

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 95.016 J

NOME: THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND
norte-americana, industrial, com sede em 1430 Tula-
ne Avenue, Nova Orleães, Louisiana 70115, ESTADOS
UNIDOS DA AMERICA

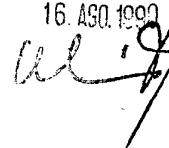
EPIGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PEPTIDOS TERAPÊU-
TICOS"

INVENTORES:

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

1989/08/16 ; US; Nº. 394.727

16. AGO. 1999

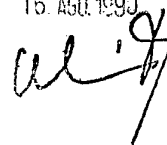


- R E S U M O -

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PÉPTIDOS TERAPEUTICOS"

Descreve-se um processo para a preparação de péptidos terapêuticos que são análogos à substância P que ocorre naturalmente e é biologicamente activa, tendo uma localização activa e uma localização de fixação responsável pela ligação do referido péptido a um receptor numa célula alvo. A referida substância possui um vínculo não péptido em vez de um vínculo péptido entre um resíduo de amino ácido do referido ponto activo e um resíduo de amino ácido adjacente, ou resíduo de amino ácido sintético, β -amino ácido ou γ -amino ácido, que substitui dois resíduos de amino ácido da localização activa.

16. AGO. 1990

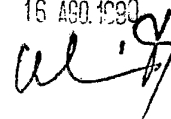


1
5
O presente invento refere-se a um processo para a preparação de péptidos terapêuticos, em particular análogos da substância péptida P que ocorre naturalmente.

10
15
20
25
A substância P (SP) tem numerosos efeitos farmacológicos, que incluem a vasodilatação e a hipotensão, contração do musculo liso vascular, estimulação de secreção salivar e pancreática, despolarização de vários nueros e liberação da histamina das células mamárias. Pensa-se que a SP desempenha uma variedade de papeis fisiológicos (muitos dos quais estão associados à indução da dor). Estes incluem a regulação da peristaltia e da actividade dos musculos lisos na região gastro-intestinal, regulação da secreção salivar e pancreática, regulação da resposta inflamatória aos ferimentos no tecido periférico, neurotransmissão e regulação da neuro-imunomodulação. Mantyh e al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5193 relatam a presença de receptores de substancia P em pontos de ferimentos no sistema nervoso central e sugerem que a SP pode estar envolvida na regulação da resposta aos ferimentos no sistema nervoso central, bem como nos tecidos periféricos. A substancia P é igualmente um agente proliferativo, que estimula a proliferação de fibroblastos, linfócitos-T, células endoteliais, células dos musculos lisos e astrocitos.

30
35
A SP pertence à familia dos péptidos bioactivos conhecidos por taquiquininos. A estrutura, actividade e função da SP são discutidas em Payan (1989) Ann.Rev.Med. 40:341. Conforme discutido em Payan, a SP partilha propriedades farmacológicas comuns e uma sequência terminal carboxi conservada (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, em que X é um resíduo de amino ácido alifático ou aromático ramificado) com outros ta

16 AGO. 1990



1 quiquininos. As actividades biológicas principais e a capaci-
dade para se fixar a um receptor, residem na sequência termi-
nal carboxil desses péptidos. A selectividade relativamente
a um receptor específico de taquiquinino é determinada pela
5 sequência amino-terminal dos péptidos, Iverson e al., (1989)
The Tachykinin System, Resumo apresentado no 11th American
Peptide Symposium. A conservação da sequência carboxil termi-
nal prolonga-se para além da SP e de outros taquiquininos de
mamíferos, para outros péptidos bioactivos, conforme mostra-
10 do no Quadro 1.

Numerosos derivados da SP, feitos por modifi-
cação lateral da cadeia e/ou substituição de amino ácido-D,
revelaram actuar como antagonistas do receptor da SP. Folkers
Patente U.S.Nº. 4.481.139, descreve antagonistas da substan-
15 cia P feitos por substituição de amino ácido D ou L. Estes
antagonistas incluem o análogo undecapéptido espantido (D-
-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂) bem
como análogos truncados da substancia P. Jensen e al. (1988)
Am.J. of Physiol. 254: G883, caracterizou a capacidade de vá-
rios antagonistas da SP para inibirem a acção da bombesina.
20 Jensen e al., estudarem quatro análogos da SP: Arg-D-Pro-Lys-
-Pro-Gln-D-Phe-Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂; Arg-D-Pro-Lys-Pro-Gln-
-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂; D-Arg-D-Pro-Lys-Pro-Gln-
-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂; e D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-
25 -Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂. Nenhum destes péptidos fi-
xadores de receptores é, no entanto, específico para o recep-
tor da SP. Verificou-se que todos eles inibiam a libertação
da amilase estimulada pela bombesina. Jewnsen e al. conclui-
ram que "a capacidade para inibir a acção da bombesina é uma
30 propriedade geral dos análogos da SP que também funcionam co-
mo antagonistas do receptor da SP e que os antagonistas do
receptor da SP são cada um deles, inibidores da acção da bom-
besina, ao funcionarem como antagonistas do receptor das bom-
besina."

35 Woll e al. (1988) Pro.Nat.Acad.Sci. USA 85:

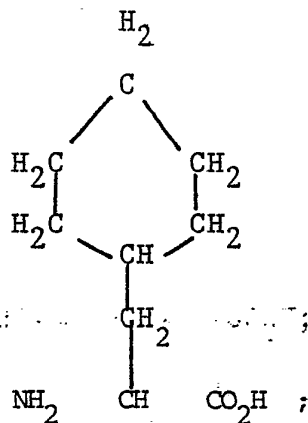
1 1857 verificaram que a substancia antagonista da SP D-Arg-Pro
-Lys-Pro-D-Phe-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-NH₂ -é um potente anta
gonista da bombesina nas células Suiças 3T3 da murina.

5 Agonistas e antagonistas de largo espectro de
hormonas péptidas activas biologicamente, incluindo a substan
cia P, foram sintetizados por meio da introdução de modifica
ções dos vínculos péptidos da hormona péptida, vêr Spatola
(1983) em Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Pepti
des and Proteins (B.Weinstein, ed.) M-Dekker, New York e
10 Basel, pp. 267-357, para uma recente revista do ramo.

Abreviaturas (pouco vulgares):

ciclohexil-Ala = (Ciclohexil alanina)

15

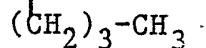


grupo identificador

20

25

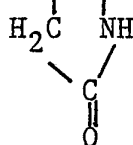
Lys-e-NHR = lisina em que o átomo e-N transporta um grupo R
(onde R é qualquer de entre H, C₁₋₁₂alquilo, C₇₋₁₀
fenilalquilo, COE (em que E é C₁₋₂₀alquilo, C₃₋₂₀alquinilo,
fenilo, neftilo, ou C₇₋₁₀fenilalquilo), ou C_{1-C12} acilo);
Nle = H₂N-CH-COOH (norleucina)



grupo identificador

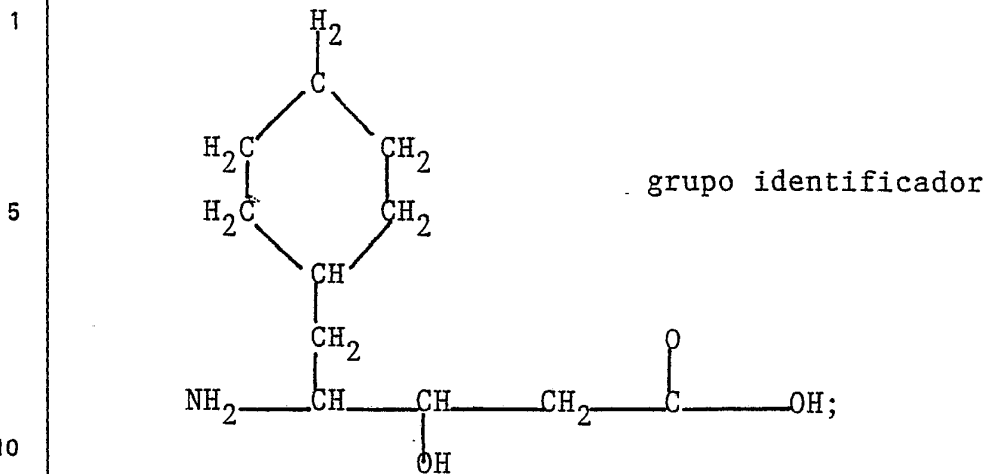
30

Nal = naftilalanina

pGlu = H₂C--CH-COOH (ácido piroglutâmico)

35

16. AGO. 1990



SP = Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂
(substância P).

15 De forma geral o presente invento refere-se a um péptido linear (isto é, não cíclico) que é um análogo da substância P biologicamente activa que ocorre naturalmente, com uma localização activa e uma localização de fixação responsável pela ligação do péptido a um receptor de uma célula alvo. O análogo tem uma das seguintes modificações: (a) um vínculo não péptido em vez de um vínculo péptido entre um resíduo de amino ácido da localização activa e um resíduo de amino ácido adjacente, (b) uma substituição de dois resíduos de amino ácidos, por exemplo estatina, AHPPA, ACHPA, um resíduo β -amino ácido, ou um resíduo γ -amino ácido, (c) um desaparecimento de um resíduo amino ácido na localização activa e uma modificação de um resíduo amino ácido fora da localização activa, o (d) a presença de um resíduo de amino ácido N-terminal que não é o resíduo de amino ácido que ocorre naturalmente do referido péptido biologicamente activo de ocorrência natural (em que β - ou γ - não são designados um amino ácido é um alfa-amino ácido).

20

25

30

35 Em formas de realização preferidas o análogo pode agir como inibidor competitivo da substância P que ocorre naturalmente por meio de fixação ao receptor e, em virtude de uma das modificações, deixar de exhibir a actividade biológi-

16 AGO 1990



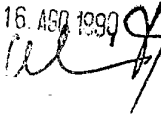
1 ca in vivo do péptido que ocorre naturalmente.

Em formas de realização preferidas a localização activa do péptido linear é na metade carboxil terminal do péptido linear. O péptido linear tem uma das seguintes modificações: (a) um vínculo não péptido em vez de um vínculo péptido entre um resíduo amino da localização activa e um resí-
5 duo amino ácido adjacente, (b) uma substituição de dois resí-
duos de amino ácido dentro da localização activa por um resí-
duo amino ácido sintético, por exemplo estatina, AHPPA, ACHPA
10 um resíduo β -amino ácido, ou um resíduo γ - amino ácido, (c)
um apagamento de um resíduo amino ácido dentro da localiza-
ção activa e uma modificação de um resíduo amino ácido fora
da localização activa, ou (d) a presença de um resíduo amino
ácido N-terminal que não é o resíduo de amino ácido que ocor-
15 re naturalmente do referido péptido biologicamente activo
que ocorre naturalmente.

