: 91), β AlaTirTirFen (SEQ ID NO: 92), β AlaTirTirIle (SEQ ID NO: 93), β AlaTirTirLeu (SEQ ID NO: 94), β AlaTirTreLeu (SEQ ID NO: 95), β AlaTirFenLeu (SEQ ID NO: 96), β AlaTirGliIle (SEQ ID NO: 97), TieTirGliLeu (SEQ ID NO: 98), β AlaTirGliLeu (SEQ ID NO: 99), β AlaTirFenIle (SEQ ID NO: 100), β AlaTirAlaIle (SEQ ID NO: 101), TieTirAlaLeu (SEQ ID NO: 102) e β AlaTirAlaLeu (SEQ ID NO: 103).

com um grupo de estabilização carregado negativamente no primeiro sítio de ligação do oligopéptido e ligado directa ou indirectamente ao agente terapêutico, num segundo sítio de ligação do oligopéptido, em que o grupo de estabilização se selecciona entre: ácido succínico, ácido diglicólico, ácido maleico, ácido piroglutâmico e ácido glutárico, providenciando assim o pró-fármaco uma menor toxicidade do agente terapêutico quando administrado ao paciente.

16. Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de o pró-fármaco permitir a administração, ao paciente, de uma dose maior de agente terapêutico, comparada com a dose do agente terapêutico sem a ligação de um pró-fármaco.

17. Pró-fármaco formado pelo processo de acordo com a reivindicação 15.

Lisboa, 8 de Junho de 2010.

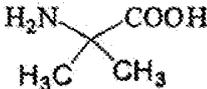
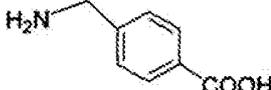
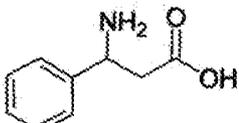
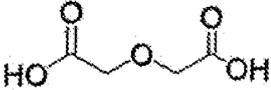
Símbolo	Nome	Estrutura
Aca	Ácido 6-aminocapróico	
Aib	Ácido aminoisobutírico	
Amb	Ácido 4-(aminometil)benzóico	
APP	Ácido 3-amino-3-fenilpropiónico	
Dg	Ácido diglicólico	

FIG. 1A

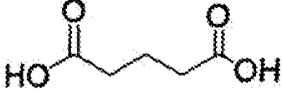
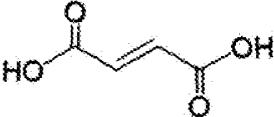
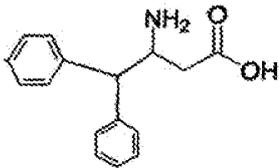
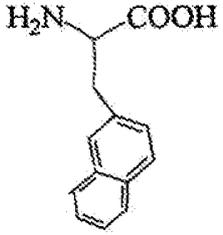
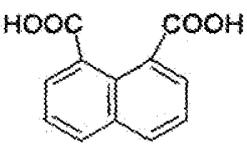
Símbolo	Nome	Estrutura
Gl	Ácido glutárico	
Mal	Ácido maleico	
NAA	Ácido 3-amino-4,4-difenilbutírico	
Nal	2-Naftilalanina	
Naf	Ácido 1,8-naftaleno-dicarboxílico	

FIG. 1B

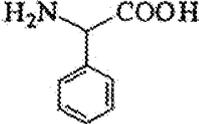
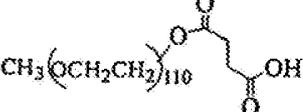
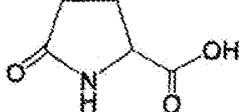
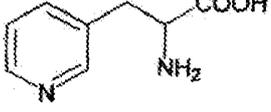
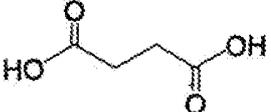
Símbolo	Nome	Estrutura
Feg	Fenilglicina	
PEG	Éster hemisuccinilo de polietileno-glicol 5000	
Pig	Ácido piroglutâmico	
Pir		
Suc	Ácido succínico	

FIG. 1C

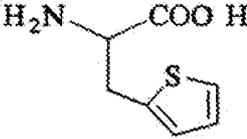
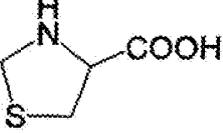
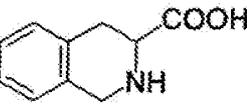
Símbolo	Nome	
Tie	2-Tienilalanina	
Tiz	3-Tioprolina ou ácido tiazolidino-4-carboxílico	
Tic	Ácido tetra-hidroisoquinolino-3-carboxílico	

