



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

(11) PI 0920896-8 B1



(22) Data do Depósito: 07/12/2009

(45) Data de Concessão: 10/11/2020

(54) Título: COMPOSTO DE FÓRMULA GERAL (I) (T-Z)N-P (I), FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E PROCESSO PARA PREPARAR UM COMPOSTO DE FÓRMULA GERAL (I)

(51) Int.Cl.: A61K 49/00; A61K 47/61.

(52) CPC: A61K 49/0054; A61K 47/61.

(30) Prioridade Unionista: 06/12/2008 DE 102008060603.0; 08/07/2009 DE 102009032359.7; 31/03/2009 DE 102009015085.4.

(73) Titular(es): B. BRAUN MELSUNGEN AG.

(72) Inventor(es): BERND HORST MEIER; IRIS THERESIA JANKOWIAK-MEIER; CLARA MEIER; NELE MEIER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009008718 de 07/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/063491 de 10/06/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/05/2011

(57) Resumo: COMPOSTO DE FORMULA GERAL (I) (T-Z) n-p (I), FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, E PROCESSO PARA PREPARAR UM COMPOSTO DE FÓRMULA GERAL (I) . A presente invenção se refere a colóides ligados a mediadores de transporte, compreendendo substância farmacêutica ou marcadores fluorescentes, a um processo para a produção deles, e a uma preparação farmacêutica compreendendo os ditos compostos.

COMPOSTO DE FÓRMULA GERAL (I) $(T-Z)_n-P$ (I), FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E PROCESSO PARA PREPARAR UM COMPOSTO DE FÓRMULA GERAL (I)

[0001] A invenção se refere a coloides ligados a mediadores de transporte, que podem compreender compostos medicinais ou marcadores fluorescentes, a um processo para a preparação deles, e a uma formulação farmacêutica contendo esses compostos.

[0002] A ligação covalente a coloides permite que substâncias sejam introduzidas por fagocitose em células do sistema imunológico, que não seriam apreendidas, ou, sendo assim, apenas em proporções desprezíveis, sem essa modificação. O pedido de patente europeia EP 1 230 935 A1 descreve a ligação química de substâncias medicinalmente ativas a um polissacarídeo, para formar um agente de ligação. A absorção de substâncias por células correspondentemente especializadas do sistema retículo-histiocítico foi demonstrada para uma ampla gama de coloides e partículas. No entanto, a introdução de maiores moléculas em células do corpo, que não são especializadas em fagocitose, é um problema. Além disso, as partículas e os coloides fagocitados por macrófagos são muito rapidamente apreendidas em lisossomos, após absorção na célula, nas quais são degradados por uma variedade de enzimas líticas. O potencial enzimático de lisossomos é alto; uma ampla gama de compostos medicinais é degradada correspondentemente rapidamente por enzimas lisossomais. Da *Chlamydia trachomatis*, é conhecido que essa bactéria é apreendida por células epiteliais eucarióticas, sem

serem degradadas enzimaticamente nos lisossomos. A absorção pode ser reduzida significativamente pela presença de heparinas ou de sulfato de heparina. Stephens et al. (*Infection and Immunity*, March 2000, p. 1080-1085, Vol. 68, No. 3) mostram que esse efeito é baseado no bloqueio do domínio de ligação de heparina.

[0003] Ao contrário, os autores mostram que microesferas de poliestireno são apreendidas nas células eucarióticas por endocitose, após serem revestidas com heparina. A própria heparina se liga a uma ampla gama de enzimas. Os pacientes tendo uma maior atividade de superóxido dismutase, no soro sanguíneo, apresentam, frequentemente, uma variante alterada da enzima CHU et al. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006;26:1985).

[0004] A variante mutada (R213G) tem uma glicina, em vez da arginina de aminoácido, na posição 213. Portanto, a ligação da enzima a heparina não é possível. Portanto, os pacientes afligidos têm uma maior atividade para a enzima, porque a enzima está basicamente presente no soro, em vez de na célula. Para os portadores desse defeito genético, isso significa um risco 2,3 maior da ocorrência de doenças cardíacas isquêmicas. O pedido de patente europeia EP 083 768 A1 descreve conjugados de heparina - proteínas diretos, nos quais a aldose terminal é ligada ao grupo amino N-terminal de uma serpina, para otimizar o efeito de serpinas na coagulação de sangue e síndromes de angústia respiratória. Após serem acopladas às heparinas, as proteínas e as enzimas são muito rapidamente eliminadas do soro. Pequenas proteínas abaixo de 70 kDa desaparecem quase

que completamente já durante a primeira passagem pelo rim. Além disso, uma ampla gama de proteínas é conhecida por apresentar problemas de estabilidade e solubilidade, que podem ser influenciados favoravelmente por ligação covalente a um polissacarídeo solúvel em água.

[0005] A heparina pertence ao grupo de glicosaminoglicanas, que consistem de cadeias lineares de unidades de dissacarídeos sulfatados. Cada unidade de dissacarídeo consiste de ácido hexurônico, que é composto variavelmente de ácido glicurônico ou idurônico e 2-amino-2-deóxi-D-glicose ou N-sulfo-D-glicosamina. Como os polissacarídeos, a heparina e as glicosaminoglicanas têm um grupo de aldeído livre na extremidade terminal. A heparina ocorre intracelularmente, quase que exclusivamente em células de mama. No entanto, as heparinas mais altamente sulfatadas, ou os sulfatos de heparina, são encontradas quase que em qualquer lugar em membranas celulares de mamíferos superiores, independentemente do tipo de órgãos.

[0006] O efeito anticoagulante da heparina é baseado principalmente na sua afinidade com a antitrombina III de serpina. A menor unidade de heparina que tem esse efeito na AT III inclui 5 unidades de sacarídeos com um grupo 3-O-sulfato no grupo glicosamina. Esse pentassacarídeo pode formar um complexo de heparina/AT III, que inibe o fator de coagulação Xa. A trombina pode ser também inibida por ligação a estruturas de heparina específicas, mas que não estão presentes em um pentassacarídeo, que tem apenas 5 unidades de sacarídeos. Para a inibição de trombina, são necessários os

compostos de heparina tendo pelo menos 18 unidades de sacarídeos.

