República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0718651-7 B1

(22) Data do Depósito: 12/11/2007

(45) Data de Concessão: 02/06/2020

(54) Título: AMIDAS PEPTÍDICAS SINTÉTICAS

(51) Int.Cl.: C07K 5/107; C07K 7/02; A61K 38/07; A61K 38/08.

(30) Prioridade Unionista: 10/05/2007 US 60/928,550; 10/11/2006 US 60/858,109.

(73) Titular(es): CARA THERAPEUTICS, INC..

(72) Inventor(es): CLAUDIO D. SCHTEINGART; FREDERIQUE MENZAGHI; GUANGCHENG JIANG; ROBERTA VEZZA ALEXANDER; JAVIER SUEIRAS-DIAZ; ROBERT H. SPENCER; DEREK T. CHALMERS; ZHIYONG LUO.

(86) Pedido PCT: PCT US2007023858 de 12/11/2007

(87) Publicação PCT: WO 2008/057608 de 15/05/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/05/2009

(57) Resumo: AMIDAS PEPTÍDICAS SINTÉTICAS A invenção se refere a ligandos de amida peptídica sintética do receptor kappa opióide e particularmente a agonistas do receptor kappa opióide que exibem baixa inibição ao P450 CYP e baixa penetração no cérebro. As amidas peptídicas sintéticas da invenção estão em conformidade com a estrutura de fórmula 1: Esses compostos são úteis na profilaxia e tratamento de dor e inflamação associadas com uma variedade de doenças e condições.

AMIDAS PEPTÍDICAS SINTÉTICAS

PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório U.S. Série Nº 60/858,109, depositado em 10 de Novembro de 2006 e ao Pedido Provisório U.S. Série Nº 60/928,550, depositado em 10 de Maio de 2007, ambos os quais são aqui expressamente integralmente incorporados por citação.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção se refere a amidas peptídicas sintéticas que incorporam D-aminoácidos na cadeia peptídica e, mais particularmente, àquelas amidas peptídicas que são agonistas dos receptores kappa opióides e métodos para a sua utilização como agentes profiláticos e terapêuticos.

TÉCNICA ANTECEDENTE

Os receptores kappa opióides têm sido sugeridos como alvo para intervenção para o tratamento ou prevenção de uma ampla variedade de doenças e estados patológicos por meio da administração de agonistas dos receptores kappa opióides. Ver, por exemplo, Jolivalt *et al.*, *Diabetologia*, 49(11):2775-85; Epub 19 de Agosto de 2006), que descrevem a eficácia da asimadolina, um agonista dos receptores kappa opióides em neuropatia diabética em roedores; e Bileviciute-Ljungar *et al.*, *Eur. J. Pharm.* 494:139-46 (2004) que descrevem a eficácia do agonista kappa U-50,488 no modelo de lesão constritiva crônica do rato (CCI) de dor neuropática e o bloqueio dos seus efeitos pelo antagonista opióide, naloxona. Estas observações suportam a utilização dos agonistas dos receptores kappa opióides para o tratamento de dor neuropática diabética, viral e induzida por quimioterapia. Foi também analisada a utilização de

agonistas dos receptores kappa para tratamento ou prevenção de dor visceral incluindo estado ginecológicos, tais como cólicas dismenorreicas e endometriose. Ver, por exemplo, Riviere, *Br. J. Pharmacol.* 141:1331-4 (2004).

Os agonistas dos receptores kappa opióides também foram propostos para o tratamento da dor, incluindo hiperalgesia. Acredita-se que a hiperalgesia é causada por mudanças no ambiente do terminal sensorial periférico que ocorrem secundárias à lesão tecidular local. A lesão tecidular (por exemplo, abrasões, queimaduras) e a inflamação podem significar aumentos significativos na excitabilidade dos nociceptores polimodais (fibras C) e mecano-receptores de alto limiar (Handwerker *et al.* (1991) *Proceeding of the VIth World Congress on Pain*, Bond *et al.*, eds., Elsevier Science Publishers BV, pp. 59-70; Schaible *et al.* (1993) *Pain* 55:5-54). Acredita-se que esta aumentada excitabilidade e respostas exageradas de aferentes sensoriais estão subjacentes à hiperalgesia, onde a resposta de dor é o resultado de uma resposta exagerada a um estímulo. A importância do estado hiperalgésico no estado de dor pós-lesão foi demonstrada repetidamente e parece ser responsável por uma importante proporção do estado de dor pós-lesão/inflamatório. Ver, por exemplo, Woold *et al.* (1993) *Anesthesia and Analgesia* 77:362-79; Dubner *et al.* (1994) In, *Textbook of Pain*, Melzack *et al.*, eds., Churchill-Livingstone, Londres, pp. 225-242.

Os receptores kappa opióides foram sugeridos como alvos para a prevenção e o tratamento de doença cardiovascular. Ver, por exemplo, Wu *et al.* "Cardioprotection of Preconditioning by Metabolic

Inhibition in the Rat Ventricular Myocyte - Involvement of kappa Opioid Receptor" (1999) *Circulation Res* vol. 84: pp. 1388-1395. Ver também Yu *et al.* "Anti-Arrhythmic Effect of kappa Opioid Receptor Stimulation in the Perfused Rat Heart: Involvement of a cAMP-Dependent Pathway" (1999) *J Mol Cell Cardiol.* vol. 31(10): pp. 1809-1819.

Constatou-se também que o desenvolvimento ou o progresso destas doenças e estados patológicos envolvendo neurodegeneração ou morte de células neuronais pode ser evitado, ou pelo menos retardado, por meio de tratamento com agonistas dos receptores kappa opióide. Acredita-se que este resultado melhorado é devido à neuroproteção pelos agonistas dos receptores kappa opióides. Ver, por exemplo, Kaushik *et al.* "Neuroprotection in Glaucoma" (2003) *J. Postgraduate Medicine* vol. 49 (1): pp. 90-95.

A presença dos receptores kappa opióides em células imunes (Bidlak *et al.*, (2000) *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 7(5):719-723) foi implicada na ação inibidora de um agonista dos receptores kappa opióide, que demonstrou suprimir a expressão do HIV-1. Ver Peterson PK *et al.*, *Biochem Pharmacol.* 2001, 61(19):1145-51.

Walker, *Adv. Exp. Med. Biol.* 521:148-60 (2003) avaliou as propriedades anti-inflamatórias dos agonistas kappa para o tratamento de osteoartrite, artrite reumatóide, doença inflamatória do intestino e eczema. Bileviciute-Ljungar *et al.*, *Rheumatology* 45:295-302 (2006) descrevem a redução da dor e a degeneração em artrite induzida por adjuvante de Freund pelo agonista kappa U-50,488.

Wikstrom *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:3742-7 (2005) descrevem a utilização do agonista kappa, TRK-820 para o

tratamento de prurido urêmico e induzido por opiáceo, e Ko *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305:173-9 (2003) descrevem a eficácia do U-50.488 em prurido induzido por morfina em macacos.

A aplicação de opióides periféricos incluindo agonistas kappa para o tratamento de doenças gastrointestinais tem sido também amplamente analisada. Ver por exemplo, Lembo, *Diges. Dis.* 24:91-8 (2006) para uma discussão da utilização de opióides no tratamento de doenças digestivas, incluindo a síndrome do intestino irritável (IBS), íleo e dispepsia funcional.

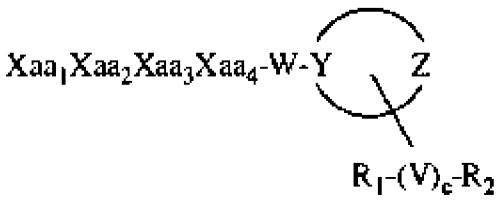
Foi também demonstrado que doenças oftálmicas, incluindo inflamação ocular e glaucoma podem ser tratadas por kappa opióides. Ver Potter *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309:548-53 (2004), que descrevem o papel do potente agonista dos receptores kappa opióides, bremazocina, na redução da pressão intra-ocular e o bloqueio deste efeito por norbinaltorfimina (norBNI), o antagonista prototípico dos receptores kappa opióides; e Dortch-Carnes *et al.*, *CNS Drug Rev.* 11(2):195-212 (2005). A Patente U.S. 6,191,126 de Gamache revela a utilização de agonistas kappa opióides para tratar a dor ocular. A dor ótica também demonstrou ser tratável pela administração de agonistas kappa opióides. Ver a Patente U.S. 6,174,878 também de Gamache.

Os agonistas kappa opióides aumentam a excreção renal de água e diminuem a excreção urinária de sódio (isto é, produzem uma diurese de água seletiva, também referida como aquarese). Muitos, mas não todos os investigadores atribuem este efeito à supressão da secreção de vasopressina da pituitária. Estudos comparando kappa opióides centralmente

atuantes e supostamente perifericamente seletivos levaram à conclusão de que os receptores kappa opióides na barreira sangue-cérebro são responsáveis pela mediação deste efeito. Outros investigadores propuseram tratar a hiponatremia com peptídeos nociceptina ou conjugados de peptídeos carregados que atuam perifericamente no receptor de nociceptina, que é relacionado mas é diferente do receptor kappa opióide. (D. R. Kapusta, *Life Sci.*, 60:15-21, 1997) (Pedido U.S. N° 5,840,696 e Pedido de Patente U.S. 20060052284.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece amidas peptídicas sintéticas que têm a fórmula I abaixo, e estereoisômeros, misturas de estereoisômeros, pró-fármacos, sais farmaceuticamente aceitáveis, hidratos, solvatos, hidratos de sal de ácido, N-óxidos e formas cristalinas isomórficas das amidas peptídicas sintéticas de fórmula I:



Fórmula I

Na fórmula I, Xaa_1 representa um aminoácido N-terminal que pode ser qualquer um de (A)(A')D-Phe, (A)(A')(α-Me)D-Phe, D-Tyr, ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, D-terc-leucina, D-neopentilglicina, D-fenilglicina, D-homofenilalanina, ou β(E)D-Ala, em que cada (A) e cada (A') são substituintes de anel fenil independentemente escolhidos de -H, -F, -Cl, $-NO_2$, $-CH_3$, $-CF_3$, -CN, e $-CONH_2$, e em que cada (E) é independentemente escolhido dos seguintes substituintes: ciclobutil,

ciclopentil, ciclohexil, piridil, tienil e tiazolil.

Xaa_2 é um segundo aminoácido que pode ser qualquer um de (A)(A')D-Phe, 3,4-dicloro-D-Phe, (A)(A')(α-Me)D-Phe, D-1-naftilalanina, D-2-naftilalanina, D-Tyr, (E)D-Ala ou D-Trp; em que (A), (A') e (E) são independentemente escolhidos dos substituintes listados acima para cada um de (A), (A') e (E).

Xaa_3 é um terceiro aminoácido que pode ser qualquer um D-norleucina, D-Phe, (E)D-Ala, D-Leu, (α-Me)D-Leu, D-homoleucina, D-Val, ou D-Met, em que (E) é independentemente escolhido dos substituintes listados acima para (E).

Xaa_4 é um quarto aminoácido que pode ser qualquer um de $(B)_2$D-arginina, $(B)_2$D-norarginina, $(B)_2$D-homoarginina, ζ-(B)D-homolisina, ácido D-2,3-diaminopropiônico, ε-(B)D-Lys, ε-$(B)_2$-D-Lys, D-aminometilfenilalanina, amidino-D-aminometil-fenilalanina, ácido γ-$(B)_2$D-γ-diamino butírico, δ-$(B)_2$α-(B')D-Orn, ácido D-2-amino-3(4-piperidil) propiônico, ácido D-2-amino-3(2-aminopirrolidil)propiônico, ácido D-α-amino-β-amidinopropiônico, ácido α-amino-4-piperidinaacético, ácido cis-α,4-diaminociclohexano acético, ácido trans-α,4-diaminociclohexanoacético, ácido cis-α-amino-4-metilaminociclohexano acético, ácido trans-α-amino-4-metilaminociclohexano acético, ácido α-amino-1-amidino-4-piperidinaacético, ácido cis-α-amino-4-guanidinociclohexano acético, ou ácido trans-α-amino-4-guanidinociclohexano acético, em que cada (B) é independentemente H ou C_1-C_4 alquila, e (B') é -H ou (α-Me);

A unidade de ligação, W pode ser qualquer uma das

seguintes três alternativas:

(i) Nulo, desde que quando W é nulo, Y é N e é ligado ao terminal C de Xaa_4 para formar uma amida (ii)-NH-$(CH_2)_b$- com b igual a zero, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6; ou (iii) -NH-(CH_2)C-O- com c igual a 2, ou 3, desde que Y é C. Em cada uma das alternativas anteriores, (ii) e (iii) o átomo N de W é ligado ao terminal C de Xaa_4 para formar uma amida.

A unidade



na fórmula I é uma unidade de anel heterocíclico de 4 a 8 membros opcionalmente substituída em que todos os heteroátomos de anel na unidade de anel são N, e em que Y e Z são cada um independentemente C ou N. No entanto, quando essa unidade de anel heterocíclico é um anel de seis, sete ou oito membros, Y e Z são separados por pelo menos dois átomos de anel. Além disso, quando essa unidade de anel heterocíclico tem um heteroátomo de anel único que é N, então a unidade de anel é não aromática.

A unidade V na fórmula I é C_1-C_6 alquila. O operador, e é zero ou 1, de modo que quando e é zero, então V é nulo e R_1 e R_2 são diretamente ligados aos mesmos átomos de anel ou diferentes.

Na primeira de quatro modalidades alternativas, a unidade R_1 na fórmula I pode ser qualquer um dos seguintes grupos: -H, -OH, halo, $-CF_3$, $-NH_2$, -COOH, C_1-C_6 alquila, amidina, amidina substituída em C_1-C_6 alquila, aril, heterociclil opcionalmente substituído, Pro-amida, Pro,

Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, CN, $CONH_2$, COR', SO_2R', CONR'R", NHCOR', OR', ou $SO_2NR'R"$; em que o heterociclil opcionalmente substituído é opcionalmente unicamente ou duplamente substituído com substituintes independentemente escolhidos de C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 alcoxi, oxo, -OH, -Cl, -F, $-NH_2$, $-NO_2$, -CN, -COOH, e amidina. As unidades R' e R" são independentemente H, C_1-C_8 alquila, aril, ou heterociclil. Alternativamente, R' e R" podem ser combinados para formar um anel de 4 a 8 membros, o referido anel é opcionalmente substituído unicamente ou duplamente com substituintes independentemente escolhidos de C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 alcoxi, -OH, -Cl, -F, $-NH_2$, $-NO_2$, -CN, -COOH e amidina. A unidade R_2 pode ser qualquer uma da -H, amidina, amidina substituída em C_1-C_6 alquila unicamente ou duplamente, -CN, $-CONH_2$, -CONR'R", -NHCOR', - $SO_2NR'R"$, ou —COOH.

Em uma segunda modalidade alternativa, as unidades R1 e R2 juntas, podem formar uma unidade de anel heterocíclico monocíclico ou bicíclico de 4 a 9 membros opcionalmente substituída que é ligada a um átomo de anel único da unidade de anel que contém Y e Z.

Em uma terceira modalidade alternativa, as unidades R_1 e R_2 juntas com um átomo de anel único da unidade de anel que contém Y e Z podem formar uma unidade de anel heterocíclico de 4 a 8 membros opcionalmente substituída para formar uma estrutura espiro.

Em uma quarta modalidade alternativa, as unidades R_1 e R_2 juntas com dois ou mais átomos de anel adjacentes da unidade de anel que contém Y e Z podem formar uma unidade de anel heterocíclico monocíclico ou bicíclico

opcionalmente substituída de 4 a 9 membros fundida à unidade de anel que contém Y e Z.

Na fórmula I, cada uma das unidades de anel heterocíclico opcionalmente substituídas de 4, 5, 6, 7, 8 e 9 membros que compreende R_1 e R_2 pode ser unicamente ou duplamente substituída com substituintes independentemente escolhidos de C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 alcoxi, fenil opcionalmente substituído, oxo, -OH, -Cl, -F, $-NH_2$, $-NO_2$, -CN, -COOH e amidina. Além disso, quando a unidade de anel que contém Y e Z de fórmula I é um anel de seis ou sete membros que tem um heteroátomo de anel único, e e é zero, então R_1 não pode ser -OH, e R_1 e R_2 não são -H.

Quando a unidade de anel que contém Y e Z na fórmula I é um anel de seis membros em que há dois heteroátomos de anel em que tanto Y quanto Z são N, e W é nulo, então a unidade $-(V)_eR_1R_2$ é anexada a um átomo de anel diferente de Z. Além disso, sob as condições anteriores, se e é zero, então R_1 e R_2 não podem ser -H. Enfim, quando Xaa_3 é D-Nle, então Xaa_4 não pode ser $(B)_2$D-Arg; e quando Xaa_3 é D-Leu ou (αMe)D-Leu, então Xaa_4 não pode ser δ-$(B)_2\alpha$-(B')D-Orn.

A invenção também proporciona um agonista de receptor kappa opióide selectivo (intercambiavelmente designado aqui como agonista de receptor kappa ou simplesmente agonista kappa), o qual é uma amida peptídica sintética da invenção, como descrito em cima.

A invenção também fornece uma composição farmacêutica, que inclui uma amida peptídica sintética da invenção e um diluente, excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

Também é fornecido um método para tratar ou prevenir

uma doença ou patologia associada ao receptor kappa opióide em um mamífero. O método inclui a administração ao mamífero de uma composição que inclui uma quantidade efectiva de uma amida peptídica sintética da invenção. A invenção também fornece usos das amidas peptídicas sintéticas da invenção para a preparação de medicamentos e composições farmacêuticas para o tratamento de doenças ou patologias associadas ao receptor kappa opióide em um mamífero.

A invenção proporciona ainda um método para tratar ou prevenir uma doença ou patologia associada ao receptor kappa opióide em um mamífero, em que uma amida peptídica sintética da invenção é co-administrada com uma dose reduzida de um composto analgésico de agonista opióide mu para produzir um efeito analgésico terapêutico tendo o composto analgésico de agonista opióide mu um efeito secundário associado (especialmente depressão respiratória, sedação, euforia, anti-diurese, náusea, vómitos, obstipação e tolerância física, dependência e adição). A dose reduzida do composto analgésico de agonista opióide mu administrada por esse método tem efeitos secundários associados inferiores do que os efeitos secundários associados à dose do composto analgésico de agonista opióide mu necessário para atingir o mesmo efeito analgésico terapêutico quando administrado individualmente.

A invenção também fornece um método para tratar ou prevenir a hiperalgesia periférica, em que o método inclui a aplicação tópica ou administração local em um mamífero em necessidade de tratamento, de uma quantidade eficaz de uma composição que inclui uma quantidade eficaz anti-hiperalgésica de uma amida peptídica sintética da invenção

em um veículo formulado para aplicação tópica ou administração local.

A invenção também fornece um método para tratar ou prevenir a hiponatremia ou hipocalemia, e desse modo tratar ou prevenir uma doença ou patologia associada à hiponatremia ou hipocalemia, tal como enfarte congestivo, cirrose hepática, síndrome nevrótico, hipertensão ou edema e de preferência quando secreção de vasopressão aumentada está associada a tal doença ou perturbação, em que o método inclui a administração a um mamífero de uma quantidade aquareticamente eficaz de uma amida peptídica sintética da invenção em um diluente, excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Mostra o esquema geral usado na síntese de derivados dos compostos (1), (6), (7), (10) e (11). As etapas a - s foram realizadas com os seguintes reagentes ou condições: a) homopiperazina, DCM; b) Fmoc-D-Dap(ivDde)-OH or Fmoc-D-Dab(ivDde)-OH or Fmoc-D-Orn(Aloc)-OH ou Fmoc-D-Orn(Cbz)-OH ou Fmoc-D-Lys(Dde)-OH ou Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, DIC, HOBt, DMF; c) 25% de piperidina em DMF; d) Fmoc-D-Leu-OH ou Fmoc-D-Nle-OH, DIC, HOBt, DMF; e) Fmoc-D-Phe-OH, DIC, HOBt, DMF; f) Cbz-D-Phe-OH, DIC, HOBt, DMF; g) 4% de hidrazina em DMF; h) $Pd(PPh_3)_4$, $CHCl_3$/AcOH/NMM; i) O-NBS-Cl, colidina, NMP; j) dimetilsulfato, DBU, NMR; k) mercaptoetanol, DBU, NMP; l)Cbz-OSu, DMF; m) acetona, AcOH, $NaBH(OAc)_3$, TMOF; n) 1H-pirazole-1-carboxamidina, DIEA, DMF; o) 50% de TFA/DCM; p) S-Metil-N-metilisotioréia hidroiodida, DIEA, DMF; q) 2-metiltio-2-imidazolina hidroiodida, DIEA, DMF; r) iodoetano, DIEA, DMF; s)

TMSOTf/TFA/m-cresol.

Figura 2: Esquema geral usado na síntese de compostos (2) - (5), (8), (9) e (12) - (14). Etapas a — k foram realizadas com os seguintes reagentes ou condições: a) N-(1-Fmoc-piperidin-4-il)-L-prolina, DIEA, DCM; b) 25% piperidina/DMF; c) Fmoc-D-Lys(Dde)-OH, DIC, HOBt, DMF; d) Fmoc-D-Leu-OH, DIC, HOBt, DMF; e) Fmoc-D-Phe-OH, DIC, HOBt, DMF; f) Boc-D-Phe-OH, DIC, HOBt, DMF; g) 4% hidrazina em DMF; h) o-NBS-Cl, colidina, NMP; i) dimetilsulfato, DBU, NMP; j) mercaptoetanol, DBU, NMP; k) TFA/TIS/H_2O.

Figura 3: Esquema geral usado na síntese de compostos (15)-(24). Etapas a — n foram realizadas com os seguintes reagentes ou condições: a) 35% piperidina, DMF; b) ácido 1-Boc-4-N-Fmoc-amino-piperidina-4-carboxílico, PyBOP, DIEA, DMF; c) (i) 35% piperidina, DMF; (ii) O-NBS-Cl, colidina, NMP; d) 30% TFA em DCM; e) Boc-D-Dap(Fmoc)-OH ou Boc-D-Dab(Fmoc)-OH ou Boc-DOrn(Fmoc)-OH, PyBOP, DIEA, DMF; f) Boc-D-Leu-OH, PyBOP, DIEA, DMF; g) Boc-D-Phe-OH, PyBOP, DIEA, DMF; h) Boc-D-Phe-OH, PyBOP, DIEA, DMF; i) 2% DBU/DMF; j) 1H-pirazol-1-carboxamidina, DIEA, DMF; k) (i) acetona, TMOF, (ii) $NaBH(OAc)_3$, DMF; l) mercaptoetanol, DBU, NMP; m) $Cu(OAc)_2$, Piridina, DBU, DMF/H_2O; n) 95% TFA/H_2O.

Figura 4: Esquema geral usado na síntese de compostos (25)-(37). Etapas a — h foram realizadas com os seguintes reagentes ou condições: a) EDCI, HOBt, DIEA, THF; b) TFA, DCM; c) Boc-D-Phe-OH, EDCI, HOBt, DIEA; d) H_2, Pd/C; e) D-Lys(Boc)-OAll, TBTU, DIEA, DMF; f) $Pd(PPh_3)_4$, pirrolidina; g) HNRaRb, HBTU; h) HCl, dioxano.

Figura 5: Concentração detectada no plasma e cérebro

de ratos após administração de 3 mg/kg de composto (2) por um período de infusão de 5 minutos através de um cateter na veia jugular. Concentração de composto (2) em ng/ml: círculos abertos: plasma, círculos sólidos: cérebro.

Figura 6: Concentrações plasmáticas de composto (6) após administração subcutânea de um bolo único de 1 mg/kg do composto a camundongos ICR. Foi feita amostra de plasma em 5, 10, 15, 20, 30 60, 90 120, e 180 minutos após a injeção.

Figura 7: Concentrações plasmáticas de composto (3) depois de administração intravenosa de um bolo único de 0,56 mg/kg do composto a macacos cynomolgus. Foi feita amostra de plasma em 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120, e 240 minutos após a injeção.

Figura 8: Curvas dose-resposta para composto (3) em camundongos ICR no ensaio de contorção induzida por ácido acético (círculos sólidos) e no ensaio de locomoção (quadrados sólidos).

Figura 9: Dose resposta de supressão mediada por composto (2) de contorção induzida por ácido acético em camundongos quando liberado pela via intravenosa.

Figura 10: Efeitos do composto (2) sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pela laqueadura do nervo espinhal L5/L6 em ratos. Círculos abertos - veículo isoladamente; Círculos sólidos — composto (2) a 0,1 mg/kg; quadrados abertos - composto (2) a 0,3 mg/kg; quadrados sólidos - composto (2) a 1,0 mg/kg. ** denota $p < 0,01$; *** denota $p < 0,001$ vs. Veículo (ANOVA de 2 vias, Bonferroni).

Figura 11: Efeito do Composto (2) em diferentes concentrações sobre hipersensibilidade abdominal induzida

por pancreatite em ratos. Cloridrato de dibutilina ou veículo isoladamente foi administrado por via intravenosa e hipersensibilidade foi avaliada por teste abdominal com um filamento de von Frey em intervalos de 30 minutos. A hipersensibilidade é expressa como número de retiradas dos dez testes. Círculos abertos — veículo isolado; círculos sólidos — composto (2) a 0,1 mg/kg; quadrados abertos - composto (2) a 0,3 mg/kg; quadrados sólidos - composto (2) a 1,0 mg/kg. ** denota $p < 0,01$; *** denota $p < 0,001$ vs. Veículo (ANOVA de 2 vias, Bonferroni).

Figura 12: Bloqueio do efeito do composto (2) sobre hipersensibilidade abdominal induzida por pancreatite por nor-BNI e metiodeto de naloxona em ratos. Coluna aberta— veículo isolado, coluna sólida— composto (2) a 1 mg/kg com metiodeto de naloxona ou norBNI como indicado. *** denota $p < 0,001$ vs. Veículo + Veículo (ANOVA de 2 vias, Bonferroni).

DESCRIÇÃO DETALHADA

Conforme utilizado por toda esta memória descritiva, o termo “amida peptídica sintética” significa um composto da invenção de acordo com a fórmula I, ou um seu estereoisômero, mistura de estereoisômeros, pró-droga, sal, hidrato, solvato, hidrato de sal ácido, N-óxido ou forma cristalina isomórfica farmaceuticamente aceitáveis. Quando ss designações Xaa_1, Xaa_2, Xaa_3 e Xaa_4 especificam D aminoácidos nas amidas peptídicas sintéticas da invenção, os estereoisômeros das amidas peptídicas da invenção de acordo com a fórmula I são limitados àqueles compostos que têm aminoácidos na configuração D onde especificado na Fórmula I. Os estereoisômeros das amidas peptídicas

sintéticas da invenção incluem compostos que têm a configuração D ou L nos centros quirais que não sejam os carbonos alfa dos quatro aminoácidos Xaa_1, Xaa_2, Xaa_3 e Xaa_4. O termo "misturas de estereoisômeros" se refere a misturas destes estereoisômeros da invenção. Conforme aqui utilizado, "racematos" se referem a misturas de estereoisômeros que têm proporções iguais de compostos com configurações D e L em um ou mais dos centros quirais que não sejam os carbonos alfa de Xaa_1, Xaa_2, Xaa_3 e Xaa_4 sem variar a quiralidade dos carbonos alfa de Xaa_1, Xaa_2, Xaa_3 e Xaa_4.

A nomenclatura utilizada para aqui definir os peptídeos é especificada por Schroder & Lubke, *The Peptides*, Academic Press, 1965, onde, de acordo com representação convencional, o N-terminal aparece à esquerda e o C-terminal à direita. Onde o resíduo de aminoácido tem formas isoméricas, tanto a forma de isômero L como a forma de isômero D do aminoácido pretendem ser cobertas, salvo indicação em contrário. Os aminoácidos são, em geral, aqui identificados pelo código padrão de três letras. O isômero D de um aminoácido é especificado pelo prefixo "D-" como em "D-Phe" que representa D-fenilalanina, o isômero D de fenilalanina. De modo semelhante, o isômero L é especificado pelo prefixo "L-" como em "L-Phe." Os peptídeos são aqui representados de acordo com a convenção habitual como seqüências de aminoácidos da esquerda para a direita: N-terminal para C-terminal, salvo especificação em contrário.

Conforme aqui utilizado, D-Arg representa D-arginina, D-Har representa D-homoarginina, que tem um grupo metileno

de cadeia lateral mais longo do que D-Arg e D-Nar representa D-norarginina, que tem um grupo metileno de cadeia lateral mais curto do que D-Arg. De modo semelhante, D-Leu significa D-leucina, D-Nle significa D-norleucina e D-Hle representa D-homoleucina. D-Ala significa D-alanina, D-Tyr significa D-tirosina, D-Trp significa D-triptofano e D-Tic significa ácido D-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-3-carboxílico. D-Val significa D-valina e D-Met significa D-metionina. D-Pro significa D-prolina, Pro-amida significa a forma D ou L de prolina amida. D-Pro amida representa D-prolina com uma amida formada na sua unidade carboxi onde o nitrogênio da amida pode estar substituído por alquila, como em $-NR_aR_b$, onde R_a e R_b são, cada um independentemente um grupo C_1-C_6 alquila, ou um de R_a e R_b é -H. Gly significa glicina, D-Ile significa D-isoleucina, D-Ser significa D-serina e D-Thr significa D-treonina. (E)D-Ala significa o isômero D de alanina que está substituído pelo substituinte (E) no carbono β. Exemplos deste grupo substituinte (E) incluem ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila, piridila, tienila e tiazoil. Deste modo, ciclopentil-D-Ala significa o isômero D de alanina que está substituído por ciclopentila no carbono β. De modo semelhante, D-Ala(2-tienil) e (2-tienil)D-Ala são intercambiáveis e ambos significam o isômero D de alanina substituído no carbono β por tienila que está ligada na posição 2 do anel.

Conforme aqui utilizado, D-Nal significa o isômero D de alanina substituído por naftila no carbono β. D-2Nal significa D-alanina substituída por naftila onde a ligação ao naftaleno é na posição 2 na estrutura do anel e D-1Nal significa D-alanina substituída por naftila onde a ligação

ao naftaleno é na posição 1 na estrutura do anel. (A)(A')D-Phe significa D-fenilalanina substituída no anel fenila com um ou dois substituintes independentemente selecionados de halogênio, nitro, metila, halometila (tal como, por exemplo, trifluorometila), per-halometila, ciano e carboxamida. D-(4-F)Phe significa D-fenilalanina que está substituída por flúor na posição 4 do anel fenila. D-(2-F)Phe significa D-fenilalanina que está substituída por flúor na posição 2 do anel fenila. D-(4-Cl)Phe significa D-fenilalanina que está substituída por cloro na posição 4 do anel fenila. (α-Me)D-Phe significa D-fenilalanina que está substituída por metila no carbono alfa. (α-Me)D-Leu significa D-leucina que está substituído por metila no carbono alfa.

As designações $(B)_2$D-Arg, $(B)_2$D-Nar e $(B)_2$D-Har representam D-arginina D-norarginina e D-homoarginina, respectivamente, tendo cada uma dois grupos substituintes (B) na cadeia lateral. D-Lys significa D-lisina e D-Hlys significa D-homolisina. ζ-(B)D-Hlys, ε-(B)D-Lys e ε-$(B)_2$-D-Lys representam D-homolisina e D-lisina cada uma tendo o grupo amino da cadeia lateral substituído com um ou dois grupos substituintes (B), conforme indicado. D-Orn significa D-ornitina e δ-(B)α-(B')D-Orn significa D-ornitina substituída com (B') no carbono alfa e substituída com (B) no grupo δ-amino da cadeia lateral.

D-Dap significa ácido D-2,3-diaminopropiônico. D-Dbu representa o isômero D do ácido alfa, gama-diamino butírico e $(B)_2$D-Dbu representa o ácido alfa, gama-diamino butírico que está substituído com dois grupos substituintes (B) no grupo gama amino. Salvo declarado em contrário, cada um dos

grupos (B) destes resíduos substituídos duas vezes é independentemente selecionado de H- e C_1-C_4-alquila. Conforme aqui utilizado, D-Amf significa D-(NH_2CH_2-)Phe, isto é, o isômero D fenilalanina substituída com aminometila no seu anel fenila e D-4Amf representa o D-Amf específico ao qual a aminometila está ligada na posição 4 do anel. D-Gmf significa D-Amf(amidina) que representa D-Phe onde o anel fenila está substituído com $-CH_2NHC(NH)NH_2$. Amd representa amidina,$-C(NH)NH_2$ e as designações (Amd)D-Amf e D-Amf(Amd) são também usadas de forma intercambiável para D-Gmf. As designações Ily e Ior são utilizadas, respectivamente, para significar isopropil Lys e isopropil Orn, onde o grupo amino da cadeia lateral é alquilado com um grupo isopropila.

Alquila significa um radical alcano que pode ser um grupo alquilo linear, ramificado e cíclico tal como, mas não limitado a metila, etila, propila, isopropila, ciclopropila, butila, t-butila, sec-butila, pentila, ciclopentila, hexila, ciclo-hexila, ciclo-hexiletila. C_1 a C_8 alquila se refere a grupos alquila que têm entre um e oito átomos de carbono. De modo semelhante C_1-C_6 alquila se refere a grupos alquila que têm entre um e seis átomos de carbono. Do mesmo modo, C_1-C_4 alquila se refere a grupos alquila que têm entre um e quatro átomos de carbono. Alquila de cadeia curta significa C_1-C_6 alquila. Me, Et, Pr, Ipr, Bu e Pn são usados de forma intercambiável para representar os grupos alquila comuns: metila, etila, propila, isopropila, butila e pentila, respectivamente. Embora a ligação para um grupo alquila seja tipicamente em uma extremidade da cadeia alquila, a ligação pode ser em

outra parte da cadeia, por exemplo, 3-pentila que também pode ser referida como etilpropila ou 1-etilprop-1-ila. Substituída em alquila, tal como amidina substituída em C_1 a C_6 alquila, indica que a unidade relevante está substituída com um ou mais grupos alquila.

Onde uma unidade especificada é nula, a unidade está ausente e se esta unidade está indicada para ser ligada a duas outras unidades, estas duas outras unidades são conectadas por uma ligação covalente. Onde uma unidade de ligação é aqui apresentada como ligada a um anel em qualquer posição no anel, e ligada a duas outras unidades, tais como R_1 e R_2, no caso onde a unidade de ligação é especificada para ser nula, então as R_1 e R_2 podem ser, cada uma independentemente ligadas a qualquer posição no anel.

Os termos "heterociclo", "anel heterocíclico" e "heterociclila" são aqui usados de forma intercambiável e se referem a um anel ou unidade de anel que tem pelo menos um átomo não-carbono no anel, também chamado de heteroátomo, que pode ser um átomo de nitrogênio, de enxofre ou de oxigênio. Onde um anel é especificado como tendo um certo número de membros, o número define o número de átomos do anel sem referência a quaisquer substituintes ou átomos de hidrogênio ligados aos átomos do anel. Heterociclos, anéis heterocíclicos e unidades heterociclilas podem incluir heteroátomos múltiplos independentemente selecionados de um átomo de nitrogênio, enxofre ou oxigênio no anel. Os anéis podem estar substituídos em qualquer posição disponível. Por exemplo, mas sem limitação, anéis com 6 e 7 membros estão muitas

vezes substituídos na posição 4 do anel e anéis com 5 membros estão freqüentemente substituídos na posição 3, onde o anel é ligado à cadeia amido peptídica na posição 1 do anel.

O termo 'saturado' se refere a uma ausência de ligações duplas ou triplas e a utilização do termo em relação aos anéis descreve anéis que não têm ligações duplas ou triplas dentro do anel, mas não exclui ligações duplas ou triplas presentes nos substituintes ligados ao anel. O termo "não-aromático" se refere no contexto de um anel em particular a uma ausência de aromaticidade naquele anel, mas não exclui a presença de ligações duplas dentro do anel, incluindo ligações duplas que são parte de um anel aromático fundido ao anel em questão. Um átomo do anel de uma unidade de anel heterocíclico saturado também não é excluído de ligação dupla a um átomo que não é do anel, tal como, por exemplo um átomo de enxofre do anel com ligação dupla a um átomo de oxigênio substituinte. Conforme aqui utilizado, heterociclos, anéis heterocíclicos e unidades heterociclilas também incluem anéis saturados, parcialmente insaturados e heteroaromáticos e estruturas de anel bicíclico fundido, salvo especificado em contrário. Um heterociclo, anel heterocíclico ou unidade heterociclila podem ser fundidos a um segundo anel, que pode ser um anel saturado, parcialmente insaturado ou aromático, cujo anel pode ser um heterociclo ou um carbociclo. Onde indicado, dois substituintes podem opcionalmente ser tomados em conjunto para formar um anel adicional. Os anéis podem estar substituídos em qualquer posição disponível. Um heterociclo, anel heterocíclico ou unidade heterociclila

podem, quando indicado, estar opcionalmente substituídos em uma ou mais posições do anel com um ou mais substituintes independentemente selecionados, tais como, por exemplo, C_1-C_6 alquila, C_3-C_8 cicloalquila, C_1-C_6 alcoxi, halo C_1-C_6 alquila, fenila opcionalmente substituída, arila, heterociclila, oxo, -OH, -Cl, -F, $-NH_2$, $-NO_2$, -CN, -COOH e amidina. Substituintes opcionais adequados do substituinte fenila incluem, por exemplo, mas sem limitação, um ou mais grupos selecionados de C_1-C_3 alquila, C_1-C_3 alcoxi, halo C_1-C_3 alquila, oxo, -OH, -Cl, -F, $-NH_2$, $-NO_2$, -CN, -COOH e amidina.

D-Phe e D-Phe substituído são exemplos de um aminoácido adequado para o resíduo Xaa_1 na Fórmula I. O anel fenila pode estar substituído em qualquer das posições 2, 3 e/ou 4. Exemplos específicos de substituições permitidas incluem, por exemplo, cloro ou flúor nas posições 2 ou 4. Além disso, o carbono alfa pode ser metilado. Outros resíduos equivalentes que representam mudanças conservadoras para D-Phe também podem ser utilizados. Estes incluem D-Ala(ciclopentil), D-Ala(tienil), D-Tyr e D-Tic. O resíduo na segunda posição, Xaa_2 também pode ser D-Phe ou D-Phe substituído com substituições que incluem um substituinte no carbono na posição 4 do anel fenila ou nas posições 3 e 4. Alternativamente, Xaa_2 pode ser D-Trp, D-Tyr ou D-alanina substituída por naftila. O resíduo na terceira posição, Xaa_3 pode ser qualquer resíduo de aminoácido não-polar, tal como, por exemplo, D-Nle, D-Leu, (α-Me)D-Leu, D-Hle, D-Met ou D-Val. No entanto, D-Ala(ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila ou ciclo-hexila) ou D-Phe também podem ser

usados como Xaa_3. O resíduo na quarta posição Xaa_4 pode ser qualquer resíduo de aminoácido carregado positivamente, tal como, por exemplo, D-Arg e D-Har, que podem estar opcionalmente substituídos com grupos alquila de cadeia curta, tal como um ou dois grupos etila. Alternativamente, D-Nar e quaisquer outros resíduos equivalentes podem ser utilizados, tais como, por exemplo, D-Lys ou D-Orn (qualquer um dos quais pode ser grupo ω-amino alquilado, por exemplo, por grupos metila ou isopropila ou metilado no grupo carbono □). Além disso, D-Dbu, D-4-Amf (que podem estar opcionalmente substituídos com amidina) e D-Hlys são também aminoácidos adequados nesta posição.