FIG. 1D

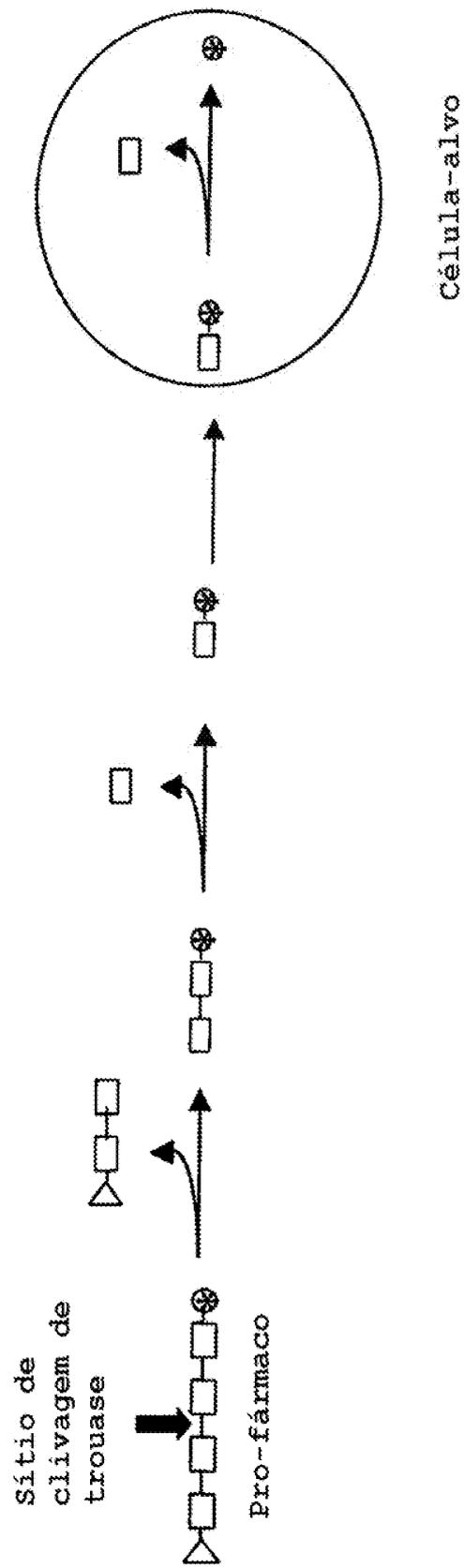


FIG. 2

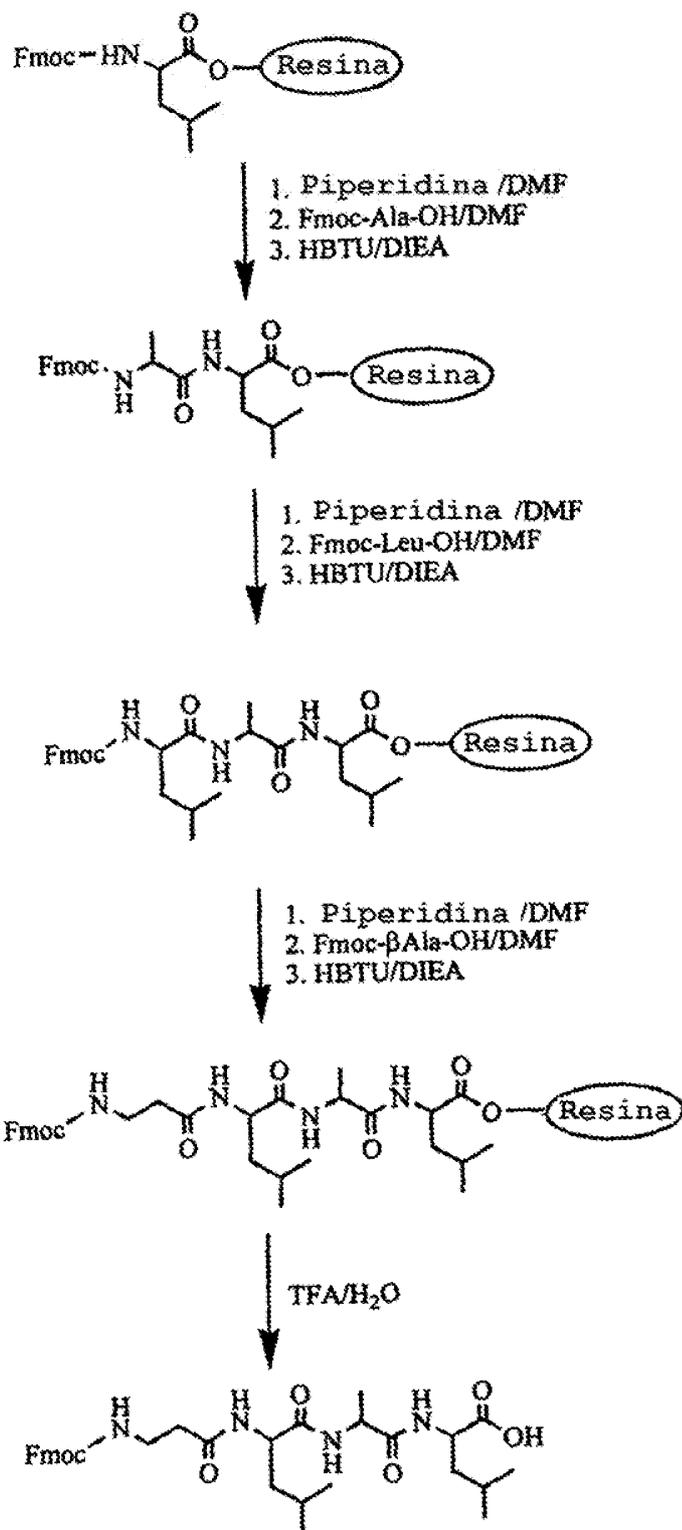


FIG. 3

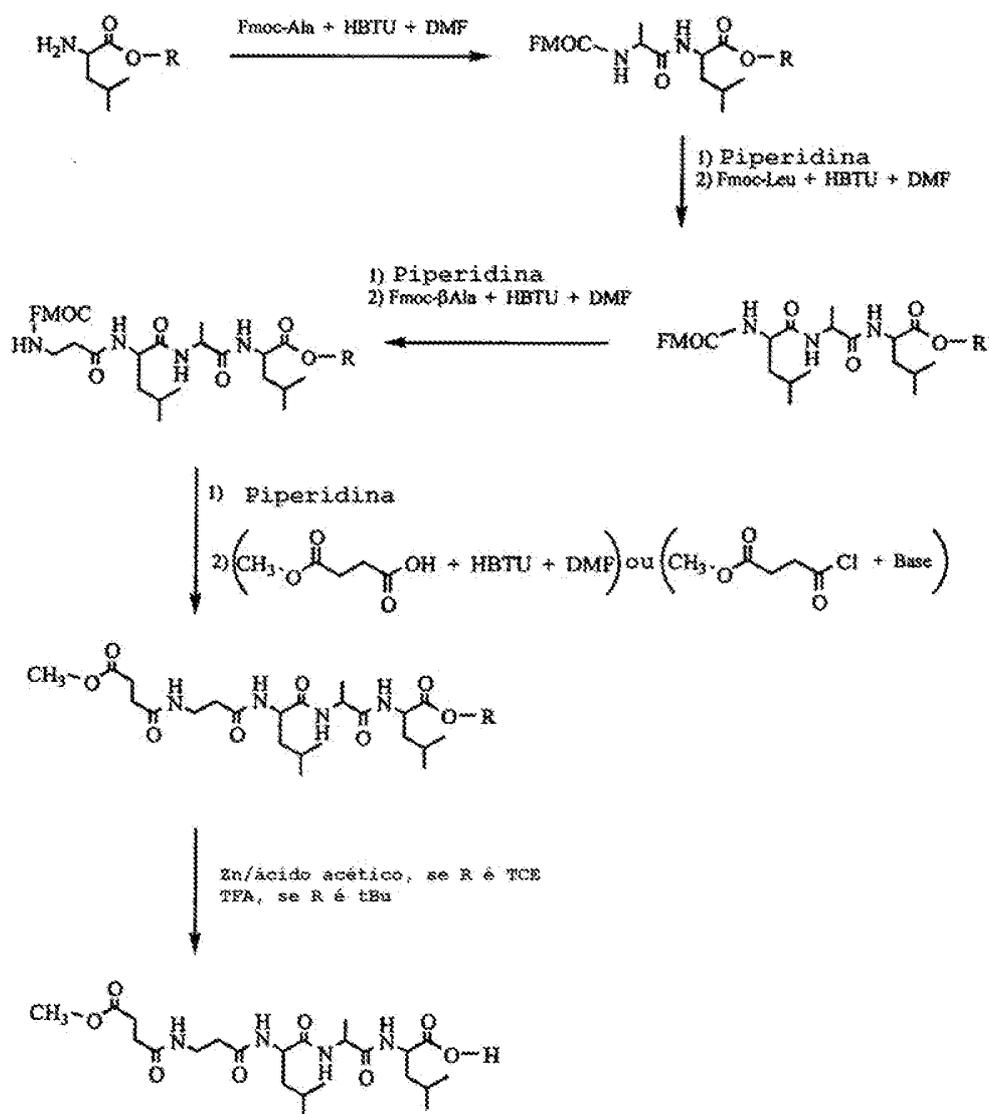


FIG. 4

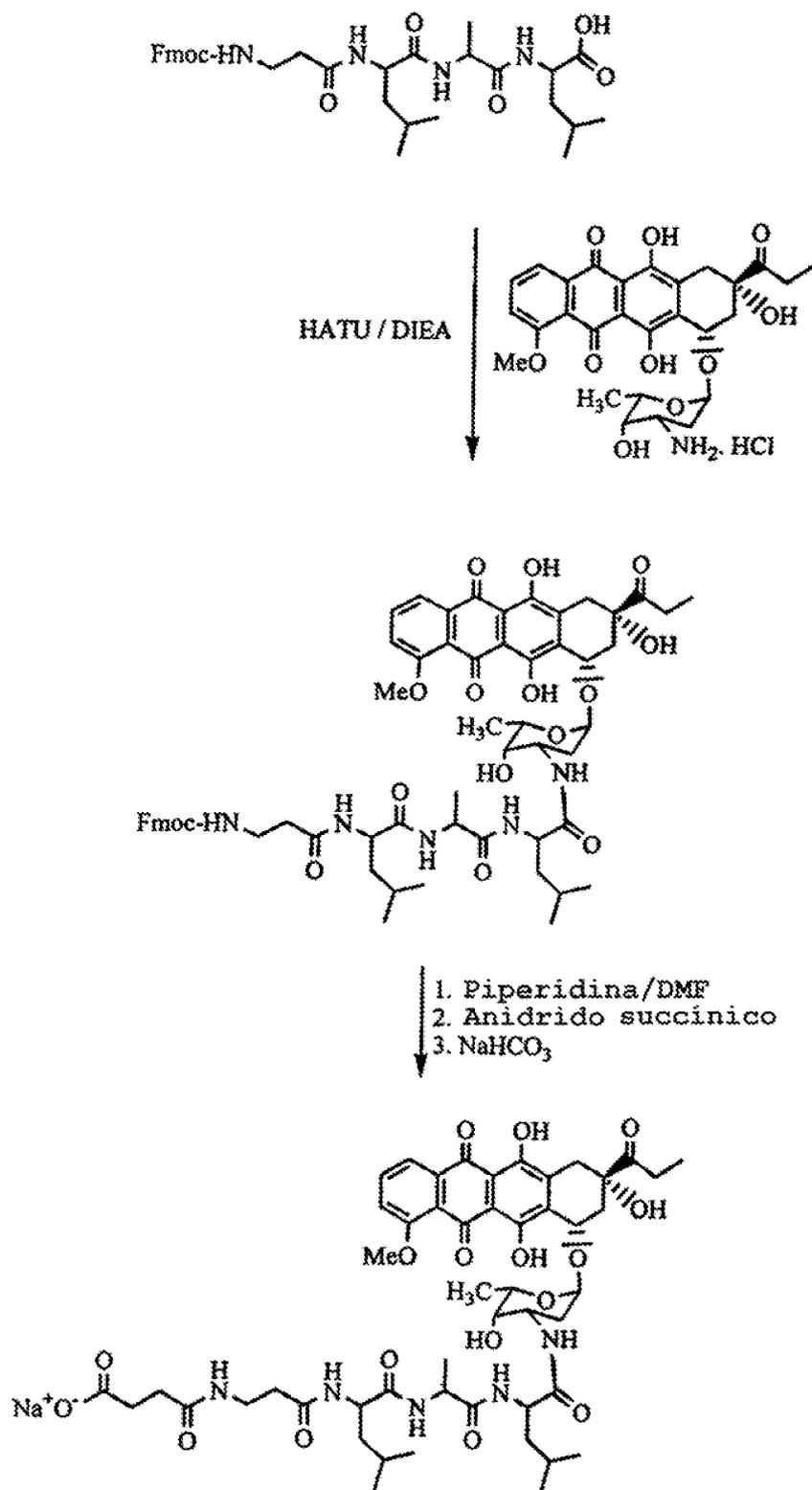


FIG. 5

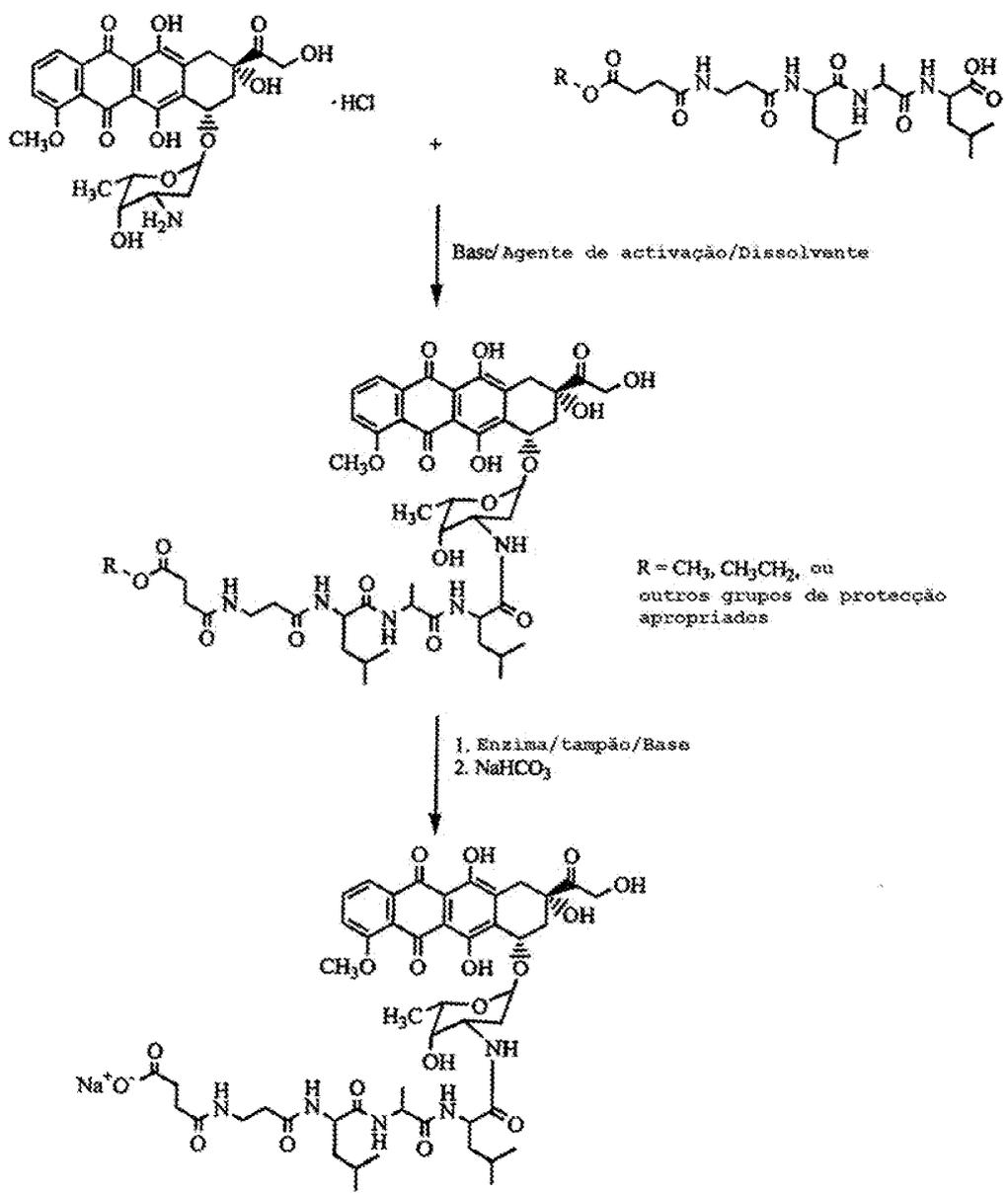


FIG.6

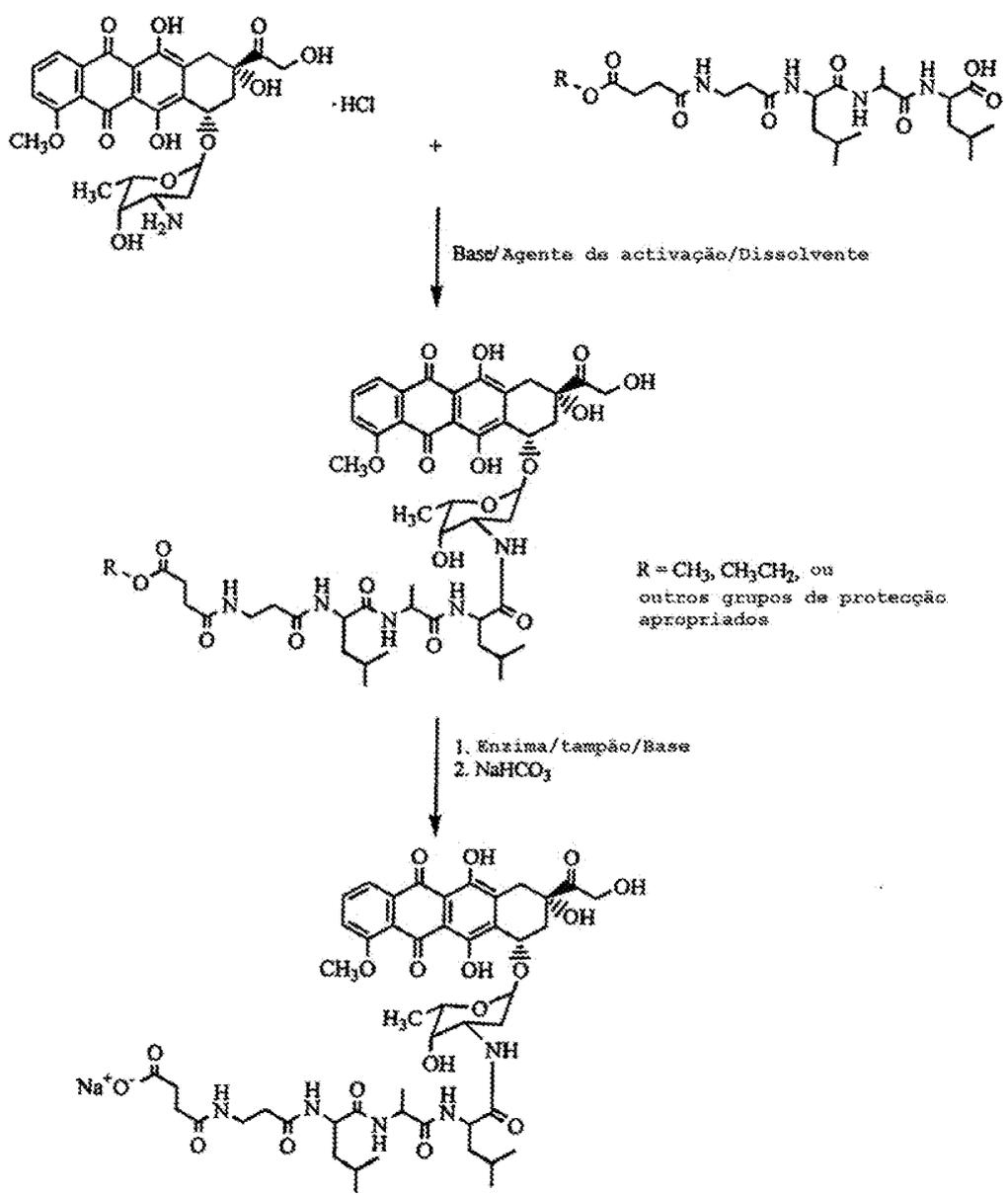


FIG.6

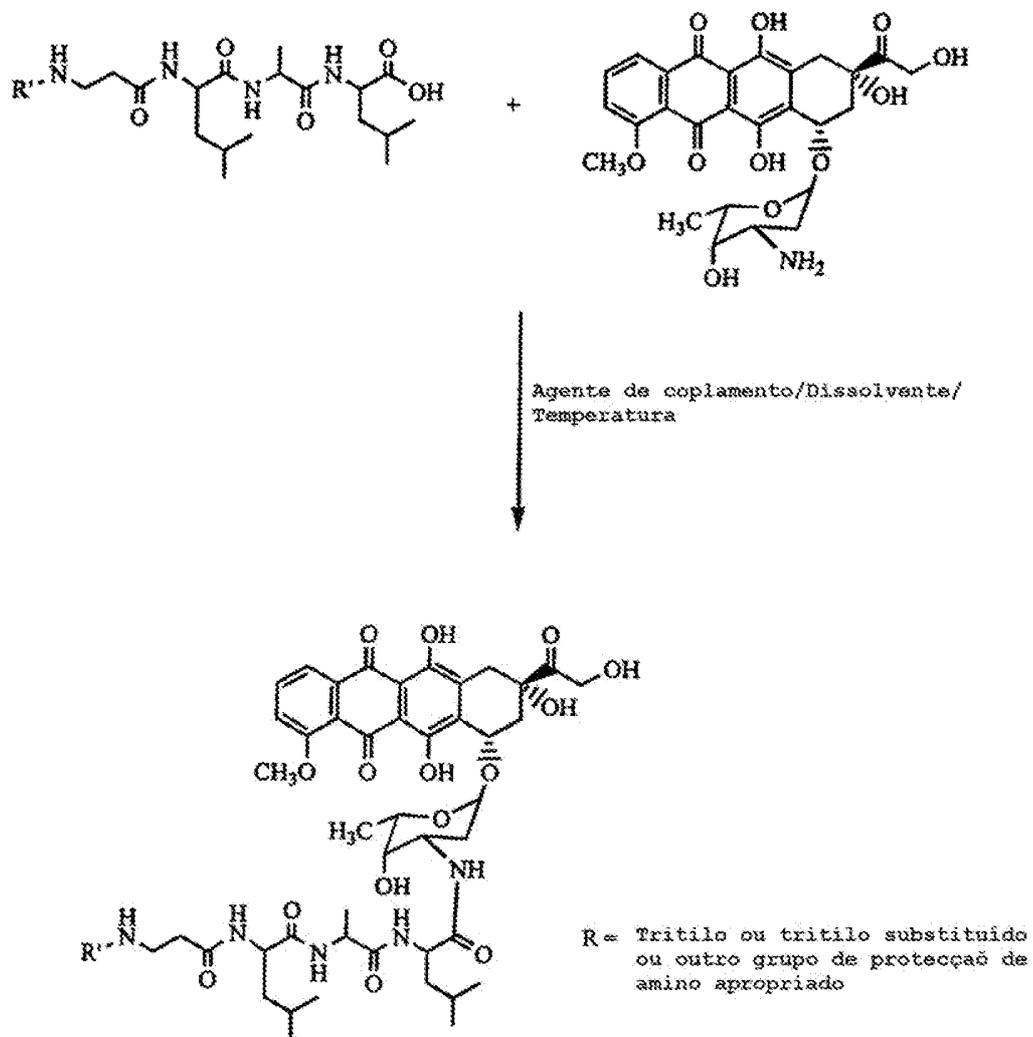


FIG. 7

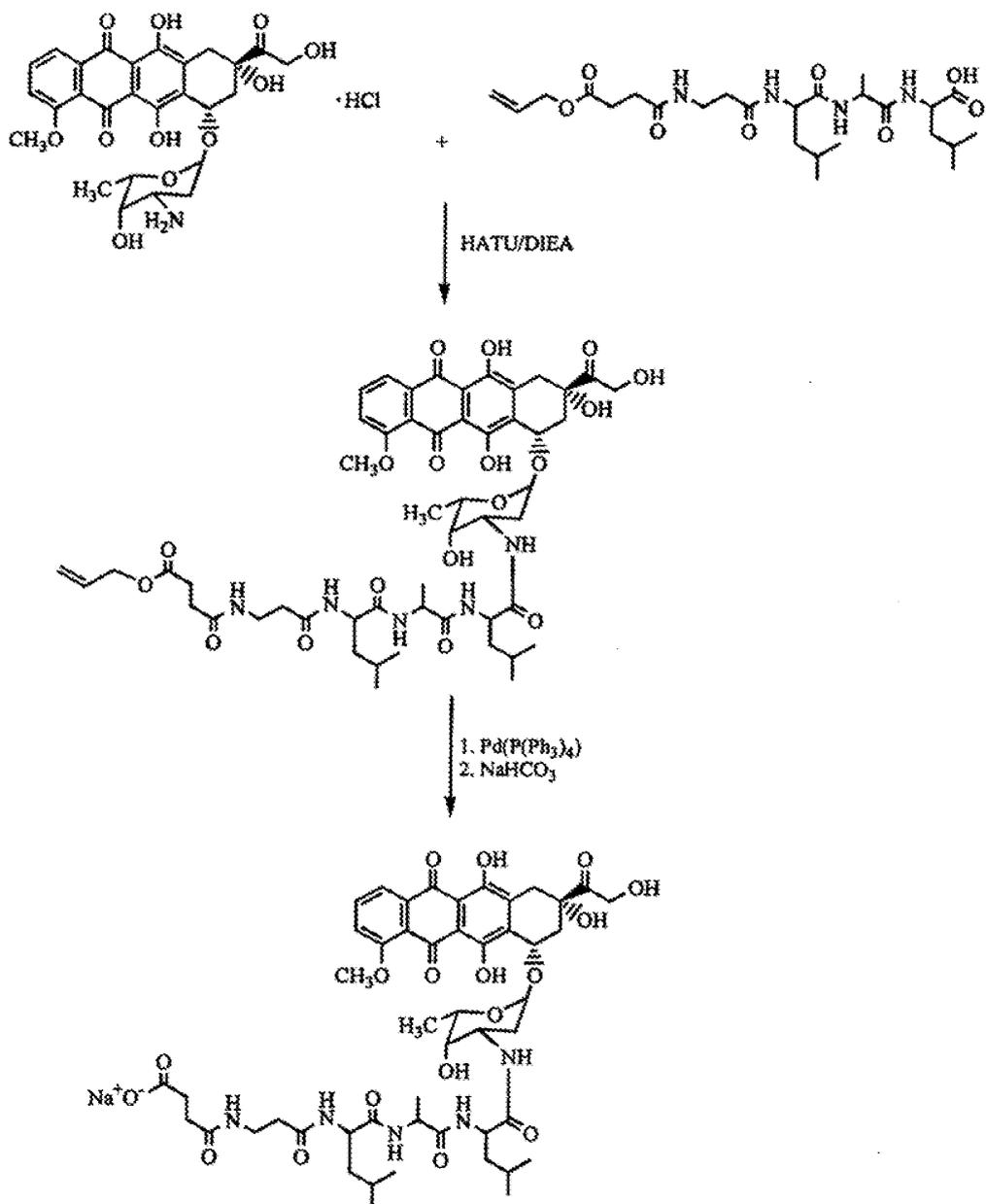


FIG. 8

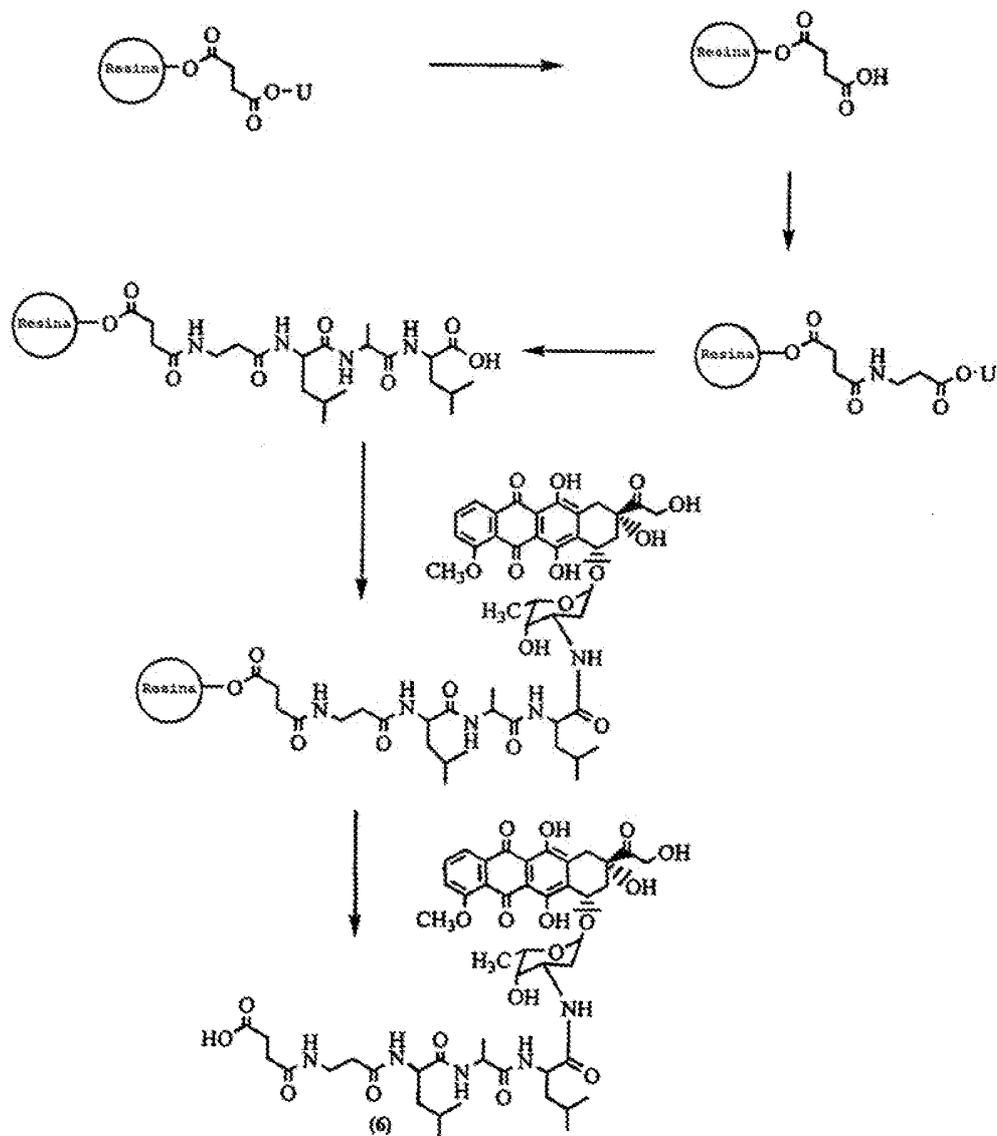


FIG. 9

No:	(AA ⁵)	(AA ⁴)	(AA ³)	(AA ²)	(AA ¹)	(AA ^{1'})	(AA ^{2'})	SEQ ID NO:
	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	
1	D-Ala	Thi	β Ala	β Ala	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 1
2	\emptyset	Thi	β Ala	β Ala	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 2
3	\emptyset	\emptyset	β Ala	β Ala	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 3
4	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Ala	Ala	Ile	SEQ ID NO: 4