[0007] O tamanho molecular e o grau de sulfatação são de importância crítica, não apenas no efeito seletivo da heparina em fatores de coagulação, mas também na interação com uma ampla gama de citocinas e fatores de crescimento endógenos. A interação de heparina com o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) requer um número mínimo de 18 unidades de glicosaminoglicana, com uma sulfatação específica do átomo de oxigênio presente em C2. As heparinas sulfatadas de 8 unidades de sacarídeos apresentam um efeito inibitório em angiogênese. Para esses octassacarídeos sulfatados, a inibição de angiogênese em células tumorais é discutida. Ao mesmo tempo, essas heparinas parecem não ter nenhum efeito em coagulação sanguínea. O tamanho molecular e as propriedades químicas, tais como o número e a localização dos grupos sulfato, carbóxi e amino, têm uma influência crítica no efeito de heparinas. Os grupos sulfatos e, menos significativamente, os grupos carbóxi dos grupos idurônico e glicurônico têm o efeito de que a heparina é uma das moléculas mais fortemente carregadas eletronegativamente em mamíferos. O tamanho molecular, bem como a quantidade e a posição dos grupos sulfato e carbóxi produzem um modelo de carga específico ou uma distribuição de cargas específica nas moléculas de heparina. A distribuição de cargas específica desempenha um papel crítico na afinidade dos compostos para as proteínas e proteases procoagulantes, e também para os domínios de ligação de heparinas de células endoteliais. A função de mediação de transporte das heparinas, que é apresentada em membranas celulares, é ainda mais

fortemente dependente da estrutura de carga do glicosaminoglicana. Portanto, a incorporação covalente de heparinas em polissacarídeos solúveis em água, como mediadores de transporte, é essencialmente distinta da incorporação dos compostos medicinalmente ativos. Se possível, a heparina deve ser acoplada ao coloide, de um modo tal que um sítio de ligação, com um número definido de unidades e cargas de dissacarídeos, seja comparável ao domínio de ligação de heparina das células. Isso significa que esse segmento da heparina se mantém quimicamente não ligado, e, além disso, não impedido estericamente pela molécula remanescente. Tal qual como com o efeito específico de heparina em ATIII e trombina, o comprimento de cadeia e o número das unidades de ácido hexurônico sulfatado e aminodeoxiglicose, projetando-se livremente do polissacarídeo, são de grande importância também nesse caso. Além disso, há indicações de que os segmentos da molécula de heparina, relevantes para os domínios de ligação de heparina, são encontrados, de preferência, na parte intermediária da molécula de heparina. A parte da molécula, utilizada para a associação descrita com os domínios de ligação, é fortemente carregada eletronegativamente, devido aos grupos carbóxi e sulfato. O bloqueio ou a perturbação desse modelo de carga estereoespecificamente relevante pela ligação covalente com o polissacarídeo, por meio de um agente de ligação, deve ser impedido para esses sítios, se possível

[0008] Sendo uma glicosaminoglicana estritamente linear, a heparina tem grupos funcionais que podem ser utilizados para a ligação a outras moléculas. Na região dos ácidos idurônico e glicurônico, grupos carbóxi estão presentes em C6. Há grupos

hidróxi em C2 e C3 e C1 da primeira unidade de sacarídeo. Cada grupo sacarídeo secundário porta um grupo amino no átomo C2. Esse grupo amino e o grupo carbóxi podem ser sulfatados. Finalmente, a heparina porta um grupo aldeído na extremidade terminal.

[0009] É conhecido que mutações pontuais em alguns genes, codificando para as proteínas, resultam em uma substituição de ácidos diaminomono-carboxílicos e por outros aminoácidos. Em alguns desses casos (superóxido dismutase), essa variação da sequência de aminoácidos é acompanhada por uma perda da capacidade de ligação a sulfatos de heparina, de forma que a proteína não é mais transportada para a célula. Esses resultados também demonstram que a incorporação de heparinas em macromoléculas, como mediadores de transporte, isto é, para a finalidade de regular a passagem pelas membranas celulares, é dependente das condições regiosseletivas na parte da macromolécula. Nesse caso, uma perda de grupos amino, não ligados por ligações de peptídeos, significa perda da capacidade de incorporar a heparina mediadora de transporte. Em tecnologia médica, é frequentemente tentado impedir a formação de coágulos de sangue em implantes, pela ligação covalente não específica a heparina.

[0010] Para a introdução de substâncias medicinalmente ativas em órgãos e sistemas celulares específicos do corpo, as seguintes condições devem ser satisfeitas:

1. A absorção do medicamento ligado é também feita em células que não são especializadas em fagocitose;

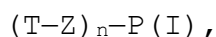
2. Após a passagem pela membrana celular externa, o medicamento ligado não deve ser apreendido por lisossomos, e não deve ser degradado enzimaticamente;

3. O complexo de medicamento, que consiste do medicamento ligado quimicamente a um mediador de transporte e/ou a um coloide, deve ser solúvel em água e circular no sangue por um período de tempo suficiente; e

4. O complexo de medicamento não deve ter qualquer influência na coagulação sanguínea.

[0011] Surpreendentemente, verificou-se então que a ligação de um mediador de transporte a um coloide (composto coloide ativo) soluciona os problemas mencionados acima e serve, em particular, como um sistema de transporte adequado para medicamentos e/ou marcadores fluorescentes ligados covalentemente a eles. Isso é válido, em particular, quando o coloide e o mediador de transporte são conjuntamente ligados estereosseletivamente. Além disso, verificou-se, surpreendentemente, que o produto de ligação pode se ligar a domínios de ligação intracelulares e ligados a membranas, se as estruturas estereoespecíficas do composto de mediador de transporte / coloide se mantiverem livres de associação e bloqueio para os domínios de ligação celulares.

[0012] A presente invenção se refere a um composto de fórmula geral (I)



em que:

- T é um mediador de transporte;
- P é um composto colóide ativo;
- Z é um primeiro agente de ligação, por meio do qual T e P são ligados covalentemente conjuntamente; e
- n é um número inteiro de pelo menos 1;

e em que o mediador de transporte T e/ou o colóide P portam grupos m $-(L-A)$, em que:

- A é uma substância medicinalmente ativa ou um marcador fluorescente;
- L é um segundo agente de ligação, pelo qual P é ligado covalentemente a A, ou pelo qual T é ligado covalentemente a A; e
- m é um número inteiro que é 0 ou pelo menos 1.

[0013] De preferência, o mediador de transporte T tem pelo menos um sítio de ligação para associação aos domínios de ligação celulares.

[0014] De acordo com a invenção, os mediadores de transporte T são distintos dos colóides P.

[0015] Os mediadores de transporte T, de acordo com a presente invenção, favorecem a absorção nas células.

[0016] O mediador de transporte T é uma glicana, selecionada, particularmente, do grupo consistindo de ácido siálico, poli(ácido siálico), ácido neuramínico, ácido N-acetilneuramínico, manose, N-acetilmanose, N-propanolmanosamina, fucose, N-

actilfucose, galactose, N-acetilgalactose, glicose, N-acetilglicose, hexoses, N-acetilhexoses, ceramidas, glicose-6-fosfato, manose-6-fosfato, glicosilfosfatidilinositol, ácido retínico, imunoglobulinas, monogliceratos, diacilgliceratos, esfingomiéline, bisfosfonatos, glicoproteínas e glicosaminoglicanas.

[0017] As glicosaminoglicanas ou os derivados de glicosaminoglicanas provaram ser os mediadores de transporte T particularmente adequados.