Em formas de realização preferidas a localização activa do péptido linear é na metade carboxil terminal do pé-
ptido linear. O péptido linear tem uma das seguintes modifi-
20 cações, (a) um vínculo não péptido em vez de um vínculo pépti-
do entre o resíduo de amino ácido terminal e o resíduo amino
ácido adjacente, ou (b) um resíduo de estatina ou AHPPA ou
ACHPA, β -amino ácido, ou γ -amino ácido em lugar dos resíduos
carboxil terminais e adjacentes de amino ácido.

Em formas de realização preferidas a substância
análoga de P tem uma das seguintes modificações, (a) um vín-
culo não péptido em vez de um vínculo péptido entre o resí-
duo de amino ácido carboxil terminal e o resíduo amino ácido
adjacente, o u (b) um resíduo de estatina ou AHPPA ou ACHPA,
30 β -amino ácido, ou γ -amino ácido em lugar dos resíduos carbo-
xil terminais e adjacentes de amino ácidos que ocorrem natu-
ralmente.

Em formas de realização preferidas o péptido line-
ar é um análogo da substância P com uma localização activa
na metade carboxil terminal do péptido linear. O análogo da
35 substância P tem uma das seguintes modificações: (a) um vín-

16. AGO 1990


1 culo não péptido em vez de um vínculo péptido entre o resíduo
carboxil terminal amino ácido e o resíduo amino ácido adjacen
te, ou (b) um resíduo de estatina ou AHPPA ou ACHPA ou β -ami
no ácido ou γ -amino ácido em lugar dos resíduos carboxil ter
5 minais ou adjacentes de amino-ácidos.

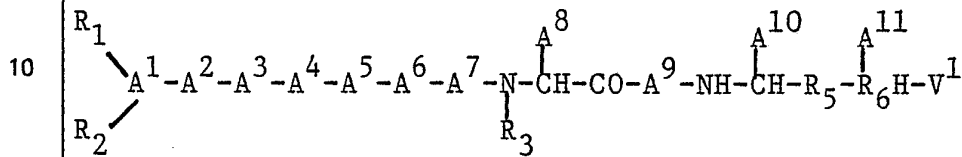
Os péptidos lineares para os quais a introdu
ção de um vínculo não péptido entre dois resíduos de amino
ácidos, ou a substituição de dois resíduos de amino ácido na
turais por um resíduo de amino ácido sintético, um resíduo
10 β -amino ácido ou um resíduo de γ -amino ácido, ou o apagamen
to ("des") do resíduo C-terminal de amino ácido uteis para a
criação ou melhoria da actividade antagonista, são aqueles em
que a actividade está associada aos dois resíduos C-terminais
de amino ácidos da cadeia de amino ácidos. Para isso, a loca
15 lização activa do péptido que ocorre naturalmente de que os
péptidos de acordo com o invento são análogos, incluem, pre
ferentemente, pelo menos um resíduo amino ácido na metade car
boxil terminal do péptido e o péptido linear de acordo com o
invento inclui esse resíduo amino ácido na sua metade carbo
20 xilterminal. Podem ser introduzidas modificações na região
envolvida na fixação do receptor ou numa região de não fixa
ção. Por vínculo não péptido quer-se significar que o átomo
de carbono que participa no vínculo entre dois resíduos é
reduzido de um carbonil carbono para um metileno carbono, is
25 to é, $\text{CH}_2\text{-NH}$; ou, menos preferivelmente, $\text{CH}_2\text{-S}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$,
 $\text{CH}_2\text{-CO}$ ou CO-CH_2 . (Uma discussão detalhada da química dos
vínculos não péptidos é fornecida em Coy e al. (1988) Tetra
hedron 44, 3:835-841, Tourwe (1985) Janssen Chim.Acta 3:3-15,
17-18 e Spatola (1983) em Chemistry and Biochemistry of Ami
30 no Acids, Peptides and Proteins, (B.Weinstein, ed) M.Dekker,
New York e Basel, pp 267-357, todas aqui incorporadas como
referências).

Preferivelmente, os análogos do invento são
25% homólogos, mais preferivelmente, 50% homólogos, aos pép
35 tidos que ocorrem naturalmente.

16. AGO. 1990

1 Uma modificação do péptido que ocorre natural-
mente para criar um antagonista é empregar, como resíduo ami-
no terminal, um isómero-D terminal de um amino ácido, ou um
amino ácido alquilado. (Onde "D" não seja designado como con-
5 figuração de um amino ácido, pretende-se que seja L.)

Uma classe de péptido do presente invento in-
clui análogos da substância P da fórmula



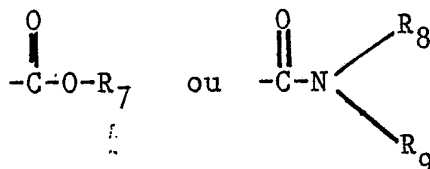
em que

- 15 A^1 = o isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Arg,
Lys, ou Lys-e-NH- R_{20} (em que R_{20} é qualquer um de H,
 C_{1-12} alquilo, C_{7-10} fenilalquilo, COR_{10} (em que E_{10} é
 C_{1-20} alquilo, C_{3-20} alcenilo, C_{3-20} alquinilo, fenilo,
naftilo, ou C_{7-10} fenilalquilo), ou C_1-C_{12} acilo); ou es-
20 tá ausente;
- A^2 = o isómero D ou L do amino ácido Pro; ou está ausente;
- A^3 = o isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Lys,
ou Lys-e-NH- R_{22} (em que R_2 é qualquer um de entre H,
 C_{1-12} alquilo, C_{7-10} fenilalquilo, COE_{12} (em que E_{12} é C_{1-20}
25 alquilo, C_{3-20} alcenilo, C_{3-20} alquinilo, fenilo, naftilo, ou
 C_{7-10} fenilalquilo) ou C_1-C_{12} acilo); ou está ausente;
- A^4 = o isómero D ou L do amino ácido Pro; ou está ausente;
- A^5 = o isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Asp,
Gln, β -Nal, Trp, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br,
30 NO_2 , OH ou CH_3), p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO_2 ,
OH ou CH_3); ou está ausente;
- A^6 = o isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Ala,
Arg, Ser, Pro, Gln, pGlu, Asn, β -Nal, Trp, Phe, o-X-Phe
(em que X = F, Cl, Br, NO_2 , OH ou CH_3), ou p-X-Phe (em
35 que X = F, Cl, Br, NO_2 , OH, ou CH_3);

16 AGO 1990

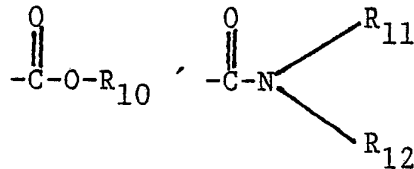
- 1 A⁷ = o isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Val, Thr, Phe, Trp, β -Nal, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃) ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃);
- 5 A⁸ = o grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Gly; Val, Trp, β -Nal, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃), ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃);
- 10 A⁹ = o isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Sar, His, Gly, Trp, β -Nal, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃) ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃);
- 15 A¹⁰ = o grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Trp, β -Nal, Leu, Nle, Ala, ciclohexil-Ala, Val, Ile, Met, Gly, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃), ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃);
- 20 A¹¹ = o grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Trp, β -Nal, Leu, Nle, Ala, Val, Ile, Met, Gly, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃), ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃), ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃); ou está ausente; cada R₁ e R₂, independentemente é qualquer um de entre H, C₁₋₁₂alquilo, C₇₋₁₀ fenilalquilo, COE₁₄ (em que E₁₄ é C₁₋₂₀alquilo, C₃₋₂₀alcenilo, C₃₋₂₀alquinilo, fenilo, naftilo, ou C₇₋₁₀ fenilalquilo, C_{1-C12} acilo, ou está ausente e R₁ e R₂ estão ligados ao átomo de alfa-amino azoto do amino ácido terminal-N do referido péptido, desde que, quando um dos R₁ ou R₂ seja COE₁₄, o outro seja obrigatoriamente H; R₃ seja H ou C₁₋₁₂ alquilo; R₅ seja qualquer um de entre CHZ₁₀-(CH₂)_{n1}-V², CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-CH₂, CH₂-CO ou CO-CH₂ (em que V² é ou

35



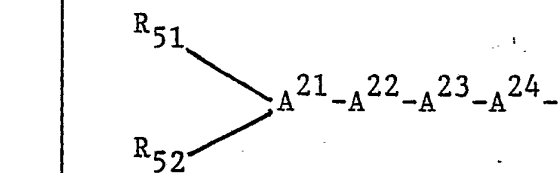
1 (em que cada um dos R_7 , R_8 e R_9 independentemente, é H, C_{1-12} alquilo, C_{7-10} fenilalquilo, ou C_{12-20} naftilalquilo; n_1 é, ou 1 ou 0; e Z_{10} é H ou OH); R_6 é C ou e V^1 é qualquer um de

5

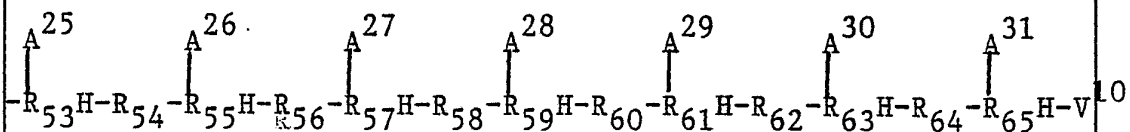


10 ou ausente (em que cada R_{10} , R_{11} e R_{12} independentemente, é H, C_{1-12} alquilo, C_{7-10} fenilalquilo, ou C_{12-20} naftalquilo) desde que, onde R_5 seja $\text{CHZ}_{10}-(\text{CH}_2)_{n_1}-V^2$, A^{11} , R_6H e V^1 estejam ausentes; desde que, ainda A^{11} , R_6H e V^1 estejam ausentes, R_5 seja obrigatoriamente $\text{CHZ}_{10}-(\text{CH}_2)_{n_1}-V^2$; desde ainda
15 que, onde A^5 seja Asp, A^6 seja Ser, A^7 seja Phe, A^8 seja Val, A^9 seja Gly, A^{10} seja Leu, A^{11} seja Leu e R_5 seja CH_2NH . pelo menos um dos A^1 , A^2 , A^3 ou A^4 esteja obrigatoriamente presente; ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

20 Outra classe de péptidos de acordo com o invento inclui os análogos da substância P da fórmula:



25



30

em que

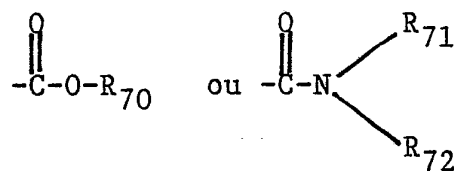
A^{21} = ao isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Arg, Lys ou Lys-e-NH- R_{80} (onde R_{80} é qualquer um de entre H, C_{1-12} alquilo, C_{7-10} fenilalquilo, COE_{20} (em que E_{20} é C_{1-20} alquilo, C_{3-20} alcenilo, C_{3-20} alquini
35 lo, fenilo, naftilo, ou C_{7-10} fenilalquilo), ou C_1 - C_{12} acilo; ou está ausente;