Os compostos da invenção contêm um ou mais centros quirais, cada um dos quais tem duas disposições espaciais tridimensionais (configurações) possíveis dos quatro substituintes à volta do átomo de carbono central. Estes são conhecidos como e*stereoisômeros*, e mais especificamente como *enantiômeros* (todos os centros quirais invertidos) ou *diastereoisômeros* (dois ou mais centros quirais, pelo menos um centro quiral permanecendo o mesmo). Em uma modalidade específica da invenção, os aminoácidos que constituem a estrutura de base tetrapeptídica, $Xaa_1Xaa_2Xaa_3Xaa_4$ são especificados para serem D-aminoácidos, isto é, a configuração oposta daqueles geralmente encontrados em mamíferos. Referência a estereoisômeros das amidas peptídicas sintéticas da invenção se refere a centros quirais a não ser os carbonos alfa dos D-aminoácidos que constituem Xaa_1-Xaa_4. Deste modo, os estereoisômeros das amidas peptídicas sintéticas que são modalidades da invenção onde cada de Xaa_1-Xaa_4 são especificados para

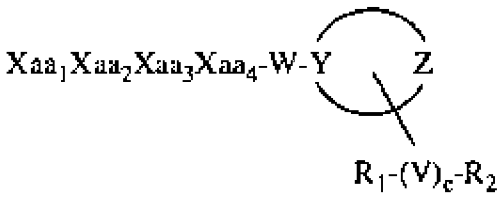
serem D-aminoácidos, não incluem L-aminoácidos ou misturas racêmicas dos aminoácidos nestas posições. De modo semelhante, referência aos racematos aqui se refere a um centro a não ser os carbonos alfa dos D-aminoácidos que constituem Xaa_1-Xaa_4. Os centros quirais nas amidas peptídicas sintéticas da invenção para os quais um estereoisômero pode tomar a configuração R ou S inclui os centros quirais na unidade ligada ao carboxi-terminal de Xaa_4, e também os centros quirais em quaisquer substituintes da cadeia lateral do aminoácido de Xaa_1-Xaa_4.

As amidas peptídicas sintéticas da invenção aqui descritas (também referidas de forma intercambiável como compostos de amida peptídica sintética, compostos da invenção, composto (número), ou simplesmente "os compostos") podem ser utilizadas ou preparadas de formas alternativas. Por exemplo, muitos compostos contendo amino podem ser utilizados ou preparados como um sal ácido. Muitas vezes estes sais melhoram as propriedades de isolamento e manipulação do composto. Por exemplo, dependendo dos reagentes, condições de reação e outros, os compostos, tais como as amidas peptídicas sintéticas aqui descritas, podem ser utilizados ou preparados, por exemplo, como os sais cloridrato ou tosilato. Formas cristalinas isomórficas, todas as formas quirais e racêmicas, N-óxido, hidratos, solvatos e hidratos de sal ácido são também contempladas como pertencendo ao âmbito da presente invenção.

Certas amidas peptídicas ácidas ou básicas da presente invenção podem existir como zwitterions. Todas as formas destes compostos de amida peptídica sintética, incluindo

ácido livre, base livre e zwitterions, são contempladas como pertencendo ao âmbito da presente invenção. É bem sabido na técnica que os compostos contendo ambos os grupos amino e carboxila muitas vezes existem em equilíbrio com a suas formas zwitteriônicas. Deste modo, para qualquer composto aqui descrito que contenha, por exemplo, ambos os grupos amino e carboxila, também será entendido que inclui o zwitterion correspondente.

Em certas modalidades as amidas peptídicas sintéticas da invenção estão de acordo com a Fórmula I:



Fórmula I

Em tais modalidades Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4 é uma unidade de tetrapeptídeo em que Xaa_1 é o aminoácido no terminal amino, que pode ser (A)(A')D-Phe, (A)(A')(α-Me)D-Phe, D-Tyr, D-Tic, D-terc-leucina, D-neopentilglicina, D-fenilglicina, D-homofenilalanina, ou β-(E)D-Ala, em que cada (A) e cada (A') são substituintes de anel fenil independentemente selecionados de -H, -F, -Cl, $-NO_2$, - CH_3, $-CF_3$, -CN, e $-CONH_2$, e (E) é selecionado de qualquer um de ciclobutil, ciclopentil, ciclohexil, tienil, piridil, ou tiazolil. O segundo aminoácido na cadeia do tetrapeptídeo, Xaa_2, pode ser qualquer um da (A)(A')D-Phe, 3,4-dicloro-D-Phe, (A)(A')(α-Me)D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Tyr, (E)D-Ala ou D-Trp. O terceiro aminoácido na cadeia do tetrapeptídeo, Xaa_3 pode ser D-Nle, D-Phe, (E)D-Ala, D-Leu, (α-Me)D-Leu, DHle, D-Val, ou D-Met. O quarto aminoácido na cadeia do

tetrapeptídeo, Xaa_4 pode ser qualquer um dos seguintes: $(B)_2$D-Arg, $(B)_2$D-Nar, $(B)_2$D-Har, ζ-(B)D-Hlys, D-Dap, ε-(B)D-Lys, ε-$(B)_2$-D-Lys, D-Amf, amidino-D-Amf, γ-$(B)_2$D-Dbu, δ-$(B)_2$α-(B')D-Orn, ácido D-2-amino-3(4-piperidil)propiônico, ácido D-2-amino-3(2-aminopirrolidil)propiônico, ácido D-α-amino-β-amidinopropiônico, ácido α-amino-4-piperidinaacético, ácido cis-α,4-diaminociclohexano acético, ácido trans-α,4-diaminociclohexanoacético, ácido cis-α-amino-4-metilaminociclohexano acético, ácido trans-α-amino-4-metilaminociclohexano acético, ácido α-amino-1-amidino-4-piperidinaacético, ácido cis-α-amino-4-guanidinociclohexano acético, ou ácido trans-α-amino-4-guanidinociclohexano acético, em que cada (B) pode ser separadamente escolhido de -H e um C_1-C_4 alquila, e (B') pode ser -H ou um grupo (α-Me).

Em certas modalidades da invenção, o grupo W ligante opcional é ausente (ou seja, nulo), desde que em tal caso, Y é N. Em outras modalidades, W é -N-(CH_2)b com b igual a zero, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6. Ainda em outras modalidades, W é -N-$(CH_2)_c$-O- com c igual a 2, ou 3, desde que em tais modalidades, Y seja C.

Em modalidades particulares da invenção, a unidade



na fórmula I é uma unidade de anel heterocíclico de 4 a 8 membros opcionalmente substituída em que todos os heteroátomos de anel na unidade de anel são N, e em que Y e Z são cada um independentemente C ou N e não são átomos de

anel adjacentes. Em tais modalidades, quando essa unidade de anel heterocíclico é um anel de seis, sete ou oito membros, os átomos de anel Y e Z são separados por pelo menos dois átomos de anel. Em tais modalidades, quando essa unidade de anel heterocíclico tem um heteroátomo de anel único que é N, então a unidade de anel é não aromática.

Em certas modalidades particulares da invenção, a unidade de conexão, V é diretamente ligada ao anel que contém Y e Z. V é a C_1-C_6 alquila que pode ser substituída com grupos R_1 e R_2. O substituinte R_1 pode ser qualquer um da -H, -OH, halo, $-CF_3$, $-NH_2$, -COOH, C_1-C_6 alquila, amidina, amidina substituída em C_1-C_6 alquila, aril, heterociclil opcionalmente substituído, Pro-amida, Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, -CN, $-CONH_2$, -COR', $-SO_2R'$, -CONR'R", -NHCOR', OR', ou $-SO_2NR'R"$. O heterociclil opcionalmente substituído pode ser unicamente ou duplamente substituído com substituintes independentemente escolhidos de C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 alcoxi, oxo, -OH, -Cl, -F, $-NH_2$, $-NO_2$, -CN, -COOH, e amidina. As unidades R' e R" são independentemente H, C_1-C_8 alquila, aril, ou heterociclil. Alternativamente, R' e R" podem ser combinados para formar um anel de 4 a 8 membros, cujo anel é opcionalmente substituído unicamente ou duplamente com substituintes independentemente escolhidos de C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 alcoxi, -OH, -Cl, -F, $-NH_2$, $-NO_2$, -CN, -COOH, e amidina. O substituinte R_2 pode ser qualquer um da -H, amidina, amidina substituída em C_1-C_6 alquila unicamente ou duplamente, -CN, - $CONH_2$, -CONR'R", -NHCOR', $-SO_2NR'R"$, ou -COOH.

Em outras modalidades particulares, V é ausente e os

grupos substituintes R_1 e R_2 são diretamente ligados aos mesmos átomos de anel ou diferentes do anel heterocíclico que contém Y e Z.

Em um aspecto alternativo de certas modalidades, as unidades R_1 e R_2 juntas podem formar uma unidade de anel heterocíclico monocíclico ou bicíclico opcionalmente substituída de 4 a 9 membros que é ligada a um átomo de anel único da unidade de anel que contém Y e Z. Em uma modalidade particular, as unidades R_1 e R_2 formam uma unidade de anel heterocíclico monocíclico ou bicíclico opcionalmente substituída de 4 a 9 membros que é diretamente ligada a um átomo de anel único da unidade de anel que contém Y e Z.

Em um segundo aspecto alternativo de certas modalidades, as unidades R_1 e R_2 juntas com um átomo de anel único da unidade de anel que contém Y e Z podem formar uma unidade de anel heterocíclico opcionalmente substituído de 4 a 8 membros para formar uma estrutura espiro.

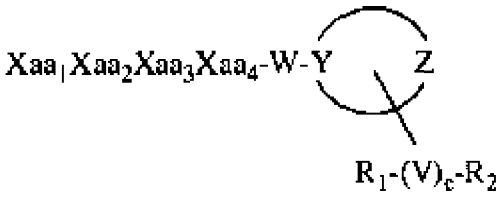
Em um terceiro aspecto alternativo de certas modalidades, as unidades R_1 e R_2 juntas com dois ou mais átomos de anel adjacentes da unidade de anel que contém Y e Z podem formar uma unidade de anel heterocíclico monocíclico ou bicíclico opcionalmente substituída de 4 a 9 membros fundida à unidade de anel que contém Y e Z.

Em modalidades particulares, cada uma das unidades de anel heterocíclico opcionalmente substituídas de 4, 5, 6, 7, 8 e 9 membros que compreende R_1 e R_2 pode ser unicamente ou duplamente substituída com substituintes independentemente escolhidos de C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 alcoxi, fenil opcionalmente substituído, oxo, -OH, -Cl, -F, $-NH_2$, -

NO_2, -CN, -COOH e amidina.

Em certas modalidades particulares, quando a unidade de anel que contém Y e Z é um anel de seis ou sete membros que inclui um heteroátomo de anel único, e quando um de Y e Z é C e o outro de Y e Z é N, e e é zero, então R_1 não pode ser -OH, e R_1 e R_2 não são -H. Além disso, quando a unidade de anel que contém Y e Z é um anel de seis membros que inclui dois heteroátomos de anel em que tanto Y quanto Z são N, e W é nulo, então a unidade $-(V)_eR_1R_2$ é anexada a um átomo de anel diferente de Z. Além disso, se e é zero, então R_1 e R_2 não podem ser -H. Enfim, quando Xaa_3 é D-Nle, então Xaa_4 não pode ser $(B)_2$D-Arg; e quando Xaa_3 é D-Leu ou (αMe)D-Leu, então Xaa_4 não pode ser δ-$(B)_2$α-(3')D-Orn.

Em certas modalidades, a presente invenção também fornece uma amida peptídica sintética que tem a fórmula:



ou um estereoisômero, racemato, pró-fármacos, sal farmaceuticamente aceitável, hidrato, solvato, hidrato de sal de ácido, N-óxido ou forma cristalina isomórfica desses; em que Xaa_1 é selecionado do grupo que consiste em (A)(A')D-Phe, (α-Me)D-Phe, D-Tyr, D- Tic, D-fenilglicina, D-homofenilalanina, e β-(E)D-Ala, em que (A) e (A') são substituintes de anel fenil independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, -F, -Cl, $-NO_2$, $-CH_3$, $-CF_3$, -CN, e $-CONH_2$, e em que (E) é selecionado do grupo que consiste em ciclobutil, ciclopentil, ciclohexil, piridil, tienil e

tiazolil; Xaa_2 é selecionado do grupo que consiste em (A)(A')D-Phe, (α-Me)D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Tyr, (E)D-Ala e D-Trp; Xaa_3 é selecionado do grupo que consiste em D-Nle, D-Phe, (E)D-Ala, D-Leu, (α-Me)D-Leu, D-Hle, D-Val, e DMet; Xaa_4 é selecionado do grupo que consiste em $(B)_2$D-Arg, $(B)_2$D-Nar, $(B)_2$D-Har, ζ-(B)D-Lys, D-Dap, ε-(B)D-Lys, ε-$(B)_2$-D-Lys, D-Amf, amidino-D-Amf, γ-$(B)_2$D-Dbu, δ-$(B)_2$α-(B')D-Orn, ácido D-2-amino-3(4-piperidil)propiônico, ácido D-2-amino-3(2-aminopirrolidil)propiônico, ácido D-α-amino-β-amidinopropiônico, ácido (R)α-amino-4-piperidinaacético, ácido cis-α,4-diaminociclohexano acético, ácido trans-α,4-diaminociclohexanoacético, ácido cis-α-amino-4-metilaminociclohexano acético, ácido trans-α-amino-4-metilaminociclohexano acético, ácido α-amino-1-amidino-4-piperidinaacético, ácido cis-α-amino-4-guanidinociclohexano acético, e ácido trans-α-amino-4-guanidinociclohexano acético, em que cada (B) é selecionado do grupo que consiste em H e C_1-C_4 alquila, e (B') é H ou (α-Me). O grupo W é selecionado do grupo que consiste em:

Nulo, desde que quando W é nulo, Y é N;

-N-$(CH_2)_b$ com b igual a zero, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6; e

-N-$(CH_2)_c$-O- com c igual a 2, ou 3, desde que Y é C;

e a unidade



é uma unidade de anel heterocíclico de 4 a 8 membros opcionalmente substituída saturada mono ou dinitrogênio em que nenhum átomo de anel diferente de Y e Z é um heteroátomo, Y é C ou N, Z é C ou N, e pelo menos um de Y e

Z é N, e desde que no caso de um anel heterocíclico de 4 ou 5 membros, Y ou Z é C, e no caso de um heterociclo de dinitrogênio, Y e Z são separados por dois ou mais átomos de carbono de anel;

V é C_1-C_6 alquila, e e é zero ou 1, em que quando e é zero, então V é nulo e R_1 e R_2 são diretamente ligados aos mesmos átomos de anel ou diferentes;

R_1 é H, OH, $-NH_2$, -COOH, C_1-C_6 alquila, amidina, amidina substituída em C_1-C_6 alquila, dihidroimidazol, Pro-amida, Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, -CN, $-CONH_2$, -CONR'R", -NHCOR', -OR', ou $-SO_2NR'R"$, em que R' e R" são independentemente H, ou C_1-C_8 alquila, ou R' e R" são combinados para formar um anel de 4 a 8 membros, o referido anel é opcionalmente substituído unicamente ou duplamente com substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 alcoxi, -OH, - Cl, -F, $-NH_2$, $-NO_2$, -CN, e -COOH, amidina; e R_2 é H, amidina, amidina substituída em C_1-C_6 alquila unicamente ou duplamente, -CN, $-CONH_2$, -CONR'R", -NHCOR', $-SO_2NR'R"$, ou -COOH;

desde que quando a unidade de anel que contém Y e Z é um anel de seis ou sete membros e quando um de Y e Z é C e e é zero então R_1 não é -OH, e R_1 e R_2 não são –H; desde que quando a unidade de anel que contém Y e Z é um anel de seis membros, tanto Y quanto Z são N, e W é nulo, então a unidade $-(V)_eR_1R_2$ é anexada a um átomo de anel diferente de Z; e se e é zero, então R_1 e R_2 não são –H; e enfim, desde que quando Xaa_3 é D-Nle, então Xaa_4 não pode ser $(B)_2$D-Arg; e quando Xaa_3 é D-Leu ou (αMe)D-Leu, então Xaa_4 não pode ser δ-$(B)_2$α-(B')D-Orn.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I, em que Xaa_1Xaa_2 é D-Phe-D-Phe, Xaa_3 é D-Leu ou D-Nle e Xaa_4 é escolhido de $(B)_2$D-Arg, D-Lys, $(B)_2$D-Har, ζ-(B)D-Lys, D-Dap, ε-(B)D-Lys, ε-$(B)_2$-D-Lys, D-Amf, amidina-D-Amf, γ-$(B)_2$D-Dbu e δ-$(B)_2$α-(B')D-Orn. Em um aspecto particular da modalidade acima, Xaa_4 é escolhido de D-Lys, $(B)_2$D-Har, ε-(B)D-Lys, e ε-$(B)_2$-D-Lys.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I, em que W é nulo, Y é N e Z é C. Em um aspecto particular da modalidade acima, a unidade de anel que contém Y e Z é um anel saturado de seis membros que compreende um heteroátomo de anel único.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I, em que Y e Z são N e são os únicos heteroátomos de anel na unidade de anel que contém Y e Z.

Em outra modalidade, quando a unidade de anel que contém Y e Z é um anel saturado de seis membros que inclui dois heteroátomos de anel e W é nulo, então Z é um átomo de carbono.

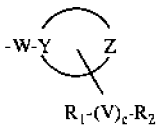
Ainda em outra modalidade, a invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I, em que R_1 e R_2 junto com zero, um ou dois átomos de anel da unidade de anel que contém Y e Z compreendem uma unidade de anel heterocíclico monocíclico ou bicíclico de 4 a 9 membros. Em um aspecto particular da modalidade acima, R_1 e R_2 junto com um átomo de anel da unidade de anel que contém Y e Z compreendem uma unidade de anel heterocíclico de 4 a 8 membros que com a unidade de anel que contém Y e Z de anel

forma uma estrutura espiro e W é nulo.

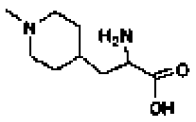
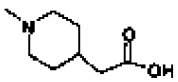
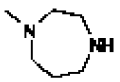
Ainda em outra modalidade, a invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I, em que e é zero e R_1 e R_2 são ligados diretamente ao mesmo átomo de carbono de anel.

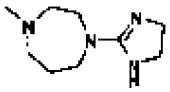
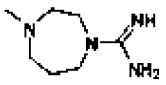
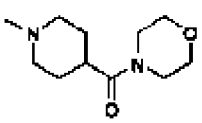
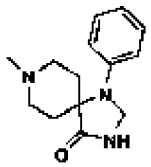
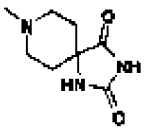
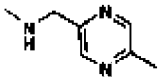
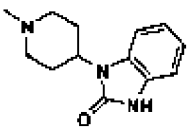
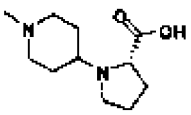
Em uma modalidade adicional, a invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I, em que R_1 é H, OH, $-NH_2$, -COOH, $-CH_2COOH$, C_1-C_3 alquila, amidina, amidina substituída em C_1-C_3 alquila, dihidroimidazol, D-Pro, D-Pro amida, ou $-CONH_2$ e em que R_2 é H, -COOH, ou C_1-C_3 alquila.

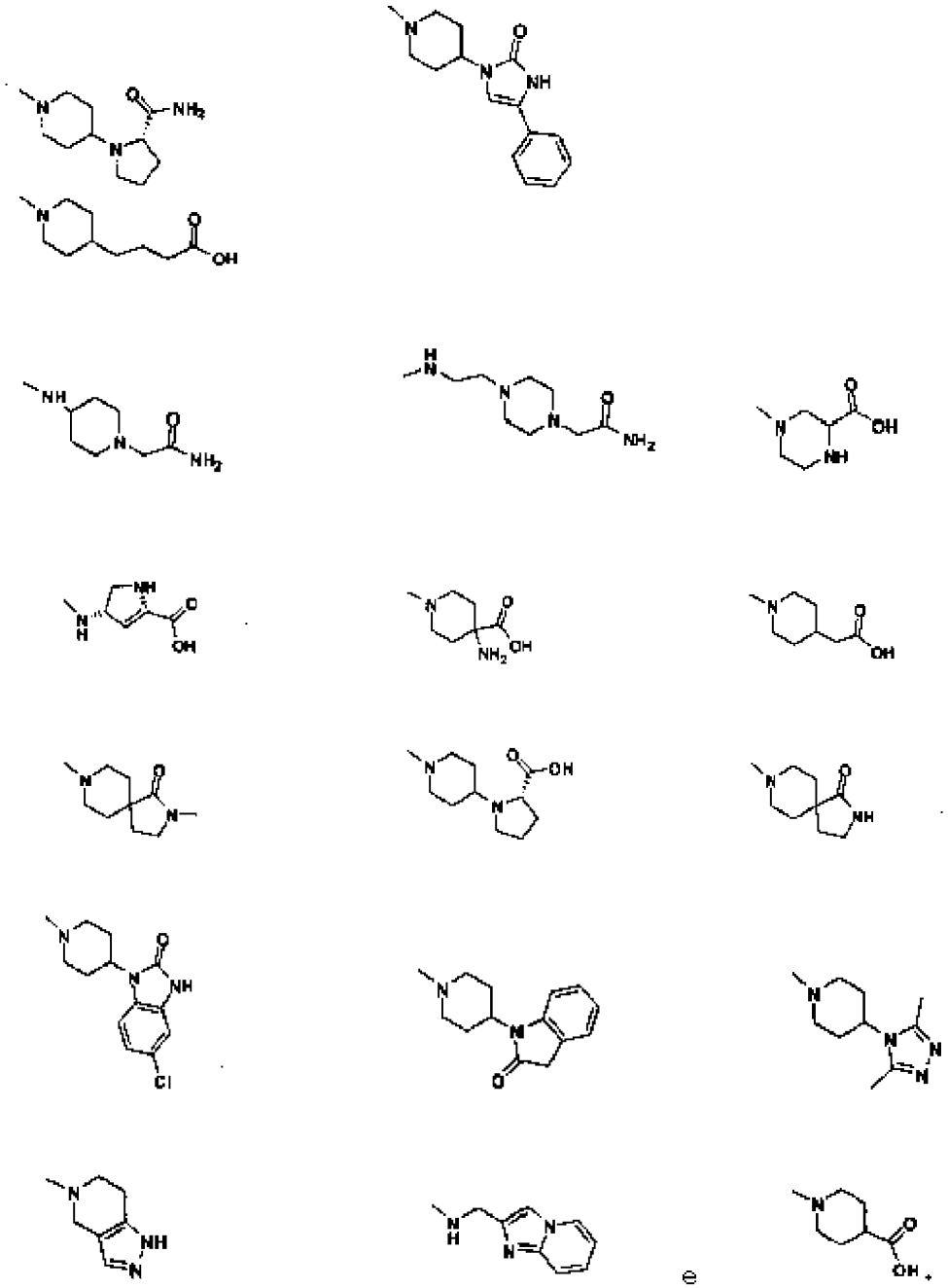
Em outra modalidade, a invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I, em que a unidade:



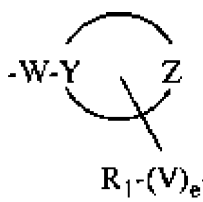
é selecionada do grupo que consiste em:



Ainda em uma outra modalidade, a invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I em que a unidade:



não é uma unidade de prolina, nem uma unidade de

prolina substituída, nem é uma unidade de prolina em que R_1 ou R_2 contém uma unidade amida.

Ainda em outra modalidade, a invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I, em que quando W é nulo, a unidade de anel que contém Y e Z de anel é um anel saturado de 5 membros com apenas um heteroátomo de anel único, e é zero e R_1 ou R_2 é anexado a um carbono de anel adjacente a Y, então R_1 é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, halo, $-CF_3$, $-NH_2$, C_1-C_6 alquila, amidina, amidina substituída em C_1-C_6 alquila, aril, Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, CN, $-SO_2R'$, -NHCOR', -OR' e $-SO_2NR'R''$ e R_2 é selecionado do grupo que consiste em -H, amidina, amidina substituída em C_1-C_6 alquila unicamente ou duplamente, -CN, -NHCOR', e $-SO_2NR'R''$.

Ainda em outra modalidade, a invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I que tem uma EC_{50} de menos que cerca de 500 nM para um receptor kappa opióide. Em um aspecto particular, a amida peptídica sintética pode ter uma EC_{50} de menos que cerca de 100 nM para um receptor kappa opióide. Em um aspecto mais particular, a amida peptídica sintética pode ter uma EC_{50} de menos que cerca de 20 nM para um receptor kappa opióide. Em um aspecto mais particular, a amida peptídica sintética pode ter uma EC_{50} de menos que cerca de 1 nM para um receptor kappa opióide. Os compostos das modalidades anteriores podem ter uma EC_{50} que é pelo menos 10 vezes maior para um receptor opióide mu e delta que para um receptor kappa opióide, preferivelmente pelo menos 100 vezes maior e mais preferivelmente pelo menos 1.000 vezes maior (por exemplo, uma EC_{50} de menos que

cerca de 1 nM para um receptor kappa opióide, e valores de EC_{50} maiores que cerca de 1.000 nM para um receptor opióide mu e um receptor opióide delta).

Ainda em outra modalidade, a invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I que em uma concentração eficaz exibe não mais que cerca de 50% de inibição de qualquer um de P_{450} CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 ou CYP 2D6 pela amida peptídica sintética em uma concentração de 10 uM depois de 60 minutos de incubação com microssomas hepáticos humanos.

Em uma modalidade adicional, a invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I, que em uma dose de cerca de 3 mg/kg em rato atinge uma concentração plasmática de pico da amida peptídica sintética que é pelo menos cerca de cinco vezes maior que a concentração de pico no cérebro. Em um aspecto particular da modalidade acima, a amida peptídica sintética tem uma ED_{50} para um efeito sedativo em um ensaio de redução da locomoção em um camundongo de pelo menos cerca de dez vezes que a ED_{50} da amida peptídica sintética para um efeito analgésico em um ensaio de contorção em um camundongo.

Em uma modalidade adicional, a invenção fornece uma amida peptídica sintética de fórmula I que tem pelo menos cerca de 50% da eficácia máxima em cerca de 3 horas após a administração da dose de cerca de 3 mg/kg da amida peptídica sintética em um rato.

Em uma modalidade, a invenção fornece uma composição farmacêutica que inclui a amida peptídica sintética de fórmula I e um excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

Em outra modalidade, a invenção fornece um método de tratamento ou prevenção de uma doença ou condição associada ao receptor kappa opióide em um mamífero; o método inclui a administração ao mamífero de uma composição que compreende uma quantidade eficaz de uma amida peptídica sintética de acordo com a fórmula I suficiente para tratar ou evitar a doença ou condição associada ao receptor kappa opióide.

Pode-se utilizar uma variedade de testes para verificar se as amidas da invenção exibem alta afinidade e seletividade para o receptor kappa opióide, longa duração da bioatividade *in vivo*, e ausência de efeitos colaterais no SNC. Ensaio para receptores são conhecidos na técnica e receptores kappa opióides de várias espécies foram clonados, bem como o foram receptores opióides mu e delta. Os receptores kappa opióide bem como os receptores mu e delta opióides são receptores clássicos acoplados à proteína G, com sete domínios transmembrana. Embora estes receptores clonados prontamente permitam que um composto candidato em particular, por exemplo, um peptídeo ou derivado de peptídeo seja rastreado, fontes naturais de receptores opióides de mamíferos são também úteis para rastreio como é conhecido na técnica (Dooley CT *et al.* Selective ligands for the mu, delta, and kappa opioid receptors identified from a single mixture based tetrapeptide positional scanning combinatorial library. *J. Biol. Chem.* 273:18848-56, 1998). Deste modo, o rastreio contra os receptores opióides kappa ou mu, seja de origem recombinante ou natural, pode ser realizado com a finalidade de determinar a seletividade das amidas peptídicas sintéticas da invenção para o receptor kappa

opióide em relação ao receptor mu opióide.

Em uma modalidade em particular, as amidas peptídicas sintéticas da invenção são agonistas seletivos do receptor kappa opióide. A potência das amidas peptídicas sintéticas da invenção como agonistas para um receptor em particular pode ser medida como uma concentração na qual metade do efeito máximo é obtido expresso como um valor de EC_{50}. A potência das amidas peptídicas sintéticas da invenção como agonistas kappa opióides, expressa como a percentagem do efeito máximo observável, pode ser determinada por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Endoh T *et al.*, 1999, Potent Antinociceptive Effects of TRK-820, a Novel κ-Opioid Receptor Agonist, *Life Sci*. 65 (16) 1685-94; e Kumar V *et al.*, Synthesis and Evaluation of Novel Peripherally Restricted κ-Opioid Receptor Agonists, 2005 *Bioorg Med Chem Letts* 15: 1091-1095.

Exemplos destas técnicas de ensaios para determinação de valores de EC_{50} são proporcionados adiante. Muitos métodos de ensaio convencionais para caracterização de ligandos opióides são conhecidos dos especialistas na técnica. Ver, por exemplo, Waldhoer *et al.*, (2004) Ann. Rev. Biochem. 73:953-990, e Satoh & Minami (1995) Pharmac. Ther. 68(3):343-364 e referências aí citadas.

Em certas modalidades em particular, as amidas peptídicas sintéticas da invenção são agonistas do receptor kappa opióide com um valor de EC_{50} inferior a cerca de 500 nM. Em outras modalidades, as amidas peptídicas sintéticas têm um valor de EC_{50} inferior a cerca de 100 nM como agonistas do receptor kappa opióide. Em ainda outras

modalidades, as amidas peptídicas sintéticas têm um valor de EC_{50} inferior a cerca de 10 nM como agonistas do receptor kappa opióide. Em modalidades em particular, as amidas peptídicas sintéticas da invenção têm um valor de EC_{50} inferior a cerca de 1,0 nM, inferior a cerca de 0,1 nM, ou inferior a cerca de 0,1 nM, ou mesmo inferior a cerca de 0,01 nM como agonistas do receptor kappa opióide.

Em modalidades em particular, as amidas peptídicas sintéticas da invenção são altamente seletivas para os receptores kappa opióide em relação aos receptores mu opióides. Em certas modalidades as amidas peptídicas sintéticas da invenção têm valores de EC_{50} para o receptor mu opióide que são pelo menos cerca de cem vezes superiores aos valores EC_{50} correspondentes para o receptor kappa opióide. Em modalidades em particular, as amidas peptídicas sintéticas da invenção têm valores de EC_{50} para o receptor mu opióide que são pelo menos cerca de mil vezes superiores aos valores EC_{50} correspondentes para o receptor kappa opióide. Alternativamente, a seletividade das amidas peptídicas sintéticas da invenção pode ser expressa como um valor de EC_{50} maior para um receptor mu opióide do que para um receptor kappa opióide. Deste modo, em modalidades em particular, as amidas peptídicas sintéticas da invenção têm valores de EC_{50} superiores a cerca de 10 uM para o receptor mu opióide e valores de EC_{50} inferiores a cerca de 10 nM, e em outras modalidades inferiores a cerca de 1,0 nM, ou mesmo inferiores a cerca de 0,01nM para o receptor kappa opióide. Em uma outra modalidade, a amida peptídica sintética em particular pode ter um valor de EC_{50} inferior a cerca de 1 nM para um receptor kappa opióide e um valor

de EC_{50} superior a cerca de 1000 nM para um receptor mu opióide ou para um receptor delta opióide.

Outra propriedade das amidas peptídicas sintéticas da invenção é a sua propriedade característica de baixa inibição das isozimas do citocromo P_{450}. As isozimas do citocromo P_{450} constituem uma grande superfamília de proteínas hemo-tiolato responsáveis pela inativação oxidativa metabólica de muitos compostos terapêuticos e outros compostos bioativos. De um modo geral, elas atuam como oxidases terminais em cadeias de transferência de elétron multicomponente, também referido como sistemas de mono-oxigenase contendo o citocromo P_{450}.

Foram identificadas mais de cinqüenta isozimas diferentes do citocromo P_{450} e foram classificadas em famílias agrupadas por relacionamento genético conforme avaliadas por homologia de seqüência do ácido nucléico. Mais abundantes entre as isozimas do citocromo P_{450} em células humanas são as isozimas 1A2 e 3A4, embora as isozimas 2B6, 2C9, 2C19, 2D6 e 2E1 também contribuam, de forma significativa, para a inativação oxidativa de compostos terapêuticos administrados. Embora a inibição das isozimas do citocromo P_{450} possam ser úteis para prolongar o tempo pós-administração *in vivo* durante o qual é mantida uma concentração eficaz das amidas peptídicas sintéticas da invenção, também prolonga a persistência de qualquer composto terapêutico co-administrado que é submetido a oxidação pelo citocromo P_{450}. Este aumento em persistência pode fazer com que a composição terapêutica co-administrada persista além do período que é ótimo para a terapêutica ou pode fazer com que a concentração *in vivo* exceda os níveis

desejados ou os níveis tolerados com segurança. Estes aumentos em persistência e/ou aumentos em concentração são difíceis de serem quantificados com precisão e são, de preferência, evitados. Os compostos terapêuticos que apresentam pouca ou nenhuma inibição da atividade das isozimas do citocromo P_{450} não têm este problema potencial e podem ser co-administrados com mais segurança com outros compostos terapêuticos sem o risco de afetar a taxa de inativação do composto terapêutico co-administrado pelas isozimas do citocromo P_{450}.

Modalidades particulares das amidas peptídicas sintéticas da invenção apresentam baixa inibição das isozimas do citocromo P_{450} em concentrações terapêuticas das amidas peptídicas sintéticas, enquanto outras não apresentam essencialmente qualquer inibição das isozimas do citocromo P_{450} em concentrações terapêuticas. Em algumas modalidades, as amidas peptídicas sintéticas a uma concentração de 10 uM apresentam uma inibição inferior a cerca de 50% das isozimas do citocromo P_{450} CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 ou CYP2D6. Em modalidades em particular, as amidas peptídicas sintéticas a uma concentração de 10 uM apresentam menos de cerca de 20% de inibição de qualquer uma destas isozimas do citocromo P_{450}. Em modalidades muito particulares, as amidas peptídicas sintéticas em uma concentração de 10 uM apresentam menos de cerca de 10% de inibição de qualquer uma destas isozimas do citocromo P_{450}.

Em outra modalidade, as amidas peptídicas sintéticas da invenção a uma concentração eficaz não exibem mais do que cerca de 50% de inibição de qualquer um de P_{450} CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 ou CYP 2D6 pela amida peptídica sintética a

uma concentração de 10 uM depois de 60 minutos de incubação com microssomas de fígado humano.

As amidas peptídicas sintéticas da invenção quando administradas a um mamífero ou a um paciente humano a uma concentração terapeuticamente eficaz exibem baixa ou essencialmente nenhuma penetração através da barreira sangue-cérebro. Os receptores kappa opióide (daqui por diante referidos, de forma intercambiável, como receptores kappa) são distribuídos em tecidos periféricos incluindo a pele e tecidos somáticos, bem como nas vísceras em humanos e outros mamíferos. Os receptores kappa são também encontrados no cérebro. A ativação dos receptores kappa nos tecido periféricos provoca a supressão da dor e respostas inflamatórias, ao passo que a ativação dos receptores kappa no cérebro provoca efeitos sedativos e também pode levar a grave disforia e alucinações. Em certas modalidades, a amida peptídica sintética da invenção quando administrada em concentrações terapeuticamente eficazes essencialmente não exibe penetração através da barreira sangue-cérebro e, portanto, minimiza ou mesmo completamente elimina os efeitos sedativos alucinogênicos de muitos outros agonistas kappa que apresentam alguma penetração através da barreira sangue-cérebro.

Uma medida útil de até que ponto as amidas peptídicas sintéticas da invenção atravessam a barreira sangue-cérebro é a proporção do pico de concentração no plasma para a concentração no tecido cerebral. Em modalidades em particular, as amidas peptídicas sintéticas da invenção quando administradas a uma dose de cerca de 3 mg/kg, exibem uma concentração de pelo menos cerca cinco vezes inferior

da amida peptídica sintética no cérebro do que no plasma quando o pico de concentração no plasma é atingido.

Outra medida útil de até que ponto as amidas peptídicas sintéticas da invenção atravessam a barreira sangue-cérebro é a proporção da dose necessária para alcançar um efeito sedativo e da dose necessária para alcançar um efeito analgésico. Os efeitos analgésicos e sedativos do estímulo do receptor kappa pelos agonistas do receptor kappa podem ser medidos por meio de testes convencionais conhecidos dos especialistas na técnica.

Em modalidades em particular, as amidas peptídicas sintéticas da invenção têm um valor de ED_{50} para um efeito sedativo que é pelo menos cerca de dez vezes o valor de ED_{50} para um efeito analgésico. Em modalidades em particular, as amidas peptídicas sintéticas da invenção têm um valor de ED_{50} para um efeito sedativo que é pelo menos cerca de trinta vezes o valor de ED_{50} para um efeito analgésico. Em ainda outras modalidades, as amidas peptídicas sintéticas da invenção têm um valor de ED_{50} para um efeito sedativo que é pelo menos cerca de cinqüenta vezes o valor de ED_{50} para um efeito analgésico.

Em outra modalidade, as amidas peptídicas sintéticas da invenção têm um valor de ED_{50} para um efeito sedativo em um ensaio de redução de locomoção em um camundongo de pelo menos cerca de dez vezes o valor de ED_{50} da amida peptídica sintética para um efeito analgésico em um teste de Writhing em um camundongo.

Um outro indicador útil de até que ponto seria esperado que as amidas peptídicas sintéticas da invenção cruzassem a barreira sangue-cérebro é proporcionado pelos

valores de permeabilidade da membrana das amidas peptídicas sintéticas em uma célula humana ou célula de outro mamífero quando administradas a uma concentração terapeuticamente relevante. Em certas modalidades, as amidas peptídicas sintéticas da invenção a concentrações terapeuticamente relevantes exibem uma capacidade baixa ou essencialmente inexistente de penetrar em uma monocamada de células cultivadas de seres humanos ou outro mamífero. Este parâmetro de permeabilidade pode ser expresso como uma permeabilidade aparente, P_{app}, representando a permeabilidade da monocamada da célula em particular para um composto de interesse. Qualquer monocamada de célula de mamífero que possa ser cultivada pode ser utilizada para determinar a sua permeabilidade para um composto específico de interesse, embora certas linhas celulares sejam frequentemente utilizadas para esta finalidade. Por exemplo, a linha celular Caco-2 é um adenocarcinoma do cólon humano que pode ser utilizada como um sistema de teste de cultura em monocamada para determinação da permeabilidade da membrana para os compostos da invenção. Em certas modalidades, as amidas peptídicas sintéticas da invenção têm uma P_{app} inferior a cerca de 10^{-6} cm/seg. Em outras modalidades específicas, as amidas peptídicas sintéticas da invenção têm uma P_{app} inferior a cerca de 10^{-7} cm/seg.

Em uma modalidade, as amidas peptídicas sintéticas da invenção a uma dose de cerca de 3 mg/kg em rato atingem um pico de concentração no plasma da amida peptídica sintética e exibe uma concentração de pelo menos cerca de cinco vezes inferior no cérebro do que o pico de concentração no

plasma.

Em outra modalidade, as amidas peptídicas sintéticas da invenção têm pelo menos cerca de 50% de eficácia máxima em cerca de 3 horas após administração de uma dose de cerca de 3 mg/kg da amida peptídica sintética em um rato.