[0018] Portanto, em uma concretização preferida, o mediador de transporte T é selecionado do grupo consistindo de heparina e sulfato de heparina, especialmente, heparina ou sulfato de heparina tendo menos de 6 unidades de sacarídeos. As heparinas tendo menos de 6 unidades de sacarídeos têm, como mediadores de transporte, a vantagem particular que a indução possivelmente ocorrendo de anticorpos pode ser evitada substancialmente com essas heparinas.

[0019] O composto colóide ativo P (também referido simplesmente como "colóide P" a seguir) é selecionado, de preferência, do grupo consistindo de amiloses, amilopectinas, acemananas, arabinogalactanas, galactomananas, galactoglicomananas, xantanas, carragenina, amido e amido modificado.

[0020] Os amidos modificados provaram ser particularmente adequados. Os amidos podem ser modificados, por exemplo, por hidroxialquilação ou esterificação. Além disso, os amidos podem ser também aminados, por exemplo, por aminação redutora.

[0021] Surpreendentemente, verificou-se que a aaminação do coloide P por meio de aaminação redutora pode produzir coloides aminados, especialmente amidos modificados, tal como amido de hidroxietila aminado ou amido de carboximetila aminado, que podem ser incorporados nos mediadores de transporte, com uma alta estereosseletividade, de tal modo que o composto obtido é similar aos compostos apreendidos pelas células corpóreas dos complexos de mediadores de transporte.

[0022] Em uma concretização preferida da presente invenção, a ligação do mediador de transporte e do coloide é feita estereosseletivamente. Ainda mais, prefere-se que a ligação da substância medicinalmente ativa ou do marcador fluorescente com o coloide e/ou mediador de transporte seja também feita estereosseletivamente.

[0023] Em uma concretização preferida, o coloide P é selecionado do grupo consistindo de amidos de hidroxialquila, amidos esterificados, amidos de carboxialquila, amido de hidroxialquila e carboxialquila, amido de hidroxialquila aminado, amido de hidroxialquila e carboxialquila aminado e amido de carboxialquila aminado.

[0024] Os amidos de carboxialquila são selecionados preferivelmente de amido de carboximetila e amido de carboxietila aminado.

[0025] Vantajosamente, outras unidades específicas, que propiciam a ligação química da substância medicinalmente ativa ou do marcador fluorescente ou do mediador de transporte, por

exemplo, biotina, aminoácidos ou unidades portando grupos sulfeto, tal como cisteína, podem ser incorporadas nos coloides.

[0026] Particularmente, de acordo com a presente invenção, o coloide P é um amido modificado, selecionado do grupo consistindo de amido de hidroxietila ou amido de hidroxietila aminado, especialmente um amido de hidroxietila que tenha sido aminado por aminação redutora.

[0027] Os grupos hidroxialquila no amido de hidroxietila (HES) foram introduzidos na molécula para impedir a degradação enzimática do amido no soro e para aperfeiçoar a solubilidade em água. O grau de substituição, DS, é definido como a razão do número total de unidades monoméricas substituídas para o número total de unidades monoméricas. A seguir, um grau de substituição, DS, é indicado, quando substituintes são introduzidos.

[0028] Em outra concretização da presente invenção, o composto coloide ativo tem um peso molecular médio de 20.000 a 800.000 dáltons, de preferência, de 25.000 a 500.000 dáltons, especialmente de 30.000 a 200.000 dáltons.

[0029] O grau de substituição, DS, dos amidos modificados, especialmente amido de hidroxietila, é, de preferência, de 0,2 a 0,8, especialmente, de 0,3 a 0,6.

[0030] Como medicamentos A, todas as substâncias podem ser usadas, que podem ser incorporadas nos coloides mencionados acima e/ou nos mediadores de transporte T por um agente de ligação L.

[0031] Os compostos de acordo com a invenção podem ser, opcionalmente, ligados com os compostos medicinalmente ativos ou marcadores fluorescentes. De preferência, o composto medicinalmente ativo é selecionado do grupo consistindo de antibióticos, agentes quimioterapêuticos, agentes citostáticos, antígenos, oligonucleotídeos, mediadores, substratos metabólicos falsos, analgésicos e substâncias citotóxicas.

[0032] Os marcadores fluorescentes são preferivelmente selecionados do grupo consistindo de isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina, rodamida e 2-aminopiridina.

[0033] Além das substâncias puramente medicinalmente ativas, os marcadores fluorescentes, por exemplo, isotiocianato de fluoresceína, podem ser também empregados terapêuticamente em conjunto com o complexo de mediador de transporte / coloide. Alguns tumores são conhecidos como expressando domínios de ligação ligados a membrana em maior número, por exemplo, para ter acesso ao sistema vascular (receptores FGF). A marcação de complexos de mediadores de transporte / coloides, de acordo com a invenção, específica para esses domínios de ligação com marcadores fluorescentes, tal como isotiocianato de fluoresceína (A.N. De Belder, K. Granath: Preparation and Properties of fluorescein-labelled dextrans, Carbohydrate Research, 30 (1973) 375-378) permite que o cirurgião identifique opticamente as frações de órgãos tendo um maior número de células com esses domínios de ligação, após injeção desse composto (formação de imagem fluorescente próxima da região infravermelha, NIRF).

[0034] No composto de acordo com a fórmula (I), $(T-Z)_n - P$, o mediador de transporte T é ligado covalentemente com o coloide P por um primeiro grupo de agente de ligação Z. Em uma concretização preferida da presente invenção, o agente de ligação Z é um grupo funcional selecionado de éster de ácido carboxílico, amidas de ácido carboxílico, uretano, grupos éter e amina, ou compreende pelo menos um desses grupos funcionais. Particularmente, a ligação química covalente de T em P, pelo agente de ligação Z, é reversível, isto é, pode ser decomposta sem dificuldade, por exemplo, enzimaticamente.

[0035] O segundo agente de ligação L, pelo qual o coloide P é ligado covalentemente com a substância medicinalmente ativa ou marcador fluorescente, ou pelo qual o mediador de transporte é ligado covalentemente com a substância medicinalmente ativa ou marcador fluorescente, também corresponde ao primeiro agente de ligação Z nas suas função e elaboração. Para o agente de ligação L, é particularmente vantajoso se ele puder ser decomposto de novo sem dificuldade, por exemplo, enzimaticamente, o que provoca que a substância medicinalmente ativa e/ou marcador fluorescente seja(m) liberado(s).

[0036] A formação do agente de ligação Z ou L pode ser conduzida por meio de métodos descritos na técnica anterior para a formação de ésteres de ácidos carboxílicos, amidas de ácidos carboxílicos, uretanos, éteres e aminas.

[0037] Em uma concretização preferida, o composto de acordo com a invenção é obtenível por uma reação de pelo menos um grupo livre de:

- isocianato (-NCO);
- carbóxi (-COOH);
- de halogeneto de ácido carboxílico (-CO-A, com A = Cl, Br ou I);
- alquilenocarbóxi $-(\text{CH}_2)_q\text{-COOH}$, com $q = 1-10$);
- éster (-COOR com R = radical orgânico);
- epóxi;
- ou de saída nucleofílico;

do coloide P subjacente com um grupo livre de:

- hidróxi (-OH)

do mediador de transporte T subjacente para formar o agente de ligação Z, em que o dito coloide P e/ou mediador de transporte T é(são) ligado(s) a m unidades (L-A).