16 AGO. 1990

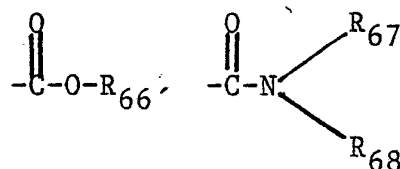
- 1 A²² = ao isómero D ou L do amino ácido Pro; ou está ausente;
- 5 A²³ = ao isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Lys ou Lys-e-NH-R₈₂ (em que R₈₂ é qualquer um de entre H, C₁₋₁₂ alquilo, C₇₋₁₀ fenilalquilo, COE₂ (onde E₂ é C₁₋₂₀ alquilo, C₃₋₂₀ alquinilo, fenilo, nafilo, ou C₇₋₁₀ fenilalquilo), ou C_{1-C₁₂} acilo); ou está ausente;
- 10 A²⁴ = ao isómero D ou L do amino ácido Pro; ou está ausente;
- A²⁵ = ao grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Asp, Gln, β-Nal, Trp, Phe, o-X-Phe (onde X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃); ou está ausente;
- 15 A²⁶ = ao grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Arg, Sar, Pro, Gln, pGlu, Phe, Trp, ciclohexil-Ala, ou Asn;
- A²⁷ = ao grupo identificador do amino ácido D-Trp; ou o grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um de entre Leu, Phe ou ciclohexil-Ala; ou está ausente;
- 20 A²⁸ = ao grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Val, β-Nal, Phe, o-X-Phe, (onde X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃); ou está ausente;
- 25 A²⁹ = ao grupo identificador do amino ácido D-Trp; ou o grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um de entre Leu, Phe, Phe ou ciclohexil-Ala;
- 30 A³⁰ = ao grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Leu, Nle, Ala, ciclohexil-Ala, Val Ile, Met, Gly, Phe, Trp, β-Nal, o-X-Phe (onde X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃); ou está ausente;
- 35 A³¹ = ao grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Trp, β-Nal, Leu, Nle, Ala, Val, Ile, Met, Gly, Phe, o-X-Phe (onde X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃), ou p-X-Phe (onde X = F, Cl, Br,

16 AGO 1990

1 NO₂, OH ou CH₃); ou está ausente;
 cada R₅₁ e R₅₂ independentemente, é qualquer um de entre H,
 C₁₋₁₂ alquilo, C₇₋₁₀ fenilalquilo, COE₂₄ (onde E₂₄ é C₁₋₂₀
 alquilo, C₃₋₂₀ alcenilo, C₃₋₂₀ alquinilo, fenilo, naftilo,
 5 ou C₇₋₁₀ fenilalquilo), C_{1-C12} acilo, ou está ausente e R₅₁
 e R₅₂ estão ligados ao átomos de alfa-amino azoto do amino
 ácido N-terminal dos referidos péptidos, desde que, quando
 um dos R₅₁ ou R₅₂ fôr COE₂₄, o outro seja obrigatoriamente
 H; R₅₃ é C, ou está ausente; cada R₅₅ e R₆₁ é, independente-
 10 mente, C; cada R₅₇, R₅₉, R₆₃ e R₆₅, independentemente, são
 o C ou estão ausentes; R₅₄ é CO-NH, CO-NCH₃ ou está ausente;
 cada R₅₆ e R₆₂, independentemente, é qualquer um de entre
 CO-NH, CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-CO-NH (em que n10 é 1 ou 0; e Z₂₀ é ou
 H ou OH), CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-CH₂, CH₂-CO ou CO-CH₂; R₅₈ é
 15 qualquer um de entre CO-NR₅₉ (em que R₅₉ é H ou C₁₋₁₂ alquilo)
 CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-CO-NH, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-CH₂, CH₂-CO, CO-CH₂
 ou ausente; R₆₀ é CO-NH ou ausente; R₆₄ é qualquer um de en-
 tre CO-NH, CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-V¹², CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-CH₂,
 20 CH₂-CO, CO-CH₂ ou ausente (onde V¹² é



25 (onde cada R₇₀, R₇₁ e R₇₂ independentemente, é H, C₁₋₁₂ alqui-
 lo, C₇₋₁₀ fenilalquilo ou C₁₂₋₂₀ naftilalquilo); e V¹⁰ é
 qualquer um dos



30 ou ausente (onde cada R₆₆, R₆₇ e R₆₈ independentemente, é H,
 35

16. AGO. 1999

1 C₁₋₁₂ alquilo, C₇₋₁₀ fenilalquilo, ou C₁₂₋₂₀ naftilalquilo) desde que, pelo menos um de entre R₅₆, R₅₈, R₆₂ ou R₆₄ seja diferente de CO-NH ou CO-NR₆₉; desde ainda que, onde R₅₆ seja CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-CO-NH, A²⁸, R₅₉H e R₆₀ estejam obrigatoriamente ausentes; desde ainda que, onde A²⁸, R₅₉H e R₆₀ estejam ausentes, R₅₈ seja obrigatoriamente CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-CO-NH; desde ainda que, onde R₆₂ seja CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-CO-NH; desde ainda que, onde R₆₂ seja CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-CO-NH, A³⁰, R₆₃H e R₆₄ estejam obrigatoriamente ausentes; desde ainda que, onde A³⁰, R₆₃H e R₆₄ estejam ausentes, R₆₂ seja obrigatoriamente CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-CO-NH; desde ainda que, onde R₆₄ seja CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-V¹², A³¹, R₆₅H e V¹⁰ estejam obrigatoriamente ausentes; desde ainda que, onde A³¹, R₆₅H e V¹⁰ estejam obrigatoriamente ausentes, R₆₄ seja obrigatoriamente CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-V¹²; ou um seu sal farmacologicamente aceitável.

Exemplos de péptidos preferidos são:

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-NH₂; D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp^LPhe-D-Trp^L[CH₂-NH]Leu-Nle-NH₂; ou D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L[CH₂-NH]Nle-NH₂. (Vínculos não péptidos em que o vínculo péptido é reduzido são aqui simbolizados por "[CH₂-NH]" ou "L"].

Um outro aspecto do invento apresenta uma substância P agonista da fórmula:

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly^L[CH₂-NH]Leu-Leu-NH₂.

Os antagonistas da SP do presente invento são úteis no tratamento de um paciente que sofra de doenças que envolvam inflamação neurogénica, por exemplo, artrite reumatóide, colite ulcerativa, eczema e doença de Crohn. Os antagonistas da SP do presente invento são úteis como agentes antiproliferativos, por exemplo, no tratamento do carcinoma das células pequenas do pulmão ou em desordens que envolvam a proliferação de fibroblastos. As propriedades antiproliferativas dos antagonistas da SP do invento também permite o seu uso na prevenção das cicatrizes de gliomas (facilitando

16 ABO 1990

1 assim a regeneração dos nervos). A acção dos antagonistas de
acordo com o invento na neurotransmissão permite o seu uso co
mo analgésico não opiáceos pode permitir a restauração da res
posta opiácea. Os antagonistas do invento são também úteis
5 como agentes anti-secretórios, actuando, por exemplo, sobre
as glandulas saliváres ou sobre o pancreas.

Nas fórmulas genéricas fornecidas acima, quando
qualquer um de R_1 , R_2 , R_7 - R_{13} , R_{51} , R_{52} , R_{66} - R_{68} ou R_{70} - R_{70}
é um grupo aromático, lipofílico, a actividade in vivo pode
10 ser de longa duração e a administração dos compostos do inven
to ao tecido alvo pode ser facilitada.

O grupo identificador de um alfa-amino ácido
(para o caso do piroglutamato vêr abaixo) é o átomo ou grupo
de átomos, diferente do átomo alfa-carbonil carbono, do
15 átomo alfa-amino azoto ou do átomo de H, ligado ao átomo al
fa-carbono assimétrico. Para ilustrar por meio de exemplos,
o grupo identificador da alanina é CH_3 , o grupo identificador
da valina é $(CH_3)_2CH$, o grupo identificador da lisina é
 $H_3N^+(CH_2)_4$ e o grupo identificador para a fenilalanina é
20 $(C_6H_5)CH_2$. O grupo identificador de um β - ou γ -amino ácido é
o átomo ou grupo de átomos análogo ligado respectivamente ao
átomo de carbono β - ou γ -. Onde o grupo identificador de um
amino ácido não é especificado, ele pode ser alfa, beta ou
gama. No caso do piroglutamato o grupo identificador consis
25 te em $-NH-CO-CH_2-CH_2-$.


Outras características e vantagens do invento
serão aparentes a partir da descrição seguinte de formas de
realização preferidas e das reivindicações.

Descrição de Formas de Realização Preferidas

30 Em primeiro lugar descrevemos resumidamente os
desenhos.

Desenhos

35 A figura 1 é constituída por um par de gráficos

16. AGO. 1990


1 que ilustram o efeito de pseudopéptidos de espantido, D-Arg-
-Pro-Lys-Pro-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂, (painel da es-
querda) e da SP, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-
-NH₂, (painel da direita) sobre a libertação da amilase esti-
5 mulada pela SP pelos ácinos do pancreas.

A Figura 2 é um gráfico que mostra o efeito do
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-NH₂ so-
bre a libertação da amilase estimulada pela SP dos ácinos
pancreáticos.

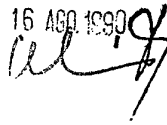
10 A Figura 3 é um par de gráficos que ilustram a
capacidade de várias SP e pseudopéptidos de espantida para
inibirem a fixação da substância P ¹²⁵I-BH aos ácinos pancreá-
ticos.

15 A Figura 4 é um gráfico que mostra a capacidade
da SP e dos pseudopéptidos de espantida para inibirem a fixa-
ção da bombesina ¹²⁵I-[Tyr⁴] aos ácinos pancreáticos.

Descrevem-se agora a estrutura, síntese e uso de
formas de realização preferidas do invento.

20 Estrutura

Os péptidos de acordo com o invento têm todos mo-
dificações, por exemplo, um vínculo não péptido em pelo menos
uma das posições indicadas, em que o átomo de carbono que
participa no vínculo entre dois resíduos é reduzido a partir
25 de um átomo carbonilo para um metileno carbono. O método de
redução do vínculo péptido que proporciona este vínculo não
péptido está descrita em Coy e al., pedido de patente U.S.,
No. de Série 879.348, atribuído aos cessionários do presente
pesido, aqui incorporado como referência. Os péptidos do pre-
30 sente invento podem ser proporcionados sob a forma de sais
farmaceuticamente aceitáveis. Exemplos de sais preferidos
são os que têm ácidos orgânicos terapeuticamente aceitáveis,
por exemplo, ácidos acético, láctico, maleico, cítrico, máli-
co, ascórbico, succínico, benzóico, salicílico, metanosulfó-
35 nico, toluenosulfónico ou pamóico, bem como ácidos poliméri-
cos tais como ácido tânico ou carboxiemtil celulose e sais

16 AGR 1990


1 com ácidos inorgânicos tais como os ácidos hidro-hálicos, por exemplo, ácido clorídrico, ácido sulfurico ou ácido fosfórico.