Em uma modalidade, as amidas peptídicas sintéticas da invenção exibem uma duração prolongada de ação em um mamífero, tal como um ser humano. Em um aspecto, a amida peptídica sintética tem uma duração de ação que é de pelo menos cerca de 50% da eficácia máxima 3 horas após a administração de 0,1 mg/kg da amida peptídica sintética. Em um outro aspecto, a amida peptídica sintética tem uma duração de ação que é de pelo menos cerca de 75% da eficácia máxima 3 horas após a administração de 0,1 mg/kg da amida peptídica sintética. Em um aspecto em particular, a amida peptídica sintética tem uma duração de ação que é de pelo menos cerca de 90% da eficácia máxima 3 horas após a administração de 0,1 mg/kg da amida peptídica sintética. Em um aspecto específico, a amida peptídica sintética tem uma duração de ação que é de pelo menos cerca de 95% da eficácia máxima 3 horas após a administração de 0,1 mg/kg da amida peptídica sintética.

Em uma outra modalidade, a invenção proporciona uma composição farmacêutica que inclui uma amida peptídica sintética de acordo com qualquer uma das modalidades acima mencionadas e um excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitáveis. A invenção proporciona métodos, composições ou formas farmacêuticas que utilizam e/ou contêm as amidas peptídicas sintéticas da invenção que são seletivas para o receptor kappa opióide. Em modalidades em particular, as

amidas peptídicas sintéticas da invenção exibem uma forte afinidade para o receptor kappa opióide e têm uma alta potência como agonistas do receptor kappa opióide.

Uma pró-droga de um composto tal como as amidas peptídicas sintéticas da invenção incluem derivados farmaceuticamente aceitáveis os quais, depois da administração, podem se converter através de metabolismo ou outro processo em uma forma biologicamente ativa do composto. As pró-drogas são particularmente desejáveis quando a pró-droga tem propriedades mais favoráveis do que o composto ativo no que diz respeito à biodisponibilidade, estabilidade ou adequabilidade para uma formulação em particular.

Conforme aqui utilizado, uma doença, estado patológico ou distúrbio associado ao receptor kappa opióide é qualquer doença, estado patológico ou distúrbio que pode ser evitado ou tratado por meio da ativação de um receptor kappa opióide. Em um aspecto, as amidas peptídicas sintéticas da invenção são agonistas do receptor kappa opióide que ativam o receptor kappa opióide. Em algumas modalidades uma dose e via de administração em particular da amida peptídica sintética da invenção pode ser selecionada por um clínico para prevenir ou curar completamente a doença, estado patológico ou distúrbio. Em outras modalidades uma dose e via de administração em particular da amida peptídica sintética da invenção selecionada por um clínico melhora ou reduz um ou mais sintomas da doença, estado patológico ou distúrbio.

Conforme aqui utilizado, "quantidade eficaz" ou "quantidade suficiente" da amida peptídica sintética da

invenção se refere a uma quantidade do composto conforme aqui descrito que pode ser terapeuticamente eficaz para inibir, prevenir ou tratar um sintoma de uma doença, distúrbio, estado ou efeito colateral em particular. Conforme aqui utilizado, uma "dose reduzida" de um composto analgésico agonista mu opióide se refere a uma dose que, quando utilizada em combinação com um agonista kappa opióide, tal como uma amida peptídica sintética da invenção, é menor do que seria normalmente proporcionada a um paciente em particular, com a finalidade de reduzir um ou mais efeitos colaterais do composto. A redução da dose pode ser selecionada de tal modo que a diminuição no efeito analgésico ou outro efeito terapêutico do composto seja um meio-termo aceitável tendo em vista o(s) efeito(s) colateral(is) reduzido(s), onde a referida diminuição no referido efeito analgésico ou outros efeitos terapêuticos do analgésico agonista mu opióide é pelo menos parcialmente, e mais preferencialmente totalmente, compensada pelo efeito analgésico ou outro efeito terapêutico de uma amida peptídica sintética da invenção. A co-adminsitração de um composto analgésico agonista mu opióide com uma amida peptídica sintética da invenção que atua como um agonista kappa opióide também permite a incorporação de uma dose reduzida da amida peptídica sintética e/ou do composto analgésico agonista mu opióide para obter o mesmo efeito terapêutico que uma dose mais alta da amida peptídica sintética ou do composto analgésico agonista mu opióide se administrados sós.

Conforme aqui utilizado, "farmaceuticamente aceitável" se refere a compostos, materiais, composições e/ou formas

farmacêuticas que são, no âmbito da avaliação médica fidedigna, adequados para contato com os tecidos de seres humanos ou animais sem grave toxicidade, irritação, resposta alérgica ou outras complicações, comensuráveis com uma proporção risco-benefício que seja razoável para o estado clínico a ser tratado.

Conforme aqui utilizado, o termo "unidade de dosagem" se refere a uma unidade fisicamente separada como dosagens unitárias para um indivíduo ou estado patológico a ser tratado. Cada unidade pode conter uma quantidade predeterminada do(s) composto(s) de amida peptídica sintética ativa calculada para produzir o(s) efeito(s) terapêutico(s) desejado(s), opcionalmente em associação com um veículo farmacêutico. A especificação para as formas de dosagem unitárias pode ser ditada por (a) as características únicas do composto ou compostos ativos e o efeito terapêutico em particular a ser alcançado e (b) as limitações inerentes na técnica de preparação de combinar este composto ou compostos ativos. A unidade de dosagem é muitas vezes expressa como o peso do composto por unidade de peso corporal, por exemplo, em miligramas do composto por quilograma de peso corporal do indivíduo ou paciente (mg/kg). Alternativamente, a dosagem pode ser expressa como a quantidade de composto por unidade de peso corporal por unidade de tempo (mg/kg/dia) em um regime de dosagem em particular. Em outras alternativas, a dosagem pode ser expressa como a quantidade de composto por unidade de área de superfície corporal (mg/m^2) ou por unidade de área de superfície corporal por unidade de tempo (mg/m^2/dia). Para formulações tópicas, a dosagem pode ser expressa de uma

maneira que seja convencional para aquela formulação, por exemplo, uma fita de meia polegada de pomada aplicada ao olho, onde a concentração do composto na formulação é expressa como uma percentagem da formulação.

Conforme aqui utilizado, o termo "sais farmaceuticamente aceitáveis" se refere a derivados dos compostos onde o composto precursor é modificado fazendo seus sais ácidos ou básicos. Exemplos de sais farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a sais ácidos minerais ou orgânicos de resíduos básicos tais como aminas, sais alcalinos ou orgânicos de resíduos ácidos, tais como ácidos carboxílicos e outros. Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais não tóxicos convencionais ou os sais de amônio quaternário do composto precursor formado, por exemplo, de ácidos inorgânicos ou orgânicos não tóxicos. Por exemplo, estes sais não tóxicos incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos, tais como os ácidos clorídrico, bromídrico, sulfúrico, sulfâmico, fosfórico, nítrico e outros; e os sais preparados de ácidos orgânicos, tais como os ácidos acético, propiônico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamôico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutâmico, benzôico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzôico, fumárico, toluenossulfônico, metanossulfônico, etano dissulfônico, oxálico, isetiônico e outros. Estes sais fisiologicamente aceitáveis são preparados por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, dissolvendo as bases amina livres com um excesso do ácido em álcool aquoso ou neutralizando um ácido carboxílico livre com uma base de metal alcalino tal

como um hidróxido ou com uma amina. Deste modo, um sal farmaceuticamente aceitável de uma amida peptídica sintética pode ser formado a partir de qualquer amida peptídica que tem o grupo funcional ácido, básico ou ambos. Por exemplo, uma amida peptídica tendo um grupo ácido carboxílico pode, na presença de uma base farmaceuticamente aceitável, formar um ânion carboxilato emparelhado com um cátion tal como um cátion sódio ou potássio. De forma semelhante, uma amida peptídica tendo um grupo funcional amina pode, na presença de um ácido farmaceuticamente aceitável, tal como HCl, formar um sal.

Um exemplo de um solvato farmaceuticamente aceitável de uma amida peptídica sintética é uma combinação de uma amida peptídica com moléculas solventes que produz um complexo destas moléculas solventes em associação com a amida peptídica. Hidratos particularmente adequados de compostos são aqueles hidratos que têm atividade comparável ou hidratos que são reconvertidos no composto ativo depois da administração. Um N-óxido farmaceuticamente aceitável de uma amida peptídica sintética que contém uma amina é um composto onde o átomo de nitrogênio da amina está ligado a um átomo de oxigênio.

Uma forma cristalina, cristalina isomórfica ou amorfa farmaceuticamente aceitável de uma amida peptídica sintética da invenção pode ser qualquer forma cristalina ou não cristalina de uma forma ácida, básica, zwitteriônica, de sal, de hidrato farmaceuticamente aceitável ou qualquer outra forma estável fisiologicamente compatível da amida peptídica sintética de acordo com a invenção.

As amidas peptídicas sintéticas da invenção podem ser

incorporadas em composições farmacêuticas. As composições podem incluir uma quantidade eficaz da amida peptídica sintética em um diluente, excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitáveis. Excipientes, veículos e/ou diluentes para utilização em composições farmacêuticas são geralmente inertes e constituem o volume da preparação.

Em uma modalidade em particular, a amida peptídica sintética é um agonista do receptor kappa opióide. Em outra modalidade, a amida peptídica sintética é um agonista seletivo do receptor kappa opióide. O sítio alvo pode ser um receptor kappa no paciente ou indivíduo em necessidade deste tratamento ou profilaxia. Certos agonistas do receptor kappa opióide da amida peptídica sintética da invenção são de atuação periférica e apresentam pouco ou nenhum efeito no SNC em doses terapeuticamente eficazes.

O excipiente ou veículo farmacêutico pode ser qualquer substância compatível, não tóxica, adequada como um veículo para administração da amida peptídica sintética da invenção. Excipientes ou veículos adequados incluem, mas não se limitam a água estéril (de preferência, livre de pirogênio), soro fisiológico, soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS), água/etanol, água/gicerol, água/sorbitol, água/polietilenoglicol, propilenoglicol, álcool cetilestearílico, carboximetilcelulose, amido de milho, lactose, glicose, celulose microcristalina, estearato de magnésio, polivinilpirrolidona (PVP), ácido cítrico, ácido tartárico, óleos, substâncias gordas, ceras ou misturas adequadas de qualquer um dos antecedentes.

A composição farmacêutica de acordo com a invenção pode ser formulada como uma forma farmacêutica líquida,

semi-sólida ou sólida. Por exemplo, a composição farmacêutica pode ser na forma de uma solução para injeção, gotas, xarope, spray, suspensão, comprimido, adesivo, cápsula, curativo, supositório, pomada, creme, loção, gel, emulsão, aerossol ou em uma forma em partículas, tais como *pellets* ou grânulos, opcionalmente prensados como comprimidos ou pastilhas, embalados em cápsulas ou suspensos em um líquido. Os comprimidos podem conter ligantes, lubrificantes, diluentes, agentes corantes, agentes aromatizantes, agentes umectantes e podem ter revestimento entérico para sobreviver o ambiente ácido do estômago e dissolver nas condições mais alcalinas do lúmen intestinal. Alternativamente, os comprimidos podem ser revestidos com açúcar ou revestidos com filme ou com um filme solúvel em água. Adjuvantes, agentes tamponantes, agentes dispersantes e outros semelhantes farmaceuticamente aceitáveis também podem ser incorporados nas composições farmacêuticas.

Ligantes incluem, por exemplo, amido, mucilagem, gelatina e sacarose. Lubrificantes incluem talco, licopódio, estearato de magnésio e de cálcio/ácido esteárico. Diluentes incluem lactose, sacarose, manitol, sal, amido e caulino. Agentes umectantes incluem propileno glicol e monoestearato de sorbitano.

Conforme aqui utilizado, aplicação ou administração local se refere à administração de uma composição farmacêutica de acordo com a invenção ao local, tal como uma articulação inflamada, que exibe o estado doloroso e/ou inflamado. Esta aplicação local inclui aplicação dentro da articulação, tal como aplicação intra-articular, por meio

de injeção, aplicação por meio de cateter ou administração como parte de um dispositivo biocompatível. Deste modo, a aplicação local se refere à aplicação a uma área interna distinta do corpo, tal como, por exemplo, uma articulação, uma área de tecido mole (tal como músculo, tendão, ligamentos, intra-ocular ou outras áreas internas musculosas) ou outra área interna do corpo. Em particular, conforme aqui utilizado, aplicação local se refere a aplicações que substancialmente não proporcionam libertação sistêmica e/ou administração sistêmica dos agentes ativos nas presentes composições. Além disso, conforme aqui utilizado, aplicação local pretende se referir a áreas distintas do corpo, isto é, outras que não sejam as várias grandes cavidades corporais (tais como, por exemplo, as cavidades peritoneais e/ou pleurais).

Conforme aqui utilizado, aplicação tópica se refere à aplicação à superfície do corpo, tal como a pele, olhos, mucosa e lábios, que pode ser dentro ou sobre qualquer parte do corpo, incluindo mas não limitado à epiderme, qualquer outra derme, ou qualquer outro tecido do corpo. Administração ou aplicação tópica significa o contato direto da composição farmacêutica de acordo com a invenção com o tecido, tal como a pele ou membrana, particularmente a mucosa córnea, ou mucosa oral, vaginal ou anorretal. Deste modo, para a finalidade desta invenção, a aplicação tópica se refere à aplicação ao tecido de uma superfície acessível do corpo, tal como, por exemplo, a pele (o tegumento ou revestimento externo) e a mucosa (as superfícies que produzem, secretam e/ou contêm muco). Em particular, aplicação tópica se refere a aplicações que

proporcionam pouca ou substancialmente nenhuma libertação sistêmica dos compostos ativos nas presentes composições. Superfícies mucosais exemplificativas incluem as superfícies mucosais dos olhos, boca (tais como os lábios, língua, gengivas, bochechas, sublingual e céu da boca), laringe, esôfago, brônquio, traquéia, passagens nasais, vagina e reto/ânus.

Para administração oral, um ingrediente ativo pode ser administrado em formas farmacêuticas sólidas, tais como cápsulas, comprimidos e pós ou em formas farmacêuticas líquidas, tais como elixires, xaropes e suspensões. O(s) componente(s) ativo(s) podem ser encapsulados em cápsulas de gelatina juntamente com ingredientes não ativos e veículos em pó, tais como glicose, lactose, sacarose, manitol, amido, celulose e derivados de celulose, estearato de magnésio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnésio e outros semelhantes. Exemplos de ingredientes não ativos adicionais que podem ser adicionados para proporcionar cor, sabor, estabilidade, capacidade de tamponamento, dispersão desejável ou outras características desejáveis são óxido de ferro vermelho, gel de sílica, lauril sulfato de sódio, dióxido de titânio, tinta branca comestível e outros semelhantes. Diluentes semelhantes podem ser utilizados para fazer comprimidos prensados. Tanto comprimidos como cápsulas podem ser fabricados como produtos de libertação sustentada para proporcionar a libertação contínua do medicamento por um período de horas. Os comprimidos prensados podem ser revestidos com açúcar ou revestidos com filme para mascarar algum sabor desagradável e proteger o comprimido da

atmosfera, ou um revestimento entérico para desintegração seletiva no trato gastrointestinal. As formas farmacêuticas líquidas para administração oral podem conter corantes e aromatizantes para aumentar a aceitação do paciente. Para facilitar a estabilidade e absorção da droga, os peptídeos da invenção podem ser libertados a partir de uma cápsula depois de passar pelo hostil ambiente proteolítico do estômago. Métodos para aumentar a estabilidade e absorção do peptídeo depois da administração oral são conhecidos na técnica (por exemplo, Mahato RI. Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 20:153-214, 2003).

As formas de dosagem, tais como pastilhas, comprimidos mastigáveis e gomas mastigáveis permitem uma ação terapêutica mais rápida em comparação com as formas farmacêuticas perorais dos compostos de amida peptídica sintética da invenção tendo absorção bucal significativa. As formulações de gomas mastigáveis são preparações sólidas de dose única com uma base consistindo principalmente de goma, que se destinam a serem mastigadas mas não deglutidas e contêm um ou mais compostos da invenção que são libertados por mastigação e se destinam a serem usadas para o tratamento local da dor e inflamação da boca ou administração sistêmica depois da absorção através da mucosa bucal. Ver, por exemplo, Patente U.S. N° 6,322,828 de Athanikar e Gubler intitulada: *Process for manufacturing a pharmaceutical chewing gum*.

Para administração nasal, os agonistas do receptor kappa opióide perifericamente seletivos podem ser formulados como aerossóis. O termo "aerossol" inclui

qualquer fase suspensa em gás dos compostos da presente invenção que seja capaz de ser inalada para dentro dos brônquios ou passagens nasais. Especificamente, o aerossol inclui uma suspensão em gás de gotículas dos compostos da presente invenção, conforme pode ser produzido em um inalador ou nebulizador de dose medida, ou em um pulverizador. O aerossol também inclui uma composição em pó seco de um composto da presente invenção suspenso no ar ou outro gás transportador, que pode ser administrado, por exemplo, por insuflação de um dispositivo inalador. Ver Ganderton & Jones, Drug Delivery to the Respiratory Tract, Ellis Horwood (1987); Gonda (1990) *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 6:273-313; e Raeburn *et al.* (1992) *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 27:143-159.

As composições farmacêuticas da invenção podem ser preparadas em uma formulação adequada para administração sistêmica, tal como, por exemplo, por administração intravenosa, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intra-retal, intrapulmonar ou oral. Alternativamente, composições farmacêuticas da invenção podem ser adequadamente formuladas para administração local, tal como, por exemplo, para administração tópica ou iontoforética, ou para administração transdérmica por um adesivo revestido, difundido ou impregnado com a formulação, e aplicação local nas articulações, tais como injeção intra-articular.

Preparações para administração por via parentérica incluem soluções estéreis para injeção, produtos solúveis secos estéreis prontos para serem combinados com um solvente imediatamente antes da utilização, incluindo

comprimidos hipodérmicos, suspensões estéreis prontas para injeção, produtos insolúveis secos estéreis prontos para serem combinados com um veículo imediatamente antes da utilização e emulsões estéreis. As soluções podem ser aquosas ou não aquosas e, deste modo, formuladas para administração por injeção, perfusão ou utilizando bombas implantáveis. Para administração por via intravenosa, subcutânea e intramuscular, formulações úteis da invenção incluem preparações de microcápsulas com propriedades de libertação controlada (R. Pwar *et al.* Protein and peptide parenteral controlled delivery. *Expert Opin Biol Ther.* 4(8):1203-12, 2004) ou encapsulação em lipossomas, com uma forma exemplificativa sendo lipossomas revestidos com polietileno, que são conhecidos na técnica como tendo um tempo de circulação prolongado na vasculatura (por exemplo, Koppal, T. "Drug delivery technologies are right on target", *Drug Discov. Dev.* 6, 49-50, 2003).

Para administração oftálmica, a presente invenção proporciona um método para tratar glaucoma ou dor e inflamação oftálmica, compreendendo administrar ao olho de um doente em necessidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma amida peptídica sintética da invenção. A amida peptídica sintética pode ser administrada topicamente com um veículo farmacêutico compatível com o olho ou não-sistemicamente utilizando uma lente de contato ou implante intra-ocular que pode opcionalmente conter polímeros que proporcionam a libertação sustentada da amida peptídica sintética. Estes veículos farmacêuticos compatíveis com o olho podem incluir adjuvantes, antimicrobianos, conservantes, tensoativos e intensificadores de

viscosidade, etc. É sabido na técnica que altas concentrações de muitos compostos são irritantes e baixas concentrações são menos irritantes; deste modo, a formulação é muitas vezes concebida para incluir as concentrações eficazes mais baixas do composto ativo, conservante, tensoativo e/ou intensificador de viscosidade, o referido intensificador de viscosidade tendo uma alta tensão superficial para reduzir a irritação do olho enquanto aumenta a retenção das soluções oftálmicas na superfície do olho. Esta libertação controlada das amidas peptídicas sintéticas da invenção pode durar 6 meses a um ano para implantes ou períodos mais curtos (3-14 dias) para lentes de contato. Estes implantes podem ter bombas osmóticas, matrizes biodegradáveis ou dispositivos de libertação sustentada intra-ocular. Estas composições tópicas podem incluir uma solução salina tamponada com ou sem lipossomas.

Soluções poliméricas aquosas, suspensões aquosas, pomadas e géis podem ser utilizados para formulações tópicas das amidas peptídicas sintéticas da invenção para aplicações oculares. As formulações aquosas também podem conter lipossomas para criar um reservatório da amida peptídica sintética. Certas destas formulações tópicas são géis que aumentam a retenção pré-corneana sem a inconveniência e deterioração de visão associadas às pomadas. O veículo farmacêutico compatível com o olho também pode incluir um polímero sintético biodegradável. Composições de microesferas biodegradáveis aprovadas para uso humano incluem os polilácticos: poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) e poli(ácido láctico-co-ácido

glicólico). Formulações biodegradáveis adicionais incluem, mas não se limitam a: poli(anidrido-co-imida), poli(ácido láctico-glicólico), polietil-2-cianoacrilato, policaprolactona, poli-hidroxibutirato valerato, poliortoéster e óxido de polietileno/teraftalato de polibutileno. Implante intra-ocular ou injeção de composições de libertação sustentada que incluem uma amida peptídica da invenção pode proporcionar controle a longo prazo (variando de meses a anos) da pressão intra-ocular e, deste modo, evitar ou reduzir a necessidade de preparações tópicas. Métodos úteis para formular e distribuir medicamentos oftálmicos são revelados na Patente U.S. N° 7,122,579 de Schwartz *et al.*, e na Patente U.S. N° 7,105,512 de Morizono *et al*. Métodos para formular medicamentos oftálmicos em lentes de contato são revelados por Gulsen e Chauhan, Ophthalmic drug delivery through contact lenses. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, (2004) 45:2342-2347.

Preparações para administração transdérmica são incorporadas em um dispositivo adequado para a referida administração, o referido dispositivo utilizando, por exemplo, iontoforese (Kalia YN *et al.*, Iontophoretic Drug Delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 56:619-58, 2004) ou uma superfície penetrante da derme (Prausnitz MR. Microneedles for Transdermal Drug Delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 56:581-7, 2004), tais como são conhecidos na técnica para serem úteis para melhorar a administração transdérmica de drogas. Um dispositivo de eletrotransporte e seus métodos de funcionamento são revelados na Patente U.S. 6,718,201. Métodos para utilização de iontoforese para promover a

administração transdérmica de peptídeos são revelados na Patente U.S. 6,313,092 e Patente U.S. 6,743,432.

Conforme aqui utilizados, os termos "eletrotransporte", "iontoforese" e "iontoforético" se referem à administração através de uma superfície corporal (por exemplo, pele ou mucosa) de um ou mais compostos farmaceuticamente ativos por meio de uma força eletromotriz aplicada a um reservatório contendo o agente. O composto pode ser administrado por eletromigração, eletroporação, eletro-osmose ou qualquer combinação destes. A eletro-osmose tem também sido referida como eletro-hidrocinese, eletro-convecção e osmose eletricamente induzida. De um modo geral, a eletro-osmose de um composto para dentro de um tecido resulta da migração do solvente no qual o composto está contido, como resultado da aplicação da força eletromotriz ao reservatório de espécie terapêutica, tal como, por exemplo, o fluxo do solvente induzido por eletromigração de outras espécies iônicas. Durante o processo de eletrotransporte, podem ocorrer certas modificações ou alterações da pele, tais como a formação de poros existentes temporariamente na pele, também referidos como "eletroporação". Qualquer transporte de espécie eletricamente assistido intensificado por modificações ou alterações da superfície do corpo (por exemplo, formação de poros na pele) são também incluídos no termo "eletrotransporte" conforme aqui utilizado. Deste modo, conforme aqui utilizado, aplicados aos compostos da presente invenção, os termos "eletrotransporte", "iontoforese" e "iontoforético" se referem (1) à administração de agentes carregados por eletromigração, (2)

à administração de agentes não carregados pelo processo de eletro-osmose, (3) à administração de agentes carregados ou não carregados por eletroporação, (4) à administração de agentes carregados pelos processos combinados de eletromigração e eletro-osmose e/ou (5) à administração de uma mistura de agentes carregados e não carregados pelos processos combinados de eletromigração e eletro-osmose. De um modo geral, os dispositivos de eletrotransporte utilizam dois eletrodos, ambos os quais são posicionados em estreito contato elétrico com alguma porção da pele do corpo. Um eletrodo, chamado eletrodo ativo ou doador, é o eletrodo a partir do qual o agente terapêutico é administrado no corpo. O outro eletrodo, chamado contra eletrodo ou eletrodo de retorno, serve para fechar o circuito elétrico através do corpo. Em conjunto com a pele do paciente, o circuito é completo por conexão dos eletrodos a uma fonte de energia elétrica, por exemplo, uma bateria e, em geral, a circuitos capazes de controlar a corrente que passa através do dispositivo.

Dependendo da carga elétrica do composto a ser administrado por via transdérmica, o anodo ou o catodo podem ser o eletrodo ativo ou doador. Deste modo, se o composto a ser transportado for carregado positivamente, por exemplo, o composto aqui exemplificado no Exemplo 1, então o eletrodo positivo (o anodo) será o eletrodo ativo e o eletrodo negativo (o catodo) servirá como o contra eletrodo, completando o circuito. No entanto, se o composto a ser administrado for carregado negativamente, então o eletrodo catódico será o eletrodo ativo e o eletrodo anódico será o contra eletrodo. Além disso, os dispositivos

para eletrotransporte necessitam de um reservatório ou fonte do agente terapêutico a ser administrado ao corpo. Estes reservatórios de droga são conectados ao anodo ou ao catodo do dispositivo de eletrotransporte para proporcionar uma fonte fixa ou renovável de uma ou mais espécies ou agentes desejados. Cada montagem de eletrodo é compreendida de um eletrodo eletricamente condutor em relação de transmissão de íon com um reservatório de líquido ionicamente condutor que em utilização é colocado em contato com a pele do paciente. Reservatórios de gel tais como os descritos em Webster (Patente U.S. 4,383,529) são uma forma de reservatório, uma vez que géis hidratados são mais fáceis de manipular e fabricar do que recipientes cheios de líquido. A água é um solvente líquido que pode ser utilizado nestes reservatórios, em parte porque os sais dos compostos peptídicos da invenção são solúveis em água e, em parte porque a água é não-irritante à pele, permitindo, deste modo, um contato prolongado entre o reservatório de hidrogel e a pele. Para eletrotransporte, os peptídeos sintéticos da invenção podem ser formulados com intensificadores de fluxo, tais como tensoativos iônicos ou co-solventes que não seja a água (Ver, por exemplo, a Patente U.S. 4,722,726 e Pedido de Patente Européia 278,473, respectivamente). Alternativamente, a camada externa (isto é, o extrato córneo) da pele pode ser mecanicamente rompida antes da administração por eletrotransporte através da mesma, por exemplo, como descrito na Patente U.S. 5,250,023.

Amidas peptídicas sintéticas periféricas que são adequadas para eletrotransporte podem ser selecionadas

medindo o seu fluxo por eletrotransporte através da superfície do corpo (por exemplo a pele ou mucosa), por exemplo, em comparação com um peptídeo de teste padronizado com características de fluxo por eletrotransporte conhecidas, por exemplo, o hormônio libertador da tirotropina (R. Burnette *et al. J. Pharm. Sci.* (1986) 75:738) ou vasopressina (Nair *et al. Pharmacol Res.* 48:175-82, 2003). O fluxo por eletrotransporte transdérmico pode ser determinado utilizando vários métodos *in vivo* ou *in vitro* conhecidos na técnica. Métodos *in vitro* incluem pinçar uma porção de pele de um mamífero apropriado (por exemplo, pele de cadáver humano) entre os compartimentos do doador e receptor de uma célula de fluxo por eletrotransporte, com o lado do estrato córneo da porção de pele voltado para o compartimento do doador. Uma solução líquida ou gel contendo a droga a ser administrada é colocada em contato com o estrato córneo e uma corrente elétrica é aplicada aos eletrodos, um eletrodo em cada compartimento. O fluxo transdérmico é calculado colhendo uma amostra da quantidade de droga no compartimento do receptor. Dois modelos bem sucedidos utilizados para otimizar a administração de droga por eletrotransporte transdérmico são o modelo de retalho de pele de porco (Heit MC *et al.* Transdermal iontophoretic peptide delivery: *in vitro* and *in vivo* studies with luteinizing hormone releasing hormone. *J. Pharm. Sci.* 82:240-243, 1993) e a utilização de pele sem pêlo isolada de roedores sem pêlo ou porquinhos da índia, por exemplo. Ver Hadzija BW *et al.* Effect of freezing on iontophoretic transport through hairless rat skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 387-390, 1992.

Os compostos da invenção para administração iontoforética transdérmica podem ter um ou, tipicamente, dois nitrogênios carregados para facilitar a sua administração.

Outros dispositivos úteis para administração transdérmica utilizam administração a alta velocidade, sob pressão, para conseguir a penetração da pele sem o uso de uma agulha. A administração transdérmica pode ser melhorada, como é conhecido na técnica, pelo uso de intensificadores químicos, algumas vezes referidos na técnica como "intensificadores de permeação", isto é, compostos que são administrados juntamente com a droga (ou, em alguns casos, usados para pré-tratar a pele antes da administração da droga) a fim de aumentar a permeabilidade do estrato córneo e, deste modo, proporcionar uma penetração aumentada da droga através da pele. Os intensificadores químicos de penetração são compostos que são inócuos e servem meramente para facilitar a difusão da droga através do estrato córneo, seja por difusão passiva, seja por um processo acionado por energia, tal como eletrotransporte. Ver, por exemplo, Meidan VM *et al.* Enhanced iontophoretic delivery of buspirone hydrochloride across human skin using chemical enhancers. *Int. J. Pharm.* 264:73-83, 2003.

As formas farmacêuticas de dosagem para administração retal incluem supositórios, cápsulas e comprimidos para efeito sistêmico. Supositórios retais, conforme aqui utilizado, significa corpos sólidos para inserção dentro do reto que fundem ou amaciam à temperatura do corpo libertando um ou mais ingredientes farmacologicamente ou terapeuticamente ativos. As substâncias farmaceuticamente

aceitáveis utilizadas nos supositórios retais incluem bases ou veículos e agentes que elevam o ponto de fusão dos supositórios. Exemplos de bases incluem manteiga de cacau (óleo de teobroma), glicerina-gelatina, carbowax, (polioxietileno glicol) e misturas apropriadas de mono, di e triglicérides de ácidos graxos. Podem também ser utilizadas combinações de várias bases. Agentes que elevam o ponto de fusão dos supositórios incluem espermacete e cera. Os supositórios retais podem ser preparados pelo método de compressão ou por moldagem. Tipicamente, os supositórios retais pesam cerca de 2 g a cerca de 3 g. Comprimidos e cápsulas para administração retal são fabricados utilizando a(s) mesma(s) substância(s) farmaceuticamente aceitável(is) e pelos mesmos métodos que as formulações para administração oral.

Os veículos farmaceuticamente aceitáveis utilizados nas preparações parentéricas incluem veículos aquosos, veículos não aquosos, agentes antimicrobianos, agentes isotônicos, tampões, antioxidantes, anestésicos locais, agentes de suspensão e dispersão, agentes emulsionantes, agentes seqüestrantes ou quelantes e outras substâncias farmaceuticamente aceitáveis.

Exemplos de veículos aquosos incluem cloreto de sódio para injeção, solução Ringer para injeção, dextrose isotônica para injeção, água estéril para injeção, dextrose e solução de Ringer lactado para injeção. Os veículos parentéricos não aquosos incluem óleos fixos de origem vegetal, óleo de semente de algodão, óleo de milho, óleo de gergelim e óleo de amendoim. Agentes antimicrobianos em concentrações bacteriostáticas ou fungistáticas têm de ser

adicionados às preparações parentéricas embaladas em recipientes de doses múltiplas que incluem fenóis ou cresóis, mercuriais, álcool benzílico, clorobutanol, ésteres metílico e propílico do ácido p-hidroxibenzôico, timerosal, cloreto de benzalcônio e cloreto de benzetônio. Os agentes isotônicos incluem cloreto de sódio e dextrose. Tampões incluem fosfato e citrato. Antioxidantes incluem bissulfito de sódio. Anestésicos locais incluem cloridrato de procaína. Agentes de suspensão e dispersão incluem carboximetilceluose de sódio, hidroxipropil metilcelulose e polivinilpirrolidona. Agentes emulsionantes incluem Polisorbato 80 (Tween 80). Um agente seqüestrante ou quelante de íons de metal, tal com o EDTA também pode ser incorporado. Os veículos farmacêuticos também incluem álcool etílico, polietileno glicol e propileno glicol para veículos miscíveis em água e o pH pode ser ajustado a um pH fisiologicamente compatível por meio da adição de hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido cítrico ou ácido láctico.

O ingrediente ativo pode ser administrado de uma só vez, ou pode ser dividido em várias doses menores a serem administradas a intervalos de tempo, ou como uma formulação de libertação controlada. O termo "formulação de libertação controlada" abrange as formulações que permitem a administração contínua de uma amida peptídica sintética da invenção a um indivíduo por um período de tempo, por exemplo, vários dias a semanas. Estas formulações podem ser administradas por via subcutânea ou intramuscular e permitem a libertação em estado estável contínuo de uma quantidade predeterminada do composto no indivíduo ao longo do tempo. A formulação de libertação controlada da amida

peptídica sintética pode ser, por exemplo, uma formulação de microcápsulas poliméricas contendo droga, tais como as descritas nas Patentes U.S. Nos. 4,677,191 e 4,728,721, aqui incorporadas por citação. A concentração do composto farmaceuticamente ativo é ajustada de modo que a administração proporcione uma quantidade eficaz para produzir um efeito desejado. A dose exata depende da idade, peso e estado do paciente ou animal, conforme é conhecido na técnica. Para qualquer indivíduo em particular, regimes de dosagem específicos podem ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade individual e a avaliação profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das formulações. Deste modo, as faixas de concentração aqui apresentadas são apenas exemplificativas e não se destinam a limitar o âmbito ou prática da invenção reivindicada.

As preparações parentéricas de dose unitária incluem embalagem em uma ampola ou pré-embalada em uma seringa com ou sem uma agulha para administração. Todas as preparações para administração por via parentérica são tipicamente estéreis, conforme é praticado na técnica. De uma maneira ilustrativa, a perfusão intravenosa de uma solução tamponada, aquosa estéril contendo um composto ativo é uma maneira eficaz de administração. Em outra modalidade uma solução ou suspensão estéril aquosa ou oleosa contendo o material ativo pode ser injetada conforme necessário para produzir o efeito farmacológico desejado.

As composições farmacêuticas da invenção podem ser aplicadas ou administradas por via intravenosa, transdérmica, transmucosa, intranasal, subcutânea,

intramuscular, oral ou tópica (tal como, por exemplo ao olho). As composições podem ser administradas para o tratamento profilático de indivíduos sofrendo ou em risco de sofrer uma doença ou distúrbio. Para aplicações terapêuticas, uma composição farmacêutica é tipicamente administrada a um indivíduo sofrendo de uma doença ou distúrbio, em uma quantidade suficiente para inibir, prevenir ou melhorar a doença ou distúrbio. Uma quantidade adequada para conseguir isto é definida como uma "dose terapeuticamente eficaz".

As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas a um mamífero com finalidade profilática ou terapêutica em qualquer uma das formulações e modos de administração acima descritos. O mamífero pode ser qualquer mamífero, tal como um mamífero domesticado ou feroz ou mesmo um mamífero selvagem. O mamífero pode ser qualquer primata, ungulado, canino ou felino. Por exemplo, e sem limitação, o mamífero pode ser um animal de estimação ou animal de companhia, tal como um cão ou um gato; um mamífero de alto valor tal como um cavalo de puro sangue ou um animal de espetáculo; um animal de fazenda, tal como uma vaca, uma cabra, uma ovelha ou um porco; ou um primata tal como um macaco, gorila, orangotango, lêmure, mico ou chimpanzé. Um mamífero adequado para profilaxia ou tratamento utilizando as composições farmacêuticas da invenção é um ser humano.

As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas a um mamífero que tem uma doença ou estado patológico que pode ser tratado pela ativação do receptor kappa opióide. Alternativamente, as composições

farmacêuticas podem ser administradas como profilaxia a um mamífero em risco de contrair ou desenvolver uma doença ou estado patológico que pode ser evitado pela ativação do receptor kappa opióide. As doenças ou estados patológicos que podem ser tratados ou evitados pela administração das composições farmacêuticas da invenção incluem, sem limitação, qualquer estado que possa ser melhorado pela ativação do receptor kappa opióide, incluindo estados tais como dor, inflamação, prurido, hiponatremia, hipocalemia, insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática, síndrome nefrótica, hipertensão, edema, íleo, tosse e glaucoma.

Em uma modalidade em particular, as composições farmacêuticas da invenção podem ser co-administradas ou podem incluir um ou mais compostos ou adjuvantes terapêuticos, tais como, mas não limitados a outros opióides, cannabinóides, anti-depressivos, anticonvulsivos, neurolépticos, anti-histaminas, acetaminofeno, corticosteróides, agentes bloqueadores do canal iônico, drogas anti-inflamatórias não esteróides (NSAIDs) e diuréticos, muito dos quais são sinérgicos em efeito com as amidas peptídicas sintéticas da invenção.

Opióides adequados incluem, sem limitação, alfentanil, alfaprodina, anileridina, bremazocina, buprenorfina, butorfanol, codeína, conorfona, dextromoramida, dextropropoxifeno, dezocina, diamorfina, di-hidrocodeína, di-hidromorfina, difenoxilato, dipipanona, doxpicomina, eto-heptazina, etilcetazocina, etilmorfina, etorfina, fentanil, hidrocodona, hidromorfona, cetobemidona, levometadil, levorfanol, lofentanil, loperamida, meperidina

(petidina), meptazinol, metadona, morfina, morfina-6-glucuronido, nalbufina, nalorfina, nicomorfina, oxicodona, oximorfona, pentazocina, fenazocina, fenoperidina, piritramida, propiram, propoxifeno, remifentanil, sufentanil, tilidato, tonazocina e tramadol.

Uma modalidade da invenção é a co-formulação e/ou co-administração de um opióide com substancial atividade agonista no receptor mu opióide, tal como morfina, fentanil, hidromorfona ou oxicodona, juntamente com uma amida peptídica sintética da invenção, com a finalidade de um efeito poupador de dose de um mu opióide, onde a dose do mu opióide é reduzida para minimizar os efeitos colaterais comuns do mu opióide, particularmente em pacientes nunca antes tratados com opióides. Estes efeitos colaterais incluem obstipação intestinal, náusea, vômito, sedação, depressão respiratória, prurido (coceira), confusão mental, desorientação e deficiência cognitiva, retenção urinária, espasmo biliar, delírio, contração mioclônica e convulsões. A seleção da dose reduzida de mu opióide exige a avaliação clínica de um especialista e depende das características únicas dos vários mu opióides, bem como as características do paciente, tais como a intensidade da dor, idade do paciente, doença coexistente, regime de droga atual e potencial interações de drogas, resultados de tratamento anterior e preferência do paciente (McCaffery, M. e Pasero, C., *Pain Clinical Manual*, Second Edition, Mosby, 1999).

Cannabinóides adequados para administração ou incorporação nas composições farmacêuticas da invenção, incluem qualquer cannabinóide natural, tal como por exemplo, tetra-hidrocanabinol (THC), ou um derivado de THC

ou um cannabinóide sintético, tal como por exemplo levonantradol, marinol, nabilona, rimonabant ou savitex.