5	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Ala	Ala	Leu	SEQ ID NO: 5
6	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Phe	Tyr	Leu	SEQ ID NO: 6
7	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Phe	Thr	Phe	SEQ ID NO: 7
8	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Phe	Gly	Ile	SEQ ID NO: 8
9	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Phe	Gly	Leu	SEQ ID NO: 9
10	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Phe	Phe	Phe	SEQ ID NO: 10
11	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Phe	Phe	Ile	SEQ ID NO: 11
12	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Phe	Phe	Leu	SEQ ID NO: 12
13	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Phe	Ala	Ile	SEQ ID NO: 13
14	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Phe	Ala	Leu	SEQ ID NO: 14
15	\emptyset	\emptyset	\emptyset	Thi	Gly	Ala	Leu	SEQ ID NO: 15
16	\emptyset	\emptyset	\emptyset	Nal	Gly	Ala	Leu	SEQ ID NO: 16
17	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Tyr	Leu	SEQ ID NO: 17
18	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Thi	Leu	SEQ ID NO: 18
19	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Thr	Phe	SEQ ID NO: 19
20	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Thr	Ile	SEQ ID NO: 20
21	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Thr	Leu	SEQ ID NO: 21
22	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Ser	Leu	SEQ ID NO: 22
23	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Pyr	Leu	SEQ ID NO: 23
24	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Leu	Leu	SEQ ID NO: 24
25	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Gly	Phe	SEQ ID NO: 25
26	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Gly	Ile	SEQ ID NO: 26
27	\emptyset	\emptyset	\emptyset	Thi	Leu	Gly	Leu	SEQ ID NO: 27
28	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Gly	Leu	SEQ ID NO: 28
29	\emptyset	\emptyset	\emptyset	Aib	Leu	Gly	Leu	SEQ ID NO: 29