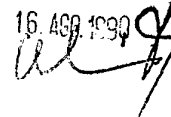
5 Síntese dos Análogos da Substância P

Segue-se a síntese do antagonista da substância P Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂NH]Leu-NH₂. Outros análogos da substância P podem ser preparados fazendo-se as modificações apropriadas ao seguinte processo sintético.

10 O primeiro passo é a preparação da resina de Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-benzidrilamina, como segue.

15 Resina de benzidrilamina-polistireno (Vega Biochemicals, Inc.) (0,97 g, 0,5 mmole) sob a forma de ião clorado é colocada no vaso de reação de um sintetizador de péptidos Beckman 990B programado para executar o seguinte ciclo de reação: (a) cloreto de metileno; (b) ácido trifluoroacético a 33% (TFA) em cloreto de metileno (2 vezes por 1 e 25 minutos cada); (c) cloreto de metileno; (d) etanol; (e) cloreto de metileno; e (f) trietilamina em clorofórmio a 10%.

20 A resina neutralizada é agitada com alfa-t-butoxicarbonil(Boc)-leucina e diisopropilcardiimida (1,5 mmoles cada) em cloreto de metileno durante 1 hora e a resina de amino ácido resultante é então ciclada através das fases (a) a (f) no programa de lavagem acima indicado. Aldeído de Boc-leucina (1,25 mmoles), preparados pelo método de Fehrentz e Castro, Synthasis, p.676 (1983), é dissolvido em 5 ml de dimetilformamida seca (DMF) e adicionado à suspensão salina de resina TFA, seguida pela adição de 100 mg (2 mmoles) de cianoborohidreto de sódio (Sasaki e Coy, Peptides 8: 119-121 (1987); Coy e al., id.). Depois de se agitar durante 1 hora, verifica-se que a mistura de resina é negativa à reação com nihidrina (1 min.), indicando a completa derivação do grupo amino livre.

16. AGO. 1990


1 Os amino ácidos seguintes (1,5 mmole) são
então sucessivamente reunidos em presença de diisopropilcar-
bodiimida (1,5 mmole) e a resina de amino ácido resultante é
ciclada através de fases de lavagem/desbloqueamento (a) a (f)
5 pelo mesmo processo indicado acima: Boc-Gly (Boc-Gly é acres-
centado sob a forma de um excesso de 6M do p-nitrofenilester)
Boc-Phe, Boc-Phe, Boc-Gln, Boc-Gln, (Boc-Gln é acrescentado
sob a forma de um excesso 6M do p-nitrofenilester), Boc-Pro,
Boc-Lys, Boc-Pro e Voc-Arg. A resina completa é então lavada
10 com metanol e secada ao ar.

A resina acima descrita (1,6 g, 0,5 mmole)
é misturada com anisolo (5 ml) e fluoreto de hidrogénio ani-
dro (35 ml) a 0°C e agitada durante 45 min. O excesso de fluo-
reto de hidrogénio é evaporado rapidamente sob uma corrente
15 de azoto seco e o péptido livre é precipitado e lavado com
éter. O péptido bruto é dissolvido num volume mínimo de 2 M
ácido acético e purificado numa coluna (2,5 x 90 cm) de
Sephadex G-25 que é eluída com 2 M de ácido acético, segui-
do por cromatografia preparatória a pressão média numa colu-
na (1,5 x 45 cm) de sílica Vydac C₁₈ (10-15 µm) que é eluída
20 com gradientes lineares de acetonitrilo em ácido trifluoro-
acético a 0,1% utilizando-se um controlador de graduação
Eldex Chromatrol (ritmo de fluxo 1 ml/min.). Onde necessário
os análogos são ainda mais purificados por recromatografia na
mesma coluna, com ligeiras modificações às condições de gra-
duação quando necessário. A homogeneidade dos péptidos foi
avaliada por meio de cromatografia de camada fina e cromato-
grafia líquida analítica de fase invertida a alta pressão e
a pureza foi de 97% ou superior. A análise de amino ácidos
30 forneceu os rácios esperados de amino ácidos. A presença do
vínculo péptido reduzido foi demonstrada por meio de espectro-
metria de massa por bombardeamento atómico rápido. cada um
dos análogos forneceu uma boa recuperação de ião molecular
correspondente à massa molecular calculada.

35 Um resíduo de estatina, AHPPA, ACHPA, β-ami

16.460.1990
[Handwritten signature]

1 no ácido ou γ -amino ácido é adicionado da mesma forma que um
resíduo de alfa-amino ácido natural, por meio de acrescenta-
mento sob a forma de um Boc-amino ácido. A estatina ou a
Boc-estatina podem ser sintetizadas de acordo com o processo
5 de Rich e al., 1978, J.Org.Chem. 43; 3624; Rich e al. (1988)
J.Org.Chem. 53:869; e Rich e al., J-Med.Chem. 23:27. AHPPA
pode ser sintetizada de acordo com o processo de Hui e al.,
1987, J.Med.Chem. 30:1287. ACHPA pode ser sintetizada de acor-
do com o processo de Schuda e al., 1988, Journal of Organic
10 Chemistry 53:873. Amino ácidos Boc-reunidos sintéticos podem
ser obtidos junto de Nova Biochemicals (Suíça), Bachem (Tor-
rance, Californis) e CalBiochem (San Diego, California).

Outros compostos podem ser preparados conforme
acima e ensaiados quanto à sua eficácia como agonistas ou an-
15 tagonistas no seguinte programa de ensaio.

Fase 1 - Liberação da Amilase dos Acinos Pancreáticos

A SP estimula a liberação da amilase nos áci-
nos pancreáticos. A estimulação ou inibição da liberação da
20 amilase pelos ácinos pancreáticos é utilizada como uma medi-
da de, respectivamente, a actividade agonista ou antagonista
de um péptido. Ácinos dispersos do pancreas de uma nimal são
suspensos em 150 ml de solução de incubação normalizada. A
libertação da amilase é medida conforme anteriormente descri-
25 to (Gardner e al. (1977) J. Physiol. 270:439). A actividade
da amilase é determinada pelos processos de Caska e al. (Ces-
ka e al. (1969) Glin.Chim.Acta. 265:437 e Ceska e al. (1969)
Clin.Chim.Acta. 26:445) utilizando-se o reagente de Phadebas.
A libertação da amilase é calculada como a percentagem da
30 actividade de amilase nos ácinos no início da incubação, que
foi libertada para o meio extracelular durante a incubação.

Fase 2 - Inibição Competitiva do Vinculo ^{125}I -Bolton-Hunter- SP

35 A ligação da ^{125}I -Bolton-Hunter-SP (^{125}I -BH-SP)

16 ABR 1990

1 aos ácinos pancreáticos sispersos é medida conforme descrito
 anteriormente (Jensen e al. (1984) Biochem.Biophys.Acta
 804:181 e Jensen e al. (1988) Am.J.Physiol.254:G883). As in-
 cubações contem 0,125 nM ^{125}I -BH-SP e 0,1 % de bacitracina
 5 em tampão de incubação normalizado e estiveram durante 30 mi-
 nutos a 37°C. A ligação não saturável da ^{125}I -BH-SP é a quan-
 tidade de radioatividade associada com os ácinos quando a
 incubação contem 0,125 nM ^{125}I -BH-SP mais 1µM de SP não mar-
 cada. Todos os valores fornecidos são para a ligação saturá-
 vel, isto é, ligação medida apenas com a ^{125}I -BH-SP (ligação
 10 total). Em todas as experiências a ligação não saturável foi
 <30% da ligação total.

Fase 3 - Inibição Competitiva da Fixação da ^{125}I -[Tyr⁴] Bom-
 besina

15 ^{125}I -[Tyr⁴] bombesina (2200 Ci/mmol) é prepara-
 da utilizando-se uma modificação do processo descrito anteri-
 ormente (Jensen e al. (1978). Pro.Natl.Acad.Sci.USA 75:6139).
 Iodo-Gen (mg) é dissolvido em 5 ml de clorofórmio e 5µl de
 20 KH_2PO_4 (pH 7,4), 6 µg [Tyr⁴] bombesina em 5 µl dessa solução
 (1 µg de Iodo-Gen) são transferidos para um frasco sob uma
 corrente de azoto. Adiciona-se a esse frasco 50 µl de KO_2PO_4
 (pH 7,4), 6 µg [Tyr⁴] bombesina em 5 µl de água e 1 mCi
 25 Na^{125}I é adicionado, misturado e incubado durante 6 min a
 4°C, altura em que a mistura de iodização é adicionada a um
 frasco de 1 M ditiotreitol e incubada a 80°C durante 60 min.
 A mistura de iodização é então carregada num cartucho Sep-Pak
 e eluída com 0,25 M de fosfato de tetra-etilamónio (TEAP)
 seguido por acetonitrilo-0,25 M TEAP 50% (vol/vol). A ^{125}I -
 30 -[Tyr⁴] bombesina é purificada utilizando-se cromatografia
 líquida de fase invertida de alto rendimento (HPLC) e eluída.

Resultados das Análises dos Péptidos Ensaia

35 Um certo número de análogos da substância P ou
 da espantida antagonista de substância P, cada um deles con-
 tendo um vínculo não péptido, podem ser sintetizados e ensai

16 AGO 1990
[Handwritten signature]

1 dos num ou mais dos ensaios descritos nas Fases 1-3 acima
descritos. A estrutura da substância P é Arg-Pro-Lys-Pro-Gln
-Gln-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂. A espantida é um análogo da SP. A
estrutura da espantida é D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe
5 -D-Trp-Leu-Leu-NH₂. A estimulação ou inibição da libertação
da amilase de ácinos pancreáticos dispersos foi utilizada co
mo ensaio para actividade agonista ou antagonista da SP res-
pectivamente. A uma concentração de 10 µM, 9 de 10 mpseudo-
péptidos derivados da espantida não conseguiram estimular a
10 libertação da amilase quando presentes isoladamente (Quadro
2). Um péptido, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe- Gly^L[CH₂-NH]
Leu-Leu-NH₂. (10 µM) tinha uma actividade agonista que pro-
vocava um aumento de 3 vezes na libertação da amilase (Qua-
dro 2). Cada um dos 9 pseudopéptidos sem actividade agonista
15 foi examinado quanto à actividade como antagonista da SP. A
uma concentração de 10 µM, cada um dos análogos pseudopépti-
dos derivados da espantida inibiram a libertação 1 nM-SO-es-
timulada da amilase .(Quadro 2). Três pseudopéptidos SP, Arg
-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-NH₂, Arg-
20 -Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe^L[CH₂-NH]Gly-Leu-Leu-NH₂ e Arg-
-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-^L[CH₂-NH]Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-NH₂ cau-
saram inibição (Quadro 2).