Antidepressivos adequados que podem ser co-administrados ou incorporados nas composições farmacêuticas da invenção, incluem, por exemplo, imipramina, desipramina, trimipramina, protriptilina, nortriptilina, amitriptilina, doxepina e clomipramina; antidepressivos atípicos tais como amoxapina, maprotilina, trazodona, bupropiona e venlafaxina; inibidores da recaptação específica da serotonina tais como fluoxetina, sertralina, paroxetina, citalopram e fluvoxamina; inibidores da recaptação específica da norepinefrina tais como reboxetina; ou antidepressivos de ação dupla tais como nefazodona e mirtazapina.

Neurolépticos adequados que podem ser co-administrados ou incorporados nas composições farmacêuticas da invenção, incluem qualquer neuroléptico, por exemplo, um composto com atividade antagonista do receptor da dopamina D2 tal como domperidona, metaclopramida, levosulpirida, sulpirida, tietilperazina, ziprasidona, zotepina, clozapina, clorpromazina, acetofenazina, carfenazina, clorprotixeno, flufenazina, loxapina, mesoridazina, molindona, perfenazina, pimozida, piperacetazina, perclorperazina, tioridazina, tiotixeno, trifluoperazina, trifluprομazina, pipamperona, amperozida, quietiapina, melperona, remoxiprida, haloperidol, rispiridona, olanzepina, sertindole, ziprasidona, amisulprida, proclorperazina e tiotixeno.

Anticonvulsivos tais como fenobarbital, fenitoína, primidona, carbamazepina, etosuximida, lamotrigina, ácido

valprôico, vigabatrin, felbamato, gabapentina, levetiracetam, oxcarbazepina, remacemida, tiagabina, e topiramato também podem ser incorporados de forma vantajosa nas composições farmacêuticas da invenção.

Relaxantes musculares tais como metocarbamol, orfenadrina, carisoprodol, meprobamato, carbamato de clorfenesina, diazepam, clordiazepóxido e clorzoxazona; agentes anti-enxaqueca tais como sumatriptano, analépticos tais como cafeína, metilfenidato, anfetamina e modafinil; anti-histaminas tais como clorfeniramina, cipro-heptadina, prometazina e pirilamina, bem como corticosteróides tais como metilprednisolona, betametasona, hidrocortisona, prednisolona, cortisona, dexametasona, prednisona, alclometasona, clobetasol, clocortrolona, desonida, desoximetasona, diflorasona, fluocinolona, fluocinonida, flurandrenolida, fluticasona, florometalona, halcinonida, halobetasol, loteprednol, mometasona, prednicarbato e triamcinolona também podem ser incorporados nas composições farmacêuticas da invenção.

Agentes bloqueadores do canal iônico tais como, por exemplo, o bloqueador do canal iônico de sódio, carbamazepina, conforme comumente utilizado no tratamento do tinnitus, arritmia, derrame isquêmico e epilepsia podem ser co-administrados ou incorporados nas composições farmacêuticas da invenção. Alternativamente, ou além disso, os bloqueadores do canal iônico de cálcio, tais como ziconotida, também podem ser utilizados, bem como antagonistas do canal iônico associados ao receptor NMDA, tal como cetamina. Há evidência de que pelo menos alguns destes bloqueadores do canal iônico podem aumentar a

potência dos efeitos analgésicos do agonista kappa e, deste modo, reduzir a dose necessária para um alívio eficaz da dor. Ver, por exemplo, Wang *et al.*, 2000, *Pain* 84: 271-81.

NSAIDs adequados, ou outros compostos não opióides com atividade anti-inflamatória e/ou analgésica que podem ser co-administrados ou incorporados nas composições farmacêuticas da invenção incluem, mas não se limitam a um ou mais dos seguintes: derivados do ácido aminoarilcarboxílico tais como etofenamato, ácido meclofenâmico, ácido mefanâmico, ácido niflúmico; derivados do ácido arilacético tais como acemetacina, amfenac, cinmetacina, clopirac, diclofenac, fenclofenac, fenclorac, ácido fenclózico, fentiazac, glucametacina, isoxepac, lonazolac, ácido metiazínico, naproxina, oxametacina, proglumetacina, sulindac, tiaramida e tolmetina; derivados do ácido arilbutírico tais como butibufeno e fenbufeno; ácidos arilcarboxílicos tais como clidanac, cetorolac e tinoridina; derivados do ácido arilpropiônico tais como ácido buclóxico, carprofeno, fenoprofeno, flunoxaprofeno, ibuprofeno, ibuproxam, oxaprozina, derivados do ácido fenilalcanôico tais como flurbiprofeno, picetoprofeno, pirprofeno, pranoprofeno, ácido protizínico e ácido tiaprofênico; ácidos piranocarboxílicos tais como etodolac; pirazoles tais como mepirizole; pirazolonas tais como clofezona, feprazona, mofebutazona, oxifinbutazona, fenilbutazona, fenil pirazolidininonas, suxibuzona e tiazolinobutazona; derivados do ácido salicílico tais como aspirina, bromosaligenina, diflusinal, fendosal, salicilato de glicol, mesalamina, salicilato de 1-naftila, salicilato de magnésio, olsalazina e salicilamida, salsalato e

sulfasalazina; tiazinacarboxamidas tais como droxicam, isoxicam e piroxicam outras tais como ácido ε-acetamidocaprôico, acetaminofeno, s-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxibutírico, amixetrina, bendazac, bucoloma, carbazonas, cromolina, difenpiramida, ditazol, hidroxicloroquina, indometacina, cetoprofeno e seus metabólitos ativos ácido 6-metoxi-2-naftilacético; guaiazuleno, ésteres aminoalquílicos heterocíclicos do ácido micofenólico e derivados, nabumetona, nimesulida, orgoteína, oxaceprol, derivados de oxazole, paranilina, pifoxima, 4, 6-di-terc-butil-s-hidroxi-1,3-pirimidinas 2-substituídas, proquazona e tenidap, e inibidores da cox-2 (ciclooxigenase II) tais como celecoxib ou rofecoxib.

Diuréticos adequados que podem ser co-administrados ou incorporados nas preparações farmacêuticas da invenção, incluem, por exemplo, inibidores de anidrase carbônica tais como acetazolamida, diclorfenamida e metazolamida; diuréticos osmóticos tais como glicerina, isosorbida, manitol, e uréia; inibidores do simporte Na^+-K^+-$2Cl^-$ (diuréticos de alça ou diuréticos de alto teto), tais como furosemida, bumetanida, ácido etacrínico, torsemida, axosemida, piretanida e tripamida; inibidores do simporte Na^+-Cl^- (tiazida e diuréticos semelhantes a tiazida), tais como bendroflumetiazida, clorotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetazida, meticlotiazida, politiazida, triclormetiazida, clortalidona, indapamida, metolazona e quinetazona; e, além disso, inibidores dos canais epiteliais renais Na^+, tais como amilorida e triamtereno, e antagonistas dos receptores mineralocorticóide (antagonistas da aldosterona), tais como espironolactona,

canrenona, canrenoato de potássio e eplerenona, que, juntos são também classificados como diuréticos poupadores de K^+. Uma modalidade é a co-formulação e/ou co-administração de um diurético de alça ou tiazida juntamente com uma amida peptídica sintética da invenção com a finalidade de obter um efeito poupador de dose de diurético de alça ou tiazida, onde a dose do diurético de alça ou tiazida é reduzida para minimizar a retenção indesejada de água e evitar ou reduzir a hiponatremia, particularmente no contexto de insuficiência cardíaca congestiva, bem como outros estados clínicos onde a diminuição da retenção de fluido corporal e a normalização do equilíbrio de sódio poderiam ser benéficos para um paciente.Ver R M Reynolds *et al.* Disorders of sodium balance *Brit. Med. J.* 2006; 332:702-705.

A hiponatremia associada ao receptor kappa opióide pode ser qualquer doença ou estado patológico onde a hiponatremia (estado de baixa concentração de sódio) está presente, por exemplo, em seres humanos, quando a concentração de sódio no plasma cai para menos de 135 mmol/L, uma anomalia que pode ocorrer isoladamente ou, mais frequentemente, como uma complicação de outros estados clínicos ou como uma conseqüência de utilizar medicamentos que podem provocar a depleção de sódio.

Uma outra modalidade e a co-formulação e/ou co-administração de um diurético poupador de potássio, por exemplo, um antagonista do receptor mineralocorticóide tal como espironolactona ou eplerenona, juntamente com uma amida peptídica sintética da invenção, com a finalidade de permitir uma dose reduzida do referido diurético poupador

de potássio, onde a dose do referido diurético é reduzida para minimizar a hipercalemia ou acidose metabólica, por exemplo, em pacientes com cirrose hepática.

Em modalidades em particular, as amidas peptídicas sintéticas da invenção exibem uma duração prolongada de ação quando administradas em doses terapeuticamente relevantes *in vivo*. Por exemplo, em algumas modalidades, as amidas peptídicas sintéticas da invenção quando administradas a um mamífero a uma dose de 3mg/kg da amida peptídica sintética mantêm pelo menos cerca de 50% de eficácia máxima em um ensaio dependente de receptor do kappa opióide 3 horas após a administração. Em algumas outras modalidades, as amidas peptídicas sintéticas da invenção quando administradas a um mamífero a uma dose de 0,1 mg/kg da amida peptídica sintética mantêm pelo menos cerca de 50% de eficácia máxima em um ensaio dependente de receptor do kappa opióide 3 horas após a administração. A eficácia máxima é operacionalmente definida como o nível mais alto de eficácia determinado para o ensaio receptor-dependente de kappa opióide em particular para todos os agonistas testados.

Em certas modalidades, as amidas peptídicas sintéticas da invenção quando administradas a um mamífero a uma dose de 0,1 mg/kg mantêm pelo menos cerca de 75% de eficácia máxima 3 horas após a administração. Em ainda outras modalidades, as amidas peptídicas sintéticas da invenção quando administradas a um mamífero a uma dose de 0,1 mg/kg mantêm pelo menos cerca de 90% de eficácia máxima 3 horas após a administração. Em algumas outras modalidades, as amidas peptídicas sintéticas da invenção quando

administradas a um mamífero a uma dose de 0,1 mg/kg mantêm pelo menos cerca de 95% de eficácia máxima 3 horas após a administração.

A invenção também proporciona um método para tratar ou prevenir uma doença ou estado patológico associado ao receptor kappa opióide em um mamífero, onde o método inclui administrar a um mamífero uma composição contendo uma quantidade eficaz de uma amida peptídica sintética da invenção. O mamífero pode ser qualquer mamífero, tal como um mamífero domesticado ou feroz, ou mesmo um mamífero selvagem. Alternativamente, o mamífero pode ser um primata, ungulado, um canino ou um felino. Por exemplo, e sem limitação, o mamífero pode ser um animal de estimação ou animal de companhia, tal como um mamífero de alto valor tal como um cavalo de puro sangue ou um animal de espetáculo; um animal de fazenda, tal como uma vaca, uma cabra, uma ovelha ou um porco; ou um primata tal como um macaco, ou mico. Em um aspecto em particular, o mamífero é um ser humano.

A quantidade eficaz pode ser determinada de acordo com métodos de rotina por um especialista na técnica. Por exemplo, uma quantidade eficaz pode ser determinada como uma dosagem unitária suficiente para prevenir ou para tratar uma doença ou estado patológico associado ao receptor kappa opióide em um mamífero. Alternativamente, a quantidade eficaz pode ser determinada como uma quantidade suficiente para se aproximar do valor de concentração EC_{50} ou uma quantidade suficiente para se aproximar duas ou três vezes ou até cerca de cinco vezes ou mesmo cerca de dez vezes do valor de concentração EC_{50} em um fluido corporal

terapeuticamente relevante do mamífero, por exemplo, onde o fluido corporal está em aposição direta a um tecido alvo, tal como o fluido sinovial de uma articulação inflamada em um paciente sofrendo de artrite reumatóide.

Em uma modalidade a amida peptídica sintética da invenção é uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficaz da amida peptídica sintética da invenção e um excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitáveis. Em um aspecto, a composição farmacêutica inclui uma amida peptídica sintética da invenção em uma quantidade eficaz para tratar ou prevenir um estado patológico associado ao receptor kappa opióide em um mamífero, tal como um ser humano. Em outro aspecto, o estado patológico associado ao receptor kappa opióide é dor, inflamação, prurido, edema, íleo, tosse ou glaucoma.

Em uma modalidade a composição farmacêutica da invenção inclui também um ou mais dos seguintes compostos: um opióide, um cannabinóide, um anti-depressivo, um anticonvulsivo, um neuroléptico, um corticosteróide, um agente bloqueador do canal iônico, ou uma droga anti-inflamatória não esteróide (NSAID).

As composições farmacêuticas que incluem uma amida peptídica sintética da invenção e um veículo ou transportador farmaceuticamente aceitáveis podem ser utilizadas para tratar ou prevenir uma ou mais de uma variedade de doenças, distúrbios ou estados patológicos associados ao receptor kappa opióide.

A doença, distúrbio ou estado patológico associados ao receptor kappa opióide que podem ser prevenidos ou tratados com as amidas peptídicas sintéticas da invenção podem ser

qualquer estado patológico associado ao receptor kappa opióide, incluindo mas não limitado à dor aguda ou crônica, inflamação, prurido, hiponatremia, edema, íleo, tosse e glaucoma. Por exemplo, a dor associada ao receptor kappa opióide pode ser dor neuropática, dor somática, dor visceral ou dor cutânea. Algumas doenças, distúrbios ou estados patológicos estão associados a mais de uma forma de dor, por exemplo, a dor pós-operatória pode ter qualquer um ou todos os componentes da dor neuropática, somática, visceral e cutânea, dependendo do tipo e da extensão do procedimento cirúrgico utilizado.

A inflamação associada ao receptor kappa opióide pode ser qualquer doença ou estado inflamatório incluindo, mas não limitado a sinusite, artrite reumatóide, tenossinovite, bursite, tendonite, epicondilite lateral, capsulite adesiva, osteomielite, inflamação osteoartrítica, doença inflamatória do intestino (IBD), síndrome do intestino irritável (IBS), inflamação ocular, inflamação otítica ou inflamação autoimune.

O prurido associado ao receptor kappa opióide pode ser qualquer doença ou estado prurítico tal como, por exemplo, prurido ocular, por exemplo associado à conjuntivite, prurido otítico, prurido associado à doença renal em estádio final onde muitos pacientes estão recebendo diálise de rim e outras formas de colestase, incluindo cirrose biliar primária, colestase intra-hepática da gravidez, doença hepática colestática crônica, uremia, colestase maligna, icterícia, bem como estados dermatológicos tais como eczema (dermatite), incluindo dermatite atópica ou de contato, psoríase, policitemia vera, líquen plano, líquen

simples crônico, pediculose (piolho), tirotoxicose, pé de atleta, urticária, sarna, vaginite, e prurido associado às hemorróidas e, bem como o prurido de picada de inseto e prurido induzido por droga, tal como prurido induzido por mu opióide.

O edema associado ao receptor kappa opióide pode ser qualquer doença ou estado edematoso tal como, por exemplo, edema devido a doença cardíaca congestiva, ou a uma síndrome de secreção inapropriada de hormônio antidiurético (ADH).

O íleo associado ao receptor kappa opióide pode ser qualquer doença ou estado do íleo incluindo mas não limitado a íleo pós-operatório ou disfunção do intestino induzida por opióide.

A dor neuropática associada ao receptor kappa opióide pode ser qualquer dor neuropática, tal como, por exemplo, neuralgia trigeminal, dor diabética, dor viral tal como dor associada ao herpes zóster, dor induzida por quimioterapia, dor de câncer metastático com compressão de nervo, dor neuropática associada a lesão traumática e procedimentos cirúrgicos, bem como variações de dor de cabeça que se acredita ter um componente neuropático, por exemplo, enxaqueca.

A dor associada ao receptor kappa opióide também inclui dor ocular, por exemplo, a seguir a ceratectomia foto-refrativa (PRK), laceração ocular, fratura do assoalho orbital, queimaduras químicas, abrasão ou irritação corneana ou associada à conjuntivite, úlceras corneanas, esclerite, episclerite, escleroceratite, herpes zóster oftálmico, ceratite intersticial, irite aguda,

ceratoconjuntivite sicca, celulite orbital, pseudotumor orbital, pênfigos, tracoma ou uveíte.

A dor associada ao receptor kappa opióide também inclui a dor de garganta, particularmente associada a estados inflamatórios, tais como rinite alérgica, bronquite aguda, o resfriado comum, úlceras de contato, lesões virais por herpes simples, mononucleose infecciosa, influenza, câncer da laringe, laringite aguda, gengivite ulcerativa necrosante aguda, abscesso peritonsilar, queimaduras faringeanas, faringite, laringofaringite por refluxo, sinusite aguda e tonsilite.

Além disso, a dor associada ao receptor kappa opióide pode ser dor artrítica, cálculos no rim, cálculos no trato urinário, cálculos na vesícula, e dor por cálculos no duto biliar, cólicas uterinas, dismenorréia, endometriose, mastite, dispepsia, dor pós-cirúrgica (tais como, por exemplo, de apendectomia, cirurgia colorretal aberta, reparo de hérnia, prostatectomia, ressecção colônica, gastrectomia, esplenectomia, colectomia, colostomia, laparoscopia pélvica, ligação tubal, histerectomia, vasectomia ou colecistectomia), dor após procedimento médico (tais como, por exemplo, após colonoscopia, cistoscopia, histeroscopia ou biópsia cervical ou endometrial), dor otítica, dor incidental do câncer e dor associada a um distúrbio GI tal como IBD ou IBS ou outros estados inflamatórios, particularmente das vísceras (por exemplo, doença do refluxo gastroesofageano, pancreatite, polinefrite aguda, colite ulcerativa, pielonefrite aguda, colecistite, cirrose, abscesso hepático, hepatite, úlcera duodenal ou gástrica, esofagite, gastrite, gastroenterite,

colite, diverticulite, obstrução intestinal, cisto ovariano, doença inflamatória pélvica, úlcera perfurada, peritonite, prostatite, cistite intersticial) ou exposição a agentes tóxicos, tais como toxinas de insetos, ou drogas tais como salicilatos ou NSAIDs.

A presente invenção proporciona um método para tratar ou prevenir uma doença ou estado patológico associado ao receptor kappa opióide em um mamífero, tal como um ser humano, onde o método inclui administrar ao mamífero uma composição compreendendo uma quantidade eficaz de uma amida peptídica sintética da invenção. Em outra modalidade o estado patológico associado ao receptor kappa opióide é dor, inflamação (tal como inflamação artrítica reumatóide, inflamação osteoartrítica, inflamação IBD, inflamação IBS, inflamação ocular, inflamação otítica ou inflamação autoimune), prurido (tal como dermatite atópica, prurido associado à diálise do rim, prurido ocular, prurido otítico, prurido por picada de inseto, ou prurido induzido por opióide), edema, íleo, tosse ou glaucoma. Em um aspecto, a dor é uma dor neuropática (tal como neuralgia trigeminal, enxaqueca, dor diabética, dor viral, dor induzida por quimioterapia ou dor metastática do câncer), uma dor somática, uma dor visceral ou uma dor cutânea. Em outro aspecto a dor é dor artrítica, dor por cálculos no rim, cólicas uterinas, dismenorréia, endometriose, dispepsia, dor pós-cirúrgica, dor após procedimento médico, dor ocular, dor otítica, dor incidental do câncer ou dor associada a um distúrbio GI, tal como IBD ou IBS. Em outro aspecto a dor é dor associada à cirurgia, onde a cirurgia é laparoscopia pélvica, ligação tubal, histerectomia e

colecistecomia. Alternativamente, a dor pode ser dor associada a um procedimento médico, tal como, por exemplo, colonoscopia, cistoscopia, histeroscopia ou biópsia endometrial. Em um aspecto específico, a dermatite atópica pode ser psoríase, eczema ou dermatite de contato. Em outro aspecto específico, o íleo é íleo pós-operatório ou disfunção do intestino induzida por opióide.

A dor associada ao receptor kappa opióide inclui hiperalgesia, que se acredita ser provocada por mudanças no ambiente do terminal sensorial periférico ocorrem secundárias à lesão tecidular local. A lesão tecidular (por exemplo, abrasões, queimaduras) e a inflamação podem significar aumentos significativos na excitabilidade dos nociceptores polimodais (fibras C) e mecano-receptores de alto limiar (Handwerker *et al.* (1991) *Proceeding of the VIth World Congress on Pain*, Bond *et al.*, eds., Elsevier Science Publishers BV, pp. 59-70; Schaible *et al.* (1993) *Pain* 55:5-54). Acredita-se que esta aumentada excitabilidade e respostas exageradas de aferentes sensoriais estão subjacentes à hiperalgesia, onde a resposta de dor é o resultado de uma resposta exagerada a um estímulo. A importância do estado hiperalgésico no estado de dor pós-lesão foi demonstrada repetidamente e parece ser responsável por uma importante proporção do estado de dor pós-lesão/inflamatório. Ver, por exemplo, Woold *et al.* (1993) *Anesthesia and Analgesia* 77:362-79; Dubner *et al.* (1994) In, *Textbook of Pain*, Melzack *et al.*, eds., Churchill-Livingstone, Londres, pp. 225-242.

Em outra modalidade o estado associado ao receptor kappa opióide é dor, inflamação (tal como inflamação

artrítica reumatóide, inflamação osteoartrítica, inflamação IBD, inflamação IBS, inflamação ocular, inflamação otítica ou inflamação autoimune), prurido (tal como dermatite atópica, prurido associado à diálise do rim, prurido ocular, prurido otítico, prurido por picada de inseto, ou prurido induzido por opióide), edema, íleo, tosse ou glaucoma. Em um aspecto, a dor é uma dor neuropática (tal como neuralgia trigeminal, enxaqueca, dor diabética, dor viral, dor induzida por quimioterapia ou dor metastática do câncer), uma dor somática, uma dor visceral ou uma dor cutânea. Em outro aspecto, a dor é dor artrítica, dor por cálculos no rim, cólicas uterinas, dismenorréia, endometriose, dispepsia, dor pós-cirúrgica, dor após procedimento médico, dor ocular, dor otítica, dor incidental do câncer ou dor associada a um distúrbio GI, tal como IBD ou IBS. Em outro aspecto a dor é dor associada a cirurgia, onde a cirurgia é laparoscopia pélvica, ligação tubal, histerectomia e colecistecomia. Alternativamente, a dor pode ser dor associada a um procedimento médico, tal como, por exemplo, colonoscopia, cistoscopia, histeroscopia ou biópsia endometrial. Em um aspecto específico, a dermatite atópica pode ser psoríase, eczema ou dermatite de contato. Em outro aspecto específico, o íleo é íleo pós-operatório ou disfunção do intestino induzida por opióide.

Em outra modalidade o estado patológico associado ao receptor kappa opióide é um estado associado ao receptor kappa opióide que pode ser prevenido ou tratado por diuréticos poupadores de sódio e potássio, também conhecido como aquarese. Um exemplo destes estados associados ao receptor kappa opióide que podem ser prevenidos ou tratados

pela administração de uma amida peptídica sintética da invenção inclui edema. O edema pode ser devido a qualquer uma de uma variedade de doenças ou estados patológicos, tais como doença cardíaca congestiva ou síndrome da secreção inapropriada de ADH.

Em outra modalidade o estado associado ao receptor kappa opióide é a hiponatremia ou outra doença edematosa. A hiponatremia ou edema associada ao receptor kappa opióide pode ser qualquer doença ou estado patológico hiponatrêmico ou edematoso tal como, por exemplo, hiponatremia e edema associados à insuficiência cardíaca congestiva ou a uma síndrome de secreção inapropriada do hormônio diurético (ADH) ou hiponatremia que está associada à terapia diurética intensiva com tiazidas e/ou diuréticos de alça. As amidas peptídicas da invenção exibem um significativo efeito aquarético poupador de sódio e poupador de potássio, que é benéfico no tratamento dos estados patológicos formadores de edema associados a hiponatremia e/ou hipocalemia. Em concordância, as amidas peptídicas sintéticas da invenção também têm utilidade em métodos para tratar ou prevenir estados relacionados à hiponatremia, cujos exemplos são proporcionados adiante. Os estados relacionados à hiponatremia podem ser categorizados de acordo com o estado do volume como hipervolêmico, euvolêmico ou hipovolêmico.

A hiponatremia hipervolêmica é geralmente causada por um aumento no nível total de água corporal conforme pode ser observado em casos de insuficiência cardíaca congestiva, síndrome nefrótica e cirrose hepática.

A hiponatremia euvolêmica é muitas vezes encontrada na

síndrome da secreção inapropriada do hormônio diurético (ADH) e também pode estar associada à pneumonia, câncer de pulmão de células pequena, polidipsia, casos de lesão de cabeça e causas orgânicas (por exemplo, o uso de certos fármacos, tais como haloperidol) ou causa psicogênica.

A hiponatremia hipovolêmica é devido à diminuição relativa no nível total de sódio no corpo e pode estar associada ao uso de diuréticos, casos de nefrite intersticial ou sudorese excessiva.

Estas formas de hiponatremia podem também ser classificadas de acordo com a concentração de sódio na urina (isto é, se a concentração for superior ou inferior a trinta milimoles por litro). Ver: R M Reynolds *et al.* Disorders of sodium balance, *Brit. Med. J.* 2006;332:702-705.

A hiponatremia associada ao receptor kappa opióide pode ser qualquer doença ou estado onde a hiponatremia (estado de baixa concentração de sódio) está presente, por exemplo, em seres humanos, quando a concentração de sódio no plasma cai para menos de 135 mmol/L, uma anomalia que pode ocorrer isoladamente ou, mais frequentemente, como uma complicação de outros estados clínicos ou como uma conseqüência da utilização de medicamentos que podem provocar a depleção de sódio.

Além destes estados patológicos, inúmeros outros estado estão associados à hiponatremia incluindo, sem limitação: causas neoplásicas de secreção excessiva de ADH, incluindo carcinomas do pulmão, duodeno, pâncreas, ovário, bexiga e uretra, timoma, mesotelioma, adenoma brônquico, carcinóide, gangliocitoma e sarcoma de Ewing; infecções

tais como: pneumonia (bacteriana ou viral), abscessos (pulmão ou cérebro), cavitação (aspergilose), tuberculose (pulmão ou cérebro), meningite (bacteriana ou viral), encefalite e AIDS; causas vasculares tais como: oclusões cerebrovasculares ou hemorragia e trombose do seio cavernoso; causas neurológicas tais como: síndrome de Guillan-Barre, esclerose múltipla, delirium tremens, esclerose amiotrófica lateral, hidrocefalia, psicose, neuropatia periférica, trauma da cabeça (fechada e penetrante), tumores ou infecções do SNC e insultos do SNC que afetam os osmo-receptores hipotalâmicos; más formações congênitas incluindo: agênese do corpo caloso, lábio/palato leporino e outros defeitos da linha mediana; causas metabólicas, tais como: porfiria intermitente aguda, asma, respiração por pressão positiva pneumotoráxica; drogas tais como: diuréticos tiazida, acetaminofeno, barbituratos, agentes colinérgicos, estrogênio, agentes hipoglicêmicos, vasopressina ou desmopressina, oxitocina em alta dose, clorpropamida, vincristina, carbamezepina, nicotina, fenotiazinas, ciclofosfamida, antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoamina oxidase e inibidores da recaptação da serotonina; administração de fluidos hipotônicos em excesso, por exemplo, durante a hospitalização, cirurgia ou durante ou após eventos atléticos (isto é, hiponatremia associada ao exercício), bem como uso de suplementos nutricionais com baixo teor de sódio em indivíduos idosos. Ver, por exemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th Ed. (2005), p. 2102.

Outros estados associados à hiponatremia incluem insuficiência renal, síndrome nefrótica (nefropatia

membranosa e doença de mudança mínima), caquexia, desnutrição, rabdomiólise, procedimentos cirúrgicos, cateterismo cardíaco eletivo, perda de sangue, bem como hipercalcemia, hipocalemia e hiperglicemia com conseqüente glicosúria levando à diurese osmótica.

A invenção também proporciona um método para tratar ou prevenir uma doença ou estado neurodegenerativo em um mamífero, tal como um ser humano, onde o método inclui administrar ao mamífero uma composição que inclui uma quantidade eficaz de uma amida peptídica sintética conforme descrito acima. A doença ou estado neurodegenerativo pode ser qualquer doença ou estado neurodegenerativo, tal como, por exemplo, isquemia, anoxia, derrame, lesão cerebral, injúria da medula espinhal ou injúria de reperfusão. Alternativamente, a doença ou estado neurodegenerativo pode ser uma doença neurodegenerativa do olho. Doenças neurodegenerativas do olho em particular que podem ser tratadas ou evitadas pelo método da invenção incluem, degeneração macular, doença isquêmica retiniana e neuropatia diabética.

Em certas modalidades a invenção proporciona métodos para a prevenção ou tratamento de doenças e estados neuronais, tais como doenças e estados que têm um componente neurodegenerativo. As amidas peptídicas sintéticas da invenção podem ser administradas em uma quantidade eficaz para proteger as células neuronais contra os efeitos de patologia ou injúria que conduziria à neurodegeneração e/ou morte celular neuronal das células não tratadas. Por exemplo, várias doenças ou estados do olho que têm um componente neurodegenerativo podem ser

evitados ou tratados pela administração de uma quantidade eficaz das amidas peptídicas sintéticas da invenção. Estas doenças e estados do olho incluem glaucoma, degeneração macular, doença isquêmica retiniana e neuropatia diabética. Acredita-se que o progresso destas doenças e estados envolve neurodegeneração ou morte celular neuronal, por exemplo por morte celular programada (apoptose) em que as células neuronais são enviadas para uma via que, sem intervenção, levaria à morte celular. Constatou-se que o desenvolvimento ou progresso destas doenças e estados pode ser evitado ou pelo menos retardado por meio do tratamento com agonistas do receptor kappa opióide. Acredita-se que este resultado melhorado é devido à neuroproteção pelos agonistas do receptor kappa opióide. Ver, por exemplo, Kaushik *et al.* "Neuroprotection in Glaucoma" (2003) *J. Postgraduate Medicine* vol. 49 (1): pp. 90-95.

No caso de glaucoma, acredita-se que a profilaxia e o tratamento por meio da administração de agonistas do receptor kappa opióide é mediado por pelo menos duas atividades distintas induzidas pela ativação do receptor kappa opióide: neuroproteção e redução da pressão intra-ocular (IOP). Embora não desejando estar ligado por qualquer teoria, acredita-se que a neuroproteção é devida, pelo menos em parte, à indução do peptídeo natriurético atrial (ANP) no olho , levando à proteção contra dano oxidativo e outros insultos.

Acredita-se também que a pressão intra-ocular anormalmente alta seja um fator que leva ao desenvolvimento de glaucoma. A pressão intra-ocular elevada também pode ser evitada ou tratada por meio da administração de agonistas

do receptor kappa opióide por três atividades separadas desencadeadas pela ativação do receptor: redução na secreção do humor aquoso, afluxo aumentado de humor aquoso e aquarese (diurese poupadora de sódio e de potássio, resultando em perda de água).

A invenção também proporciona um método para tratar ou prevenir uma doença ou estado associado ao receptor kappa do olho de um mamífero, tal como a pressão intra-ocular elevada (IOP). O método inclui administrar ao mamífero uma composição que inclui uma quantidade eficaz de uma amida peptídica sintética conforme descrito acima. Em um aspecto da invenção, a amida peptídica sintética é administrada topicamente. Em um outro aspecto da invenção, a amida peptídica sintética é administrada como um implante.

Em outras modalidades a invenção proporciona métodos de prevenção ou tratamento de certas doenças e estados cardiovasculares tendo um componente degenerativo celular. As amidas peptídicas sintéticas da invenção podem ser administradas em uma quantidade eficaz para proteger as células do miocárdio contra os efeitos de patologia ou lesão que levariam à degeneração e/ou morte celular das células não tratadas. Por exemplo, várias doenças ou estados cardiovasculares podem ser evitados ou tratados por meio da administração de uma quantidade eficaz das amidas peptídicas sintéticas da invenção. Estas doenças e estados cardiovasculares incluem, sem limitação, doença cardíaca coronariana, isquemia, enfarte cardíaco, lesão de reperfusão e arritmia. Ver, por exemplo, Wu *et al.* "Cardioprotection of Preconditioning by Metabolic Inhibition in the Rat Ventricular Myocyte - Involvement of

kappa Opioid Receptor" (1999) *Circulation Res* vol. 84: pp. 1388-1395. Ver também Yu *et al.* "Anti-Arrythmic Effect of kappa Opioid Receptor Stimulation in the Perfused Rat Heart: Involvement of a cAMP-Dependent Pathway" (1999) *J Mol Cell Cardiol.* vol. 31(10): pp. 1809-1819.

Doenças e estados patológicos de outros tecidos e órgãos que podem ser evitados ou tratados por meio da administração de uma quantidade eficaz das amidas peptídicas sintéticas da invenção incluem, mas não se limitam a isquemia, anoxia, derrame, lesão cerebral ou da medula espinhal e injúria de reperfusão.

Outra forma de dor associada ao receptor kappa opióide que pode ser tratada ou evitada com as amidas peptídicas sintéticas da invenção é a hiperalgesia. Em uma modalidade, o método inclui administrar uma quantidade eficaz de uma amida peptídica sintética da invenção a um mamífero sofrendo ou em risco de desenvolver hiperalgesia para prevenir, minorar ou completamente aliviar a hiperalgesia.

As amidas peptídicas sintéticas da invenção podem ser administradas pelos métodos aqui revelados para o tratamento ou prevenção de qualquer estado hiperalgésico, tal como, mas sem limitação, um estado hiperalgésico associado à dermatite alérgica, dermatite de contato, úlceras da pele, inflamação, erupções cutâneas, irritação fúngica e estados hiperalgésicos associados a agentes infecciosos, queimaduras, abrasões, escoriações, contusões, ulceração causada pelo frio, acne, picadas/ferroadas de insetos, úlceras da pele, mucosite, gengivite, bronquite, laringite, dor de garganta, herpes-zóster, irritação fúngica, bolhas causadas pela febre, furúnculo, verrugas

plantares, procedimentos cirúrgicos ou lesões vaginais. Por exemplo, as amidas peptídicas sintéticas da invenção podem ser administradas topicamente às superfícies de uma mucosa, tal como a boca, esôfago ou laringe ou às passagens brônquicas ou nasais. Alternativamente, as amidas peptídicas sintéticas da invenção podem ser administradas topicamente à vagina ou reto/ânus.

Além disso, as amidas peptídicas sintéticas da invenção podem ser administradas por métodos aqui revelados para o tratamento ou prevenção de qualquer estado hiperalgésico associado a queimaduras, abrasões, escoriações, abrasões (tais como abrasões corneanas), contusões, ulceração causada pelo frio, acne, picadas/ferroadas de insetos, úlceras da pele (por exemplo, úlceras diabéticas ou úlceras de decúbito), mucosite, inflamação, gengivite, bronquite, laringite, dor de garganta, herpes-zóster, irritação fúngica (tais como pé de atleta ou tinha da região genitocrural), bolhas causadas pela febre, furúnculo, verrugas plantares ou lesões vaginais (tais como lesões vaginais associadas à micose ou doenças sexualmente transmitidas). Os métodos contemplados para administração das amidas peptídicas sintéticas da invenção para o tratamento ou prevenção de hiperalgesia incluem aqueles onde o composto é aplicado topicamente a uma superfície dos olhos, boca, laringe, esôfago, brônquios, passagens nasais, vagina ou reto/ânus.

Estados hiperalgésicos associados à recuperação pós-cirúrgica podem ser tratados por meio da administração das amida peptídicas sintéticas da invenção. Os estados hiperalgésicos associados à recuperação pós-cirúrgica podem

ser qualquer estado hiperalgésico associado à recuperação pós-cirúrgica, tal como, por exemplo, ceratectomia radial, extração de dente, lumpectomia, episiotomia, laparoscopia e artroscopia.

Os estados hiperalgésicos associados à inflamação também podem ser tratados por meio da administração das amidas peptídicas sintéticas da invenção. Inflamação periodontal, inflamação ortodôntica, conjuntivite inflamatória, hemorróidas e inflamações venéreas podem ser tratadas ou evitadas pela administração tópica ou local das amidas peptídicas sintéticas da invenção.

A invenção também proporciona um método para induzir a diurese em um mamífero em necessidade. O método inclui administrar ao mamífero uma composição compreendendo uma quantidade eficaz de uma amida peptídica sintética da invenção conforme descrito acima.

A invenção também proporciona um método para induzir a secreção de prolactina em um mamífero. O método inclui administrar ao mamífero uma composição compreendendo uma quantidade eficaz de uma amida peptídica sintética da invenção conforme descrito acima. O método para induzir a secreção de prolactina é adequado para tratar um mamífero, tal como um ser humano sofrendo de lactação insuficiente, lactação inadequada, lactação sub-ótima, motilidade reduzida de esperma, um distúrbio relacionado à idade, diabetes tipo I, insônia ou sono REM inadequado. Em um aspecto em particular, o método inclui co-administrar a amida peptídica sintética com uma dose reduzida de um composto analgésico agonista mu opióide para produzir um efeito analgésico terapêutico, o composto tendo um efeito

colateral associado, onde a dose reduzida do composto tem um efeito colateral associado menor do que o efeito colateral associado com a dose do composto analgésico agonista mu opióide necessário para obter o efeito analgésico terapêutico quando administrado só.

A presente invenção também proporciona um método de ligação de um receptor kappa opióide em um mamífero, o método inclui o passo de administrar ao mamífero uma composição contendo uma quantidade eficaz de uma amida peptídica sintética da presente invenção. A quantidade eficaz pode ser determinada de acordo com métodos de rotina por um especialista na técnica. Por exemplo, a quantidade eficaz pode ser determinada como uma dosagem unitária suficiente para ligar os receptores kappa opióides em um mamífero e provocar um efeito antinociceptivo, um efeito anti-inflamatório, um efeito aquarético ou uma elevação dos níveis de prolactina no soro ou qualquer outro efeito sensível ao receptor kappa opióide. Alternativamente, a quantidade eficaz pode ser determinada como uma quantidade suficiente para se aproximar do valor de EC_{50} em um fluido corporal do mamífero, ou uma quantidade suficiente para se aproximar duas ou três, ou até cerca de cinco ou mesmo cerca de dez vezes o valor de EC_{50} em um fluido corporal terapeuticamente relevante do mamífero.

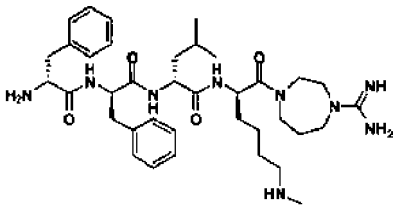
SÍNTESE DAS AMIDAS PEPTÍDICAS DA INVENÇÃO

Como aqui usada, a designação química "tetrapeptídeo-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]" é usada para indicar a unidade aminoacil das amidas peptídicas sintéticas da invenção derivadas do ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico, em que o átomo de nitrogênio

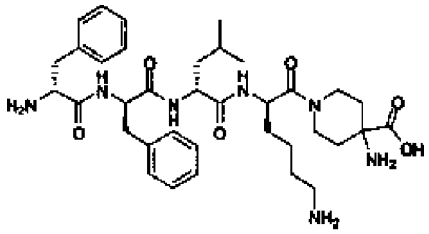
do anel piperidina está ligado ao carbonil-carbono do terminal C do fragmento do tetrapeptídeo, a menos que indicado de forma diferente.