[0038] Em outra concretização da presente invenção, o composto de acordo com a invenção é obténível por uma reação de pelo menos um grupo livre de:

- hidróxi (-OH)

do coloide P subjacente com um grupo livre de:

- isocianato (-NCO);
- carbóxi (-COOH);

- de halogeneto de ácido carboxílico ($-\text{CO}-\text{A}$, com $\text{A} = \text{Cl}, \text{Br}$ ou I);
- alquilenocarbóxi ($-(\text{CH}_2)_q-\text{COOH}$, com $q = 1-10$);
- éster ($-\text{COOR}$ com $\text{R} =$ radical orgânico);
- epóxi;
- ou de saída nucleofílico;

do mediador de transporte T subjacente, para formar o agente de ligação Z, em que o dito coloide P e/ou mediador de transporte T é(são) ligado(s) a m unidades (L-A).

Em outra concretização da presente invenção, o composto de acordo com a invenção é obtenível por uma de pelo menos um grupo livre de:

- amino ($-\text{NH}_2$)

do coloide P subjacente com um grupo livre de:

- isocianato ($-\text{NCO}$);
- carbóxi ($-\text{COOH}$);
- de halogeneto de ácido carboxílico ($-\text{CO}-\text{A}$, com $\text{A} = \text{Cl}, \text{Br}$ ou I);
- alquilenocarbóxi ($-(\text{CH}_2)_q-\text{COOH}$, com $q = 1-10$);
- éster ($-\text{COOR}$ com $\text{R} =$ radical orgânico);
- epóxi;

- ou de saída nucleofílico;

do mediador de transporte T subjacente, para formar o agente de ligação Z, em que o dito coloide P e/ou mediador de transporte T é(são) ligado(s) a m unidades (L-A).

[0039] Ainda mais, em uma concretização preferida, o composto de acordo com a invenção é obtenível por uma de pelo menos um grupo livre de:

- isocianato (-NCO);
- carbóxi (-COOH);
- de halogeneto de ácido carboxílico (-CO-A, com A = Cl, Br ou I);
- alquilenocarbóxi $-(\text{CH}_2)_q\text{-COOH}$, com $q = 1-10$);
- éster (-COOR com R = radical orgânico);
- epóxi;
- ou de saída nucleofílico;

do coloide P subjacente com um grupo livre de:

- amino (-NH₂)

do mediador de transporte T subjacente, para formar o agente de ligação Z, em que o dito coloide P e/ou mediador de transporte T é(são) ligado(s) a m unidades (L-A).

[0040] Particularmente, o composto de acordo com a invenção é obtenível por uma de pelo menos um grupo livre de:

- hidróxi (-OH); ou

- amino (-NH₂)

do coloide P subjacente com um grupo livre de:

- isocianato (-NCO);

- carbóxi (-COOH);

- de halogeneto de ácido carboxílico (-CO-A, com A = Cl, Br ou I);

- alquilenocarbóxi (-CH₂)_q-COOH, com q = 1-10);

- éster (-COOR com R = radical orgânico);

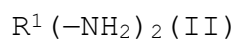
- epóxi;

- ou de saída nucleofílico;

do mediador de transporte T subjacente, para formar o agente de ligação Z, em que o dito coloide P e/ou mediador de transporte T é(são) ligado(s) a m unidades (L-A).

[0041] De acordo com a presente invenção, os grupos de saída nucleofílicos são selecionados, de preferência, do grupo de halogenetos e tosilatos.

[0042] Ainda mais, os compostos de acordo com a invenção podem ser obtidos pela reação de uma diamina de fórmula geral II:



na qual R¹ é selecionado de:

- uma ligação única;
- grupos hidrocarbila alifáticos ou alicíclicos, saturados ou insaturados, lineares ou ramificados com 1 a 22 átomos de carbono;
- grupos arila, aril-C₁-C₄-alquila e aril-C₂-C₆-alquenila com 5 a 12 átomos de carbono no grupo arila, que pode ser opcionalmente substituído com grupos C₁-C₆ alquila e/ou C₂-C₆ alcóxi; ou
- grupos heteroarila, heteroarila-C₁-C₄-alquila e heteroarila-C₂-C₆-alquenila com 3 a 8 átomos de carbono no grupo heteroarila e um ou dois heteroátomos selecionados de N, O e S, que podem ser substituídos com grupos C₁-C₆ alquila e/ou C₂-C₆ alcóxi;

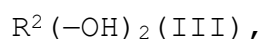
com um grupo funcional livre do mediador de transporte T subjacente e pelo menos um grupo funcional livre do coloide P subjacente, que são selecionados independentemente de grupo:

- isocianato (-NCO);
- carbóxi (-COOH);
- de halogeneto de ácido carboxílico (-CO-A, com A = Cl, Br ou I);
- alquilenocarbóxi $-(\text{CH}_2)_q\text{-COOH}$, com $q = 1-10$;
- éster (-COOR com R = radical orgânico);
- epóxi;
- ou de saída nucleofílico;

para formar o agente de ligação Z, em que o dito coloide P e/ou mediador de transporte T é(são) ligado(s) com m unidades - (L-A).

[0043] As diaminas adequadas incluem, por exemplo, 1,2-diaminoetano, 1,2- or 1,3-diaminopropano, 1,2-, 1,3- or 1,4-diaminobutano, 1,5-diaminopentano, 2,2-dimetil-1,3-diaminopropano, hexametilonediamina, 1,7-diaminoeptano, 1,8-diaminooctano, trimetil-1,6-diaminoexano, 1,9-diaminononano, 1,10-diaminodecano, 1,12-diaminododecano, 1,2-diaminocicloexano, 1,4-diaminocicloexano, 1,3-cicloexanobis(metilamina), 1,2-fenilenodiamina, 1,3-fenilenodiamina, 1,4- fenilenodiamina, 4,4'-etilenodianilina, 4,4'-metilenodianilina, 4,4'-diaminoestilbeno, 4,4'-tiodianilina, 4-aminofenildissulfeto, 2,6-diaminopiridina, 2,3-diaminopiridina, 3,4-diaminopiridina, 2,4-diaminopirimidina, 4,5-diaminopirimidina, 4,6-diaminopirimidina.