As capacidades relativas de cada um dos pépti-
dos para inibir a libertação estimulada pela SP da amilase,
25 foi determinada pelo efeito da dose de péptido sobre a amila-
se. Foram efectuados estudos dose inibição para cada um dos
9 pseudopéptidos, utilizando-se uma concentração de SP (1nM)
que provoca uma estimulação semi-máxima. (Fig. 1). Os resul-
tados para os 5 pseudopéptidos derivados da espantida estão
30 representados na Fig 1, painel da esquerda. D-Arg-Pro-Lys-
-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L[CH₂-NH]Nle-NH₂ foi equi-
potente relativamente à espantida, provocando uma inibição
detectável a 0,03 µM e inibição semi-máxima a 1,8 µM (Quadro
3). D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp^L[CH₂-NH]Leu-
35 -Nle-NH₂ foi duas vezes menos potente (IC₅₀ 3,5 uM. Quadro 3)

16 AGO 1990
[Handwritten signature]

1 do que a espantida. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^L[CH₂-NH]D-Trp-
-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ foi 2,6 vezes (IC₅₀ 4,7 μM) menos poten-
te do que a espantida. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp^L[CH₂-
-NH]Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ foi 3,5 vezes (IC₅₀, 6,4-μM) menos
5 potente e D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe^L[CH₂-NH]D-Trp-
-Leu-Nle-NH₂ foi 17 vezes (IC₅₀, 30 μM) menos potente do que
a espantida (Quadro 3).

Os resultados para os análogos de pseudopépti-
dos da SP estão representados na Fig. 1 painel da direita.
10 Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-NH₂ foi o de-
derivado da SP mais potente provocando uma inibição detectá-
vel a 0,3 μM de inibição semi-máxima a 7,1 μM (Quadro 3, di-
reita). Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe^L[CH₂-NH]Gly-Leu-Leu-
-NH₂ e Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^L[CH₂-NH]Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-
15 -NH₂ foram menos eficazes, provocando uma inibição detectável
a 10 μM. Eles são, respectivamente, 7 vezes e 46 vezes menos
potente do que Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-
-NH]Leu-NH₂ (Quadro 3, direita). Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe^L
[CH₂-NH]Phe-Gly-Leu-Leu-NH₂ não exibiu qualquer actividade
20 inibitória a concentrações tão elevadas como 30 μM (Fig. 1,
direita). O derivado mais potente do pseudopéptido antagonis-
ta da SP foi a Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-
-NH]Leu-NH₂ (Fig. 1, Quadro 2).

Os efeitos inibitórios do derivado do pseudo-
25 péptido antagonista da SP, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-
-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-NH₂, estão representados na Fig. 2. Fo-
ram incubados ácidos com concentrações crescentes de SP. A
libertação da amilase foi detectável com 0,1 nM de SP, foi
semi-máxima com 1 nM SP2 e foi máxima com 10 nM (Fig. 2). A
30 adição de Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]-
Leu-NH₂ provocou um desvio paralelo para a direita na curva
de resposta à dose para a libertação de amilase estimulada
pela SP. O desvio foi proporcional à concentração de Arg-Pro-
-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-NH₂ adicionada
35 mas não houve modificações na resposta máxima (Fig. 2). D-
-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L[CH₂-NH]Nle-NH₂

16 AGO 1989

1 deram resultados semelhantes (dados não representados).

A interação entre os análogos derivados da SP e da espantida com os receptores da SP dos ácinos pancreáticos foi medida pela capacidade de um péptido para inibir a
5 fixação de ^{125}I -BH-SP aos ácinos. (Ver Quadro 3 e Fig. 3).

Os pseudopéptidos derivados da espantida mostram uma gama de potências. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L[CH₂-NH]Nle-NH₂ é aproximadamente equivalente em potência à espantida provocando uma inibição detectável a
10 0,03 μM e semi-máxima a 2,2 μM (Fig. 3, esquerda, Quadro 3). D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp^L[CH₂-NH]Leu-Nle-NH₂ e D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^L[CH₂-NH]D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ são duas vezes menos potentes do que a espantida. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp^L[CH₂-NH]Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂
15 foi três vezes menos potente (K_i , 6,3 μM) menos potente do que a espantida. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe^L[CH₂-NH]D-Trp-Leu-Nle-NH₂ foi sete vezes (K_i , 14,7 μM) menos potente do que a espantida (Fig. 3, Quadro 3).

Os pseudopéptidos derivados da SP mostram também uma variação de potências. Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-NH₂ provoca uma inibição detectável a 0,1 μM e semi-máxima a 3 μM . Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly^L[CH₂-NH]Leu-Leu-NH₂ é 1,5 vezes inferior em potência, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe^L[CH₂-NH]Gly-Leu-Leu-NH₂ é
20 20 vezes menos potente e Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe^L[CH₂-NH]Phe-Gly-Leu-Leu-NH₂ e Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^L[CH₂-NH]Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-NH₂ são mais de 62 vezes menos potentes do que Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-NH₂.

Ao contrário de análogos de SP anteriormente estudados os péptidos do invento são específicos para o receptor SP. Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]-Leu-NH₂ foi ensaiado quanto à sua capacidade para inibir a liberação da amilase produzida por diversos secretagogos pancreáticos (Quadro 4). Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-NH₂ (20 μM) inibiu a liberação da amilase
35

16 AGO. 1990

1 estimulada pela SP mas não alterou a libertação da amilase
estimulada pelos bombesina, CCK-8, carbacol, VIP, escretina,
CGRP A23187 ou TPA.

5 Os mais potentes receptores do antagonis
ta foram ensaiados quanto à sua capacidade para inibir a fi-
xação de ^{125}I -[Tyr⁴] bombesina aos receptores de bombesina dos
ácinos pancreáticos. A espantida inibia a fixação de ^{125}I -
-[Tyr⁴] bombesina conforme anteriormente comunicado (Jensen
10 e al. (1988) Am.J.Physiol. 254:G883) produzindo inibição se-
mi-máxima a 100 μM (Fig. 4). D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp
-Phe-D-Trp-Leu^L[CH₂-NH/Nle-NH₂] inibia a fixação da ^{125}I -[Tyr⁴]
bombesina mas era 3 vezes menos potente do que a espantida
provocando a inibição semi-máxima aos 10 μM ($P < 0,05$ ao compa
15 rar-se com a espantida) (Fig. 4). Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-
-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH/Leu-NH₂] não causou inibição detectá
vel até uma concentração superior a 30 μM e tiveram um K_i cal
culado de $300 \pm 20 \mu\text{M}$. Espantida e D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln
-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L[CH₂-NH/Nle-NH₂] tinham uma afinidade in
20 ferior tripla a decupla para a inibição da fixação da ^{125}I -
[Tyr⁴] bombesina, quando comparada com a ^{125}I -BH-SP.

A capacidade do Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-
-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH/Leu-NH₂] para inibir a fixação da
 ^{125}I -[Tyr⁴] bombesina foi 70 vezes inferior à sua capacidade
para inibir a fixação da ^{125}I -BH-SP.

25 Utilização

Os péptidos do invento podem ser adminis
trados a um mamífero, particularmente um humano, de uma das
30 formas tradicionais (por exemplo, oralmente, parentericamen-
te, transdermicamente ou através das mucosas, numa formula-
ção de libertação retardada que utiliza um polímero biodegra
dável biocompatível, ou por administração local por meio de
micélios, geleias e lipossomas.

35 Os péptidos podem ser administrados a um
paciente humano numa dosagem de 0,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ a 5 $\text{mg}/\text{Kg}/\text{dia}$.

16 Abr 1990
[Handwritten signature]

1 Quadro 1. Os cinco resíduos carboxil-terminais de uma variedade de péptidos bioativos.

5	Péptido	Sequencia carboxil terminal
	Bombesina	-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂
	Neuromedina-β	-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH ₂
	Neuromedina-C	-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂
	Litorina	-Val-Gly-His-Phe-Met-NH ₂
10	Neuroquinina-A	-Phe-Val-Gly-Leu-Leu-NH ₂
	Neuroquinina-B	-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
	Substância P	-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
	Sequência Taquiquinina Prototípica -Phe-X-Leu-Met-NH ₂	(onde X = a resíduo amino ácido ramificado alifático ou aromático)
15		
20		
25		
30		
35		

16 AGO 1990
[Handwritten signature]


1 Quadro 2. Efeito dos vários pseudopéptidos derivados da esp
 amitida e da substância SP sobre a libertação basal e estimu
 lada pela SP da amilase.

5

Libertação da Amilase (percent.to
tal)

	<u>Péptido Adicionado</u>	<u>Isolada</u>	<u>SP (1 nM)</u>
10	Nenhuma	3.4 ± 0.5	6.6 ± 0.7
	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-	3.1 ± 0.7	4.3 ± 0.5
	Phe-Gly-Leu ^L [CH ₂ -NH]Leu-NH ₂ (10µM)		
	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-	10.4 ± 1.0 **	NT-agonista
15	Phe-Gly ^L [CH ₂ -NH]Leu-Leu-NH ₂ (10µM)		
	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-	3.1 ± 1.0	5.4 ± 0.7 *
	Phe ^L [CH ₂ -NH]Gly-Leu-Leu-NH ₂ (10 µM) ²		
	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-	3.8 ± 0.7	6.4 ± 0.3
20	Phe ^L [CH ₂ -NH]Phe-Gly-Leu-Leu- -NH ₂ (10 µM)		
	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln- ^L [CH ₂ -	3.1 ± 0.9	6.1 ± 1.0
	-NH ₂]Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-NH ₂ (10 ² µM)		
	D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-	3.8 ± 0.05	3.6 ± 0.1 *
25	Trp-Phe-D-Trp-Leu ^L [CH ₂ -NH]- Nle-NH ₂ (10 µM)		
	D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-	3.9 ± 0.8	4.2 ± 0.2 *
	Trp-Phe-D-Trp ^L [CH ₂ -NH]Leu-Nle-NH ₂ (10 µM)		
30	D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-	4.0 ± 0.5	5.6 ± 0.8 *
	Trp-Phe ^L [CH ₂ -NH]D-Trp-Leu-Nle-NH ₂ (10 µM)		
	D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-	4.1 ± 0.5	4.8 ± 1.2 *
	Trp ^L [CH ₂ -NH]Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH ₂ (10 µM)		
35	D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln ^L [CH ₂ -NH]D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH ₂ (10 µM)	3.8 ± 0.3	4.5 ± 0.8 *

16 AGO 1990



1 * significativamente menos do que apenas SP p <0,05

5 ** Significativamente maior do que nenhuma adições p <0,01
Os ácidos foram incubados a 37°C durante 30 minutos com 1 nM
SP e 10 uM de concentrações dos vários análogos pseudopépti-
10 dos de SP e espantida, tanto sós como em combinação. A liber-
tação da amilase foi expressa como percentagem da actividade
da amilase em ácidos no início da incubação que foi libertada
para o meio extracelular durante a incubação. Os valores são
médias \pm 1SEM de pelo menos 5 experiências diferentes. Em ca-
da experiência cada um dos valores foi determinado em dupli-
cado. Abreviaturas; NT-agonista = não testado como antagonis-
ta porque era um agonista.