A Figura 1 mostra o esquema sintético geral usado na preparação dos compostos (1) (6), (7), (10) e (11); a Figura 2 mostra o esquema sintético geral usado na preparação dos compostos (2) a (5), (8), (9) e (12) - (14); a Figura 3 mostra o esquema sintético geral usado na preparação de amidas peptídicas sintéticas (15) - (24); e a Figura 4 mostra o esquema usado na preparação das amidas peptídicas sintéticas (25) - (37):

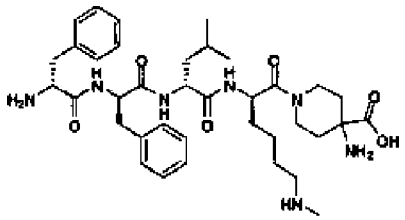
Composto (1): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N°: 1):



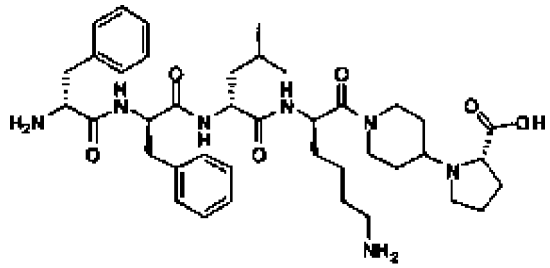
Composto (2): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH (Id. de Seq. N°: 2):



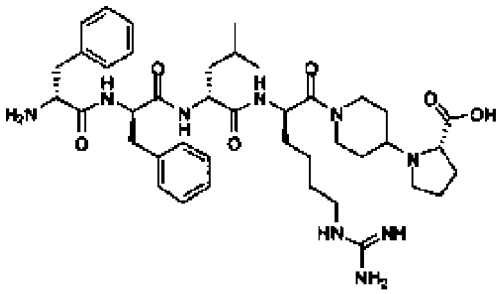
Composto (3): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[ω (ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH (Id. de Seq. N°: 1):



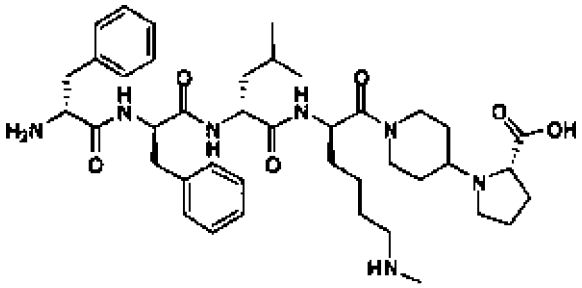
Composto (4): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. N°: 2):



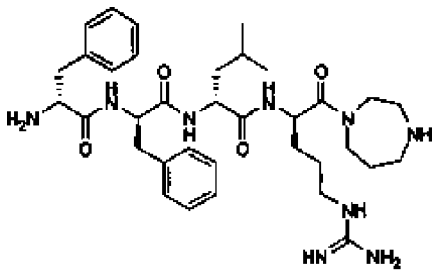
Composto (5): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. N°: 3):



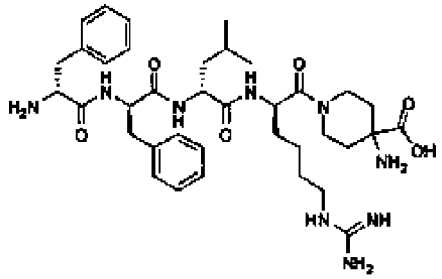
Composto (6): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. N°: 1):



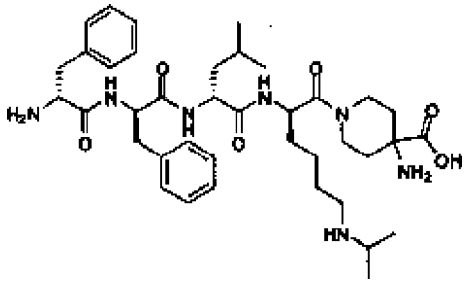
Composto (7): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg-[amida de homopiperazina] (Id. de Seq. N°: 4):



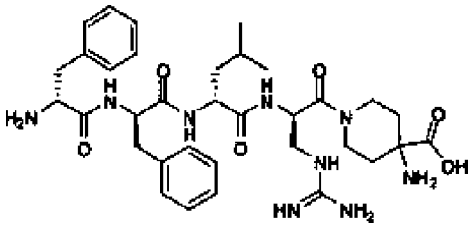
Composto (8): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH (Id. de Seq. N°: 3):



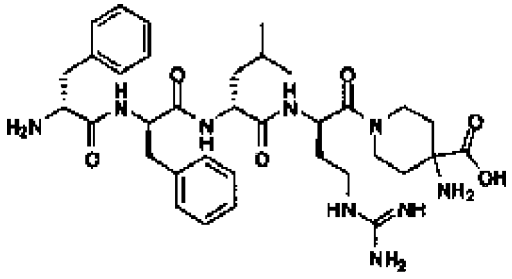
Composto (9): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-iPr)D-Lys-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH, (Id. de Seq. N°: 5):



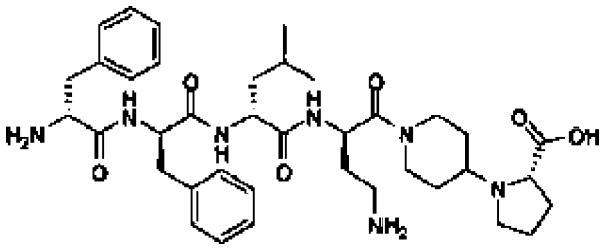
Composto (10): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β-amidino)D-Dap-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH (Id. de Seq. N°: 6):



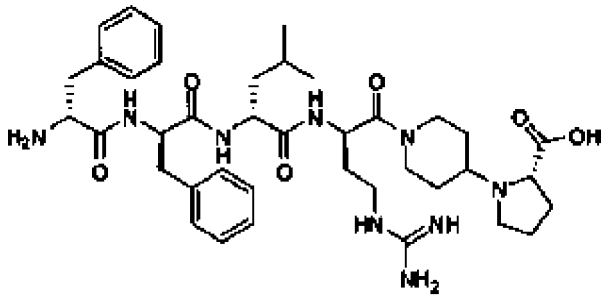
Composto (11): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Nar-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH (Id. de Seq. N°: 7):



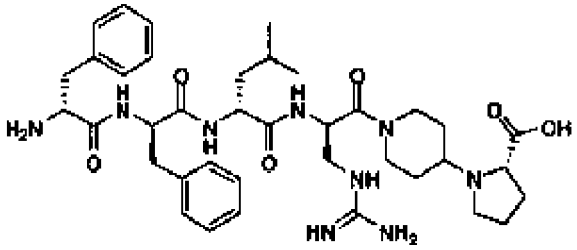
Composto (12): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dbu-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. N°: 8):



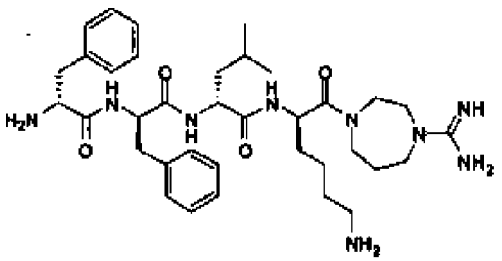
Composto (13): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Nar-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. N°: 7):



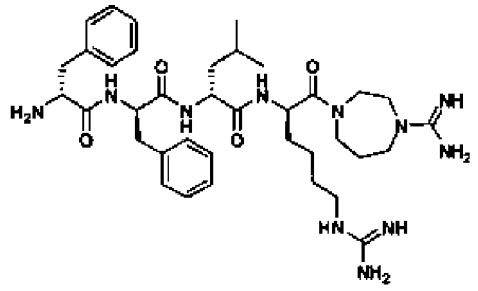
Composto (14): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dap(amidino)-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. N°: 6):



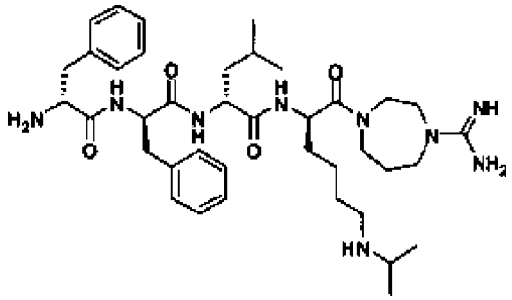
Composto (15): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N°: 2):



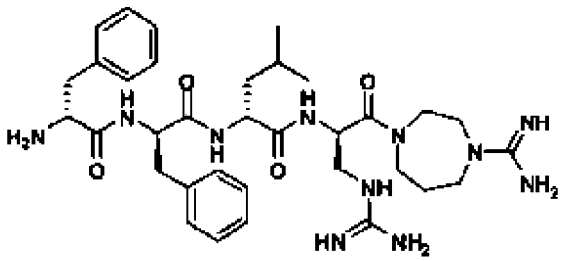
Composto (16): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N°: 3):



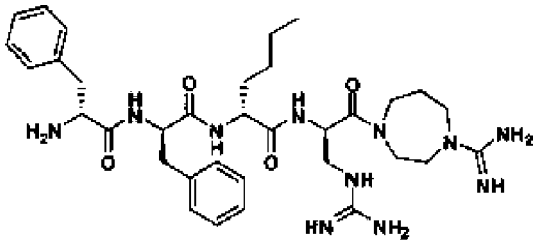
Composto (17): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-iPr)D-Lys-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N°: 5):



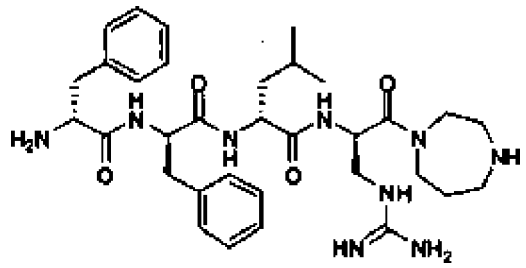
Composto (18): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β-amidino)D-Dap-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N°: 6):



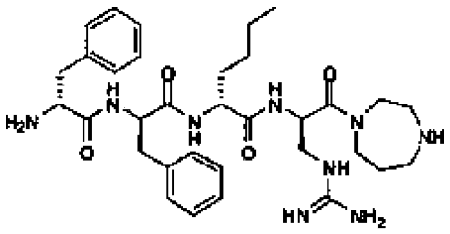
Composto (19): D-Phe-D-Phe-D-Nle-(β-amidino)D-Dap-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N°: 6):



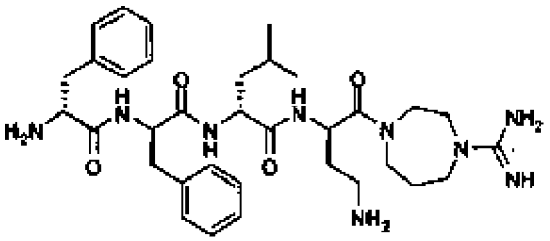
Composto (20): D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β-amidino)D-Dap[amida de homopiperazina] (Id. de Seq. N°: 6):



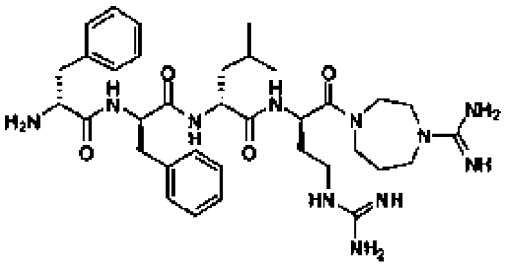
Composto (21): D-Phe-D-Phe-D-Nle-(β-amidino)D-Dap-[amida de homopiperazina] (Id. de Seq. N°: 6):



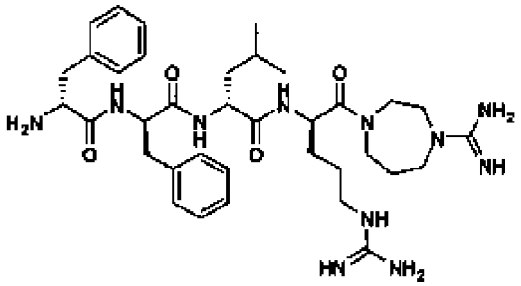
Composto (22): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dbu-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N°: 8):



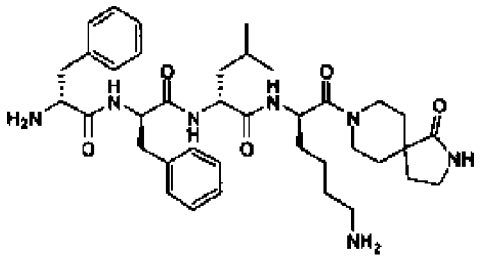
Composto (23): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Nar-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N°: 7):



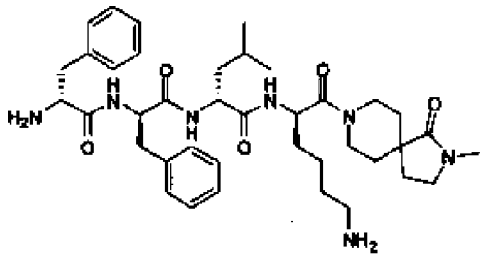
Composto (24): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N°: 4):



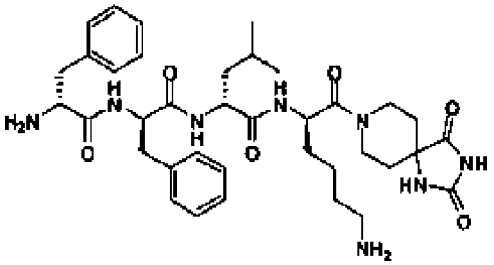
Composto (25): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 2,8-diazaspiro[4,5]decan-1-ona] (Id. de Seq. N°: 2):



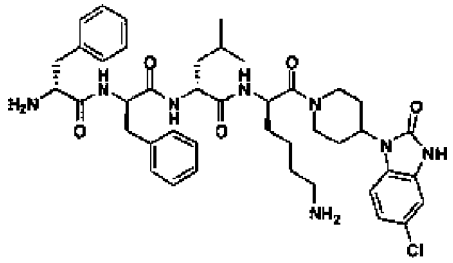
Composto (26): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 2-metil-2,8-diazaspiro[4,5]decan-1-ona] (Id. de Seq. N°: 2):



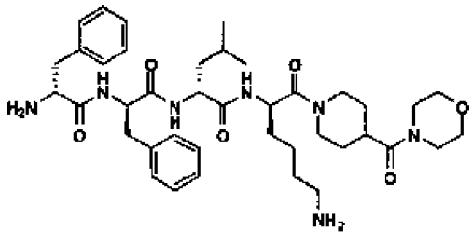
Composto (27): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 1,3,8-triazaspiro[4,5]decano-2,4-diona] (Id. de Seq. N°: 2):



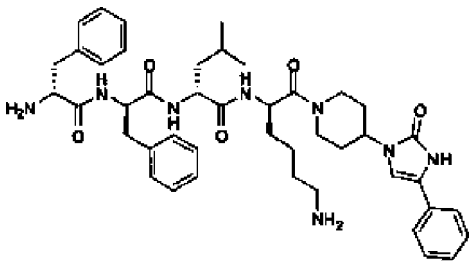
Composto (28): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 5-cloro-1-(piperidin-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3)H-ona] (Id. de Seq. N°: 2):



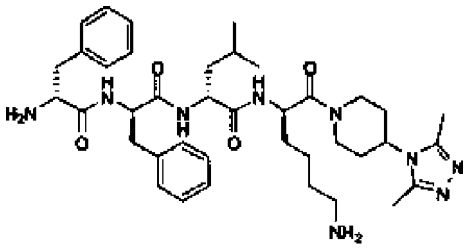
Composto (29): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de morfolino(piperidin-4-il)metanona] (Id. de Seq. N°: 2):



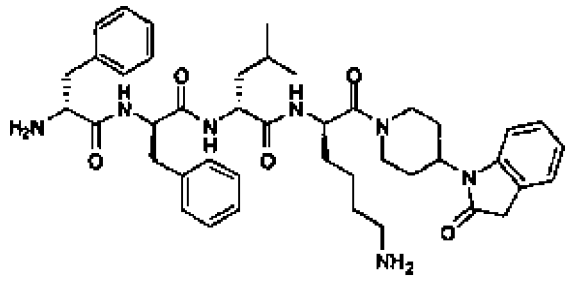
Composto (30): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 4-fenil-1-(piperidin-il-1*H*-imidazol-2(3*H*)-ona] (Id. de Seq. N°: 2):



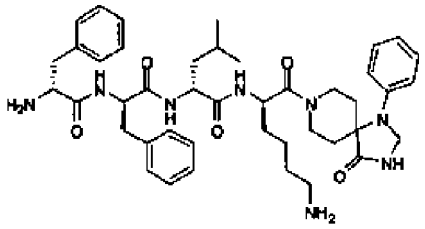
Composto (31): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 4-(3,5-dimetil-4*H*-1,2,4-triazol-4-il)piperidina] (Id. de Seq. N°: 2):



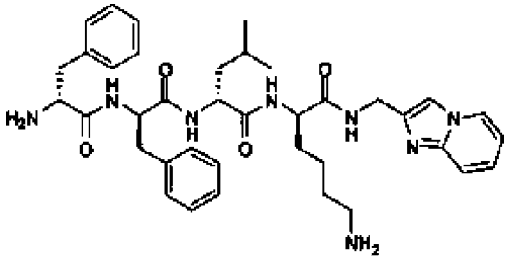
Composto (32): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 1-(piperidin-4-il)indolin-2-ona] (Id. de Seq. N°: 2):



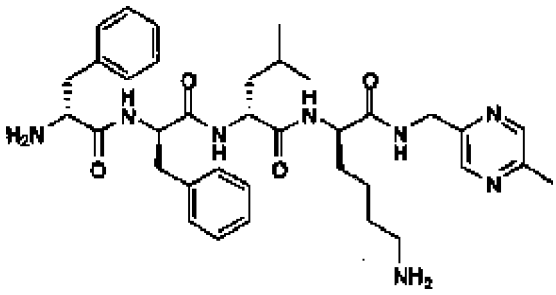
Composto (33): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona] (Id. de Seq. N°: 2):



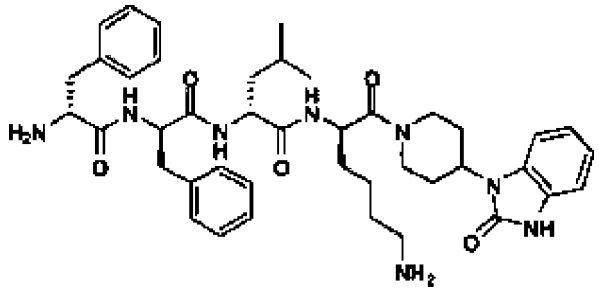
Composto (34): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de imidazo[1,2-a]piridina-2-ilmetil] (Id. de Seq. N°: 2):



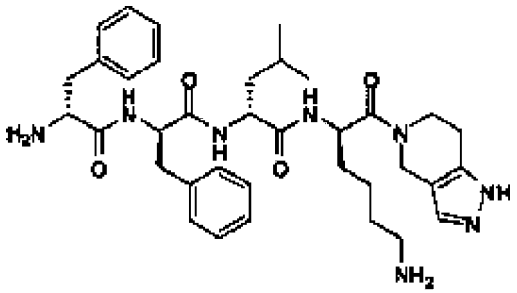
Composto (35) D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de (5-metilpirazin-2-il)metil] (Id. de Seq. N°: 2):



Composto (36): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 1-(piperidin-4-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-2(3*H*)-ona] (Id. de Seq. N°: 2):



Composto (37): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-pirazolo[4,3-c]piridina] (Id. de Seq. N°: 2):



EXEMPLOS

MÉTODOS SINTÉTICOS EXPERIMENTAIS GENÉRICOS:

Os derivados de aminoácidos e resinas foram adquiridos de fornecedores comerciais (Novabiochem, Bachem, Peptide International e PepTech Corporation). Outros químicos e solventes foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Fisher Scientific e VWR. Os compostos aqui foram sintetizados por métodos convencionais em química de peptídeo em fase sólida utilizando metodologia Fmoc e Boc. Salvo especificado em contrário, todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente.

As seguintes referências padrão proporcionam

orientação em configuração experimental genérica e a disponibilidade do material de partida e reagentes necessários: Kates, S. A., Albericio, F., Eds., *Solid Phase Synthesis, A Practical Guide*, Marcel Dekker, New York, Basel, (2000); Bodanszky, M., Bodanszky, A., Eds., *The Practice of Peptide Synthesis, Second Edition*, Springer-Verlag, (1994); Atherton, E., Sheppard, R. C., Eds., *Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach,* IRL Press at Oxford University Press, (1989); Stewart, J. M., Young, J. D., *Solid Phase Synthesis,* Pierce Chemical Company, (1984); Bisello, *et al.*, *J. Biol. Chem. 273*, 22498-22505 (1998); e Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc. 85*, 2149-2154 (1963).

Abreviações adicionais aqui utilizadas:

ACN: acetonitrila

Aloc: aliloxicarbonila

Boc: terc-butoxicarbonila

BOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)-fosfônio

Cbz: benziloxicarbonila

Cbz-OSu: Nα-(Benziloxicarboniloxi) succinimida

DBU:1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno

DCM: Diclorometano

Dde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclo-hex-1-ilideno)etila

DIC: N,N'-diisopropilcarbodiimida

DIEA: N,N-diisopropiletilamina

DMF: N,N-dimetilformamida

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonila

HATU: hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio

HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-

1,1,3,3-tetrametilamínio

HOBt: 1-hidroxibenzotriazole

HPLC: cromatografia líquida de alto desempenho

i: iso

ivDde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclo-hex-1-ilideno)-3-metilbutila

NMM: 4-metil morfolino

NMP: N-metilpirrolidinona

All: alila

o-NBS-Cl: cloreto de *o*-nitrobenzenossulfonila

Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildi-hidro-benzofuran-5-sulfonila

PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidino-fosfônio

RP: fase reversa

TBTU: tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

TEAP: fosfato de trietilamônio

TFA: ácido trifluoroacético

TIS: triisopropilsilano

TMOF: ortoformato de trimetila

TMSOTf: trifluorometanossulfonato de trimetilsilila

Trt: tritila

Os peptídeos sintetizados por metodologia Fmoc foram clivados com uma mistura de TFA/TIS/H_2O (v/v/v = 95:2.5:2.5). O passo de clivagem na metodologia Boc foi alcançado com uma mistura de HF/anisole (v/v = 9:1) ou com uma mistura de TMSOTf/TFA/m-cresol (v/v/v = 2:7:1).

As reações de acoplamento no alongamento da cadeia peptídica foram realizadas manualmente em um sintetizador de peptídeo e mediadas por reagentes de acoplamento com um

excesso de 2 a 4 vezes de derivados de aminoácidos. Os reagentes de acoplamento utilizados na síntese dos vários compostos da invenção foram selecionados das seguintes combinações: DIC/HOBt, HATU/DIEA, HBTU/DIEA, TBTU/DIEA, PyBOP/DIEA e BOP/DIEA.

A desproteção da cadeia lateral do aminoácido na posição N° 4 (designada Xaa_4 no produto final da amida peptídica sintética) de peptídeos ligados a resina foi conseguida como a seguir: os peptídeos foram montados a partir Xaa_4 e progressivamente adicionando Xaa_3, depois Xaa_2 e finalmente Xaa_1. Os grupos protetores de cadeia lateral do diaminoácido introduzidos em Xaa_4 foram seletivamente removidos como a seguir: (i) Os grupos N-Dde ou N-ivDde foram removidos por 2-4% de hidrazina em DMF. Ver Chabra, S. R., *et al.*, *Tetrahedron Lett. 39*:1603-1606 (1998) e Rohwedder, B., *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, *39*: 1175 (1998); (ii) N-Aloc: removido por 3 eq. de $(Ph_3P)_4Pd$ em $CHCl_3$/AcOH/NMM (v/v/v = 37:2:1). Ver Kates, S. A., *et al.* em "*Peptides Chemistry, Structure and Biology, Proc. 13th American Peptide Symposium*", Hodges, R. S. e Smith, J. A. (Eds), ESCOM, Leiden, 113-115 (1994).

Quando os peptídeos foram montados com metodologia de proteção Boc, o grupo protetor de cadeia lateral dos diaminoácidos introduzidos em Xaa_4 era N-Fmoc, que foi removido por 20-30% de piperidina em DMF.

A isopropilação do terminal nitrogênio na cadeia lateral do aminoácido em Xaa_4 dos peptídeos ligados a resina foi conseguida como a seguir: Depois da desproteção, o peptídeo ligado a resina com a função ω-amino livre em Xaa_4 foi feito reagir com uma mistura de acetona e

$NaBH(OAc)_3$ em TMOF produzindo o peptídeo Nω-isopropila ligado a resina.

Monometilação do terminal nitrogênio na cadeia lateral do aminoácido em Xaa_4 dos peptídeos ligados a resina: Para sintetizar peptídeos Nω-metila ligados a resina, a função ω-amino livre foi primeiro derivatizada com cloreto de *o*-nitrobenzeno-sulfonila (*o*-NBS-Cl; Biron, E.; Chatterjee, J.; Kessler, H. Optimized selective N-methylation of peptides on solid support. *J. Pep. Sci.* 12:213-219 (2006). A sulfonamida resultante foi então metilada com uma mistura de dimetilsulfato e 1,8-diaza-biciclo[5.4.0]undec-7-eno em NMP. O grupo protetor de *o*-NBS foi subsequentemente removido por uma mistura de mercaptoetanol e 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno em NMP.

Guanilação do terminal nitrogênio na cadeia lateral do aminoácido em Xaa_4 dos peptídeos ligados a resina: Depois da desproteção, o peptídeo ligado a resina com a função ω-amino livre na posição nº 4 foi feito reagir com uma mistura de cloridrato de 1H-pirazole-1-carboxamidina (Bernatowicz, M. S., et al., *J. Org. Chem.* 57, 2497-2502 (1992) e DIEA em DMF produzindo o peptídeo ligado a resina Nω-guanidino.

Os peptídeos foram purificados por HPLC preparativa em tampões fosfato de trietilamônio (TEAP) ou ácido trifluoroacético (TFA). Quando necessário, os compostos foram finalmente convertidos nos sais trifluoroacetato ou acetato utilizando metodologia HPLC convencional. As frações com pureza superior a 97% foram combinadas e liofilizadas. A pureza dos peptídeos sintetizados foi determinada por RP-HPLC analítica.

A RP-HPLC analítica foi realizada em um sistema de administração multissolvente Waters 600 com um detector de absorbância UV sintonizável Waters 486 e um módulo de dados Waters 746. As Análises por HPLC dos peptídeos foram realizadas utilizando uma coluna Vydac C_{18} (0,46 × 25 cm, tamanho de partícula de 5 μm, tamanho de poro de 300 Å) a uma taxa de fluxo de 2,0 mL/min. Os solventes A e B eram 0,1% de TFA em H_2O e 0,1% de TFA em 80% de ACN/20% de H_2O, respectivamente. Os tempos de retenção (t_R) são dados em min. A RP-HPLC preparativa foi obtida utilizando um cartucho preparativo Vydac C_{18} (5 × 30 cm, tamanho de partícula de 15-20 μm, tamanho de poro de 300 Å) a uma taxa de fluxo de 100 mL/min, em um sistema de cromatografia preparativa Waters Prep LC 2000 com um detector de absorbância UV sintonizável Waters 486 e um gravador *strip chart* Servogor 120. Os tampões A e B eram 0,1% de TFA em H_2O e 0,1% de TFA em 60% de ACN/40% de H_2O, respectivamente. A Análise por HPLC do composto final foi realizada em um Cromatógrafo Líquido Hewlett Packard 1090 usando uma coluna Phenomenex Synergi MAX-RP C_{12} (2,0 × 150 mm, tamanho de partícula de 4 μm, tamanho de poro de 80 Å) a uma taxa de fluxo de 0,3 mL/min a 40 °C. Os tampões A e B eram 0,01% de TFA em H_2O e 0,01% de TFA em 70% de ACN/30% de H_2O, respectivamente. A identidade das amidas peptídicas sintéticas foi confirmada por espectrometria de massa por electrospray. Os espectros de massa foram gravados em um espectrômetro de massa Finnigan LCQ com uma fonte ESI.

EXEMPLO 1: Síntese de composto (1)

D-Phe-D-Phe-D-Leu- (ε-Me)D-Lys- [amida de 4-amidinohomo piperazina] (Id. de Seq. N° 1).

Ver esquema mostrado na Figura 1. Os derivados de aminoácidos usados foram Bcz-D-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Leu-OH, e Fmoc-D-Lys(Dde)-OH. O peptídeo de ligação a resina totalmente protegido foi sintetizado a partir de resina p-nitrofenilcarbonato Wang (5,0 g, 4,4 mmol; Novabiochem). A ligação da homopiperazina à resina foi atingida através da mistura da mesma com uma solução de homopiperazina (8,7 g, 87 mmol; Acros Organics) em DCM (100 mL) de um dia para o outro à temperatura ambiente. A resina foi lavada com DMF e DCM e seca *in vacuo*. A resina homopiperazina carbamato Wang resultante (5,1 g; homopiperazina-[resina carbamato Wang]) foi dividida em várias porções e uma porção de 1,5 g (1,3 mmol) foi usada para continuar a síntese de peptídeos. Os acoplamentos mediados por DIC/HOBt foram realizados com um excesso em 3 vezes de derivados de aminoácidos. O grupo Fmoc foi removido em 25% de piperidina em DMF. Após a finalização do alongamento da cadeia peptídica, a resina foi tratada com hidrazina 4 % em DMF durante 3 x 3 min para remoção de Dde. A resina foi lavada com DMF e DCM e seca *in vacuo*. A resina peptídica resultante (2,4 g; Bcz-D-Phe-D-Phe-DLeu-DLys-homopiperazina-[resina carbamato Wang]) foi dividida novamente e uma porção de 0,6 g (0.3 mmol) foi usada para derivação subsequente (N-metilação).

A metilação da função ω-amina de D-Lys em Xaa_4 foi realizada em três etapas: (i) [*o*-NBS Proteção]: O peptídeo de ligação a resina (0,3 mmol) foi primeiramente tratado com uma solução *o*-NBS-Cl (0,4 g, 2 mmol) and colidina (0,7 ml, 5 mmol) em NMP (7 ml) à temperatura ambiente durante 30 min. A resina foi então lavada em NMP.

(ii) [N-Metilação]: O peptídeo de ligação a resina *o*-NBS protegido foi então feito reagir com uma solução de of 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (0,5 ml, 3 mmol) e dimetilsulfato (1,0 ml, 10 mmol; Aldrich) em NMP (7 ml) à temperatura ambiente durante 5 min. A resina foi então lavada com NMP e o processo de lavagem foi repetido uma vez. (iii) [*o*-NBS Desproteção]: a resina peptídica foi tratada com um asolução de mercaptoetanol (0,7 ml, 10 mmol) e 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (0,8 ml, 5 mmol) em NMP (7 ml) à temperatura ambiente durante 5 min. A resina foi então lavada com NMP e o processo de lavagem foi repetido uma vez.

Para proteger a amina secundária N-metila resultante de D-Lys em Xaa_4, o peptídeo metilado de ligação a resina foi feito reagir com uma solução de Bcz-OSu (6 mmol) em DMF (7 ml). A resina foi lavada com DMF e DCM e seca *in vacuo*. O peptídeo foi então clivado da resina através de tratamento com uma solução de TFA/DCM (15 ml, v/v = 1:1) à temperatura ambiente durante 2 horas. A resina foi então filtrada e lavada com TFA. O filtrado foi vaporizado *in vacuo* e o peptídeo bruto (0,3 mmol; Bcz-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys(Me,Bcz)-[homopiperazina amida]) foi precipitado por éter dietílico .

Para a guanilação da homopiperazina em C-terminal, o péptideo mencionado em cima (0,3 mmol) foi tratado com uma solução de 1H-Pirazol-1-carboxamidina hidrocloreto (0,4 g, 3,0 mmol) e DIEA (0,5 ml, 6 mmol) em DMF (3 ml) de um dia para o outro à temperatura ambiente. Adicionou-se ácido aceptico e H_2O para arrefecer a reacção e a solução foi congelada e seca em um liofilizador para dar o peptídeo

protegido desejado, Bcz-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys(Me,Z)-[4-Amidinohomopiperazina amida] (0,6 g).

Para a desproteção/hidrólise final, a peptídeo mencionado em cima (0,6 g) foi tratado com uma mistura de TMSOTf/TFA/m-cresol (10 ml, v/v/v = 2:7:1) à temperatura ambiente durante 2 horas. A mistura foi evaporada e o peptídeo bruto (0,6 g) foi precipitado por éter dietílico. Para a purificação, o peptídeo bruto derivado acima (0,6 g) foi dissolvido em TFA 0,1% em H_2O (50 mL), e a solução foi carregada em uma coluna de HPLC e purificada usando o sistema de tamponamento de TFA (tampões A = TFA 0,1% em H_2O e B = TFA 0,1% em ACN 60%/H_2O 40%). O composto foi eluído com um gradiente linear de tampão B, 25% B até 75% B ao longo de 30 min, t_R = 37% de B. As frações com pureza acima de 97% foram reunidas em pool, congeladas e secas em um liofilizador, para gerar o peptídeo purificado como um pó amorfo branco (153 mg). Análise por HPLC: t_R = 14,41 min, pureza de 99,8%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 692,5, observada - 692,5.

EXEMPLO 2: Síntese de composto (2)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH (Id. de Seq. N° 2):

Veja o esquema da Figura 2 e Biron *e cols.*, "Optimized selective N-metilation of peptides on solid support". *J. Peptide Science* 12: 213-219 (2006). Os derivados de aminoácido usados foram Boc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-LeuOH, Fmoc-D-Lys(Dde)-OH e ácido N-Boc-amino-(4-N-Fmoc-piperidinil) carboxílico. Foram realizadas análises de HPLC e MS, como descrito na síntese do composto (1) descrita

acima.

O peptídeo totalmente protegido ligado à resina foi sintetizado manualmente partindo de resina cloreto 2-clorotritila (1,8 g, 0,9 mmol; Peptide International). A adesão de ácido N-Boc-amino-(4-N-Fmoc-piperidinil) carboxílico seguida por alongamento da cadeia peptídica e desproteção de Dde em D-Lys(Dde) em Xaa_4 foi realizada de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (1). Veja acima. A resina peptídica resultante (0,9 mmol; Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-(ácido NBoc-amino-4-piperidinil-carboxílico)-[resina 2-Cl-Trt]) foi dividida, e uma porção de 0,3 mmol foi usada para clivagem subseqüente. A resina peptídica (0,3 mmol) foi então tratada com uma mistura de TFA/TIS/H_2O (15 mL, v/v/v = 95:2,5:2,5) em temperatura ambiente por 90 min. A resina foi então filtrada e lavada com TFA. O filtrado foi evaporado *in vacuo* e o peptídeo bruto (0,3 mmol; D-Phe-D-Phe-DLeu-D-Lys-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH) foi precipitado por éter dietílico.

Para a purificação, o peptídeo bruto (0,3 mmol) foi dissolvido em ácido acético 2% em H_2O (50 mL), e a solução foi carregada em uma coluna de HPLC e purificada usando o sistema de tamponamento de TEAP com um pH de 5,2 (tampões A = TEAP 5,2 e B = TEAP 5,2 20% em ACN 80%). O composto foi eluído com um gradiente linear de tampão B, 7% de B até 37% de B ao longo de 60 min. As frações com pureza acima de 95% foram reunidas em pool, e a solução resultante foi diluída com dois volumes de água. A solução diluída foi então carregada em uma coluna de HPLC para troca de sal e purificação adicional com um sistema de tamponamento de TFA

(tampões A = TFA 0,1% em H_2O e B = TFA 0,1% em ACN 80%/H_2O 20%), e um gradiente linear de tampão B, 2% de B até 75% de B ao longo de 25 min. As frações com pureza acima de 97% foram reunidas em pool, congeladas e secas em um liofilizador, para gerar o peptídeo purificado como um pó amorfo branco (93 mg). Análise por HPLC: t_R = 16,43 min, pureza de 99,2%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 680,4, observada - 680,3.

O Composto (2) também foi preparado usando um esquema de reação análogo àquele mostrado na figura 2, com os seguintes derivados de aminoácido: Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-D-Lys(Boc)-OH e ácido Boc-4-amino-1-Fmoc-(piperidina)-4-carboxílico.

O peptídeo totalmente protegido ligado à resina foi sintetizado manualmente partindo de resina cloreto 2-clorotritila (PS DVB 1%, 500 g, 1 meq/g). A resina foi tratada com ácido Boc-4-amino-1-Fmoc-4-(piperidina)-4-carboxílico (280 g, 600 mmol) em uma mistura de DMF, DCM e DIEA (260 mL de cada) foi adicionada. A mistura foi agitada por 4 horas, e então a resina foi coberta por 1 hora pela adição de MeOH (258 mL) e DIEA (258 mL). A resina foi isolada e lavada com DMF (3 x 3 litros). A resina contendo o primeiro aminoácido foi tratada com piperidina em DMF (3 x 3 litros de 35%), lavada com DMF (9 x 3 litros) e Fmoc-D-Lys(Boc)-OH (472 g) foi acoplado usando PyBOP (519 g) na presença de HOBt (153 g) e DIEA (516 mL) e em DCM/DMF (500 mL/ 500 mL) com agitação por 2,25 horas. O dipeptídeo contendo resina foi isolado e lavado com DMF (3 x 3,6 litros). O grupo Fmoc foi removido por tratamento com

piperidina em DMF (3 x 3,6 litros de 35%) e a resina foi lavada com DMF (9 x 3,6 litros) e tratada com Fmoc-D-Leu-OH (354 g), DIC (157 mL) e HOBt (154 g) em DCM/DMF (500 mL / 500 mL) e agitada por 1 hora. A lavagem subseqüente com DMF (3 x 4,1 litros), seguida por clivagem do grupo Fmoc com piperidina em DMF (3 x 4,2 litros de 35%) e então lavagem da resina com DMF (9 x 4,2 litros), forneceu o tripeptídeo ligado à resina. Esse material foi tratado com Fmoc-D-Phe-OH (387 g), DIC (157 mL) e HOBt (153 g) em DCM/DMF (500 mL / 500 mL) e agitado de um dia para o outro. A resina foi isolada, lavada com DMF (3 x 4,7 litros), e então tratada com piperidina em DMF (3 x 4,7 litros de 35%) para clivar o grupo Fmoc, e então lavada novamente com DMF (9 x 4,7 litros). A resina carregada com tetrapeptídeo foi tratada com Fmoc-D-Phe-OH (389 g), DIC (157 mL) e HOBt (154 g) em DCM/DMF (500 mL / 500 mL) e agitada por 2,25 horas. A resina foi isolada, lavada com DMF (3 x 5,2 litros) e então tratada com piperidina (3 x 5,2 litros de 35%) em DMF. A resina foi isolada e lavada seqüencialmente com DMF (9 x 5,2 litros) então DCM (5 x 5,2 litros). Ela foi seca para gerar um rendimento de 90,4% de peptídeo protegido ligado à resina. O peptídeo foi clivado da resina usando TFA/ água (4,5 litros, 95/5), o que também serviu para remover os grupos de proteção Boc. A mistura foi filtrada, concentrada (1/3) e então precipitada por adição a MTBE (42 litros). O sólido foi coletado por filtração e seco sob pressão reduzida para gerar o peptídeo bruto.