[0044] Além disso, em outra concretização da presente invenção, os compostos de acordo com a invenção podem ser obtidos por uma reação de um diol de fórmula geral III:



em que R^2 é selecionado de:

- grupos hidrocarbila alifáticos ou alicíclicos, saturados ou insaturados, lineares ou ramificados com 1 a 22 átomos de carbono;

- grupos arila, aril-C₁-C₄-alquila e aril-C₂-C₆-alquenila com 5 a 12 átomos de carbono no grupo arila, que pode ser opcionalmente substituído com grupos C₁-C₆ alquila e/ou C₂-C₆ alcóxi; ou

- grupos heteroarila, heteroarila-C₁-C₄-alquila e heteroarila-C₂-C₆-alquenila com 3 a 8 átomos de carbono no grupo heteroarila e um ou dois heteroátomos selecionados de N, O e S, que podem ser substituídos com grupos C₁-C₆ alquila e/ou C₂-C₆ alcóxi;

com um grupo funcional livre do mediador de transporte T subjacente e pelo menos um grupo funcional livre do coloide P subjacente, que são selecionados independentemente de grupo:

- isocianato (-NCO);
- carbóxi (-COOH);
- de halogeneto de ácido carboxílico (-CO-A, com A = Cl, Br ou I);
- alquilenocarbóxi $-(\text{CH}_2)_q\text{-COOH}$, com $q = 1-10$;
- éster (-COOR com R = radical orgânico);
- epóxi;
- ou de saída nucleofílico;

para formar o agente de ligação Z, em que o dito coloide P e/ou mediador de transporte T é(são) ligado(s) com m unidades -(L-A).

[0045] Os dióis adequados incluem, por exemplo, glicol etilênico, glicol propilênico, glicol butilênico, e glicol neopentílico, pentanodiol-1,5,3-metilpentanodiol-1,5, bisfenol A, 1,2- or 1,4-cicloexanodiol, caprolactonadiol (produto de reação de caprolactana e glicol etilênico), bisfenóis hidroxialquilados, trimetilolpropano, trimetiloletano, pentaeritritol, hexanodiol-1,6, heptanodiol-1,7, octanodiol-1,8, butanodiol-1,4, 2-metiloctanodiol-1,8, nonanodiol-1,9, decanodiol-1,10, cicloexanodimetilol, glicol di-, tri- e tetraetilênico, glicol di-, tri- and tetrapropilênico, poli (glicóis etilênico e propilênico) com um peso molecular médio de 150 a 15.000.

[0046] Em outra concretização da presente invenção, os compostos de acordo com a invenção são obtidos por uma reação de um ácido dicarboxílico de fórmula geral IV:



em que R^3 é selecionado de:

- uma ligação única;
- grupos hidrocarbila alifáticos ou alicíclicos, saturados ou insaturados, lineares ou ramificados com 1 a 22 átomos de carbono;
- grupos arila, aril- C_1 - C_4 -alquila e aril- C_2 - C_6 -alquenila com 5 a 12 átomos de carbono no grupo arila, que pode ser opcionalmente substituído com grupos C_1 - C_6 alquila e/ou C_2 - C_6 alcóxi; ou

- grupos heteroarila, heteroarila-C₁-C₄-alquila e heteroarila-C₂-C₆-alquênila com 3 a 8 átomos de carbono no grupo heteroarila e um ou dois heteroátomos selecionados de N, O e S, que podem ser substituídos com grupos C₁-C₆ alquila e/ou C₂-C₆ alcóxi;

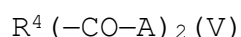
com um grupo funcional livre do mediador de transporte T subjacente e pelo menos um grupo funcional livre do coloide P subjacente, que são selecionados independentemente de:

- grupo amino (-NH₂); ou
- grupo hidróxi (-OH);

para formar o agente de ligação Z, em que o dito coloide P e/ou mediador de transporte T é(são) ligado(s) com m unidades -(L-A).

[0047] Os ácidos dicarboxílicos adequados incluem, por exemplo, ácido oxálico, ácido malônico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido azelaico, ácido sebácico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido sórbico, ácido ftálico, ácido tereftálico, ácido isoftálico ou ácido agárico.

[0048] Em particular, os compostos de acordo com a invenção também podem ser obtidos pela reação de um halogeneto de ácido dicarboxílico de fórmula geral V:



em que A = Cl, Br ou I, e R⁴ é selecionado de:

- uma ligação única;

- grupos hidrocarbila alifáticos ou alicíclicos, saturados ou insaturados, lineares ou ramificados com 1 a 22 átomos de carbono;
- grupos arila, aril-C₁-C₄-alquila e aril-C₂-C₆-alquenila com 5 a 12 átomos de carbono no grupo arila, que pode ser opcionalmente substituído com grupos C₁-C₆ alquila e/ou C₂-C₆ alcóxi; ou
- grupos heteroarila, heteroarila-C₁-C₄-alquila e heteroarila-C₂-C₆-alquenila com 3 a 8 átomos de carbono no grupo heteroarila e um ou dois heteroátomos selecionados de N, O e S, que podem ser substituídos com grupos C₁-C₆ alquila e/ou C₂-C₆ alcóxi;

com um grupo funcional livre do mediador de transporte T subjacente e pelo menos um grupo funcional livre do coloide P subjacente, que são selecionados independentemente de:

- grupo amino (-NH₂); ou
- grupo hidróxi (-OH);

para formar o agente de ligação Z, em que o dito coloide P e/ou mediador de transporte T é(são) ligado(s) com m unidades -(L-A).

[0049] Além disso, em outra concretização preferida, os compostos de acordo com a invenção são obteníveis pela reação de um diéster de fórmula geral VI:



em que R' é um grupo C₁₋₁₀ alquila e R⁵ é selecionado de:

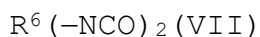
- uma ligação única:
- grupos hidrocarbila alifáticos ou alicíclicos, saturados ou insaturados, lineares ou ramificados com 1 a 22 átomos de carbono;
- grupos arila, aril-C₁-C₄-alquila e aril-C₂-C₆-alquenila com 5 a 12 átomos de carbono no grupo arila, que pode ser opcionalmente substituído com grupos C₁-C₆ alquila e/ou C₂-C₆ alcóxi; ou
- grupos heteroarila, heteroarila-C₁-C₄-alquila e heteroarila-C₂-C₆-alquenila com 3 a 8 átomos de carbono no grupo heteroarila e um ou dois heteroátomos selecionados de N, O e S, que podem ser substituídos com grupos C₁-C₆ alquila e/ou C₂-C₆ alcóxi;

com, respectivamente, um grupo funcional livre do mediador de transporte T subjacente e pelo menos um grupo funcional livre do coloide P subjacente, que são selecionados independentemente de:

- grupo amino (-NH₂); ou
- grupo hidróxi (-OH);

para formar o agente de ligação Z, em que o dito coloide P e/ou mediador de transporte T é(são) ligado(s) com m unidades -(L-A).