15

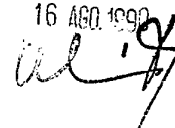
20

25

30

35

16 AGO. 1990



1 Quadro 3. Capacidade dos SP, espantida e pseudopéptido para inibir a fixação da ^{125}I -BH-SP ou a libertação estimulada pela SP da amilase.

5	Péptido	Fixação da ^{125}I -BH-SP	Inibição da Libertação da Amilase Estimulada por ^{125}I Nmsp
		K_i ou K_d (μM)	IC_{50} (μM)
10	D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-NH ₂ (Espantida)	2.1 ± 0.6	1.8 ± 0.1
	D-Arg-Pro-Lys-pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu ^L [CH ₂ -NH]Nle-NH ₂	2.2 ± 0.4	1.8 ± 0.25
15	D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp ^L [CH ₂ -NH]Leu-Nle-NH ₂	3.6 ± 0.7	3.5 ± 0.6
	D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe ^L [CH ₂ -NH]D-Trp-Leu-Nle-NH ₂	14.7 ± 2.0	30 ± 5.0
20	D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp ^L [CH ₂ -NH]Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH ₂	6.3 ± 3.3	6.4 ± 1.4
	D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln ^L [CH ₂ -NH]D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH ₂	4.3 ± 1.1	4.7 ± 1.3
25	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂ (SP)	0.0025 ± 0.0005	Não-Agonista
	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu ^L [CH ₂ -NH]Leu-NH ₂	4.3 ± 0.3	7.1 ± 0.9
30	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe--Gly ^L [CH ₂ -NH]Leu-NH ₂	5.6 ± 2.2	Não-Agonista
	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe ^L [CH ₂ -NH]Gly-Leu-Leu-NH ₂	41.3 ± 16.7	>30
35	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe ^L [CH ₂ -NH]Phe-Gly-Leu-Leu-NH ₂	265.0 ± 89.0	>30
	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln ^L [CH ₂ -NH]Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-NH ₂	310.0 ± 88.0	>30

15 JUN 1990

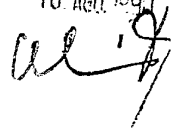
1 Os valores são médias \pm lSEM. OS valores Kd para a SP são obtidos da análise Scatchard de estudos de fixação da SP rotulada com ^{125}I , os valores K_i para agonista e antagonistas de estudos de fixação ^{125}I -BH-SP foram obtidos de acordo com a equação: $K_i = (R/1-R) (SB/S+A)$ R é a fixação saturável observada da ^{125}I -BH-SP em presença do antagonista (B) expressa como uma fracção da obtida quando B não está presente; A é a concentração de ^{125}I -BH-SP (0,125 nM). B é a concentração de antagonista, S é o K_d da SP determinada pela análise de Scatchard. Não agonista = péptido não testado quanto à actividade de inibição devido à actividade agonista quando presente isolado.

15 Quadro 4. Capacidade do Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]/Leu-NH₂ para afectar a libertação da amilase estimulada por vários escretagogos.

20	Escretagogo	Libertação da Amilase Isolada	(Percent Total)
			Leu ¹¹ , L ¹⁰⁻¹¹ -SP (20 μM)
	Nenhuma	2.7 \pm 0.4	2.3 \pm 0.3
	Substância P (1 nM)	8.7 \pm 1.8	4.3 \pm 0.5
	CCK-8 (0,1 nM)	19.7 \pm 4.2	21.6 \pm 4.9
25	Bombesina (0,3 nM)	14.8 \pm 4.1	14.3 \pm 3.1
	Carbacol (10 μM)	22.7 \pm 4.1	20.7 \pm 4.3
	VIP (0,3 nM)	20.5 \pm 3.5	18.9 \pm 4.2
	Escretina (0,1 μM)	18.9 \pm 3.6	18.8 \pm 4.1
	CGRP (0,1 μM)	12.1 \pm 3.3	12.0 \pm 3.9
30	A23187 (0,1 μM)	9.9 \pm 1.5	11.6 \pm 1.6
	TPA (0,1 μM)	32.2 \pm 5.7	30.2 \pm 5.6

* Significativamente menos do que apenas o escretagogo p < 0,001

35



1 Os ácidos foram incubados durante 30 minutos a
27°C com diversos escretagogos isolados ou com Arg-Pro-Lys-
Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-NH₂. Em cada experi-
5 ência, cada um dos valores foi determinado em duplicado e os
resultados fornecem médias \pm 1SEM de pelo menos quatro expe-
riências diferentes. Abreviaturas: CCK-8, COOH- octapéptido
terminal de colecistoquinina; VIP, péptido intestinal vaso-
constritor, respectivamente; CGRP, péptido relacionado com o
10 gene da calcitonina; A23187 e TPA, 1,2-o-tetradecanoilofor-
bol-1,3-acetato.

- R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

15 1ª. - Processo para a preparação de péptidos
terapêuticos, caracterizado pelo facto de estes serem análo-
gos à substância P que ocorre naturalmente e é biologicamente
activa, tendo uma localização e uma localização de fixação
do referido péptido a um receptor numa célula alvo, tendo o
20 referido análogo uma das seguintes modificações: (a) um vín-
culo não péptido em vez de um vínculo péptido entre um resí-
duo de amino ácido da referida localização activa e um resí-
duo de amino ácido adjacente, (b) um resíduo de estatina ou
AHPPA ou ACHPA ou β -amino ou γ -amino ácido, em lugar de dois
25 resíduos de amino ácido gerados naturalmente da referida lo-
calização activa, (c) um apagamento de um resíduo de amino
ácido no interior da localização activa e uma modificação de
um resíduo de amino ácido fora da localização activa, ou (d)
a presença de um resíduo N-terminal de amino ácido do referi-
30 do péptido biologicamente activo, gerado naturalmente.

35 2ª. - Processo para a preparação de péptidos
terapêuticos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
pelo facto de o referido análogo ser capaz de se ligar ao re-
ferido receptor, de forma a poder actuar como um inibidor
compatitivo do referido péptido que ocorre naturalmente, por

16 AGO 1991



1 meio da ligação ao referido receptor e, em virtude de uma das
modificações referidas, sem apresentar in vivo a actividade
do referido péptido natural.

3ª. - Processo para a preparação de péptidos
5 terapêuticos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
pelo facto de a referida localização activa do referido pépti-
do linear ser na metade carboxil terminal do referido péptido
linear, tendo o referido péptido linear uma ou mais das se-
guintes modificações: (a) um vínculo não péptido em vez de um
10 vínculo péptido entre um resíduo de amino ácido da referida
localização activa e um resíduo de amino ácido adjacente, (b)
um resíduo de estatina ou AHPPA ou ACHPA ou β -amino ácido ou
 γ -amino ácido em lugar de dois resíduos de amino ácido natu-
ralmente gerados da referida localização activa, (c) um apa-
15 gamento de um resíduo de amino ácido na localização activa e
uma modificação de um resíduo de amino ácido fora da locali-
zação activa, ou (d) a presença de um resíduo N-terminal de
amino ácido que não seja o resíduo N-terminal de amino ácido
natural do referido péptido biologicamente activo que ocorre
20 naturalemet.

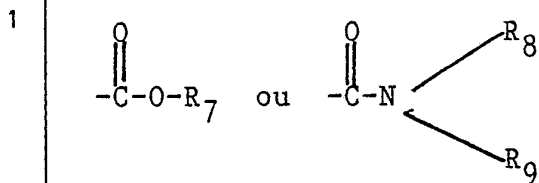
4ª. - Processo para a preparação de péptidos
terapêuticos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
pelo facto de a referida localização activa do referido pé-
ptido linear ser na metade terminal carboxil do referido pé-
25 ptido linear, tendo o referido péptido linear uma ou mais
das seguintes modificações: (a) um vínculo não péptido em
vez de um vínculo péptido entre o resíduo carboxil terminal
do amino ácido e o resíduo de amino ácido adjacente, ou (b)
um resíduo de estatina ou AHPPA ou ACHPA ou β -amino ácido
30 ou γ -amino ácido em lugar dos resíduos carboxil terminal e
amino ácido adjacente de ocorrência natural.

5ª. - Processo para a preparação de pépti-
dos terapêuticos, de acordo com a reivindicação 1, caracteri-
zado pelo facto de ser um análogo da substância P biologica-
35 mente activa que ocorre naturalemet, tendo o referido análo-
go uma das seguintes modificações: (a) um vínculo não pépti-

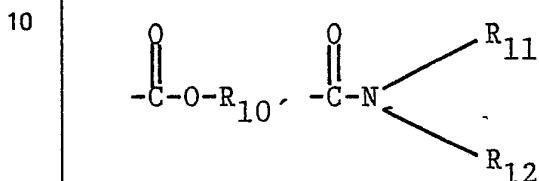
16 AGO 1990
[Handwritten signature]

- 1 Gln, β -Nal, Trp, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃), p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃); ou está anulado;
- 5 A⁶ = isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Ala, Arg, Ser, Pro, Gln, pGlu, Asn, β -Nal, Trp, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃);
- A⁷ = isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Val, Thr, Phe, Trp, β -Nal, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃) ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃);
- 10 A⁸ = grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Gly, Val, Trp, β -Nal, Phe, p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃) ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃);
- 15 A⁹ = isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Sar, His, Gly, Trp, β -Nal, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃), ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃);
- 20 A¹⁰ = grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Trp, β -Nal, Leu, Nle, Ala, ciclohexil-Ala, Val, Ile, Met, Gly, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃), ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃);
- 25 A¹¹ = grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Trp, β -Nal, Leu, Nle, Ala, Val, Ile, Met, Gly, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃), ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃); ou está anulado;
- 30 cada um dos R₁ e R₂ é, independentemente, qualquer um de H, C₁₋₁₂ alquilo, C₇₋₁₀ fenilalquilo, COE₁₄ (em que E₁₄ é C₃₋₂₀ alcenilo, C₃₋₂₀ alquinilo, fenilo, naftilo ou C₇₋₁₀ fenilalquilo, (C₁₋₁₂ acilo, ou está anulado e R₁ e R₂ estão ligados ao átomo de α -amino azoto do amino ácido N-terminal do referido péptido, desde que, quando um dos R₁ ou R₂ seja COE₁₄ o outro seja obrigatoriamente H, R₃ é H ou C₁₋₁₂ alquilo; al
- 35 quilo; R₅ é qualquer de CHZ₁₀-(CH₂)_{n1}-V², CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-CH₂ CH₂-CO, ou CO-CH₂ em que V² é qualquer um dos