Para a purificação, o peptídeo bruto foi dissolvido em TFA 0,1% em H_2O, e purificado por HPLC preparativa de fase reversa (C18) usando um gradiente de TFA 0,1%/água - ACN

como a fase móvel. As frações com pureza acima de 95% foram reunidas em pool, concentradas e liofilizadas para fornecer peptídeo puro (> 95,5% puro). Foi efetuada troca iônica usando uma resina de troca iônica Dowex, eluindo com água. A fase aquosa foi filtrada (cápsula de filtro de 0,22 μm) e liofilizada, para gerar o sal de acetato do peptídeo (rendimento global, 71,3%, >99% puro).

EXEMPLO 3: Síntese de composto (3)

Ácido D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[ω(4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH (Id. de Seq. N° 1):

A síntese foi iniciada com 0,3 mmol da resina peptídica: Boc-D-PheD-Phe-D-Leu-D-Lys-(ácido N-Boc-amino-4-piperidinil-carboxílico)-[resina 2-Cl-Trt], que foi preparada durante a síntese do composto (2), como descrito abaixo. Também foram realizadas análises de HPLC e MS, como descrito na síntese do composto (2) acima.

Para a metilação da função ω-amino de D-Lys em Xaa_4, foi seguido um procedimento de três etapas como descrito na síntese do composto (1). Veja a descrição acima. O peptídeo metilado ligado à resina (Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu(ε-Me)D-Lys-(ácido N-Boc-amino-4-piperidinil-carboxílico)-[resina 2-Cl-Trt]) foi então tratado com uma mistura de TFA/TIS/H_2O (15 mL, v/v/v = 95:2,5:2,5) em temperatura ambiente por 90 min. A resina foi então filtrada e lavada com TFA. O filtrado foi evaporado *in vacuo* e o peptídeo bruto (0,3 mmol; D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[ω(ácido 4-amino-piperidina-4-carboxílico)]-OH) foi precipitado por éter dietílico.

O peptídeo bruto (0,3 mmol) foi purificado por HPLC preparativa de acordo com o protocolo descrito na síntese do composto (2). Veja acima. As frações com pureza acima de

97% foram reunidas em pool, congeladas e secas em um liofilizador, para gerar o peptídeo purificado como um pó amorfo branco (185 mg). Análise por HPLC: t_R = 16,93 min, pureza de 99,2%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 694,4, observada - 694,4.

EXEMPLO 4: Síntese de composto (4)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. N° 2):

Os derivados de aminoácido usados foram Boc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-D-Lys(Dde)-OH e N-(1-Fmoc-piperidin-4-il)-L-prolina. Foram realizadas análises de HPLC e MS, como descrito na síntese do composto (1). Veja descrição detalhada acima. O esquema seguido foi substancialmente como mostrado na Figura 2, exceto que os acoplamentos foram mediados por HATU/DIEA, ao invés de DIC.

O peptídeo totalmente protegido ligado à resina foi sintetizado manualmente partindo de resina cloreto 2-clorotritila (3,2 g, 2,4 mmol; NeoMPS). A adesão do primeiro aminoácido à resina foi obtida por tratamento com uma mistura de N-(1-Fmoc-piperidin-4-il)-L-prolina (2,0 g, 4,8 mmol) e DIEA (3,3 mL, 19,2 mmol) em DCM (40 mL) e DMF (10 mL) em temperatura ambiente por 4 horas. A resina foi lavada com 3x DCM/MeOH/DIEA (v/v/v = 17:2:1) e 3x DCM e seca *in vacuo*. A resina resultante (3,7 g; N-(4-piperidinil)-L-prolina-[resina 2-Cl-Trt]) foi dividida em várias porções e uma porção de 1,9 g (1,2 mmol) foi usada para continuar a síntese peptídica. Foram feitos acoplamentos simples mediados por HATU/DIEA com um excesso de 3 vezes de derivados de aminoácido. O grupo Fmoc foi

removido com piperidina 25% em DMF. Após a finalização do alongamento da cadeia peptídica, a resina foi tratada com hidrazina 4% em DMF três vezes por 3 min cada para remover Dde. A resina foi lavada com DMF e DCM e seca *in vacuo*. A resina peptídica resultante (2,1 g; Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-N-(4-piperidinil)-L-prolina-[resina 2-Cl-Trt]) foi dividida novamente, e uma porção de 0,7 g (0,4 mmol) foi usada para clivagem subseqüente. A resina peptídica foi tratada com uma mistura de TFA/TIS/H_2O (15 mL, v/v/v = 95:2,5:2,5) em temperatura ambiente por 90 min. A resina foi filtrada e lavada com TFA. O filtrado foi evaporado *in vacuo* e o peptídeo bruto (220 mg, D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH) foi precipitado por éter dietílico.

Para a purificação, o peptídeo bruto acima (220 mg) foi dissolvido em TFA 0,1% em H_2O (50 mL) e a solução foi carregada em uma coluna de HPLC e purificada usando o sistema de tamponamento de TFA (tampões A = TFA 0,1% em H_2O e B = TFA 0,1% em ACN 60%/H_2O 40%). O composto foi eluído com um gradiente linear de tampão B, 25% B até 75% B ao longo de 25 min, t_R = 43% de B. As frações com pureza acima de 97% foram reunidas em pool, congeladas e secas em um liofilizador, para gerar o peptídeo purificado como um pó amorfo branco (89 mg). Análise por HPLC: t_R = 18,22 min, pureza de 99,5%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 734,5, observada - 734,4.

EXEMPLO 5: Síntese de composto (5)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. N°: 3):

A resina peptídica Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-N-(4-piperidinil)-L-prolina-[resina 2-Cl-Trt], que foi preparada durante a síntese do composto (4) descrita acima, foi usada como o material de partida. Foram realizadas análises de HPLC e MS, como descrito na síntese do composto (1) acima.

Para a guanilação da função ω-amino de D-Lys em Xaa_4, a resina peptídica (0,7 g, 0,4 mmol) foi tratada com uma mistura de cloridrato de 1H-pirazol-1-carboxamidina (0,6 g, 4,0 mmol) e DIEA (0,7 mL, 4,0 mmol) em DMF (15 mL) de um dia para o outro em temperatura ambiente. A resina foi lavada com DMF e DCM e seca *in vacuo*. O peptídeo foi então clivado da resina por tratamento com uma mistura de TFA/TIS/H_2O (15 mL, v/v/v = 95:2,5:2,5) em temperatura ambiente por 90 min. A resina foi então filtrada e lavada com TFA. O filtrado foi evaporado *in vacuo*, e o peptídeo bruto (170 mg; D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH) foi precipitado por éter dietílico.

Para a purificação, o peptídeo bruto acima (170 mg) foi dissolvido em TFA 0,1% em H_2O (50 mL), e a solução foi carregada em uma coluna de HPLC e purificada usando um sistema de tamponamento de TFA (tampões A = TFA 0,1% em H_2O e B = TFA 0,1% em ACN 60%/H_2O 40%). O composto foi eluído com um gradiente linear de tampão B, 25% B até 75% B ao longo de 25 min, t_R = 46% de B. As frações com pureza acima de 97% foram reunidas em pool, congeladas e liofilizadas para gerar o peptídeo purificado como um pó amorfo branco (81 mg). Análise por HPLC: t_R = 19,42 min, pureza de 100%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada – 776,5, observada – 776,5.

EXEMPLO 6: Síntese de composto (6)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. N° 1):

A síntese foi iniciada com 0,7 g (0,4 mmol) da resina peptídica, Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-N-(4-piperidinil)-L-prolina-[resina 2-Cl-Trt], que foi preparada durante a síntese do composto (4), como descrito acima. Foram realizadas análises de HPLC e MS, como descrito na síntese do composto (1) acima. Nesse caso, o peptídeo Xaa_1-Xaa_4 foi pré-sintetizado e acoplado, ao contrário à montagem em etapas do peptídeo mostrada na Figura 2.

Para a metilação da função ω-amino de D-Lys em Xaa_4, foi seguido um procedimento de três etapas, como descrito na síntese do composto (1) acima. O peptídeo metilado ligado à resina (Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-N-(4-piperidinil)-L-prolina-[resina 2-Cl-Trt]) foi então tratado com uma mistura de TFA/TIS/H_2O (15 mL, v/v/v = 95:2,5:2,5) em temperatura ambiente por 90 minutos. A resina foi filtrada e lavada com TFA. O filtrado foi evaporado *in vacuo*, e o peptídeo bruto (200 mg; D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH) foi precipitado por éter dietílico.

Para a purificação, o peptídeo bruto acima (200 mg) foi dissolvido em TFA 0,1% em H_2O (50 mL), e a solução carregada em uma coluna de HPLC e purificada usando um sistema de tamponamento de TFA (tampões A = TFA 0,1% em H_2O e B = TFA 0,1% em ACN 60%/H_2O 40%). O composto foi eluído com um gradiente linear de tampão B 25% a 75%, ao longo de 30 min, t_R = 42% de B. As frações com pureza acima de 97% foram reunidas em pool, congeladas e secas em um

liofilizador, para gerar o peptídeo purificado como um pó amorfo branco (41 mg). Análise por HPLC: t_R = 18,66 min, pureza de 98,1%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 748,5, observada - 748,5.

EXEMPLO 7: Síntese de composto (7)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg-[amida de homopiperazina] (Id. de Seq. N° 4):

Os derivados de aminoácido usados foram Boc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Leu-OH e Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH. Foram realizadas análises de HPLC e MS, como na síntese do composto (1) descrita acima. O peptídeo ligado à resina totalmente protegido foi sintetizado em um Sintetizador Múltiplo SYMPHONY (Protein Technology Inc.) partindo da resina carbamato de homopiperazina de Wang (0,35 mmol; homopiperazina-[resina carbamato de Wang]) que foi preparada durante a síntese do composto (1). Foram feitos acoplamentos simples mediados por HBTU/DIEA com um excesso de 4 vezes de derivados de aminoácido. O grupo Fmoc foi removido com piperidina 25% em DMF. Após a finalização da síntese automatizada, a resina peptídica (Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg(Pbf)-[amida de homopiperazina]) foi transferida para um vaso de síntese peptídica manual, e tratada com uma mistura de TFA/TIS/H_2O (15 mL, v/v/v = 95:2,5:2,5) em temperatura ambiente por 90 min. A resina foi filtrada e lavada com TFA. O filtrado foi evaporado *in vacuo*, e o peptídeo bruto (380 mg; D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg-[amida de homopiperazina]) foi precipitado por éter dietílico.

Para a purificação, o peptídeo bruto acima (380 mg) foi dissolvido em TFA 0,1% em H_2O (50 mL) e a solução foi

carregada em uma coluna de HPLC e purificada usando um sistema de tamponamento de TFA (tampões A = TFA 0,1% em H_2O e B = TFA 0,1% em ACN 60%/H_2O 40%). O composto foi eluído com um gradiente linear de tampão B, 25% B até 75% B ao longo de 25 min, t_R = 36% de B. As frações com pureza acima de 97% foram reunidas em pool, congeladas e liofilizadas para gerar o peptídeo purificado como um pó amorfo branco (222 mg). Análise por HPLC: t_R = 16,75 min, pureza de 100%, gradiente 2% de B até 22% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 664,4, observada - 664,5.

EXEMPLO 8: Síntese de composto (8)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico]-OH (Id. de Seq. N° 3):

Esse composto foi preparado basicamente de acordo com o procedimento descrito acima para a síntese do composto (5), exceto que o ácido N-Boc-amino-(4-N-Fmoc-piperidinil) carboxílico serviu de substituto para N-(1-Fmoc-piperidin-4-il)-L-prolina na adesão à resina 2-Cl-Trt. Peptídeo purificado final: pó amorfo, 85 mg em rendimento em uma escala de síntese de 1 mmol. Análise por HPLC: t_R = 17,87 min, pureza de 100%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 722,4, observada - 722,5.

EXEMPLO 9: Síntese de composto (9)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-iPr)D-Lys-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH (Id. de Seq. N° 5):

A síntese foi iniciada a partir de 0,15 mmol da resina peptídica Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-(ácido N-Boc-amino-4-piperidinil-carboxílico)-[resina 2-Cl-Trt], que foi

preparada durante a síntese do composto (2) acima. Para a isopropilação da função ω-amino de D-Lys em Xaa_4, a resina peptídica foi tratada com uma mistura de triacetoxiborohidreto de sódio (3 mmol) e acetona (6 mmol) em TMOF (10 mL) por 4 horas em temperatura ambiente. As etapas de clivagem e purificação subseqüentes foram realizadas de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (2). Peptídeo purificado final: pó amorfo, 67 mg em rendimento. Análise por HPLC: t_R = 19,29 min, pureza de 98,4%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 722,5, observada - 722,5.

EXEMPLO 10: Síntese de composto (10):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β-amidino)D-Dap-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH (Id. de Seq. N° 6):

Veja o esquema da Figura 3. Os derivados de aminoácido usados foram Boc-D-Phe-OH, Boc-D-Phe-OH, Boc-D-Leu-OH, Boc-D-Dap(Fmoc)-OH e o ácido N-Fmoc-amino-(4-N-Boc-piperidinil) carboxílico. Foram realizadas análises de HPLC e MS, como descrito na síntese do composto (1). O peptídeo totalmente protegido ligado à resina foi sintetizado manualmente começando com a resina 4-Fmoc-hidrazinobenzoil AM NovaGel (3 mmol; Novabiochem). Primeiro o grupo de proteção Fmoc na resina de partida foi removido por piperidina 25% em DMF, e a resina foi então tratada com uma mistura de ácido N-Fmoc-amino-(4-N-Boc-piperidinil) carboxílico (7,5 mmol), PyBOP (7,5 mmol) e DIEA (15 mmol) em DMF de um dia para o outro em temperatura ambiente. O grupo Fmoc no aminoácido anexado foi substituído por *o*-NBS em duas etapas: (i) remoção Fmoc por piperidina 25% em DMF. (ii) proteção de *o*-NBS de acordo

com o procedimento descrito na síntese do composto (1). A resina peptídica resultante, o ácido N-*o*-NBS-amino-(4-N-Boc-piperidinil) carboxílico-[resina hidrazinobenzoil AM NovaGel], foi dividida em várias porções, e uma porção de 1 mmol foi usada para continuar a síntese peptídica. Foram feitos acoplamentos simples mediados por PyBOP/DIEA com um excesso de 3 vezes de derivados de aminoácido. O grupo Boc foi removido com TFA 30% em DCM. Após a finalização do alongamento da cadeia peptídica, a resina foi tratada com DBU 2% em DMF por 2 x 8 min para remoção de Fmoc, seguida por guanilação da função ω-amino de D-Dap em Xaa_4 de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (5), acima. A desproteção de *o*-NBS final foi realizada de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (1).

Para clivagem oxidativa, a resina peptídica seca foi misturada com uma mistura de $Cu(OAc)_2$ (1 mmol), piridina (4 mmol) e DBU (2 mmol) em H_2O 5% em DMF e foi borbulhado ar através da resina por 6 h em temperatura ambiente. A resina foi filtrada e lavada com DMF, e o filtrado foi evaporado *in vacuo*. O resíduo, Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β-amidino)D-Dap-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH, foi tratado com 95% TFA em H_2O para remoção de Boc. A solução foi evaporada *in vacuo* e o peptídeo bruto (1 mmol; D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β-amidino)D-Dap-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH) foi precipitado por éter dietílico.

A purificação do peptídeo bruto acima foi obtida de acordo com o protocolo descrito na síntese do composto (2). O peptídeo purificado era um pó amorfo (16 mg). Análise por HPLC: t_R = 16,97 min, pureza de 99,9%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon

molecular esperada - 680,4, observada - 680,4.

EXEMPLO 11: Síntese de composto (11)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Nar-[ω(ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico)]-OH (Id. de Seq. N° 7):

Esse composto foi preparado de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (10), exceto que Boc-D-Dbu(Fmoc)-OH serviu de substituto para Boc-D-Dap(Fmoc)-OH no acoplamento do derivado de aminoácido em Xaa_4. Peptídeo purificado final: pó amorfo, 23 mg em rendimento em uma escala de síntese de 1 mmol. Análise por HPLC: t_R = 17,12 min, pureza de 99,2%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 694,4, observada - 694,5.

EXEMPLO 12: Síntese de composto (12)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dbu-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. N° 8):

Esse composto foi preparado de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (4), como descrito acima. A variação foi a substituição de Fmoc-D-Dbu(ivDde)-OH para Fmoc-D-Lys(Dde)-OH no acoplamento do derivado de aminoácido em Xaa_4. Peptídeo purificado final: pó amorfo, 7 mg em rendimento em uma escala de síntese de 0,4 mmol. Análise por HPLC: t_R = 18,15 min, pureza de 98,9%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 706,4, observada - 706,4.

EXEMPLO 13: Síntese de composto (13)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Nar-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. N° 7):

A síntese foi iniciada a partir de 0,4 mmol da resina

peptídica Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dbu-N-(4-piperidinil)-L-prolina-[resina 2-Cl-Trt], que foi preparada durante a síntese do composto (12). A guanilação da função ω-amino de D-Dbu em Xaa_4 foi obtida de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (5), acima. As etapas de clivagem e purificação subseqüentes foram realizadas de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (1). Peptídeo purificado final: pó amorfo, 7 mg em rendimento. Análise por HPLC: t_R = 18,68 min, pureza de 97,3%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 748,5, observada - 748,5.

EXEMPLO 14: Síntese de composto (14)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dap(amidino)-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. N° 6):

O composto foi preparado de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (13), exceto que Fmoc-D-Dap(ivDde)-OH serviu de substituto para Fmoc-D-Dbu(ivDde)-OH no acoplamento do derivado de aminoácido em Xaa_4. Peptídeo purificado final: pó amorfo, 12 mg em rendimento em uma escala de síntese de 0,4 mmol. Análise por HPLC: t_R = 18,55 min, pureza de 98,0%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 734,4, observada - 734,4.

EXEMPLO 15: Síntese de composto (15)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N° 2):

O composto foi preparado de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (1), exceto que a metilação da função ω-amino de D-Lys em Xaa_4 foi omitida. Peptídeo

purificado final: pó amorfo, 140 mg em rendimento em uma escala de síntese de 0,3 mmol. Análise por HPLC: t_R = 14,02 min, pureza de 99,3%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 678,4, observada - 678,5.

EXEMPLO 16: Síntese de composto (16)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Har-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N° 3):

O composto foi preparado de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (1), exceto que a etapa de guanilação serviu de substituto para a metilação da função ω-amino de D-Lys em Xaa_4. A guanilação foi obtida de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (5), acima. Peptídeo purificado final: pó amorfo, 173 mg em rendimento em uma escala de síntese de 0,3 mmol. Análise por HPLC: t_R = 15,05 min, pureza de 98,6%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 720,5, observada - 720,5.

EXEMPLO 17: Síntese de composto (17)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-iPr)D-Lys-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N° 5):

O composto foi preparado de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (1), exceto que uma etapa de isopropilação substituiu a metilação da função ω-amino de D-Lys em Xaa_4. A isopropilação foi obtida de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (9). Peptídeo purificado final: pó amorfo, 233 mg em rendimento em uma escala de síntese de 0,3 mmol. Análise por HPLC: t_R = 16,16 min, pureza de 94,5%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular

esperada – 720,5, observada – 720,5.

EXEMPLO 18: Síntese de composto (18)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-(β-amidino)D-Dap-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N° 6):

O composto foi preparado de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (16), exceto para a substituição de Fmoc-D-Dap(ivDde)-OH para Fmoc-D-Lys(Dde)-OH no acoplamento do derivado de aminoácido em Xaa_4. Peptídeo purificado final: pó amorfo, 155 mg em rendimento em uma escala de síntese de 0,3 mmol. Análise por HPLC: t_R = 14,44 min, pureza de 99,1%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 678,4, observada – 678,5.

EXEMPLO 19: Síntese de composto (19)

D-Phe-D-Phe-D-Nle-((β-amidino)D-Dap[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N° 6):

O composto foi preparado de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (18) acima, exceto para a substituição de Fmoc-D-Nle-OH para Fmoc-D-Leu-OH no acoplamento do derivado de aminoácido em Xaa_3. Peptídeo purificado final: pó amorfo, 190 mg em rendimento em uma escala de síntese de 0,3 mmol. Análise por HPLC: t_R = 14,69 min, pureza de 98,9%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada – 678,2, observada – 678,5.

EXEMPLO 20: Síntese de composto (20)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-((3-amidino)D-Dap-[amida de homopiperazina] (Id. de Seq. N° 6):

O composto foi preparado de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (18) acima, exceto que a

guanilação da homopiperazina no terminal C foi omitida. Peptídeo purificado final: pó amorfo, 172 mg em rendimento em uma escala de síntese de 0,3 mmol. Análise por HPLC: t_R = 13,84 min, pureza de 99,1%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 636,4, observada - 636,5.

EXEMPLO 21: Síntese de composto (21)

D-Phe-D-Phe-D-Nle-(β-amidino)D-Dap-[amida de homopiperazina] (Id. de Seq. N° 6):

O composto foi preparado de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (19), exceto que a guanilação da homopiperazina no terminal C foi omitida. Peptídeo purificado final: pó amorfo, 149 mg em rendimento em uma escala de síntese de 0,3 mmol. Análise por HPLC: t_R = 14,06 min, pureza de 98,5%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 636,4, observada - 636,5.

EXEMPLO 22: Síntese de composto (22)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Dbu-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N° 8):

O composto foi preparado de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (15), exceto para a substituição de Fmoc-D-Dbu(ivDde)-OH para Fmoc-D-Lys(Dde)-OH no acoplamento do derivado de aminoácido em Xaa_4. Peptídeo purificado final: pó amorfo, 152 mg em rendimento em uma escala de síntese de 0,3 mmol. Análise por HPLC: t_R = 14,03 min, pureza de 98,1%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 650,4, observada - 650,5.

EXEMPLO 23: Síntese de composto (23)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Nar-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N° 7):

O composto foi preparado de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (16), exceto para a substituição de Fmoc-D-Dbu(ivDde)-OH para Fmoc-D-Lys(Dde)-OH no acoplamento do derivado de aminoácido em Xaa_4. Peptídeo purificado final: pó amorfo, 227 mg em rendimento em uma escala de síntese de 0,3 mmol. Análise por HPLC: t_R = 14,37 min, pureza de 99,3%, gradiente 5% de B até 25% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 664,4, observada - 664,5.

EXEMPLO 24: Síntese de composto (24)

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg-[amida de 4-amidinohomopiperazina] (Id. de Seq. N° 4):

O composto foi preparado por guanilação da homopiperazina no terminal C de Bcz-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Arg-[amida de homopiperazina], que foi sintetizada de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (7), descrita acima. A clivagem e purificação subseqüentes foram realizadas de acordo com o procedimento descrito na síntese do composto (1), acima. Peptídeo purificado final: pó amorfo, 102 mg em rendimento em uma escala de síntese de 0,3 mmol. Análise por HPLC: t_R = 17,34 min, pureza de 98,4%, gradiente 2% de B até 22% de B ao longo de 20 min; MS ($M+H^+$): massa do íon molecular esperada - 706,5, observada - 706,5.

EXEMPLO 25: Síntese do Composto (25): D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[1,3-dioxolan-2-il)metanamina amida] (SEQ ID NO: 2):

Estas sínteses foram realizadas de acordo com o

esquema mostrado na Figura 4. Os intermediários descritos em baixo correspondem aos mostrados na Figura 4. Para uma suspensão de intermediárioI Boc-D-Phe-OH I-1 (7.96 g, 30,0 mmol), intermediário D-Leu-OBn p-TsOH I-2 (11.80 g, 30,0 mmol), monohidrato HOBt (4.46 g, 33,0 mmol) e DIEA (8,53 g, 66,0 mmol) THF de anidrido (250 mL), arrefecidos em um banho de água gelada foi adicionado EDCI (6,33 g, 33,0 mmol) em quatro porções ao longo de 20 minutos com 5 minutos entre cada adição. A suspensão foi agitada de um dia para o outro a partir de uma temperatura de partida de 0 °C para temperatura ambiente. Após a evaporação de THF, os resíduos foram dissolvidos em acetate etílico e lavados sequencialmente com 10% de ácido citrico, $NaHCO_3$ saturado e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e evaporada sob pressão reduzida. Os resíduos foram dissolvidos em DCM, passados através de sílica gel e eluídos em 20% de acetato etílico em hexanos. O eluente foi evaporado para dar o produto puro Boc-D-Phe-D-Leu-OBn, intermediário I-3 (12.40 g, 88%) na forma de óleo. LC-MS: m/z = 469 (M+H).

O intermediário I-3 (12.40 g, 26,5 mmol) foi dissolvido em DCM (50mL). Adicionou-se TFA (25 mL) e a solução foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas. Após a evaporação de DCM e TFA, os resíduos foram residue tornaram-se em azeotrópicos através de tolueno para dar o sal TFA de D-Phe-Leu-OBn, intermediário I-4. Este dipeptídeo bruto foi suspenso em THF, ao qual se adicionou Boc-D-Phe-OH (6,36 g, 24 mmol), monohidrato HOBt (4.04 g, 26,4 mmol) e DIEA (8,7 mL, 50,0 mmol) a 0 °C. EDCI (6,33 g, 6.4 mmol) foi adicionado em quarto porções durante 20

minutos com 5 minutos entre cada adição. A suspensão foi agitada de 0 °C à temperatura ambiente de um dia para o outro. Após a evaporação de THF, os resíduos foram dissolvidos em acetato etílico e lavados sequencialmente com 10% de ácido citrico, $NaHCO_3$ saturado e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e evaporada sob pressão reduzida. Os resíduos foram recristalizados de 400 mL acetona/hexanos (1:3) para dar 9,1 g de produto puro. O licor de base foi evaporado e novamente recristalizado a partir de acetona/hexanos (1:3) para dar 2,0 g de produto. O rendimento total foi de 11,1 g (68% em duas etapas). LC-MS: m/z = 616 (M+H).

Em um frasco limpo sob pressão com azoto, foi adicionado palladium humido em cabrono (1,8 g) e uma solução de Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-OBn, intermediário I-5 (11,1 g, 18,05 mmol) em metanol (50 mL). A mistura foi agitada em balão de hidrogénio de um dia para o outro. Após a filtração através de celite, o metanol foi evaporado sob reduzida pressão. Os resíduos foram dissolvidos em acetona (20 mL) e lentamente adicionados com 500 mL de água com 25 mL de 1N HCl sob agitação vigorosa. O produto puro Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-OH, intermediário I-6 foi obtido por filtração a 9,4 g (99%). LC-MS: m/z = 526 (M+H).

A uma solução de intermediário I-6 (2.06 g, 3.90 mmol), D-Lys(Boc)-OAll hidrocloreto (1,26 g, 3,90 mmol) e DIEA (1,7 ml, 9,8 mmol) em DMF adicionou-se TBTU (1,56 g, 4,88 mmol) em três porções durante 15 min a 0 °C. Após agitação de um dia para o outro a partir de uma temperature de partida de 0 °C para a temperatura ambiente, DMF foi evaporado sob elevado vácuo. A mistura de reacção bruta

foi precipitada em 400 mL de água gelada e filtrada para recolha do precipitado Boc-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys(Boc)-OAll intermediário I-7 (2,60 g), que foi usado sem purificação adicional para a próxima etapa.

A uma solução de intermediário I-7 (2,60 g, 3,3 mmol) em MeCN (75 mL) adicionou-se pirrolidina (1,1 ml, 13,3 mmol) e paladium tetracis(trifenilfosfina) (400 mg, 0,35 mmol) a 0 °C. A mistura de reacção foi agitada à temperature ambiente durante 3 horas e evaporada até ficar seca. Os resíduos foram purificados por cromatografia de coluna de fase reversa com 30% de MeCN/água a 90% de MeCN/água para dar o ácido puro, intermediário I-8 (2,0 g, 80%) após evaporação de acetonitrila/água. LC-MS: m/z = 754 (M+H).

A uma solução do ácido, do intermediário I-8 (150 mg, 0,20 mmol), da amina HNR_aR_b, de 2,8-diazaspiro[4,5]decan-1-ona (57 mg, 0,30 mmol) e DIEA (175 ul, 1,0 mmol) em DMF (5 mL) adicionou-se HBTU (113 mg, 3,0 mmol) a 0 °C. Após agitação de um dia para o outro a partir de uma temperatura de partida de 0 °C para temperatura ambiente, DMF foi evaporado sob pressão reduzida. Os resíduos foram agitados com 4N HCl em 1,4-dioxano (2,0 mL) à temperatura ambiente durante 1 hora. Após a remoção do dioxano, os resíduos foram dissolvidos em água e purificados em cromatografia de coluna de fase reversa com um gradiente de 10% de MeCN/água a 60% de MeCN/água em 30 minutos para dar o produto puro, o composto (25) (108 mg, 78% de rendimento para as duas etapas) após evaporação do solvente. LC-MS: m/z = 690 (M+H).

EXEMPLO 26: Síntese de composto (26):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 2-metil-2,8-diazaspiro[4,5]decan-1-ona] (Id. de Seq. N° 2):

O Composto (26) foi preparado basicamente como descrito para o composto 25 acima, exceto que a amina (HNR_aR_b no esquema da Figura 4) na etapa de acoplamento final da amida foi 2-metil-2,8-diazaspiro[4,5]decan-1-ona no lugar de 2,8-diazaspiro[4,5]decan-1-ona. LC-MS: m/z = 704 (M+H).

EXEMPLO 27: Síntese de composto (27):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 1,3,8-triazaspiro[4,5] decano-2,4-diona] (Id. de Seq. N° 2):

O Composto (27) foi preparado basicamente como descrito para o composto 25 acima, exceto que a amina 1,3,8-triazaspiro[4,5]decano-2,4-diona foi usada na etapa final. LC-MS: m/z = 705 (M+H).

EXEMPLO 28: Síntese de composto (28):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 5-cloro-1-(piperidin-4-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-2(3)H-ona] (Id. de Seq. N° 2):

O Composto (28) foi preparado basicamente como descrito acima para o composto 25 acima, exceto que a amina 5-cloro-1-(piperidin-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3)H-ona foi usada. LC-MS: m/z = 394.

EXEMPLO 29: Síntese de composto (29):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de morfolino(piperidin-4-il)metanona] (Id. de Seq. N° 2):

O Composto (29) foi preparado basicamente como descrito acima para o composto 25 acima, exceto que a amina morfolino(piperidin-4-il)metanona foi usada. LC-MS: m/z = 366.

EXEMPLO 30: Síntese de composto (30):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 4-fenil-1-(piperidin-il-1*H*-imidazol-2(*3H*)-ona] (Id. de Seq. N° 2):

O Composto (30) foi preparado basicamente como descrito acima para o composto 25 acima, exceto que a amina 4-fenil-1-(piperidin-il-1*H*-imidazol-2(*3H*)-ona foi usada. LC-MS: m/z = 779 (M+H).

EXEMPLO 31: Síntese de composto (31):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 4-(3,5-dimetil-4*H*-1,2,4-triazol-4-il)piperidina] (Id. de Seq. N° 2):

O Composto (31) foi preparado basicamente como descrito acima para o composto 25 acima, exceto que a amina 4-(3,5-dimetil-4*H*-1,2,4-triazol-4-il)piperidina foi usada. LC-MS: m/z = 716 (M+H).

EXEMPLO 32: Síntese de composto (32):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 1-(piperidin-4-il) indolin-2-ona] (Id. de Seq. N° 2):

O Composto (32) foi preparado basicamente como descrito acima para o composto 25 acima, exceto que a amina 1-(piperidin-4-il)indolin-2-ona foi usada.

LC-MS: m/z = 752 (M+H).

EXEMPLO 33: Síntese de composto (33):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5] decan-4-ona amida] (Id. de Seq. N° 2):

O Composto (33) foi preparado basicamente como descrito acima para o composto 25 acima, exceto que a amina 1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-ona foi usada. LC-MS: m/z = 767 (M+H).

EXEMPLO 34: Síntese de composto (34):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de imidazo[1,2-

a]piridina-2-ilmetanamina] (Id. de Seq. N° 2):

O Composto (34) foi preparado basicamente como descrito acima para o composto 25 acima, exceto que a amina imidazo[1,2-a]piridina-2-ilmetanamina foi usada. LC-MS: m/z = 683 (M+H).

EXEMPLO 35: Síntese de composto (35):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys[amida de (5-metilpirazin-2-il) metilamina] (Id. de Seq. N° 2):

O Composto (35) foi preparado basicamente como descrito acima para o composto 25 acima, exceto que a amina (5-metil pirazin-2-il)metanamina foi usada na etapa final. LC-MS: m/z = 659 (M+H).

EXEMPLO 36: Síntese de composto (36):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 1-(piperidin-4-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-2(*3H*)-ona] (Id. de Seq. N° 2):

O Composto (36) foi preparado basicamente como descrito acima para o composto 25 acima, exceto que a amina 1-(piperidin-4-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-2(*3H*)-ona foi usada. LC-MS: m/z = 753 (M+H).

EXEMPLO 37: Síntese de composto (37):

D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[amida de 4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-pirazolo[4,3-c]piridina] (Id. de Seq. N° 2):

O Composto (37) foi preparado basicamente como descrito acima para o composto 25 acima, exceto que a amina 4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-pirazolo[4,3-c]piridina foi usada. LC-MS: m/z = 659 (M+H).

EXEMPLO 38: Confirmação de estruturas de amidas peptídicas sintéticas 1-24

A Tabela I mostra o peso molecular calculado do íon molecular, MH^+ para cada composto, e o peso molecular real

observado por espectrometria de massa. Também é mostrado o tipo de fase sintética usada na síntese de cada composto: fase sólida, ou mista; e o tipo de resina usada na síntese, seja uma resina 2-clorotritila "2-Cl-Trt", uma resina hidrazinobenzoil "hidrazina" ou uma resina p-nitrofenil-carbonato (Wang) "carbonato". O número da figura que mostra o esquema sintético relevante para a síntese de cada composto é mostrado na última coluna.

Tabela I - Síntese e confirmação de estruturas de compostos (1)-(24)

COMPOSTO	MH+ CALCULADO	MH+ OBSERVADO	FASE SINTÉTICA	RESINA	FIGURA
1	692,5	692,5	mista	Carbonato	1
2	680,4	680,3	sólida	2-Cl-Trt	2
3	694,4	694,4	sólida	2-Cl-Trt	2
4	734,5	734,4	sólida	2-Cl-Trt	2
5	776,5	776,5	sólida	2-Cl-Trt	2
6	748,5	748,5	sólida	2-Cl-Trt	2
7	664,4	664,5	sólida	Carbonato	1
8	722,4	722,5	sólida	2-Cl-Trt	2
9	722,5	722,5	sólida	2-Cl-Trt	2
10	680,4	680,4	sólida	hidrazina	3
11	694,4	694,5	sólida	hidrazina	3
12	706,4	706,4	sólida	2-Cl-Trt	2
13	748,5	748,5	sólida	2-Cl-Trt	2
14	734,4	734,4	sólida	2-Cl-Trt	2
15	678,4	678,5	mista	Carbonato	1
16	720,5	720,5	mista	Carbonato	1
17	720,5	720,5	mista	Carbonato	1
18	678,4	678,5	mista	Carbonato	1

19	678,4	678,5	mista	Carbonato	1
20	636,4	636,5	sólida	Carbonato	1
21	636,4	636,5	sólida	Carbonato	1
22	650,4	650,5	mista	Carbonato	1
23	692,4	692,5	mista	Carbonato	1
24	706,5	706,5	mista	Carbonato	1

EXEMPLO 39: Inibição da produção de AMPc pelo estímulo do receptor kappa opióide endógeno de camundongo em células R1.G1

A potência da amidas peptídicas sintéticas como agonistas do receptor kappa opióide foi determinada medindo a inibição da atividade adenilato ciclase estimulada por forscolina. Células R1.G1 (uma linhagem celular de timoma de camundongo que expressa apenas o receptor kappa opióide e nenhum outro subtipo de receptor opióide) foram primeiro expostas a forscolina (para induzir AMPc) mais a amida peptídica sintética na concentração de teste. Depois da incubação, o nível de AMPc nas células R1.G1 desafiadas foi determinado utilizando um imunoensaio AMPc à base de transferência ressonante de energia de fluorescência resolvida no tempo (TR-FRET) (LANCE™, Perkin Elmer). O método detalhado está descrito adiante:

Células de camundongo R1.G1 (ATCC, Manassas, VA) foram desenvolvidas em suspensão em DMEM com alto teor de glicose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Cellgro, Herndon, VA) contendo 10% de soro de cavalo e 2% de glutaMax (Invitrogen, Carlsbad. CA) sem antibióticos adicionados. No dia do experimento, as células foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente e depois lavadas uma vez com HBSS (Solução Salina Tamponada com HEPES,

Invitrogen, Carlsbad, CA). As células foram então centrifugadas uma vez mais e ressuspensas em tampão de estímulo (HBSS com 0,05% de FAF-BSA (Albumina de soro bovino livre de ácido graxo, Roche Applied Science, Indianapolis, IN), HEPES 5 mM) a 2 milhões de células por mL. O anticorpo fornecido com o kit de imunoensaio AMPc LANCE™ foi então adicionado às células de acordo com as instruções do fabricante e 12.000 células por poço foram então adicionadas aos poços contendo forscolina a uma concentração final fixa predeterminada (tipicamente cerca de 2,5 uM) e a quantidade previamente determinada da amida peptídica sintética a ser testada. As amidas peptídicas sintéticas foram testadas em uma variedade de concentrações para determinar a potência. As células foram incubadas com a amida peptídica sintética mais forscolina durante cerca de 20 minutos à temperatura ambiente. Depois da incubação as células são lisadas pela adição de 12 uL de mistura de detecção conforme fornecido com o kit LANCE™, seguido por incubação durante uma hora à temperatura ambiente. A fluorescência resolvida no tempo foi lida utilizando um filtro de excitação a 330 - 380 nm, um filtro de emissão a 665 nm, espelho dicrôico 380, e Z = 1 mm. Uma curva padrão para a concentração de AMPc neste ensaio permitiu a determinação da quantidade de AMPc presente em cada poço. Foi produzida uma curva traçando um gráfico da concentração da amida peptídica sintética em contraste com os níveis de AMPc nas células de teste e submetida a regressão não linear usando um algoritmo de ajuste de curva de quatro parâmetros para calcular o valor de EC_{50}, a concentração da amida peptídica sintética necessária para produzir 50% da

supressão máxima da produção de AMPc pela amida peptídica sintética.

A Tabela II mostra os valores de EC50 obtidos nesse ensaio com compostos de amida peptídica sintética (1) a (36).