30	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Phe	Ile	SEQ ID NO: 30
31	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Phe	Leu	SEQ ID NO: 31
32	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Aib	Leu	SEQ ID NO: 32
33	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Ala	Ala	SEQ ID NO: 33
34	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Ala	β Ala	SEQ ID NO: 34
35	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Ala	Phe	SEQ ID NO: 35
36	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Ala	Gly	SEQ ID NO: 36
37	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Ala	Ile	SEQ ID NO: 37
38	\emptyset	\emptyset	\emptyset	β Ala	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 38
39	\emptyset	\emptyset	\emptyset	Tic	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 39
40	\emptyset	\emptyset	\emptyset	Thz	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 40

FIG. 10A

No:	(AA ⁵)	(AA ⁶)	(AA ⁷)	(AA ⁸)	(AA ⁹)	(AA ¹⁰)	(AA ¹¹)	SEQ ID NO:
	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	
41	∅	∅	∅	Thi	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 41
42	∅	∅	∅	Nal	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 42
43	∅	∅	∅	NAA	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 43
44	∅	∅	∅	D-Leu	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 44
45	∅	∅	∅	D-Ala	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 45
46	∅	∅	∅	D-Met	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 46
47	∅	∅	∅	APP	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 47
48	∅	∅	∅	Amb	Leu	Ala	Leu	SEQ ID NO: 48
49	∅	∅	∅	βAla	Leu	Ala	Nal	SEQ ID NO: 49
50	∅	∅	∅	βAla	Leu	Ala	Ser	SEQ ID NO: 50
51	∅	∅	∅	βAla	Leu	Ala	Tyr	SEQ ID NO: 51
52	∅	∅	∅	βAla	Met	Tyr	Phe	SEQ ID NO: 52
53	∅	∅	∅	βAla	Met	Tyr	Leu	SEQ ID NO: 53
54	∅	∅	∅	βAla	Met	Gly	Ile	SEQ ID NO: 54
55	∅	∅	∅	Thi	Met	Gly	Leu	SEQ ID NO: 55
56	∅	∅	∅	βAla	Met	Phe	Phe	SEQ ID NO: 56