16 AGO 1980
al. S.

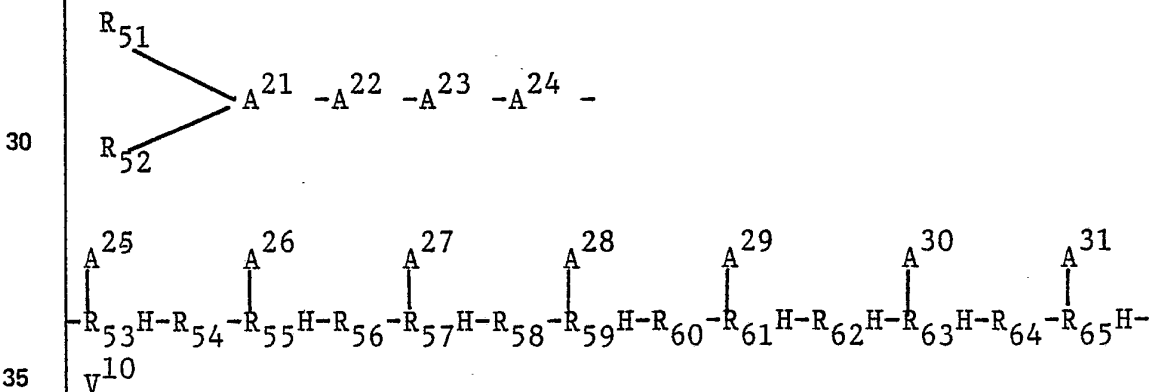


5 (em que cada R_7, R_8 e R_9 é, independentemente, H , C_{1-12} alquilo, C_{7-10} fenilalquilo, C_{7-10} fenilalquilo, ou C_{12-20} naftilalquilo); n_1 é ou 1 ou 0; e Z_{10} é ou H ou OH); R_5 é C ou e V^1 é qualquer um de



15 ou anulado (em que cada $\text{R}_{10}, \text{R}_{11}$ e R_{12} é, independentemente, H , C_{1-12} alquilo, C_{7-10} fenilalquilo, ou C_{12-20} naftilalquilo); desde que, onde R_5 seja $\text{CHZ}_{10}-(\text{CH}_2)_{n_1}-\text{V}^2$; A^{11} , R_6H e V^1 estejam obrigatoriamente anulados; desde ainda que, onde A^{11} , R_6H e V^1 estejam anulados, R_5 seja obrigatoriamente $\text{CHZ}_{10}-(\text{CH}_2)_{n_1}-\text{V}^2$; desde ainda que, quando A^5 seja ASP , A^6 seja Ser , A^7 seja Phe , A^8 seja Val , A^9 seja Gly , A^{10} seja eu , A^{11} seja Leu e R_5 seja CH_2NH , pelo menos um dos $\text{A}^1, \text{A}^2, \text{A}^3$ ou A^4 esteja obrigatoriamente presente; ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

25 9ª. - Processo para a preparação de péptidos terapêuticos de acordo com a reivindicação 5 de fórmula:



Mod. 71-10000 ex. 89/07

16 AGO 1990

al

1 caracterizado pelo facto de:

= isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Arg, Lys, ou Lys- -NH-R₈₀ (em que R₈₀ é qualquer um de H, C₁₋₂₀ alquilo, C₇₋₁₀ fenilalquilo, COE₂₀ (em que E₂₀ é C₁₋₂₀ alquilo, C₃₋₂₀ alcenilo, C₃₋₂₀ alquinilo, efnilo, naftilo ou C₇₋₁₀ fenilalquilo), ou C_{1-C₁₂} ácido); ou está anulado;

A²² = isómero D ou L do amino ácido Pro; ou está anulado

A²³ = isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Lys, ou Lys- -NH-R₈₂ é qualquer um de H, C₁₋₁₂ alquilo, C₇₋₁₀ fenilalquilo, COE₂₂ (em que E₂₂ é C₁₋₂₀ alquilo, C₃₋₂₀ alquilo, fenilo, naftilo, ou C₇₋₁₀ fenilalquilo), ou C_{1-C₁₂} ácido); ou está anulado;

A²⁴ = isómero D ou L do amino ácido Pro; ou está anulado;

A²⁵ = grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Asp, Gln, β-Nal, Trp, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃); ou está anulado;

A²⁶ = grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Arg, Sar, Pro, Gln, pGln, Phe, Trp, ciclohexil-Ala ou Asn;

A²⁷ = grupo identificador do amino ácido D-Trp; ou o grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos Leu, Phe, ou ciclohexil-Ala; ou está anulado;

A²⁸ = grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Val, β-Nal, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃), ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃); ou está anulado;

A²⁹ = grupo identificador do amino ácido D-Trp; ou o grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos Leu, Phe, ou ciclohexil-Ala;

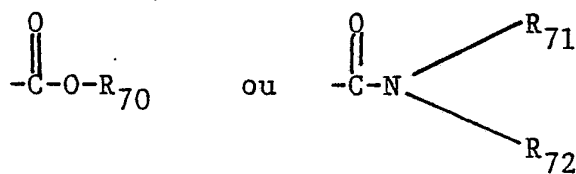
A³⁰ = grupo identificador do isómero D ou L de qualquer um dos amino ácidos Leu, Nle, Ala, ciclohexil-Ala, Val, Ile, Met, Gly, Phe, Trp, β-Nal, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃), ou p-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂,

16 AGO 1999
al

1 OH, ou CH₃) ou está anulado;
 A³¹ = grupo identificador do isómero D ou L de qual-
 quer um dos amino ácidos Trp, β-Nal, Leu, Nle, Ala, Val, Ile
 Met, Gly, Phe, o-X-Phe (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH ou CH₃)
 5 ou p-X-Phe, (em que X = F, Cl, Br, NO₂, OH, ou CH₃); ou está
 anulado;

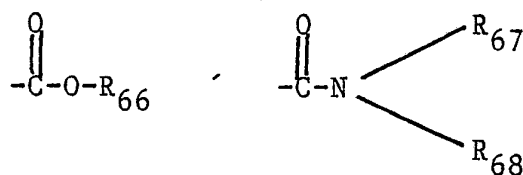
cada R₅₁ e R₅₂, independentemente, é qualquer um de H, C₁₋₁₂
 alquilo, C₇₋₁₀ fenilalquilo, COE₂₄ (em que E₂₄ é C₁₋₂₀ alce-
 nilo, C₃₋₂₀ alquinilo, fenilo, naftilo, ou C₇₋₁₀ fenilalqui-
 10 lo), C_{1-C12} acilo, ou está anulado, e R₅₁ e R₅₂ estão ligados
 ao átomo α-amino de azoto de amino ácido N-terminal do refe-
 rido péptido, desde que, quando dos R₅₁ ou R₅₂ é COE₂₄, o
 outro seja obrigatoriamente H; R₅₃ é C, ou está anulado; cada
 um dos R₅₅ e R₆₁, independentemente, é C; cada um dos R₅₇,
 15 R₅₉, R₆₃, R₆₅, independentemente, é ou C ou anulado; R₅₄ é
 CO-NCH₃, ou está anulado; cada um dos R₅₆ e R₆₂, independente-
 mente, é qualquer um de CO-NH, CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-CO-NH (em que
 n10 é ou 1 ou 0; e Z₂₀ é ou H ou OH), CH₂-NH, CH₂-NH, CH₂-S
 CH₂-CH₂, CH₂-CO, ou CO-CH₂; R₅₈ é qualquer um entre CO-NR₆₉
 20 (em que R₆₉ é H ou C₁₋₁₂ alquilo), CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-CO-NH,
 CH₂-NH, CH₂-CH₂, CH₂-CO, CO-CH₂, ou anulado; R₆₀ é CO-NH, ou
 anulado; R₆₄ é qualquer um entre CO-NH, CHZ₂₀-(CH₂)_{n10}-V¹²,
 CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-CH₂, CH₂-CO, CO-CH₂, ou anulado (em que
 V¹² é ou de

25



30 (em que cada R₇₀, R₇₁ e R₇₂, independentemente, é H, C₁₋₁₂ al-
 quilo, C₇₋₁₀ fenilalquilo, ou C₁₂₋₂₀ naftilalquilo); e V¹⁰ é
 qualquer um dos

35

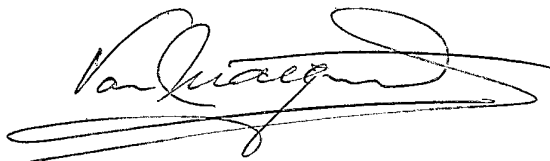


1 ou anulado (em que cada um dos R_{66} , R_{67} e R_{68} independente-
 mente, é H, C_{1-12} alquilo, C_{7-10} fenilalquilo, ou C_{12-20} naf-
 tilalquilo); desde que, pelo menos um dos R_{56} , R_{58} , R_{62} ou
 5 R_{64} seja diferente de ou CO-NH ou CO-NR₆₉; desde ainda que,
 onde A^{27} , R_{57H} e R_{58} estejam anulados, R_{56} seja obrigatória-
 mente $CHZ_{20}-(CH_2)_{n10}-CO-NH$; desde ainda que, onde R_{58} seja
 $CHZ_{20}-(CH_2)_{n10}-CO-NH$, A^{28} , R_{59H} e R_{60} estejam obrigatoriamente
 anulados; desde ainda que, onde A^{28} , R_{59H} e R_{60} estejam anulados; desde
 ainda que, onde A^{28} , R_{59H} e R_{60} estejam anulados, R_{58} seja obrigatória-
 10 mente $CHZ_{20}-(CH_2)_{n10}-CO-NH$; desde ainda que, onde R_{62} seja
 $CHZ_{20}-(CH_2)_{n10}-CO-NH$, A^{30} , R_{63H} e R_{64} estejam obrigatoriamen-
 te anulados; desde ainda que onde A^{30} , R_{63H} e R_{64} estejam
 anulados, R_{62} obrigatoriamente $CHZ_{20}-(CH_2)_{n10}-CO-NH$; desde
 ainda que, onde R_{64} seja $CHZ_{20}-(CH_2)_{n10}-V^{12}$, A^{31} , R^{65H} e V^{10}
 15 estejam obrigatoriamente anulados; desde ainda que, onde A^{31}
 R^{65H} e V^{10} estejam anulados, R_{64} seja obrigatoriamente
 $CHZ_{20}-(CH_2)_{n10}-V^{12}$ ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

Lisboa, 14. DEZ. 1990

20 Por THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL
 FUND

O AGENTE OFICIAL

25 

VASCO MARQUES LENTE
 Agente Oficial
 do Propriedade Industrial
 Cartório-Arco da Conceição, 3, 1.º-1160-117