Tabela II - Atividade e eficácia do agonista kappa opióide

	mKOR		hKOR	
Composto N°	EC_{50} (nM)	Eficácia (%)	EC_{50} (nM)	Eficácia (%)
(1)	0,043	103	0,15	97
(2)	0,048	96	0,16	99
(3)	0,052	96	0,16	100
(4)	0,075	94	0,15	92
(5)	0,034	89	0,17	98
(6)	0,036	89	0,13	100
(7)	0,012	98	0,11	100
(8)	0,043	90	0,12	96
(9)	0,078	96	0,17	100
(10)	0,826	90	0,30	86
(11)	0,052	92	0,15	82
(12)	0,055	89	0,17	100
(13)	0,032	88	0,13	90
(14)	0,349	86	0,21	81
(15)	0,028	92	0,11	92
(16)	0,021	105	0,11	96
(17)	0,039	103	0,10	102
(18)	1,02	103	1,15	93
(19)	2,152	99	nd	nd
(20)	0,491	102	0,39	84

(21)	0,732	103	1,06	99
(22)	0,095	103	0,18	86
(23)	0,091	104	0,17	84
(24)	0,036	97	0,09	93
(25)	0,0314	82	0,0027	101
(26)	0,0194	86	0,0083	99
(27)	0,0056	87	<0,001	88
(28)	0,0582	83	0,0083	100
(29)	0,0464	86	0,0145	100
(30)	0,1293	88	0,0116	95
(31)	0,0216	86	0,0042	95
(32)	0,0485	92	0,005	102
(33)	0,0767	86	0,0165	101
(34)	0,3539	90	0,0208	101
(35)	0,0359	86	0,0064	99
(36)	0,0234	87	0,0052	100

nd — não determinado; mKOR e hKOR - receptores kappa opióides de camundongo e humanos

EXEMPLO 40: Potência das amidas peptídicas sintéticas sobre o receptor kappa opióide humano

Células de Rim Embriônicas Humanas (células HEK-293, ATCC, Manassas, VA) em placas de 100 mm foram transfetadas com o reagente de transfeção, Fugene6 (Roche Molecular Biochemicals) e construções de ADN em uma proporção de 3,3 para 1. As construções de ADN usadas nas transfecções foram como a seguir: (i) um vetor de expressão para o receptor kappa opióide humano, (ii) um vetor de expressão para uma proteína G quimérica humana e (iii) uma construção repórter luciferase em que a expressão da luciferase é induzida pelo fator de transcrição sensível ao cálcio NFAT.

O vetor de expressão contendo o receptor kappa opióide humano foi construído como a seguir: O gene OPRK1 humano foi clonado de ARN total de gânglios da raiz dorsal humanos por PCR e o gene foi inserido no vetor de expressão pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para construir o vetor de expressão mamífero OPRK1 humano pcDNA3-hOPRK1.

Para construir o vetor de expressão da proteína G quimérica humana, a proteína G quimérica Gαqi5 foi primeiro construída substituindo os últimos 5 aminoácidos da Gαq humana com a seqüência dos últimos 5 aminoácidos de Gαi por PCR. Uma segunda mutação foi introduzida a este gene Gαqi5 humano na posição 66 do aminoácido para substituir a glicina (G) com um ácido aspártico (D) por mutagênese sítio-dirigida. Este gene foi, então, subclonado em um vetor de expressão mamífero pcDNA5/FRT (Invitrogen) para produzir o vetor de expressão da proteína G quimérica humana, pcDNA5/FRT-hGNAq-G66D-i5.

Para preparar a construção do gene repórter luciferase, elementos de resposta sintética incluindo 3 cópias de TRE (elementos sensíveis a 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato) e 3 cópias de NFAT (fator nuclear de células T ativadas) foram incorporadas a montante de um promotor mínimo c-fos. Este elemento sensível e cartucho promotor foi então inserido em um vetor do gene repórter luciferase pGL3-basic (Promega) para construir a construções do plasmídeo do gene repórter luciferase pGL3b-3TRE-3NFAT-cfos-Luc.

A mistura de transfecção de cada placa de células incluía 6 microgramas de pcDNA3-hOPRK1, 6 microgramas de pcDNA5/FRT-hGNAq-G66D-i5 e 0,6 microgramas de pGL3b-3TRE-

3NFAT-cfos-Luc. As células foram incubadas por um dia a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 depois da transfecção e plaqueadas em placas opacas de 96 poços a 45.000 células por poço em 100 microlitros de meio. No dia seguinte, os compostos de teste e de referência foram adicionados às células em poços individuais. Uma variedade de concentrações dos compostos de teste foi adicionada a um conjunto de poços e uma variedade similar de concentrações de compostos de referência foi adicionada a um conjunto de poços de controle. As células foram, então, incubadas por 5 horas a 37 °C. No final da incubação, as células foram lisadas pela adição de 100 microlitros de mistura de detecção contendo substrato luciferase (AMP (22ug/mL), ATP (1,1mg/mL), ditiotreitol (3,85 mg/mL), HEPES (concentração final 50 mM), EDTA (0,2 mg/mL), Triton N-101 (4 uL/mL), ácido fenilacético (45 ug/mL), ácido oxálico (8,5 ug/mL), luciferina (28 ug/mL), pH 7,8). As placas foram vedadas e a luminescência foi lida em 30 minutos. Foi traçado um gráfico da concentração de cada um dos compostos em contraste com as contagens de luminescência por segundo (cps) e as curvas de resposta resultantes foram submetidas a regressão não linear usando um algoritmo de ajuste de curva de quatro parâmetros para calcular o valor de EC_{50} (a concentração de composto necessária para produzir 50% do aumento máximo na atividade da luciferase) e a eficácia (o percentual de ativação máximo para a indução total por qualquer um dos agonistas receptores kappa opióides conhecidos, tais como asimadolina (EMD-61753: Ver Joshi *et al.*, 2000, *J. Neurosci.* 20(15):5874-9), ou U-69593: Ver Heidbreder *et al.*, 1999, *Brain Res.* 616(1-2):335-8).

A Tabela II apresenta os valores de EC_{50} obtidos do ensaio de inibição de AMPc com os compostos exemplificados sintetizados de acordo com a presente invenção e testados em receptor kappa opióide de camundongo (mKOR) com replicação confirmatória de resultados no receptor kappa opióide humano (hKOR) por meio dos métodos acima descritos.

As amidas peptídicas sintéticas da invenção foram testadas em um ensaio similar quanto à potência do receptor mu opióide. Cada composto testado tinha um valor de EC_{50} para o receptor mu opióide humano superior ou igual a 1 uM.

EXEMPLO 41: Permeabilidade da membrana das amidas peptídicas sintéticas

A linhagem celular Caco-2 é uma linhagem celular de adenocarcinoma do cólon humano que diferencia em cultura e é utilizada como modelo do revestimento epitelial do intestino delgado humano. Os compostos da presente invenção foram testados em um ensaio de permeabilidade de membrana utilizando o subclone TC7 de Caco-2 em um ensaio convencional (Cerep, Seattle, WA). Em resumo, o coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) foi determinado na direção apical-para-basolateral (A-B) ao largo das monocamadas de células cultivadas em filtros de membrana de policarbonato de 96 poços.

Os compostos foram testados em uma concentração de 10 uM em pH 6,5 em DMSO 1%, com o lado receptor mantido em pH 7,4. A placa do ensaio foi incubada por 60 minutos a 37°C com agitação suave. Foram coletadas amostras no momento zero do lado doador e ao final do período de incubação tanto do lado doador quanto do lado receptor. As amostras foram analisadas por HPLC-MS/MS. O valor de P_{app} (expresso

como 10^{-6} cm/sec) foi então calculado com base na taxa de surgimento de composto no lado receptor. O P_{app} foi calculado com a equação:

$$P_{app} = \frac{1}{S \cdot C_0}\left(\frac{dQ}{dT}\right)$$

em que P_{app} é a permeabilidade aparente; S é a área de superfície da membrana, C_0 é a concentração doadora no momento 0 e dQ/dt é a quantidade de fármaco transportada por tempo. Quatro compostos de referência (labetalol, propranolol, ranitidina e vinblastina) foram testados concomitantemente para assegurar a validade do ensaio, bem como asimadolina, que supostamente é um opióide kappa que atua perifericamente. Os resultados são mostrados na Tabela III.

Tabela III - Permeabilidade da membrana

Composto	Permeabilidade média (cm^{-6}/sec)
(1)	<0,10
(3)	<0,02
(6)	<0,02
Asimadolina	37,5
Labetalol	9,9
Propranolol	53,8
Ranitidina	0,5
Vinblastina	<0,2

Acredita-se que os compostos que exibem baixa permeabilidade nesse tipo de ensaio tenham um potencial reduzido para atravessar a barreira hematencefálica *in vivo*, na medida em que uma alta permeabilidade passiva

parece ser um fator crucial de fármacos que atuam no sistema nervoso central (SNC) (Mahar Doan *e cols.* "Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 303: 1.029-37).

EXEMPLO 42: Inibição de citocromo P_{450} oxidases

A inibição das isozimas de citocromo P_{450} oxidase CYP1A, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 pelos compostos da amida peptídica sintética da invenção foi determinada de acordo com os seguintes métodos realizados por Cerep (Seattle, WA):

No ensaio do citocromo P_{450} CYP1A, microssomas de fígado humano (0,2 mg/mL de proteína) foram incubados por 15 minutos a 37 °C com 10 uM do composto de teste, 1 uM de etoxiresorufina, 1,3 mM de NADP, 3,3 mM de glicose-6-fosfate e 0,4 U/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase. Na ausência do composto de teste a etoxiresorufina adicionada como substrato é oxidada em resorufina e na presença de um inibidor da isozima CYP, a quantidade de resorufina produzida é reduzida. Utilizou-se furafilina como inibidor de referência.

A mistura de reação do ensaio do citocromo P_{450} CYP2C9 contendo microssomas de fígado humano (0,2 mg/mL de proteína) foi incubada por 15 minutos a 37 °C com 10 uM do composto de teste, 10 uM de tolbutamida, 1,3 mM de NADP, 3,3 mM de glicose-6-fosfato e 0,4 U/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase. Na ausência do composto de teste a tolbutamida é oxidada em 4-hidroxitolbutamida, e na presença de um inibidor da isozima CYP, a quantidade de 4-

hidroxitolbutamida produzida é reduzida. Sulfafenazol (IC_{50}: 0,35 uM) foi o inibidor de referência.

Para o ensaio do citocromo P_{450} CYP2C19, microssomas de fígado humano (0,2 mg/mL de proteína) foram incubados por 15 minutos a 37 °C com 10 uM do composto de teste, 10 uM de omeprazol, 1,3 mM de NADP, 3,3 mM de glicose-6-fosfato e 0,4 U/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase. Na ausência do composto de teste, o omeprazol é oxidado em 5-hidroxi-omeprazol, e na presença de um inibidor da isozima CYP, a quantidade de 4-hidroxi-omeprazol produzida é reduzida. Oxibutinina (IC_{50}: 7,1 uM) foi o inibidor de referência.

A reação do ensaio do citocromo P_{450} CYP2D6 contendo microssomas de fígado humano (0,2 mg/mL de proteína) foi incubada por 15 minutos a 37 °C com 10 uM do composto de teste, 5 uM de dextrometorfano, 1,3 mM de NADP, 3,3 mM de glicose-6-fosfato e 0,4 U/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase. Na ausência do composto de teste, o dextrometorfano é oxidado e na presença de um inibidor da isozima CYP, a quantidade de produto de oxidação é reduzida. Quinidina (IC_{50}: 0,093 uM) foi o inibidor de referência.

Para o ensaio do citocromo P_{450} CYP2C19, microssomas de fígado humano (0,2 mg/mL de proteína) foram incubados por 20 minutos a 37°C com 10 uM do composto de teste, 5 uM de midazolam, 1,3 mM NADP, 3,3 mM glicose-6-fosfato e 0,4 U/ml glicose-6-fosfato desidrogenase. Na ausência do composto de teste, o midazolam é oxidado e na presença de um inibidor da isozima recombinante a quantidade de produto de oxidação é reduzida. O produto da oxidação é determinado a partir da área sob a curva depois de separação HPLC-MS/MS.

Cetoconazole (IC_{50}: 0,55 uM) foi o inibidor de referência.

Em cada ensaio, a percentagem de inibição do citocromo P_{450} CYP da isozima P_{450} foi determinada como cem vezes a proporção de (1-a quantidade do produto na amostra na presença do composto de teste) dividida pela quantidade de produto na amostra contendo isozima não tratada. Os resultados dos ensaios em duplicata (expressos como percentagem da atividade de CYP restante) são apresentados na Tabela IV.

Tabela IV - Atividade percentual de isozimas citocromo P_{450} CYP

Composto / Isozima P_{450}	(1)	(3)	(6)
CYP1A	89,8	93,1	89,5
CYP2C9	93,2	97,4	92,1
CYP2C19	98,5	103,2	97,2
CYP2D6	96,0	99,5	93,9
CYP3A4	92,5	94,3	93,6

EXEMPLO 43: Estabilidade do composto (2) aos microssomas de fígado humano

Microssomas de fígado humano (concentração final de 0,3 mg/mL de proteína) em 0,1 M de tampão fosfato pH 7,4 e sistema de regeneração NADPH (1 mM de NADP, 5 mM de glicose-6-fosfato e 1 Unidade/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase) foram pré-incubados a 37°C, antes da adição de substrato, composto (2), para gerar uma concentração final de substrato de 1 μM; e uma concentração final de metanol de 0,6%. Foram removidas alíquotas em 0 e 60 minutos. Um volume igual de 50/50 acetonitrila/metanol foi adicionado, as amostras foram centrifugadas e a quantidade

de composto remanescente no sobrenadante foi medida por meio de HPLC acoplada a espectrometria de massa em tandem por comparação de áreas de pico geradas das amostras de 0 e 60 minutos. Amostras em duplicata mostraram 96% e 118% de composto (2) restantes após incubação de 60 minutos com microssomas de fígado humano.

EXEMPLO 44: Farmacocinética do composto (2) em ratos

Para determinar as proporções entre a concentração cerebral e a plasmática do composto (2), um grupo de 6 ratos conscientes com cateter na veia jugular recebeu a administração de 3 mg/kg de peptídeo ao longo de um período de infusão de 5 minutos no cateter da veia jugular. Trinta, 60 e 180 minutos após o início da infusão, foram coletadas amostras de sangue de 2 animais em cada ponto do tempo por punção cardíaca terminal e cérebros inteiros foram removidos rapidamente. O plasma foi isolado por centrifugação. Espectrometria de massa/cromatografia líquida em tandem (LC-MS/MS) foi usada para quantificar a concentração de fármaco no plasma e cérebro de ratos. Os resultados são mostrados na Figura 5.

EXEMPLO 45: Farmacocinética do composto (6) em camundongos e macacos *Cynomolgus*

Um bolo único do composto de amida peptídica sintética foi administrado por injeção subcutânea aos camundongos ICR (n = 6, machos, peso corporal 23-37 g, Charles River, Wilmington, MA) e amostras de plasma coletadas em 5, 10, 15, 20, 30 60, 90, 120 e 180 minutos pós-injeção. A Figura 6 mostra os resultados obtidos após injeção subcutânea de uma dose de 1 mg/kg de composto (6) em camundongos ICR. A "meia-vida" para esse foi determinada como o tempo

necessário para que a concentração plasmática caia em 50% após a concentração máxima no plasma ter sido obtida; espera-se que a meia-vida de eliminação computada, com base na constante da taxa de eliminação da fase de eliminação mais lenta, seja mais longa. Veja a Tabela V abaixo.

EXEMPLO 46: Farmacocinética do composto de amida peptídica sintética em macacos

Foram administradas amostras a macacos machos *Macaca fascicularis* (SNBL USA, Ltd., Everett, WA, macacos *Cynomolgus purpose-bred*, intimamente relacionados aos seres humanos, tanto filogenética quanto fisiologicamente), com idade de 3-7 anos e pesando 3-5 quilogramas. As amostras foram administradas em uma veia superficial do braço ou da perna (por exemplo, braquial ou safena) em solução salina 0,9% para injeção, USP (Baxter Healthcare, Deerfield, Ill.) da seguinte forma: uma amostra contendo 4 mg de composto (6) da presente invenção a ser testado foi preparada em 2 mL de solução salina 0,9% para injeção. A dose de 2 mL foi administrada como um bolo intravenoso ao animal de teste, resultando em uma dose de aproximadamente 0,4 a 0,65 mg/kg, dependendo do peso corporal do animal. Foram coletadas amostras de sangue de 0,6 mL por punção venosa de uma veia periférica em 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a injeção da dose, e então em 1, 2 e 4 horas. Cada amostra foi colocada em um tubo de ensaio de vidro pré-resfriado contendo heparina lítio e imediatamente resfriado no gelo. O plasma foi coletado após centrifugação a 2.000 g por quinze minutos a 2-8°C. As camadas de plasma de cada amostra foram transferidas para tubos de polipropileno e armazenadas congeladas a -60°C ou menos até serem testadas.

Alíquotas de 100 microlitros de plasma descongelado foram salpicadas com 5 microlitros de uma solução de 400 ng/mL de um padrão interno apropriado (nesse caso um composto de amida peptídica sintética padronizado conhecido) em TFA 0,1%, e as proteínas foram precipitadas com 100 microlitros de TFA 0,1% em acetonitrila. As amostras foram centrifugadas a 1.000 x g por 5 minutos, e os sobrenadantes analisados por LC-MS. A análise por LC-MS foi realizada em um espectrômetro de massa Finnigan LCQ Deca que faz interface com um sistema de HPLC Surveyor (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA). A análise por HPLC foi realizada em colunas de fase reversa C18 de 2,1 x 150 mm, com um gradiente de TFA 0,01% em acetonitrila em TFA 0,01% em água. A detecção de massa foi realizada no modo de monitoramento de reação selecionado (SRM).

A quantificação foi realizada contra uma curva de calibração do analito em plasma em branco de macaco *Cynomolgus* usando o mesmo padrão interno. A análise dos dados e a extração de parâmetros farmacocinéticos foram realizadas com o programa "PK Solutions 2,0" (Summit Research Services, Ashland, Ohio, USA). A Tabela V, abaixo, mostra a meia-vida em camundongos ICR após injeção subcutânea de composto (6) e a meia-vida para esse composto após administração intravenosa em bolo em macacos *Cynomolgus*.

Tabela V - Meia-vida *in vivo* de composto de amida peptídica sintética (6)

	Camundongos ICR	Macacos *Cynomolgus*
Via de	Subcutânea	Intravenosa

administração		
Meia-vida (min)	22,0	58, 6

Composto (6) é D-Phe-D-Phe-D-Leu-(ε-Me)D-Lys-[N-(4-piperidinil)-L-prolina]-OH (Id. de Seq. Nº 1).

A persistência de composto (3) no plasma de macacos *Cynomolgus* após administração intravenosa de um bolo de 0,56 mg/kg é mostrada na Figura 7.

EXEMPLO 47: Teste de contorções induzido por ácido acético em camundongos

Este teste identifica os compostos que exibem atividade analgésica contra a dor visceral ou dor associada à ativação de nociceptores sensíveis a um pH baixo [ver Barber e Gottschlich (1986) *Med. Res. Rev.* 12: 525-562; Ramabadran e Bansinath (1986) *Pharm. Res.* 3: 263-270]. A administração intraperitoneal de uma solução diluída de ácido acético provoca um comportamento de contorções em camundongos. Uma contorção é definida como uma contração dos músculos abdominais acompanhada por uma extensão dos membros anteriores e alongamento do corpo. O número de contorções observadas na presença e na ausência dos compostos de teste é contado para determinar a atividade analgésica dos compostos.

A cada dia que se realizou um teste de contorções, um grupo de camundongos de controle com veículo (n=6-8) que foi tratado de forma idêntica ao grupo de teste (exceto por o composto de teste ter sido omitido da dose da injeção) foi sempre incluído e o número total médio de contorções neste grupo foi usado como o ponto de referência absoluto que define 0% de diminuição da percepção de dor para todos

os outros camundongos recebendo um composto de teste naquele dia. Especificamente, o número total de contorções de cada camundongo recebendo o composto de teste foi convertido na % da diminuição da percepção da dor de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de diminuição da percepção da dor} = \frac{(W_V - W_C)}{W_V} \times 100$$

Onde W_V é o número médio de contorções no grupo tratado com veículo e W_C é o número de contorções no camundongo tratado com o composto. Os dados foram analisados utilizando a equação de Hill de 2 parâmetros (também conhecida como modelo Emax), onde se presume que Emax seja 100% de antinocicepção (isto é, sem contorções durante o período de 15 minutos após a administração do ácido acético).

Camundongos ICR, machos, 23-37 gramas de peso, foram pesados e colocados em câmaras de observação individuais (de um modo geral, uma proveta de vidro de 4000 mL) com uma fina camada de cama de palha SANI-CHIPS para roedores no fundo. Para determinar a atividade e a potência dos compostos de teste, doses diferentes de solução do composto ou veículo foram injetadas por via subcutânea na parte posterior do pescoço 15 ou 180 minutos antes da administração da solução de ácido acético. Depois da administração do composto ou controle com veículo, os camundongos foram levados de volta às suas câmaras de observação individuais esperando a administração por via intraperitoneal da solução de ácido acético. Quinze minutos ou três horas mais tarde, de acordo com o intervalo de tempo definido em cada experimento entre a administração do

composto e a injeção de ácido acético, uma dose correspondente a 10 mL/kg de uma solução 0,6% (v/v) de ácido acético foi então injetada no quadrante inferior direito do abdômen. Imediatamente depois da injeção, o camundongo foi levado de volta à sua câmara de observação e o registro dos números de contorções começou imediatamente. O número de contorções foi contado durante um período de 15 minutos a partir do momento da injeção de ácido acético, os dados sendo colhidos durante três períodos de tempo separados de 5 minutos (0-5 min, 5-10 min e 10-15 min).

Os dados foram registrados como valores de ED_{50}, e coeficiente de Hill. O valor de ED_{50} é expresso como média ± erro padrão da média (sem) (ED_{50} +/- sem) ou como a média geométrica com 95% de intervalos de confiança (95% de CI) usando escores T. O coeficiente de Hill é expresso como a média aritmética ± sem calculada a partir dos valores obtidos dos animais. Os resultados para o composto (2) estão apresentados na Figura 8 (círculos sólidos).

Para análise dose-resposta, os dados brutos foram convertidos em % do efeito máximo possível (%MPE) usando a fórmula: %MPE = ((pontuação de teste — pontuação dos tratados com veículo) / (0 — pontuação dos tratados com veículo)) * 100. Os dados brutos foram analisados usando um ANOVA de uma via, seguido por pós-testes de Dunnett. A dose que despertava 50% de atenuação da hipersensibilidade (ED_{50}) foi determinada usando análise de regressão linear. Os compostos foram administrados pela via intravenosa. A Tabela VI resume os resultados desses experimentos.

Tabela VI - Efeitos dos Compostos (2) e (5) sobre a contorção induzida por ácido acético em camundongos.

Composto	ED_{50} (mg/kg, iv, 15 min pós-dose)	% MPE (180 min pós-ED_{90})	% MPE (240 min pós-ED_{90})	% MPE (300 min pós-ED_{90})
(2)	0,07 (0,06-0,1)	77 ± 5%	81 ± 4%	84 ± 4%
(5)	0,01 (0,01-0,02)	54 ± 10%	NT	NT

NT = não testado

Foi gerada uma dose-resposta para o composto (2) no modelo de contorção induzida por ácido acético em camundongos usando doses de 0,01, 0,03, 0,1 e 0,3 mg/kg administradas por via intravenosa, como descrito acima. Usando o método acima, foi determinado um relacionamento dose-resposta linear para o composto (2) para doses que variam de 0,01 mg/kg a 0,3 mg/kg, como mostrado na Figura 9.

EXEMPLO 48: Inibição da locomoção em camundongos para medir a sedação por compostos depois de injeção subcutânea (ensaio de redução da locomoção)

Os compostos que exibem atividade sedativa inibem a locomoção espontânea em camundongos em uma câmara de teste. Para determinar o efeito sedativo potencial dos compostos de teste, a extensão da redução de locomoção depois da administração do composto de teste ou controle com veículo pode ser determinada e comparada com um aparelho especializado concebido para este fim (Opto-Varimex Activity Meter). No início de cada experimento, cada camundongo foi pesado e examinado para determinar boa saúde. Para determinar a atividade e a potência dos

compostos, doses diferentes da solução do composto ou veículo foram injetadas por via subcutânea 15 ou 180 minutos antes do início da coleta de dados. A injeção subcutânea foi realizada na parte posterior do pescoço do camundongo, pinçada em forma de "tenda" para permitir acesso apropriado para a agulha da seringa. Depois da injeção, cada animal foi colocado individualmente em caixas de Plexiglas (43 cm x 43 cm) no interior do aparelho Opto-Varimex Activity Meter. Antes do animal ser colocado no aparelho, uma fina camada de cama de palha SANI-CHIPS para roedores foi colocada no fundo da caixa de Plexiglas a fim de proporcionar um ambiente confortável. Cada aparelho Opto-Varimex Activity Meter foi, então, ligado e teve início a aquisição de dados pelo Sistema ATM3 Auto-Track. Os dados foram processados e os resultados expressos da mesma maneira descrita para os dados do ensaio de convulsões no Exemplo 47.

EXEMPLO 49: Efeito analgésico vs. efeito sedativo de amida peptídica sintética (3)

A inibição da contorção induzida por ácido acético por um composto é uma indicação de um efeito analgésico (também denominado efeito antinociceptivo). Similarmente, uma redução da locomoção causada pela administração do composto pode ser usada como uma medida de seu efeito sedativo geral.

A ED_{50} determinada no ensaio de contorção induzida por ácido acético em camundongos ICR foi de 52 μg/kg, quando a amida peptídica sintética (3) foi administrada por via subcutânea, como descrito no Exemplo 34 e mostrado na Figura 8 (círculos sólidos). O valor de ED_{50} determinado no

ensaio de inibição de locomoção descrito no Exemplo 35 foi de 2.685 μg/kg para a mesma amida peptídica sintética administrada por via subcutânea. Veja a Figura 8 (quadrados sólidos). A proporção terapêutica do efeito analgésico em relação ao efeito sedativo é o número de vezes maior da ED_{50} necessário para se obter uns efeitos sedativos, comparados como a ED_{50} necessária para se obter um efeito analgésico. Dessa forma, o composto (3) exibe uma proporção de aumento de (2.685/52), ou seja, 51,6 vezes. Dessa forma, a proporção terapêutica é aproximadamente de 52 vezes para o composto (3).

EXEMPLO 50: Modelo de ligação de nervo medular (SNL)

O modelo de SNL (Kim e Chung 1992) foi usado para induzir dor neuropática crônica. Os ratos foram anestesiados com isofluorano, o processo transverso esquerdo de L5 foi removido e os nervos medulares L5 e L6 fora fortemente ligados com sutura de seda 6-0. A ferida foi então fechada com suturas internas e grampos externos. Catorze dias após o SNL, os valores basais, pós-lesão e pós-tratamento para a sensibilidade mecânica não nociva foram avaliados usando 8 filamentos de Semmes-Weinstein (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) com rigidez variável (0,4, 0,7, 1,2, 2,0, 3,6, 5,5, 8,5 e 15 g) de acordo com o método *up-down* (Chaplan *e cols.* 1994). Os animais foram colocados em uma plataforma metálica perfurada e deixou-se que eles se aclimatassem ao ambiente por um mínimo de 30 minutos antes do teste. A média e o erro padrão da média (SEM) foram determinados para cada pata em cada grupo de tratamento. Como esse estímulo normalmente não é considerado doloroso, aumentos significativos induzidos por

lesão na responsividade nesse teste são interpretados como uma medida de alodinia mecânica. A dose que despertou 50% de atenuação da hipersensibilidade mecânica (ED_{50}) foi determinada com o uso de análise de regressão linear. O composto (2) foi administrado pela via intravenosa. A Figura 10 resume os resultados desses experimentos. A ED_{50} calculada para o composto (2) nesse modelo foi de 0,38 mg/kg (0,31-0,45; intervalo de confiança de 95%).

EXEMPLO 51: Analgesia ocular induzida por compostos (2), (3) e (4)

A analgesia ocular foi avaliada por instilação de cinco volumes do composto de teste, 50 microlitros cada, em soro fisiológico, na concentração a ser testada, no olho direito de coelhos albinos virgens da cepa Nova Zelândia dentro de um período de vinte minutos. Quinze minutos após a última instilação do composto de teste, cada animal recebeu a administração de uma única instilação de 30 microlitros de 10 mg/mL de capsaicina (33 mM) no olho tratado. Capsaicina é conhecida por induzir dor corneana. A dor corneana foi avaliada por medida da abertura palpebral medida em milímetros usando uma régua transparente sobre os olhos tratados e não tratados. Nesse modelo animal, a redução do tamanho da abertura palpebral após instilação de capsaicina é uma indicação do grau de dor ocular. Dessa forma, qualquer restauração observada (aumento) do tamanho da abertura palpebral após tratamento com composto de teste é considerada uma medida de alívio de dor ocular induzida por capsaicina.

Essas avaliações foram feitas antes do tratamento com o composto de teste (pré-teste), imediatamente antes da

instilação de capsaicina e depois 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 minutos após a instilação de capsaicina. A Tabela VII mostra a média das medidas da abertura palpebral (em relação ao olho não tratado, expressa como percentual de controle) considerada ao longo do período de 10-30 minutos após instilação de capsaicina em coelhos pré-instilados com um agonista kappa opióide da invenção e após pré-instilação com uma concentração-padrão de diltiazem, um bloqueador do canal de cálcio benzotiazepínico com efeitos anestésicos locais. Veja Gonzalez *e cols.*, (1993) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 3.329-3.335.

Tabela VII - Efeito de compostos (2), (3) e (4) na redução de dor ocular

Composto	Tempo (pós-capsaicina)	Média (% do controle)	SEM (% do controle)
Nenhum (soro fisiológico)	10-30 min	61,2	6,5
Diltiazem a 10 mM	10-30 min	74,6	5,5
(2) a 10 mg/mL	10-30 min	82,7	5,3
(3) a 10 mg/mL	10-30 min	76,0	5,2
(4) a 10 mg/mL	10-30 min	56,7	8,4

Média de cinco animais; SEM: erro padrão da média

EXEMPLO 52: Dose-resposta do Composto (2) na dor ocular induzida por capsaicina

A analgesia ocular induzida pelo Composto (2) em várias concentrações instiladas no olho direito de coelhos albinos virgens da cepa Nova Zelândia foi avaliada, como descrito acima. Os resultados foram comparados com a analgesia induzida por 10 mg/mL de morfina (um agonista

opióide não seletivo) como controle ativo sistêmico e com 10 mM de diltiazem como controle ativo tópico no mesmo experimento e sob as mesmas condições. A Tabela VIII abaixo mostra os resultados acumulados.

Tabela VIII - Dose-Resposta do Composto (2) na dor ocular induzida por capsaicina

Composto	Tempo (pós-capsaicina)	Média (% do controle)	SEM (% do controle)
Morfina a 10 mg/mL	10-30 min	74,8	11,1
Diltiazem a 10 mM	10-30 min	77,6	7,4
(2) a 1 mg/mL	10-30 min	60,5	9,9
(2) a 10 mg/mL	10-30 min	56,6	9,3
(2) a 25 mg/mL	10-30 min	75,5	7,1
(2) a 50 mg/mL	10-30 min	87,5	4,8

Média de dez animais; SEM: erro padrão em relação à média

EXEMPLO 53: Efeito do Composto (2) em um modelo de pancreatite em ratos

Inflamação pancreática crônica foi induzida em ratos por administração intravenosa de dicloreto de dibutilina (DBTC, Aldrich Milwaukee, WI) dissolvido em etanol 100% em uma dose de 8 mg/kg sob anestesia por isofluorano (2-3 litros/min, 4%/vol até anestesiado, depois 2,5%/vol por todo o procedimento). Os animais de controle receberam o mesmo volume de veículo (etanol 100%) isoladamente. A dor da pancreatite foi avaliada por determinação da sensibilidade abdominal por sondagem do abdome de ratos com um filamento de von Frey calibrado (4 g). Deixou-se que os ratos se aclimatassem em gaiolas com trama de arame

suspensas por 30 minutos antes do teste. Uma resposta era indicada pela retirada súbita do abdome, lambidas da área abdominal ou retirada de todo o corpo. Um experimento único consistiu em 10 aplicações do filamento de von Frey aplicado uma vez a cada 10 segundos para permitir que o animal cesse qualquer resposta e retorne a uma posição relativamente inativa. A ocorrência média de eventos de retirada em cada experimento é expressa como o número de respostas a 10 aplicações. Os ratos sem inflamação do pâncreas tipicamente exibem freqüências de retiradas à sondagem com filamento de von Frey de 0-1. Deixou-se que os animais se recuperassem por 6 dias após a administração de DBTC, antes de quaisquer manipulações farmacológicas. Animais que não demonstraram hipersensibilidade abdominal suficiente (ou seja, ratos com menos de 5 respostas positivas de 10 possíveis) foram excluídos do estudo.

O número de respostas positivas após sondagem abdominal (de 10 possíveis) foi registrado em cada ponto do tempo. Os dados são apresentados como número médio de retiradas (± SEM) para cada grupo de dosagem em cada ponto do tempo correspondente. Para análise da dose-resposta, os dados brutos foram convertidos em % do efeito máximo possível (%MPE) usando a fórmula: %MPE = ((pontuação de teste − pontuação pós-DBTC) / (pontuação pré-DBTC − pontuação pós-DBTC)) * 100. Os dados brutos foram analisados usando um ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido por pós-testes de Bonferroni. A dose que despertou 50% de atenuação da hipersensibilidade (ED_{50}) foi determinada usando análise de regressão linear. Os compostos foram administrados pela via intraperitoneal. A

Figura 11 resume os resultados desses experimentos. A ED_{50} calculada para o composto (2) nesse modelo foi de 0,03 mg/kg (0,006-0,14; intervalo de confiança de 95%).

Para determinar se a eficácia do Composto (2) (1 mg/kg) é mediada por meio da ativação de receptores kappa opióides periféricos, grupos de oito ratos foram pré-tratados com o antagonista seletivo do receptor kappa opióide nor-BNI (1 mg/kg) ou com um antagonista não seletivo do receptor opióide, metiodeto de naloxona (10 mg/kg), que não atravessa a barreira hematencefálica, antes do tratamento com o composto (2). A Figura 12 resume os resultados desses estudos.

EXEMPLO 54: Modelo de prurido em camundongos

Foram usados grupos de 10 (e, em um caso, 11) camundongos machos Swiss Webster (25-30 g). Cada animal foi pesado e deixou-se que se aclimatasse por pelo menos uma hora em caixas de observação retangulares individuais. Os rabos dos camundongos foram imersos por 30 segundos em água morna para dilatar as veias do rabo, e os animais então receberam uma injeção intravenosa de veículo (soro fisiológico) ou composto (2) (0,01, 0,03, 0,10 e 0,30 mg de base livre/kg). Quinze minutos mais tarde, cada camundongo recebeu dicloridrato de GNTI (Tocris) (0,30 mg/kg; 0,25 mL/25 g) ou composto 48/80 (Sigma) (50 pg em 0,10 mL de soro fisiológico) por via subcutânea atrás do pescoço. Os animais foram então observados em pares (ocasionalmente em três), e o número de movimentos da pata traseira dirigidos ao pescoço foi contado por 30 minutos. O percentual de inibição médio da coceira causada pelo composto (2) foi tabulado, e a dose associada a 50% de inibição foi obtida

por análise de regressão linear (PharmProTools). A Tabela IX resume os resultados desses experimentos.

Tabela IX - Efeitos do Composto (2) sobre o prurido induzido pelo Composto 48/80 ou por GNTI em camundongos.

Composto #	Modelo do Composto 48/80 ED50 (mg/kg, iv, 15 min pós-dose)	Modelo do GNTI ED50 (mg/kg, iv,15 min pós-dose)
(2)	0,08 (0,04-0,2)	0,05 (0,02-0,1)

As descrições de cada patente dos EUA e pedidos de publicados, e textos das referências de literatura citados nesta descrição são aqui incorporadas a título de referência na sua totalidade. No caso de qualquer definição ou descrição encontrada em uma ou mais daquelas referências se encontrar em conflito com a definição correspondente ou presente descrição, então a definição ou descrição divulgadas no presente documento é intencionada.

Os exemplos fornecidos no presente documento são para efeitos de ilustração apenas e não devem ser interpretados como limitativos do âmbito da invenção, cujo âmbito total será de imediato reconhecido pelos peritos na arte.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Cara Therapeutics, Inc.
Schteingart, Claudio D.
Menzaghi, Frederique
Jiang, Guangcheng
Alexander, Roberta V.
Sueiras-Diaz, Javier
Spencer, Robert H.
Chalmers, Derek T.
Luo, Zhiyong

<120> AMIDAS PEPTÍDICAS SINTÉTICAS

<130> 016408-0366471

<140> A ser cedido

<141> 12-11-2007

<150> 60/858,109

<151> 10-11-2006

<150> 60/928,550

<151> 10-05-2007

<160> 8

<170> PatentIn versão 3.4

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: sequência de D-aminoácido

<220>

<221> PEPTÍDEO

<222> (1)..(4)

<223> Todas as sequências de D-aminoácido sequence

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é D-alfametil-Lisina ligada a -W-(Y- Z anel)-VeR1R2

<400> 1

Phe Phe Leu Xaa

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: sequência de D-aminoácido

<220>

<221> PEPTÍDEO

<222> (1)..(4)

<223> Todas as sequências de D-aminoácido.

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é D-Lisina ligada a -W-(Y- Z anel)-VeR1R2

<400> 2

Phe Phe Leu Xaa

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Sequência de D-aminoácido

<220>

<221> PEPTÍDEO

<222> (1)..(4)

<223> Todas as sequências de D-aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é D-homoarginina ligada a -W-(Y- Z anel)-VeR1R2

<400> 3

Phe Phe Leu Xaa

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Sequência de D-aminoácido

<220>

<221> PEPTÍDEO

<222> (1)..(4)

<223> Todas as sequências de D-aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é D-Arginina ligada a -W-(Y- Z anel)-VeR1R2

<400> 4

Phe Phe Leu Xaa

1

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Sequência de D-aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(4)

<223> Todas as sequências de D-aminoácido.

<220>

<221> MOD-RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é isopropil-D-Lisina ligada a -W-(Y- Z anel)-VeR1R2

<400> 5

Phe Phe Leu xaa

1

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Sequência de D-aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(4)

<223> Todas as sequências de D-aminoácido.

<220>

<221> MOD-RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é ácido beta-amidina-D-2,3-diaminopropiônico ligado a -W-(Y- Z anel)-VeR1R2

<400> 6

Phe Phe Leu Xaa

1

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Sequência de D-aminoácido

<220>

<221> PEPTÍDEO

<222> (1)..(4)

<223> Todas as Sequências de D-aminoácido.