[0050] Particularmente, os compostos de acordo com a invenção são obteníveis pela reação de um diisocianato de fórmula geral VII:



em que R^6 é selecionado de:

- grupos hidrocarbila alifáticos ou alicíclicos, saturados ou insaturados, lineares ou ramificados com 1 a 22 átomos de carbono;
- grupos arila, aril-C₁-C₄-alquila e aril-C₂-C₆-alquenila com 5 a 12 átomos de carbono no grupo arila, que pode ser opcionalmente substituído com grupos C₁-C₆ alquila e/ou C₂-C₆ alcóxi; ou
- grupos heteroarila, heteroarila-C₁-C₄-alquila e heteroarila-C₂-C₆-alquenila com 3 a 8 átomos de carbono no grupo heteroarila e um ou dois heteroátomos selecionados de N, O e S, que podem ser substituídos com grupos C₁-C₆ alquila e/ou C₂-C₆ alcóxi;

com, respectivamente, um grupo funcional livre do mediador de transporte T subjacente e pelo menos um grupo funcional livre do coloide P subjacente, que são selecionados independentemente de:

- grupo amino (-NH₂); ou
- grupo hidróxi (-OH);

para formar o agente de ligação Z, em que o dito coloide P e/ou mediador de transporte T é(são) ligado(s) com m unidades -(L-A).

[0051] Os diisocianatos adequados incluem, por exemplo, diisocianato de toluileno, diisocianato de bitoluileno,

diisocianato de dianisidina, diisocianato de tetrametileno, diisocianato de hexametileno, diisocianato de m-fenileno, diisocianato de m-xilileno, diisocianato de C₁-C₆ alquilbenzeno, diisocianato de 1-clorobenzeno, diisocianato de cicloexilmetano, 4,4'-diisocianato de 3,3'-dimetoxidifenilmetano, 2,4-diisocianato de 1-nitrobenzeno, 2,4-diisocianato de 1-alcoxibenzeno, diisocianato de etileno, diisocianato de propileno, 1,2-diisocianato de cicloexileno, diisocianato de 3,3'-dicloro-4,4'-bifenileno, diisocianato de difenileno, diisocianato de 2-clorotrimetileno, 1,2-diisocianato de butileno, diisocianato de etilideno, 4,4'-diisocianato de difenilmetano, diisocianato de difeniletano, diisocianato de 1,5-naftaleno, diisocianato de cicloexano e diisocianato de isoforona.

[0052] Particularmente, o composto de acordo com a invenção é obtenível pela reação de um diepóxido com, respectivamente, um grupo funcional livre do mediador de transporte T subjacente e pelo menos um grupo funcional livre do coloide P subjacente, que são selecionados independentemente de:

- grupo amino (-NH₂); ou
- grupo hidróxi (-OH);

para formar o agente de ligação Z, em que o dito coloide P e/ou mediador de transporte T é(são) ligado(s) com m unidades -(L-A).

[0053] Em particular, o 1,2,3,4-diepoxibutano ou 1,2,7,8-diepoxioctano provaram ser os diepóxidos adequados.

[0054] Os compostos, nos quais a ligação do mediador de transporte T e do coloide P é feita por aminação redutora, provaram ser particularmente vantajosos. Desse modo, particularmente, os compostos de acordo com a invenção são obteníveis por aminação redutora de um coloide P, tendo grupos amino livre ($-NH_2$) com um mediador de transporte T, tendo pelo menos um grupo aldeído ou ceto, e em que o coloide P e/ou o mediador de transporte T é(são) ligado(s) com m unidades $-(L-A)$.

[0055] No presente caso, o coloide P, tendo grupos amino, é selecionado, de preferência, do grupo consistindo de amido aminado, amido de hidroxietila aminado, amido de hidroxialquila e carboxialquila aminado e amido de carboxialquila aminado. Particularmente, prefere-se amido de hidroxietila aminado, que o próprio pode ser obtido, por exemplo, por aminação redutora.

[0056] Particularmente, os coloides P, ligados por aminação redutora com os mediadores de transporte T, incluem os mediadores de transporte selecionados do grupo de heparina ou derivados de heparina.

[0057] Em uma concretização particularmente preferida da presente invenção, o mediador de transporte T é heparina, e o coloide P é amido de hidroxietila, e o primeiro agente de ligação Z é um grupo $-NH$.

[0058] Como já mencionado acima, o segundo agente de ligação L é, de preferência, um grupo funcional selecionado de éster de ácido carboxílico, amida de ácido carboxílico, uretano, grupos

éter e amina, ou compreende pelo menos um desses grupos funcionais.

[0059] Ainda mais, vários coloides P também podem ser ligados pelas moléculas do agente de ligação L e/ou Z, para formar aglomerados maiores. Essa reação pode competir com a ligação de A e/ou T no coloide P. De acordo com a invenção, a razão dessas reações competidoras pode ser influenciada por modificação adequada do processo empregado. Isso pode ser feito mais simplesmente por variação da razão dos reagentes e substratos empregados e por modificação do peso molecular do coloide. Além disso, as condições reacionais, tais como temperatura, pressão e catalisadores, também influenciam a razão das duas reações.

[0060] O coloide P pode ter também um ou mais mediadores de transporte T ligados pelo primeiro agente de ligação Z. O número de mediadores de transporte T ligados com o coloide P é definido pelo parâmetro n. Em uma concretização preferida da presente invenção, n é um número inteiro de 1 a 10.000, de preferência, de 2 a 1.000, particularmente, de 5 a 500, especialmente, de 10 a 100.

[0061] Em outra concretização preferida da presente invenção, o mediador de transporte T e/ou o coloide P são ligados covalentemente, pelo segundo agente de ligação L, com A, isto é, a substância medicinalmente ativa ou o marcador fluorescente. Portanto, em uma concretização preferida da presente invenção, o parâmetro m é um número inteiro de pelo menos 1, de preferência, m é um número inteiro de 1 a 10.000, particularmente, de 2 a 1.000, mais particularmente, de 5 a 500, especialmente, de 10 a 100.

[0062] A presente invenção se refere ainda a uma formulação farmacêutica compreendendo o composto de acordo com a invenção.

[0063] A formulação farmacêutica de acordo com a invenção é, de preferência, uma formulação aquosa, e, particularmente, uma injetável. De preferência, o composto de acordo com a invenção está em uma concentração de 0,0001 a 50% em peso, especialmente, de 0,01 a 10% em peso, por exemplo, de 0,1 a 5,5% em peso, respectivamente, com base na composição total.

[0064] A presente invenção se refere ainda a um processo para preparar o composto de acordo com a invenção por ligação de um mediador de transporte T com um composto colóide ativo P, para formar um agente de ligação Z, pelo qual T e P são ligados covalentemente entre si, e em que o colóide P e/ou o mediador de transporte T é(são) ligados com m unidades -(L-A). Os significados de T, P, Z, L e A são iguais àqueles definidos acima.

[0065] Em uma concretização preferida do processo de acordo com a invenção, a ligação do mediador de transporte T e do colóide P é feita por aminação redutora.

[0066] No presente caso, prefere-se que, em uma primeira etapa, o colóide P, que é selecionado do grupo consistindo de amido aminado, amido de hidroxietila aminado, amido de hidroxialquila e carboxialquila aminado e amido de carboxialquila aminado, é reagido com um mediador de transporte T, selecionado do grupo de heparinas ou derivados de heparina, na presença de um agente redutor.