57	∅	∅	∅	βAla	Met	Phe	Ile	SEQ ID NO: 57
58	∅	∅	∅	Tic	Met	Ala	Leu	SEQ ID NO: 58
59	∅	∅	∅	Nal	Met	Ala	Leu	SEQ ID NO: 59
60	∅	∅	∅	NAA	Met	Ala	Leu	SEQ ID NO: 60
61	∅	∅	∅	βAla	Met	Ala	Leu	SEQ ID NO: 61
62	∅	∅	∅	APP	Met	Ala	Leu	SEQ ID NO: 62
63	∅	∅	∅	βAla	Nle	Tyr	Ile	SEQ ID NO: 63
64	∅	∅	∅	βAla	Nle	Tyr	Leu	SEQ ID NO: 64
65	∅	∅	∅	βAla	Nle	Thr	Ile	SEQ ID NO: 65
66	∅	∅	∅	βAla	Nle	Thr	Leu	SEQ ID NO: 66
67	∅	∅	∅	βAla	Nle	Gly	Phe	SEQ ID NO: 67
68	∅	∅	∅	βAla	Nle	Gly	Ile	SEQ ID NO: 68
69	∅	∅	∅	βAla	Nle	Gly	Leu	SEQ ID NO: 69
70	∅	∅	∅	βAla	Nle	Phe	Ile	SEQ ID NO: 70
71	∅	∅	∅	βAla	Nle	Ala	Ile	SEQ ID NO: 71
72	∅	∅	∅	βAla	Nle	Ala	Leu	SEQ ID NO: 72
73	∅	∅	∅	βAla	Nle	Ala	Phe	SEQ ID NO: 73
74	∅	∅	∅	βAla	Nva	Ala	Leu	SEQ ID NO: 74
75	∅	∅	∅	βAla	Phe	Tyr	Ile	SEQ ID NO: 75
76	∅	∅	∅	Thi	Pro	Gly	Leu	SEQ ID NO: 76
77	∅	∅	∅	Thi	Pro	Ala	Leu	SEQ ID NO: 77
78	∅	∅	∅	Nal	Pro	Ala	Leu	SEQ ID NO: 78
79	∅	∅	∅	βAla	Pro	Ala	Leu	SEQ ID NO: 79
80	∅	∅	∅	βAla	Phe(Cl)	Ala	Leu	SEQ ID NO: 80