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é D-Norarginina ligada a -W-(Y- Z anel)-VeR1R2

<400> 7

Phe Phe Leu Xaa

1

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Sequência de D-aminoácido

<220>

<221> PEPTÍDEO

<222> (1)..(4)

<223> Todas as sequências de D-aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é ácido D-alfa,gama-diaminobutírico ligado a -W-(Y- Z anel)-VeR1R2

<400> 8

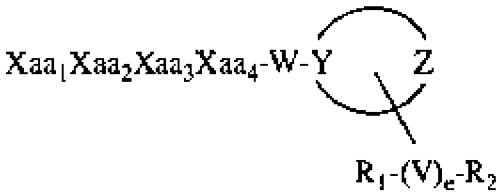
Phe Phe Leu Xaa

1

1/4

REIVINDICAÇÕES

1. Amida de peptídeo sintético **caracterizado** por ter a fórmula:



ou um estereoisômero, mistura de estereoisômeros, pró-fármacos, sal farmaceuticamente aceitável, hidrato, solvato, hidrato de sal de ácido, N-óxido ou forma cristalina isomórfica desses;

em que

Xaa_1 é selecionado do grupo que consiste em (A)(A')D-Phe, (A)(A')(α-Me)D-Phe, D-Tyr, D-Tic, D-terc-leucina, D-neopentilglicina, D-fenilglicina, D-homofenilalanina, e β-(E)D-Ala, em que cada (A) e cada (A') são substituintes de anel fenil independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, -F, -Cl, $-NO_2$, $-CH_3$, $-CF_3$, -CN, e $-CONH_2$, e em que cada (E) é independentemente selecionado do grupo que consiste em ciclobutil, ciclopentil, ciclohexil, piridil, tienil e tiazolil;

Xaa_2 é selecionado do grupo que consiste em (A)(A')D-Phe, 3,4-dicloro-D-Phe, (A)(A')(α-Me)D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Tyr, (E)D-Ala e D-Trp;

Xaa_3 é selecionado do grupo que consiste em D-Nle, D-Phe, (E)D-Ala, D-Leu, (α-Me)D-Leu, D-Hle, D-Val, e D-Met;

Xaa_4 é selecionado do grupo que consiste em $(B)_2$D-Arg, $(B)_2$D-Nar, $(B)_2$D-Har, ζ-(B)D-Hlys, D-Dap, ε-(B)D-Lys, ε-$(B)_2$-D-Lys, D-Amf, amidino-D-Amf, γ-$(B)_2$D-Dbu, δ-$(B)_2$α-(B')D-Orn, ácido D-2-amino-3(4-piperidil)propiônico, ácido

D-2-amino-3(2-aminopirrolidil)propiônico, ácido D-α-amino-β-amidinopropiônico, ácido α-amino-4-piperidinaacético, ácido cis-α,4-diaminociclohexano acético, ácido trans-α,4-diaminociclohexanoacético, ácido cis-α-amino-4-metilaminociclohexano acético, ácido trans-α-amino-4-metilaminociclohexano acético, ácido α-amino-1-amidino-4-piperidinaacético, ácido cis-α-amino-4-guanidinociclohexano acético, e ácido trans-α-amino-4-guanidinociclohexano acético, em que cada (B) é independentemente selecionado do grupo que consiste em H e C_1-C_4 alquil, e (B') é H ou (α-Me);

W é selecionado do grupo que consiste em:

Nulo, desde que quando W é nulo, Y é N;

-NH-$(CH_2)_b$- com b igual a zero, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6; e

-NH-$(CH_2)_c$-O- com c igual a 2, ou 3, desde que Y é C;

a porção



é uma porção de anel heterocíclico de 4 a 8 membros opcionalmente substituído em que todos os heteroátomos de anel na referida porção de anel são N; em que Y e Z são cada um independentemente C ou N; desde que quando tal porção de anel é um anel de seis, sete ou oito membros, Y e Z são separados por pelo menos dois átomos de anel; e desde que quando tal porção de anel tem um heteroátomo de anel único que é N, então tal porção de anel é não aromática;

V é C_1-C_6 alquil, e e é zero ou 1, em que quando e é zero, então V é nulo e R_1 e R_2 são diretamente ligados aos mesmos átomos de anel ou diferentes;

em que (i) R_1 é selecionado do grupo que consiste

em -H, -OH, halo, $-CF_3$, $-NH_2$, -COOH, C_1-C_6 alquil, C_1-C_6 alcoxi, amidino, C_1-C_6 alquil-substituído amidino, aril, heterociclil opcionalmente substituído, Pro-amida, Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, -CN, $-CONH_2$, -COR', $-SO_2R'$, -CONR'R", -NHCOR', OR' e $SO_2NR'R"$; em que o referido heterociclil opcionalmente substituído é opcionalmente unicamente ou duplamente substituído com substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C_1-C_6 alquil, C_1-C_6 alcoxi, oxo, -OH, -Cl, -F, $-NH_2$, $-NO_2$, -CN, -COOH, e amidino; em que R' e R" são cada um independentemente -H, C_1-C_8 alquil, aril, ou heterociclil ou R' e R" são combinados para formar um anel de 4 a 8 membros, cujo anel é opcionalmente unicamente ou duplamente substituído com substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C_1-C_6 alquil, -C_1-C_6 alcoxi, -OH, -Cl, -F, $-NH_2$, $-NO_2$, -CN, -COOH e amidino; e R_2 é selecionado do grupo que consiste em -H, amidino, C_1-C_6 alquil-substituído amidino unicamente ou duplamente, -CN, $-CONH_2$, -CONR'R", -NHCOR', $-SO_2NR'R"$ e -COOH; ou

(ii) R_1 e R_2 juntos podem formar uma porção de anel heterocíclico monocíclico ou bicíclico opcionalmente substituído de 4 a 9 membros que é ligado a um átomo de anel único da porção de anel que contém Y e Z; ou

(iii) R_1 e R_2 juntos com um átomo de anel único da porção de anel que contém Y e Z de anel podem formar uma porção de anel heterocíclico opcionalmente substituído de 4 a 8 membros para formar uma estrutura espiro; ou

(iv) R_1 e R_2 juntos com dois ou mais átomos de anel adjacentes da porção de anel que contém Y e Z podem formar uma porção de anel heterocíclico monocíclico ou bicíclico

opcionalmente substituído de 4 a 9 membros fundida à porção de anel que contém Y e Z;

em que cada uma das referidas porções de anel heterocíclico opcionalmente substituído de 4, 5, 6, 7, 8 e 9 membros que compreende R_1 e R_2 é opcionalmente unicamente ou duplamente substituída com substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C_1-C_6 alquil, C_1-C_6 alcoxi, fenil opcionalmente substituído, oxo, -OH, -Cl, -F, $-NH_2$, $-NO_2$, -CN, -COOH, e amidino;

desde que quando a porção de anel que contém Y e Z é um anel de seis ou sete membros que tem um heteroátomo de anel único e e é zero, então R_1 não é -OH, e R_1 e R_2 não são -H;

desde que também quando a porção de anel que contém Y e Z é um anel de seis membros que tem dois heteroátomos de anel, Y e Z são N e W é nulo, então $-(V)_eR_1R_2$ é anexado a um átomo de anel diferente de Z; e se e é zero, então R_1 e R_2 não são -H; e

por último, desde que quando Xaa_3 é D-Nle, então Xaa_4 não é $(B)_2$D-Arg, e quando Xaa_3 é D-Leu ou (αMe)D-Leu, então Xaa_4 não é δ-$(B)_2\alpha$-(B')D-Orn.

2. Amida de peptídeo sintético, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que Xaa_4 é selecionado do grupo que consiste em $(B)_2$D-Arg, D-Lys, $(B)_2$D-Har, ζ-(B)D-Hlys, D-Dap, ε-(B)D-Lys, $\varepsilon(B)_2$ D-Lys, D-Amf, amidino-D-Amf, γ-$(B)_2$D-Dbu e δ-$(B)_2\alpha$-(B')D-Orn.

3. Amida de peptídeo sintético, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que Xaa_3 é selecionada de um grupo que consiste em D-Nle e D-Leu.

4. Amida de peptídeo sintético, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de que Xaa_3 é D-Leu e Xaa_4 é selecionada de um grupo que consiste de D-Arg, D-Nar, D-Har, D-Lys, ε-(isopropil)-D-Lys, e ε-(metil)-D-Lys

5. Amida de peptídeo sintético, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, **caracterizada** pelo fato de que Xaa_1-Xaa_2 é D-Phe-D-Phe.

6. Amida de peptídeo sintético, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, **caracterizada** pelo fato de que W é nulo.

7. Amida de peptídeo sintético, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que Y é N e Z é C.

8. Amida de peptídeo sintético, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a porção de anel que contém Y e Z é um anel saturado de seis membros que compreende um heteroátomo de anel único.

9. Amida de peptídeo sintético, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, **caracterizada** pelo fato de que Y e Z são ambos N e são os únicos heteroátomos de anel na porção de anel que contém Y e Z.

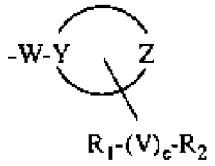
10. Amida de peptídeo sintético, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9, **caracterizada** pelo fato de que e é zero.

11. Amida de peptídeo sintético, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que R_1 e R_2 são ligados ao mesmo átomo de anel.

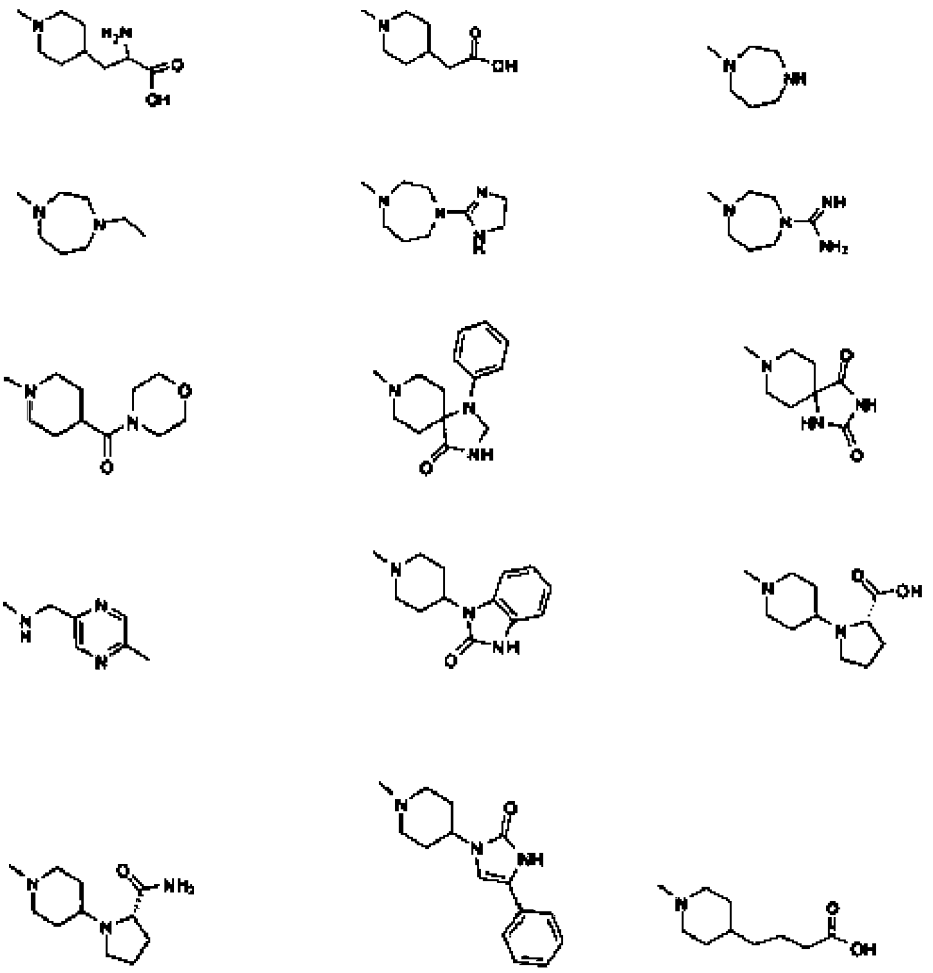
12. Amida de peptídeo sintético, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 ou 11, **caracterizada**

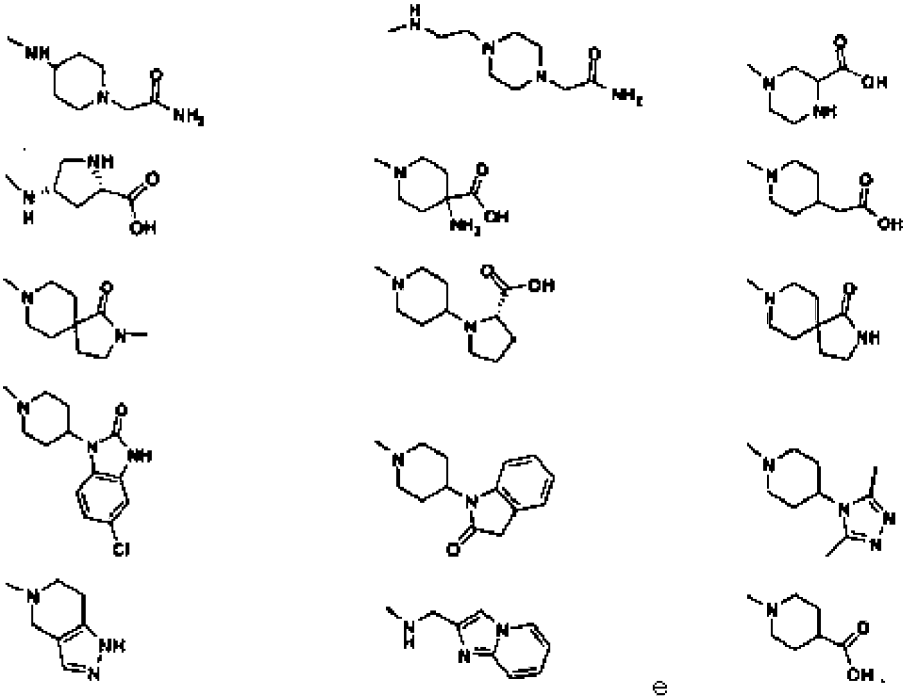
pelo fato de que R_1 é –H, -OH, $-NH_2$, -COOH, C_1-C_3 alquil, amidino, C_1-C_3 alquil amidino substituído, dihidroimidazol, D-Pro, D-Pro amida, ou $CONH_2$ e onde R_2 é H, -COOH,ou C1-C3 alquil.

13. Amida de peptídeo sintético, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12 **caracterizada** pelo fato de que a porção



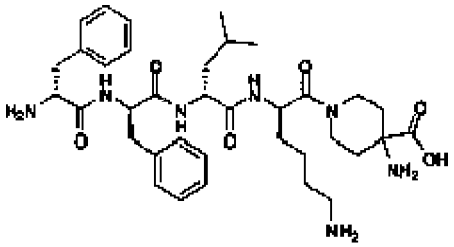
é selecionado do grupo que consiste em:





e

14. Amida de peptídeo sintético, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por ter a estrutura do composto (2):



D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-[ω(ácido-4-aminopiperidina-4 carboxílico)]-OH.

15. Composição farmacêutica **caracterizada** por compreender uma quantidade eficaz da amida de peptídeo sintético das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 e um excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

16. Uso de uma amida de peptídeo sintético de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pelo fato de ser para fabricação de um medicamento para tratar ou evitar que um mamífero tenha uma doença ou

condição associada ao receptor opióide kapa, em que a dita condição associada ao receptor opióide kappa é selecionada de um grupo que consiste de inflamação, prurido, edema, hiponatremia, hipocalemia, obstrução intestinal, tosse, glaucoma e dor, preferencialmente em que a dor é selecionada de um grupo que consiste de dor neuropática, dor somática, dor visceral e dor cutânea, dor artrítica, dor de cálculo renal, cólicas uterinas, dismenorréia, endometriose, dispepsia, dor pós-procedimento médico, dor ocular, dor de ouvido, dor de câncer avançado e dor associada com um distúrbio do trato GI, dor pós-cirúrgica preferencialmente em que a cirurgia é laparoscopia pélvica, laqueadura de trompas, histerectomia e colecistecomia.

17. Amida de peptídeo sintético de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pelo fato de ser para utilização no tratamento ou prevenção de uma doença ou condição associada ao receptor opióide kapa em um mamífero, em que a dita condição associada ao receptor opióide kappa é selecionada de um grupo que consiste de inflamação, prurido, edema, hiponatremia, hipocalemia, obstrução intestinal, tosse, glaucoma, dor, preferencialmente em que a dor é selecionada de um grupo que consiste de dor neuropática, dor somática, dor visceral e dor cutânea, dor artrítica, dor de cálculo renal, cólicas uterinas, dismenorréia, endometriose, dispepsia, dor pós-procedimento médico, dor ocular, dor de ouvido, dor de câncer avançado e dor associada com um distúrbio do trato GI e dor pós-cirúrgica, preferencialmente em que a cirurgia é laparoscopia pélvica, laqueadura de trompas, histerectomia e colecistecomia.

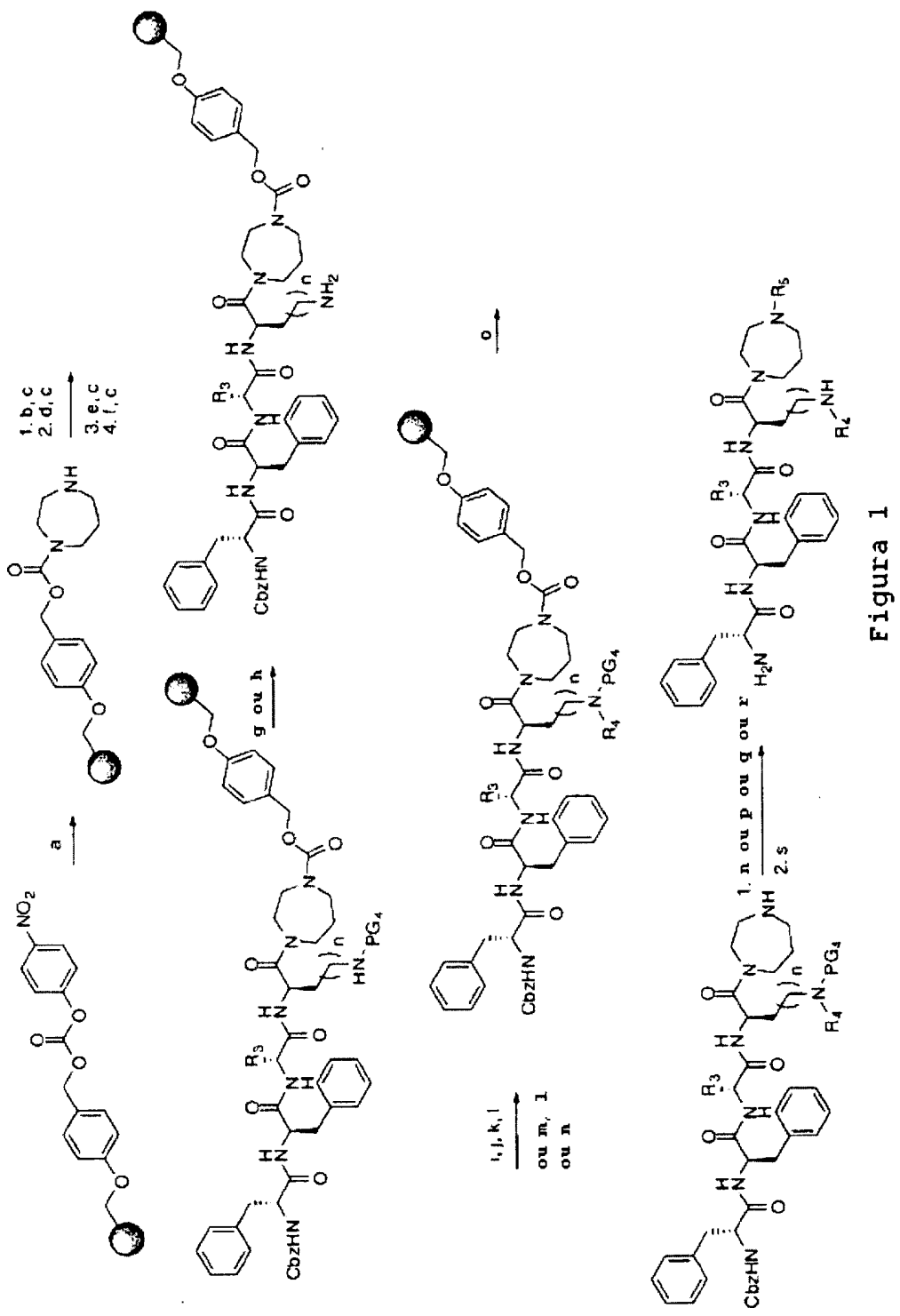


Figura 1

Figura 2

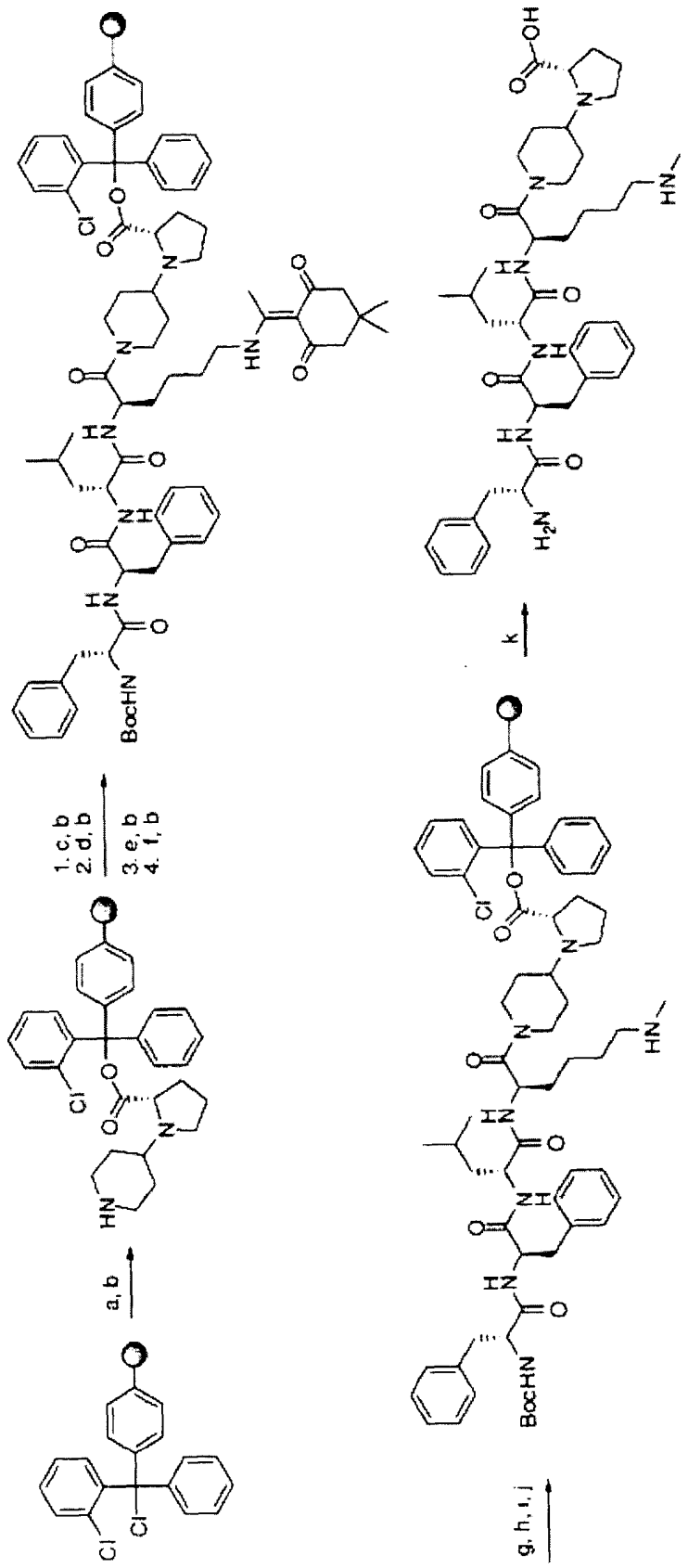


Figura 3

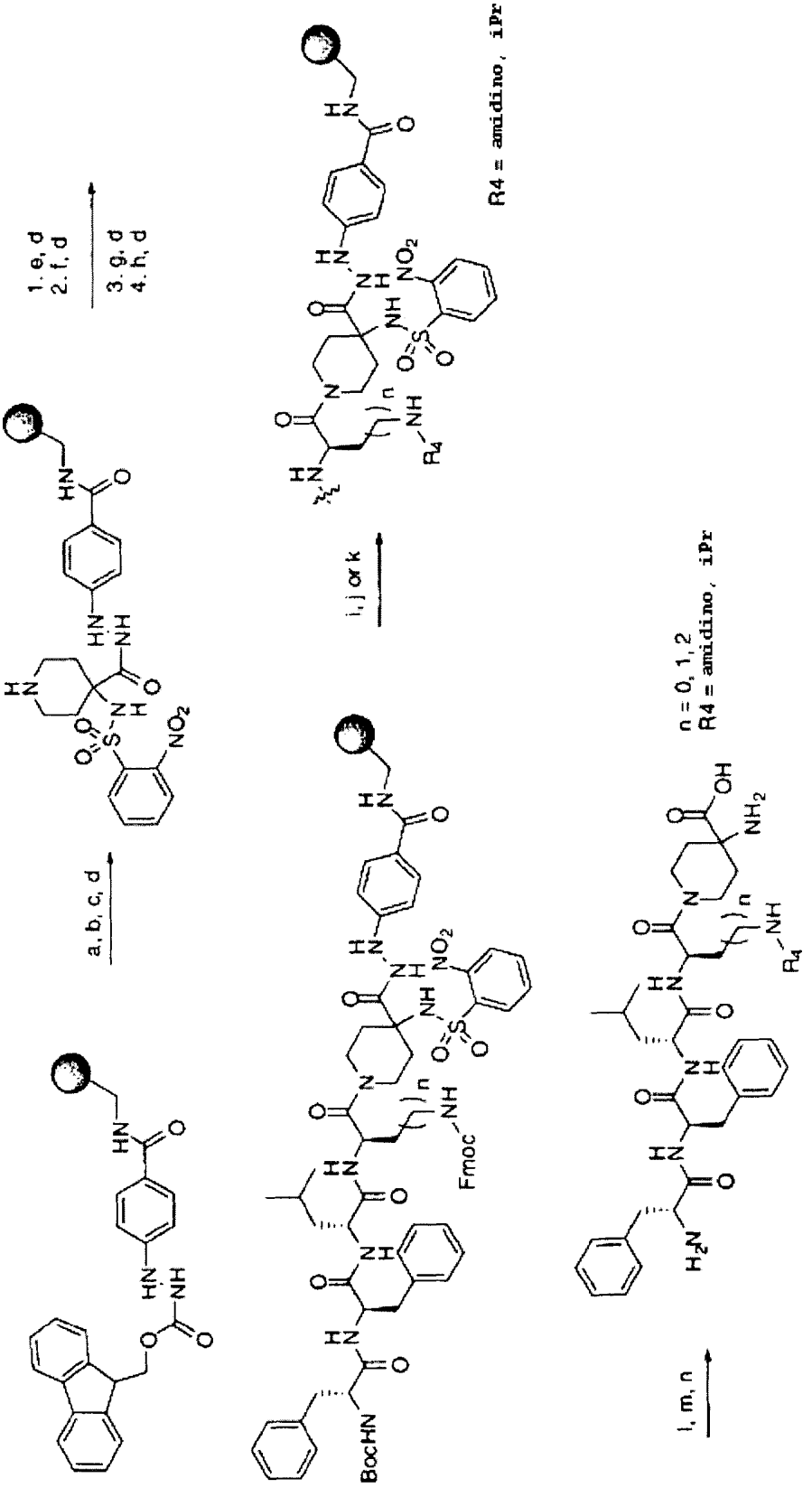

a, b, c, d
1, e, d
2, f, d
3, g, d
4, h, d
i, j or k
l, m, n
n = 0, 1, 2
R4 = amidino, iPr
R4 = amidino, iPr
Fmoc
BocHN

Figura 4

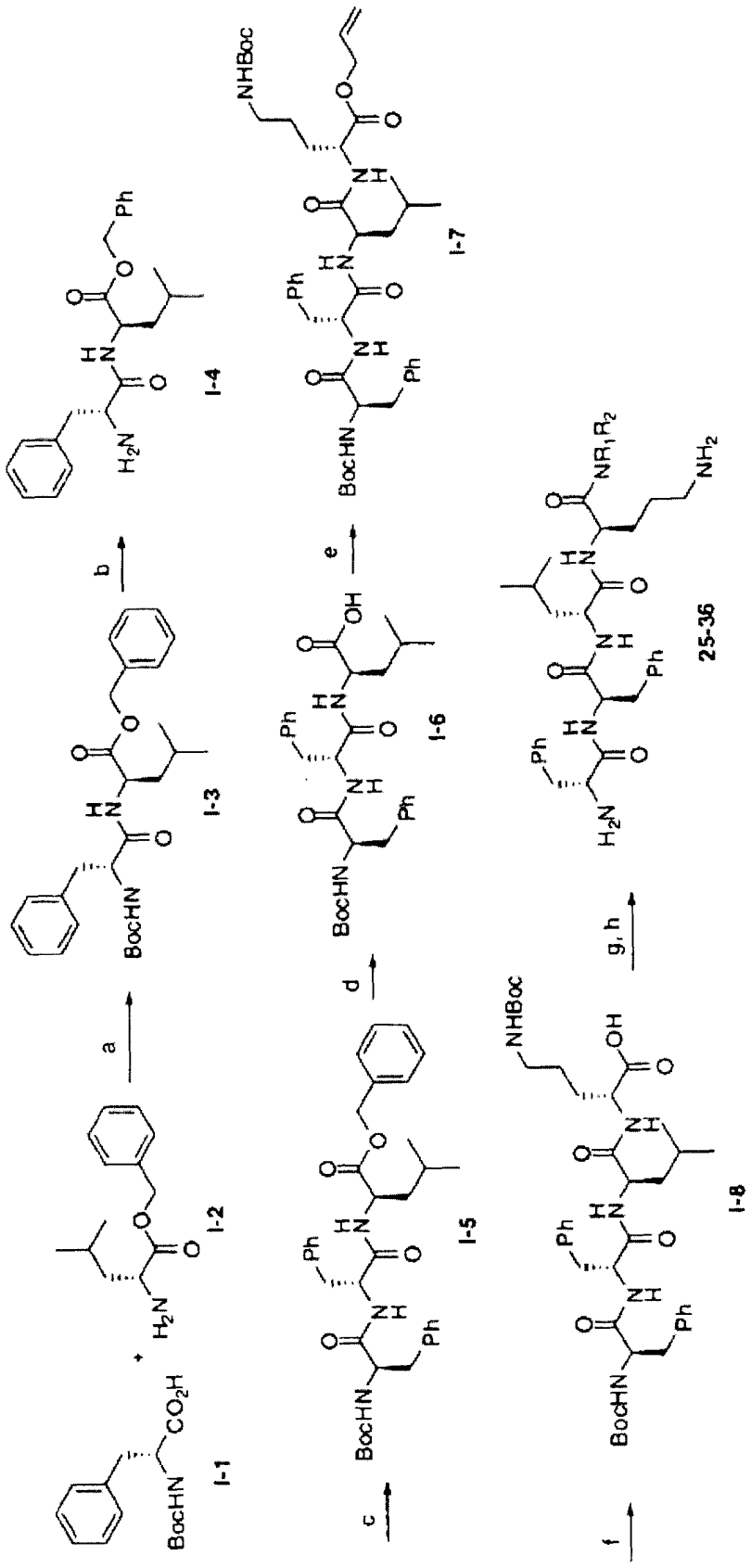

I-1
I-2
I-3
I-4
I-5
I-6
I-7
I-8
25-36
a
b
c
d
e
f
g, h
BocHN
CO_2H
H_2N
Ph
NHBoc
OH
NR_1R_2
NH_2

Figura 5

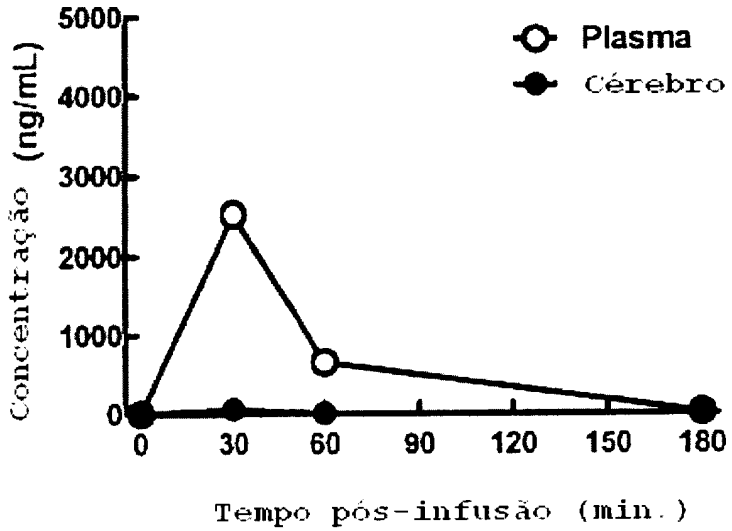


Figura 6

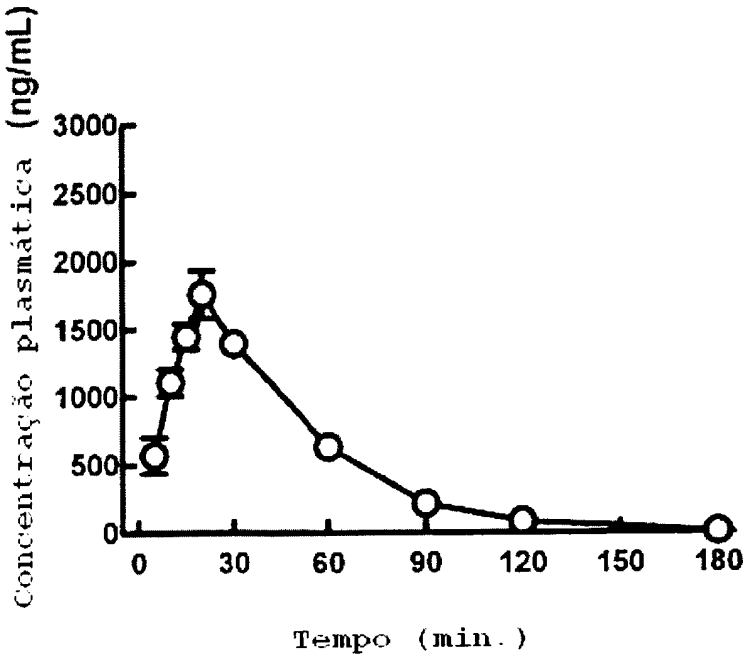


Figura 7

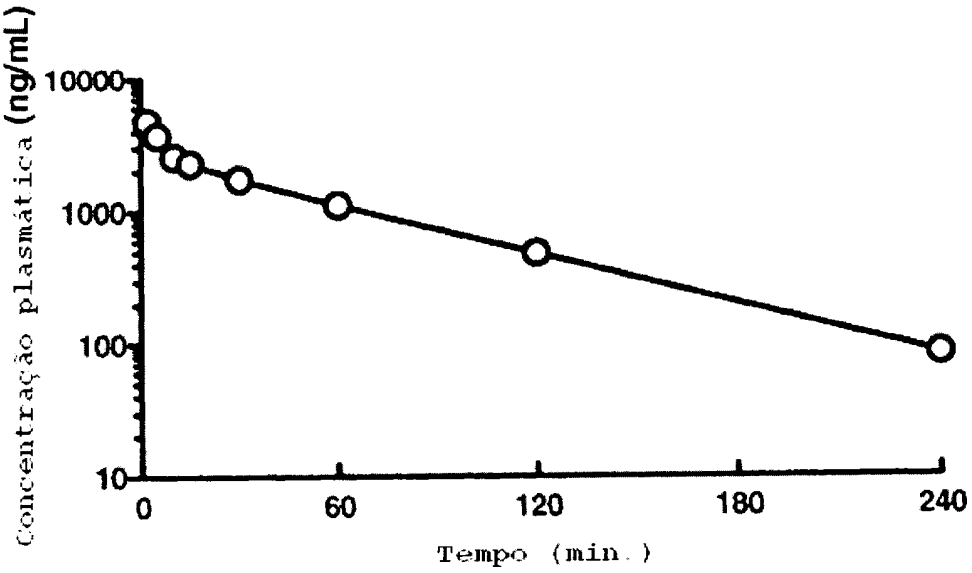


Figura 8

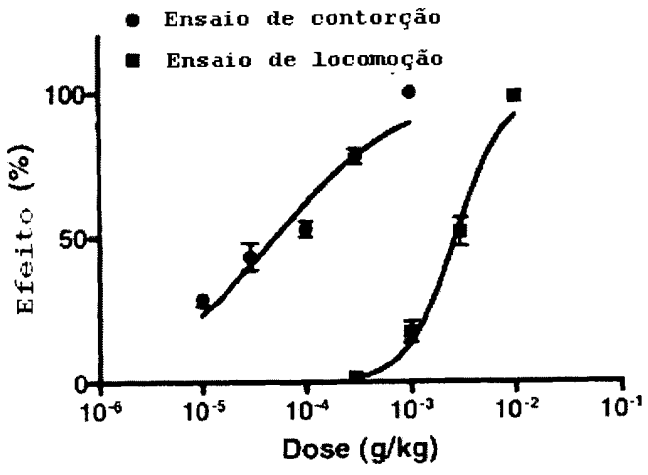


Figura 9

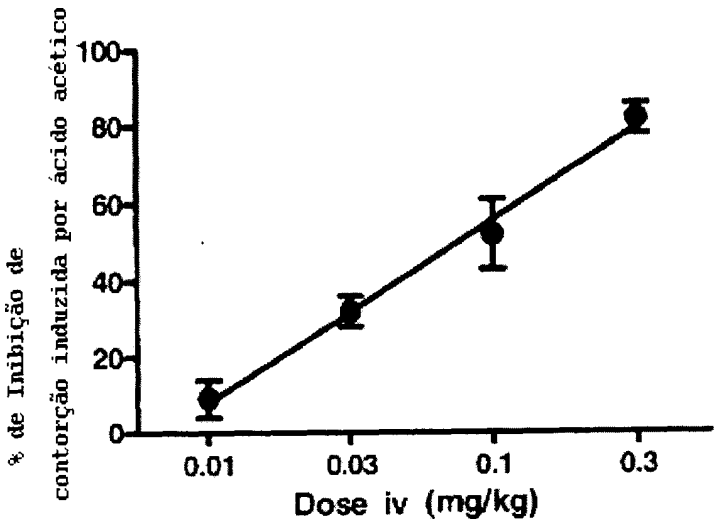


Figura 10

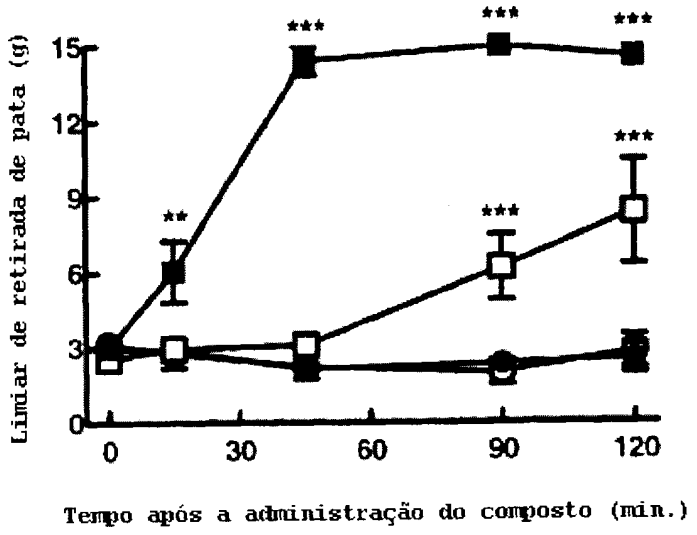


Figura 11

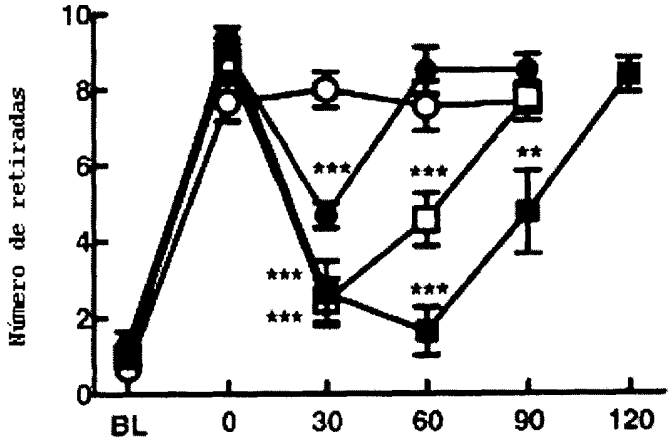


Figura 12