[0067] De preferência, o agente redutor é selecionado do grupo consistindo de LiAlH_4 , LiBH_4 , NaBH_4 e NaBCNH_3 .

[0068] Em outra concretização preferida do processo de preparação de acordo com a invenção, uma aminaçãõ redutora de um amido modificado, de preferência, um amido de hidroxietila ou um amido de carboximetila, é executada primeiro em uma etapa preliminar. A aminaçãõ redutora é executada vantajosamente com amônia ou hidróxido de amônio, na presença de um catalisador. Essa reação é, de preferência, executada em uma atmosfera de hidrogênio, sob pressão elevada, por exemplo, de 10 a 300 bar, de preferência, de 20 a 100 bar, e a temperaturas dentro de uma faixa de 50 a 300°C, de preferência, de 80 a 200°C. Os catalisadores níquel Raney ou cobalto/níquel são usados como os catalisadores.

[0069] O amido modificado aminado assim obtido pode ser subsequentemente ligado a um mediador de transporte, por exemplo, uma glicosaminoglicana, em outra reação de aminaçãõ redutora.

[0070] Em outra concretização do processo da presente invenção, o mediador de transporte T, de preferência, a glicosaminoglicana, especialmente, a heparina ou o derivado de heparina, é aplicado a um suporte carregado eletricamente em uma primeira etapa. Subsequentemente, a outra reação de acoplamento com o coloide P é conduzida, na qual o mediador de transporte T é deixado no suporte carregado. A aplicação do mediador de transporte ao suporte carregado provou ser vantajosa, uma vez que as regiões carregadas ionicamente do mediador de transporte T, especialmente da heparina ou de um derivado de heparina, vão

ser orientadas por elas mesmas no sentido do portador de carga, e, portanto, essas regiões são de difícil acesso para a reação de acoplamento com o coloide P. Desse modo, os domínios de ligação específicos do mediador de transporte podem ser obtidos seletivamente com esse processo.

[0071] Em uma concretização particular da presente invenção, a heparina ou um derivado de heparina é empregado como o mediador de transporte, e amido de hidroxietila ou amido de carboximetila é empregado como o coloide.

[0072] De preferência, a parte da molécula de heparina, intencionada para associação com o domínio de ligação da heparina, é associada com um corpo, de preferência, um corpo nanoestruturado, particularmente, um carregado positivamente, e mantido livre de ligação covalente na molécula de amido de hidroxietila e/ou amido de carboximetila. Por exemplo, para esse fim, uma placa de cobre pode ser revestida com um isolante e liberada da camada isolante em sítios selecionados por uso de um laser. É particularmente vantajoso se as estruturas de carga dos domínios de ligação de heparina forem detectadas por microscopia eletrônica de varredura, e, correspondentemente, os modelos de carga para a imobilização das moléculas de heparina são queimados na camada isolante. Também, a microscopia eletrônica de varredura pode ser usada para introduzir modelos de carga adequados para a camada isolante do corpo de associação. As aplicações correspondentes de tecnologia a laser são conhecidas daqueles versados na técnica. A aplicação do mediador de transporte a uma superfície carregada pode ser também feita diretamente por aplicação a outras moléculas carregadas

positivamente. São particularmente adequados para esse fim os polímeros fortemente carregados positivamente, que estão presentes na forma de um filme, como um polycation, sob as condições reacionais das sínteses, de acordo com a invenção. Nos agentes de ligação reagindo sob condições reacionais alcalinas, a quitosana, por exemplo, está presente como um polycation, ao qual a heparina é facilmente associada. Deve-se notar que, quando a heparina é ligada covalentemente ao coloide P, especialmente, amido de hidroxietila, uma ligação não vai ser formada entre um grupo funcional da quitosana e o polissacarídeo, mas apenas entre o amido de hidroxietila e a heparina.

[0073] A invenção vai ser ainda ilustrada pelos seguintes exemplos, mas sem ser limitada a eles.

Exemplos

Exemplo 1a (ligação de isotiocianato de fluoresceína acoplado a amido de hidroxietila (FITC-HES) com heparina)

[0074] 200 mg de heparina¹⁾ são dissolvidos em 10 mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato), pH 7,5, e a solução é pipetada em uma placa carregada positivamente com um gerador de Van de Graaf. A placa é mantida carregada por 1 semana, até que a solução tenha secado como um filme. Sobre o filme, pipeta-se e distribui-se por rotação 0,2 mL de 1,2,7,8-diepoxi octano (da ALFA-AESAR GmbH & Co. KG, Alemanha). De acordo com o método descrito por DeBelder e Granath²⁾, 80 mg de amido de hidroxietila (HES) [peso molecular médio: 50 kDa; DS = 0,4] são ligados covalentemente a unidades de isotiocianato de

fluoresceína (FITC-HES). O FITC-HES é dissolvido em 10 mL de uma mistura de 3 mL de NaOH 1 N e 7 mL de acetona, e deixado cair na placa carregada com agitação. A mistura é ajustada a um pH de 10 e agitada a cada 30 minutos em um ambiente escurecido. Após 12 horas, a solução é retirada, dialisada contra água e seca por congelamento, subsequentemente. O reagente é retomado em 10 mL de PBS, pH = 7,5. Em uma eletroforese, o produto de ligação migra significativamente mais rápido do que um FITC-HES não ligado à heparina.

Exemplo 1b (eficiência do compostos de FITC-HES-heparina de acordo com o Exemplo 1a)

[0075] 100 mg de substância seca do composto de FITC-HES-heparina sintetizado no Exemplo 1a) são dissolvidos em 5 mL de uma solução aquosa de NaCl a 0,9%, e a solução é injetada i.p. em um rato Wistar. Após 6 horas, o animal foi sacrificado sob anestesia, e os órgãos foram removidos.

[0076] Do baço, um pedaço de tecido de um tamanho de 0,6 x 0,8 cm foi tirado e colocado em formalina de um dia para o outro. Após uma série de etanol e uma série de benzoato de metila ascendentes, as seções tendo uma espessura de 6 - 8 μ m foram preparadas. As preparações foram observadas com um microscópio de fluorescência, a um comprimento de onda de 450 - 490 nm.

[0077] As Figuras 1 e 2 mostram uma forte fluorescência das células a um aumento de 20 vezes. As áreas brilhantes nas fotografias demonstram a absorção do complexo de HES-heparina marcado por fluorescência nas células de tecido do baço.

Exemplo 2 (ligação de amido de hidroxietila e carboximetila com heparina)

[0078] 200 mg de heparina¹⁾ são dissolvidos em água destilada e tratados como no Exemplo 1a). 10 mL de um amido de hidroxietila e carboximetila [DS para os grupos carboximetila = 0,06 e DS para os grupos hidroxietila = 0,34] a 6% são dissolvidos em 10 mL de uma solução de acetona em HCl a 0,1 N (3 mL de HCl 0,1 n e 7 mL de acetona) e adicionados conjuntamente com 0,2 mL de 1,2,7,8-diepoxioctano, seguido por agitação.