FIG. 10B

No:	(AA ¹)	(AA ²)	(AA ³)	(AA ⁴)	(AA ⁵)	(AA ⁶)	(AA ⁷)	SEQ ID NO:
	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	
81	∅	∅	∅	βAla	Phe(NO ₂)	Ala	Ile	SEQ ID NO: 81
82	∅	∅	∅	βAla	Phe(NO ₂)	Ala	Leu	SEQ ID NO: 82
83	∅	∅	∅	βAla	Phg	Ala	Leu	SEQ ID NO: 83
84	∅	∅	∅	βAla	Pyr	Ala	Leu	SEQ ID NO: 84
85	∅	∅	∅	Tic	Thr	Gly	Leu	SEQ ID NO: 85
86	∅	∅	∅	βAla	Thi	Gly	Ile	SEQ ID NO: 86
87	∅	∅	∅	βAla	Thi	Ala	Leu	SEQ ID NO: 87
88	∅	∅	∅	βAla	Tic	Ala	Ile	SEQ ID NO: 88
89	∅	∅	∅	βAla	Tic	Ala	Leu	SEQ ID NO: 89
90	∅	∅	∅	βAla	Val	Ala	Leu	SEQ ID NO: 90
91	∅	∅	∅	βAla	Trp	Ala	Leu	SEQ ID NO: 91
92	∅	∅	∅	βAla	Tyr	Tyr	Phe	SEQ ID NO: 92
93	∅	∅	∅	βAla	Tyr	Tyr	Ile	SEQ ID NO: 93
94	∅	∅	∅	βAla	Tyr	Tyr	Leu	SEQ ID NO: 94
95	∅	∅	∅	βAla	Tyr	Thr	Leu	SEQ ID NO: 95
96	∅	∅	∅	βAla	Tyr	Phe	Leu	SEQ ID NO: 96
97	∅	∅	∅	βAla	Tyr	Gly	Ile	SEQ ID NO: 97
98	∅	∅	∅	Thi	Tyr	Gly	Leu	SEQ ID NO: 98
99	∅	∅	∅	βAla	Tyr	Gly	Leu	SEQ ID NO: 99
100	∅	∅	∅	βAla	Tyr	Phe	Ile	SEQ ID NO: 100
101	∅	∅	∅	βAla	Tyr	Ala	Ile	SEQ ID NO: 101
102	∅	∅	∅	Thi	Tyr	Ala	Leu	SEQ ID NO: 102
103	∅	∅	∅	βAla	Tyr	Ala	Leu	SEQ ID NO: 103

FIG. 10C

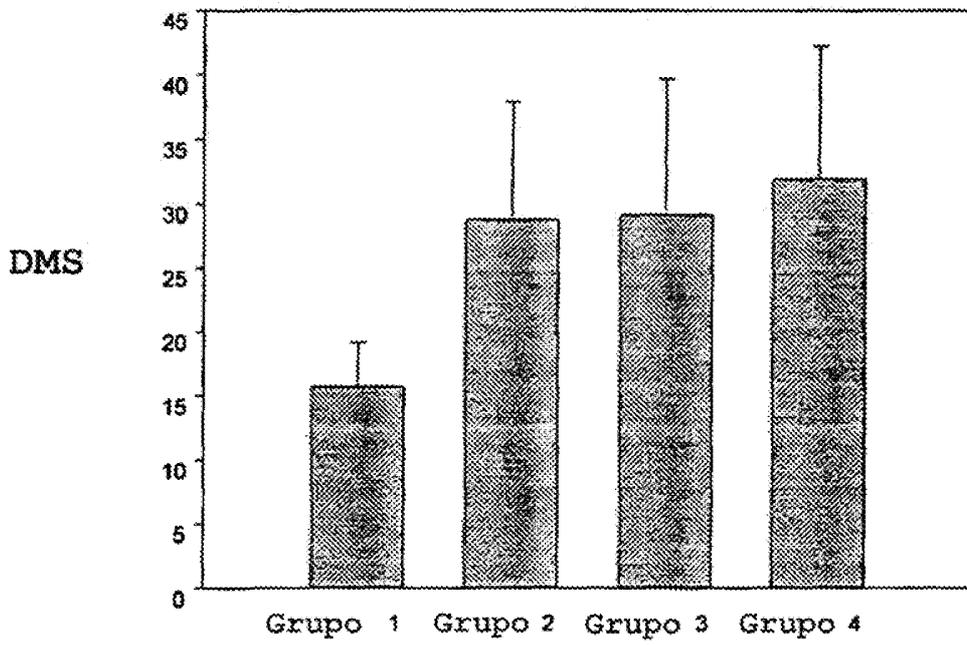


FIG. 11

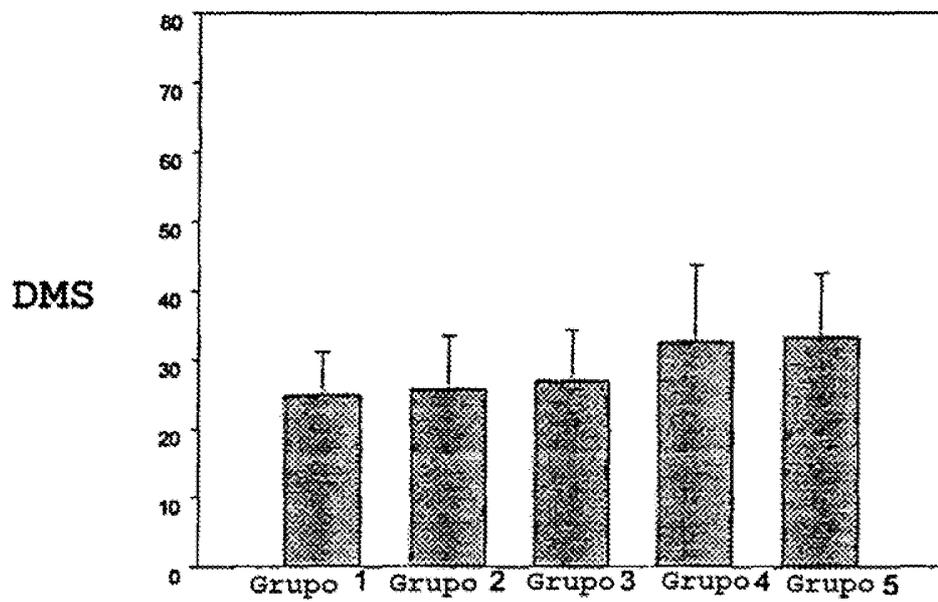


FIG. 12