30

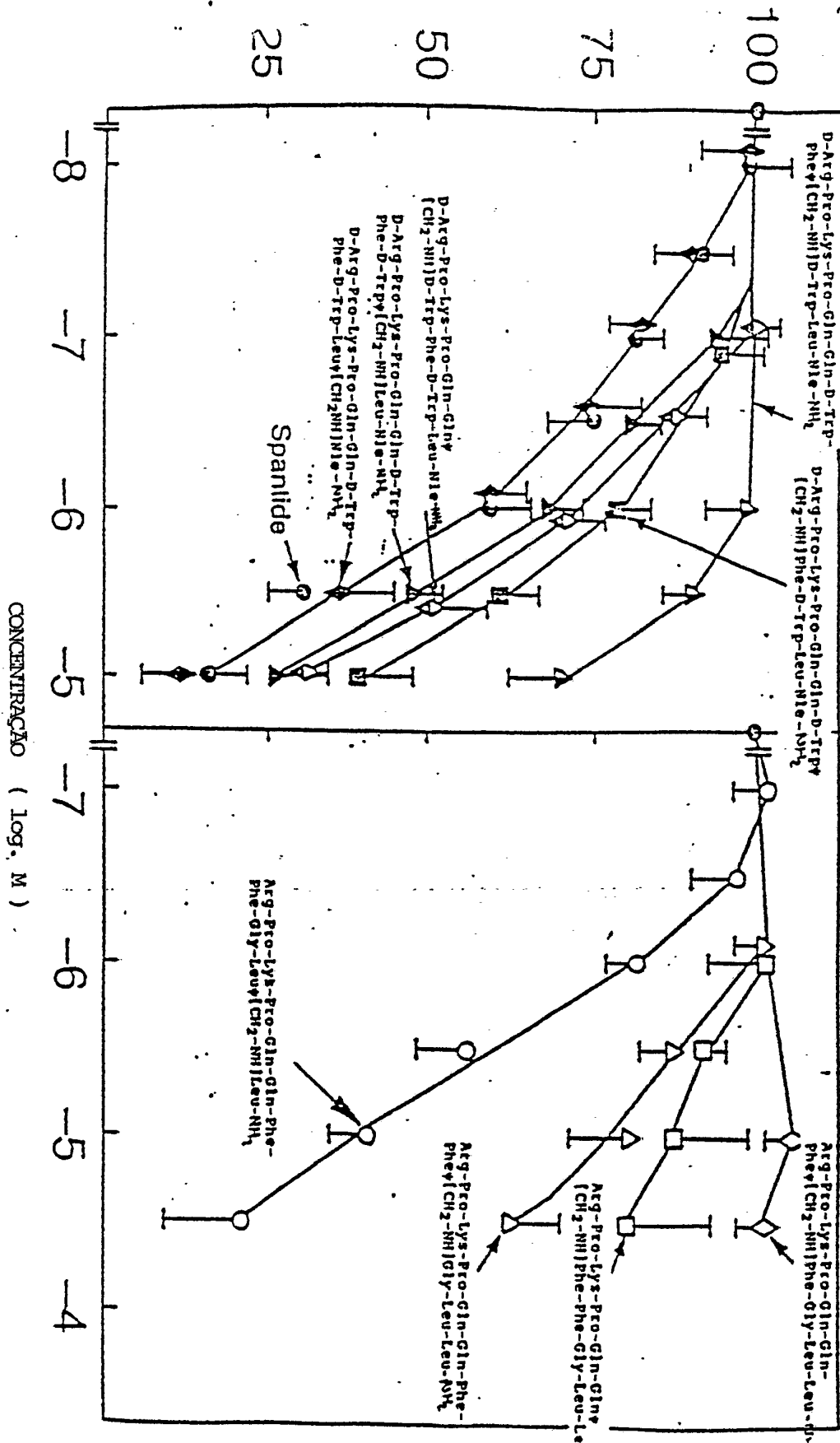
35

16 AGO 1990
[Handwritten signature]

LIBERTAÇÃO DA AMILASE ESTIMULADA PELA SP

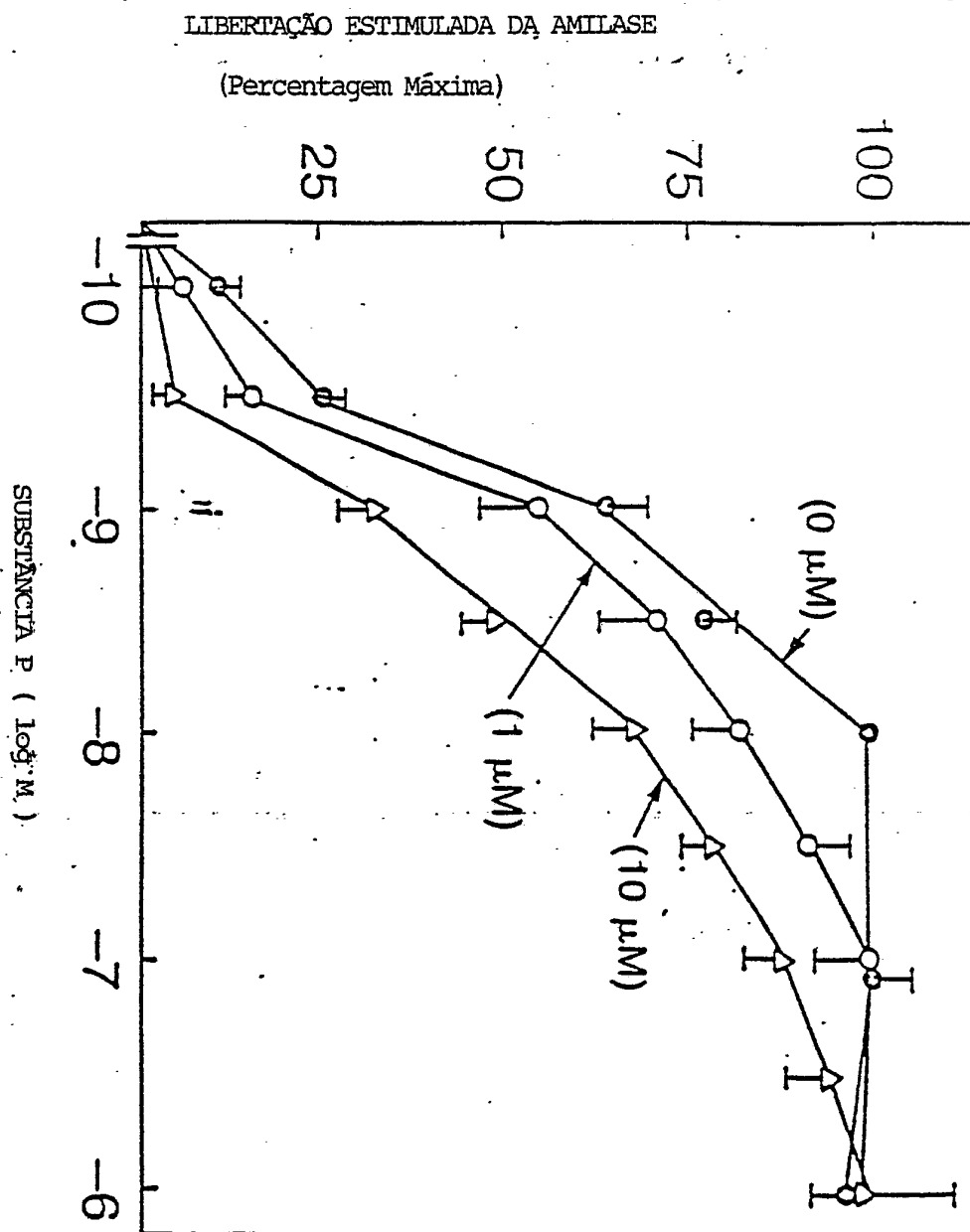
(Percentagem cpntrolo)

FIG. 1



alif

FIG. 2



Handwritten signature

FIG. 3

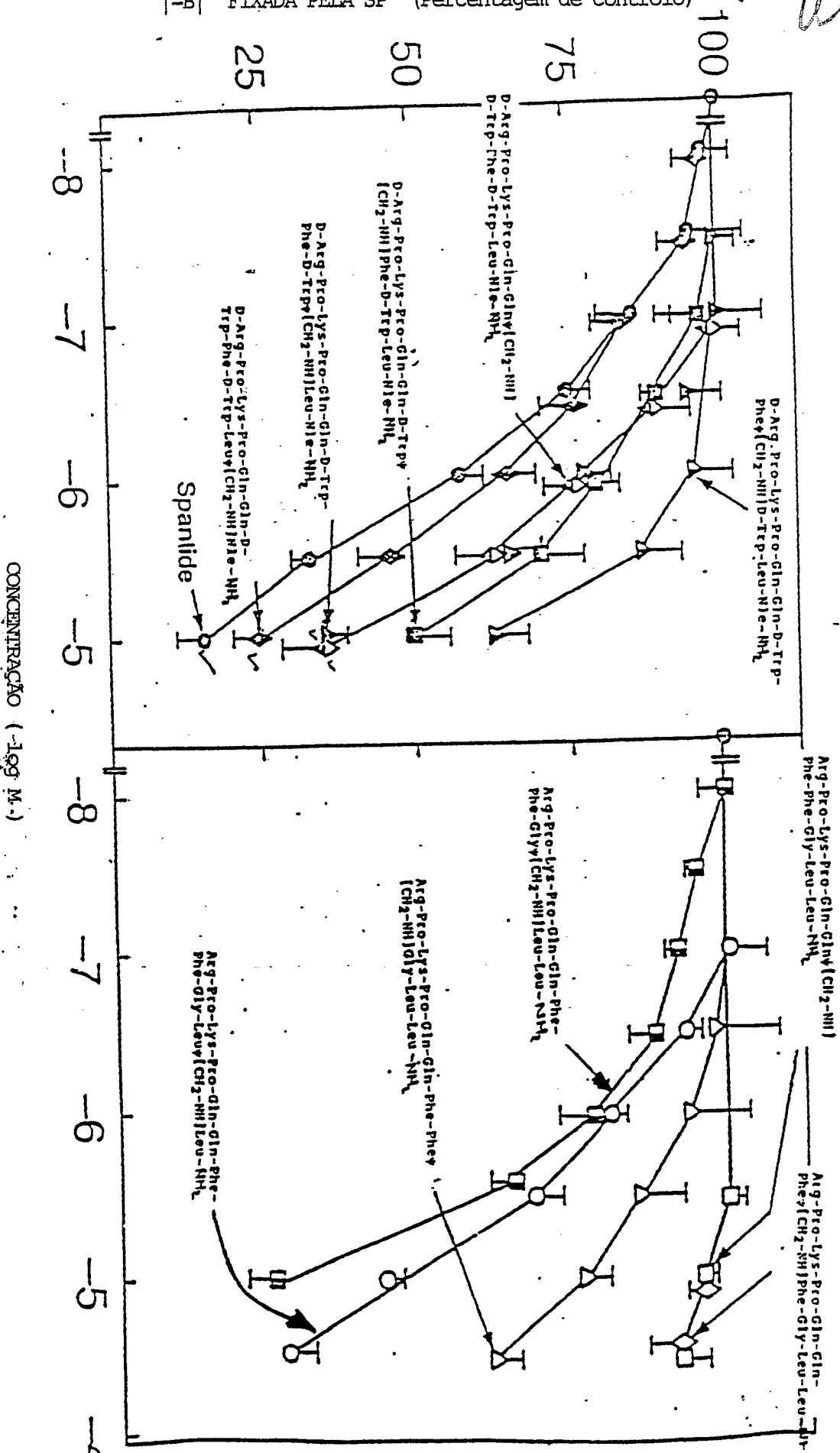


FIG. 4

VÍNCULO DE ^{125}I -[Tyr⁴] Bombesina
(Porcentagem de controlo)