[0079] A mistura é ajustada a um pH de 3 a 4 por adição de uma solução de HCl / acetona e agitada a cada 30 minutos. Após 12 horas, a solução é retirada, dialisada contra água destilada e subsequentemente seca por congelamento.

Exemplo 3 (ligação de um HES aminado com heparina)

[0080] 200 g de um amido de hidroxietila (HES) [peso molecular médio $M_w = 50.000$; $DS = 0,3$] são colocados em um autoclave, conjuntamente com uma solução de hidróxido de amônio a 27% e 300 g de um catalisador de níquel / cobre / cromo, com uma proporção de níquel de 75%, uma proporção de cobre de 23% e uma proporção de cromo de 2%. Sob adição de hidrogênio, a autoclave é pressurizada por um período de 12 horas. A temperatura é ajustada a 220°C. Subsequentemente, a mistura é retirada, dialisada e seca por congelamento. 200 mg de heparina¹⁾ são dissolvidos em 5 mL de PBS, pH = 7,5 e pipetados em uma cápsula Petri, carregada positivamente com um gerador de Van de Graaff. 200 mg do amido aminado redutoramente são

dissolvidos em 10 mL de água destilada, e a solução é adicionada cuidadosamente. Depois, 0,025 mg de cianoboridreto de sódio, NaBH_3CN , é misturado. A cápsula Petri é agitada cuidadosamente. Após 2 horas, de novo 0,025 mg de cianoboridreto de sódio é adicionado, e a mistura é agitada cuidadosamente até que bolhas parem de subir. A adição de cianoboridreto de sódio é repetida quatro vezes do mesmo modo. Depois, o reagente é deixado em repouso por 72 horas; finalmente, é retomado em um excesso de PBS, $\text{pH} = 7,4$, dialisado e seco por congelamento.

Exemplo 4 (ligação de um HES aminado com heparina, seguida por reação com albumina humana)

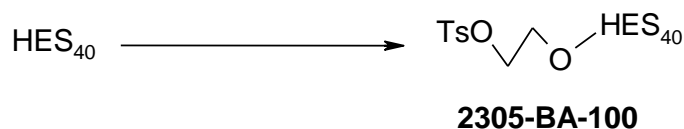
[0081] 200 g de um amido de hidroxietila (HES) [peso molecular médio $M_w = 50.000$; $DS = 0,3$] são colocados em um autoclave, conjuntamente com uma solução de hidróxido de amônio a 27% e 300 g de um catalisador de níquel / cobre / cromo, com uma proporção de níquel de 75%, uma proporção de cobre de 23% e uma proporção de cromo de 2%. Sob adição de hidrogênio, a autoclave é pressurizada por um período de 12 horas. A temperatura é ajustada a 270°C . Subsequentemente, a mistura é retirada, dialisada e seca por congelamento. 200 mg de heparina¹⁾ são dissolvidos em 5 mL de PBS, $\text{pH} = 7,5$ e pipetados em uma cápsula Petri, carregada positivamente com um gerador de Van de Graaff. 200 mg do amido aminado redutoramente são dissolvidos em 10 mL de água destilada, e a solução é adicionada cuidadosamente. Depois, 0,025 mg de cianoboridreto de sódio, NaBH_3CN , é misturado. A cápsula Petri é agitada cuidadosamente. Após 2 horas, de novo 0,025 mg de cianoboridreto de sódio é adicionado, e a mistura é agitada

cuidadosamente até que bolhas parem de subir. A adição de cianoboridreto de sódio é repetida quatro vezes do mesmo modo.

[0082] Depois, o reagente é deixado em repouso por 24 horas. Após carga renovada pelo gerador de Van de Graaff, 10 mg de albumina humana em 10 mL de PBS (pH = 7,5) são adicionados. Subsequentemente, 0,025 mg de cianoboridreto de sódio, NaBH₃CN, é misturado. A cápsula Petri é agitada cuidadosamente. A adição de 0,025 mg de cianoboridreto de sódio, NaBH₃CN, seguida por agitação, é repetida quatro vezes com e quatro vezes sem um gerador Van de Graaf operacional. O reagente é finalmente retomado em um excesso de PBS (pH 7,5), dialisado e seco por congelamento.

Exemplo 5 (liga de amido de hidroxietila com heparina por meio de hexano-1,6-diamina)

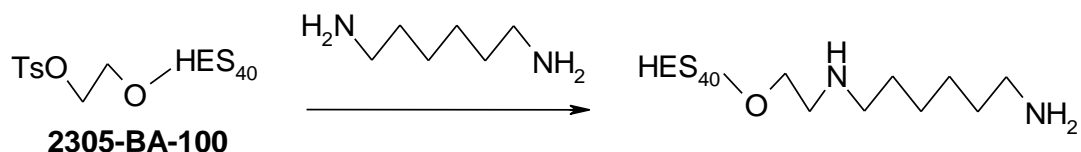
a) Tosilação do amido de hidroxietila



[0083] HES₄₀³⁾ (20 g) é suspenso em piridina (200 mL) e aquecido, sob refluxo, até que seja formada uma solução clara. Depois, a solução é resfriada a 0°C, e cloreto de tosila (19,4 g, 200 eq.) é adicionado em porções sob agitação, e a solução reacional é deixada aquecer lentamente à temperatura ambiente. Sob agitação, a solução reacional é adicionada à acetonitrila (500 mL). Imediatamente, um precipitado branco se forma, que é filtrado e seco à vácuo. A espuma branca obtida é coevaporada com acetonitrila três vezes, o resíduo é retomado em água destilada, e dialisada por 24 horas. Após remoção da água por

evaporação, o composto-título é obtido como um sólido incolor (2,6 g). Comparado com aquele de HES₄₀ puro, o espectro ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) mostra adicionalmente picos CH aromáticos simétricos, com uma variação química de 7 - 8 ppm, o que indica grupos tosila.

b) Substituição do HES tosilado com agente de ligação de amino



[0084] Uma solução de 2305-BA-100 (3,3 g) e hexanodiamina (10,0 g, 1.000 equ.) em DMF (5 mL) é agitada a 50°C de um dia para o outro, e depois desejada em acetona (300 mL). O sólido precipitado é filtrado e seco. Para purificação adicional, o produto bruto é dissolvido em água destilada e dialisado por 24 horas. Após remoção da água por evaporação, o produto de reação mencionado acima é obtido como um sólido incolor (1,5 g). Comparado com aquele da heparina, o espectro ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) mostra adicionalmente picos CH aromáticos, com uma variação química de 1 - 2 ppm, o que indica agente de ligação de amino.

c) Acoplamento de EDC⁴⁾, do produto de reação obtido na etapa b), com HEP¹⁾

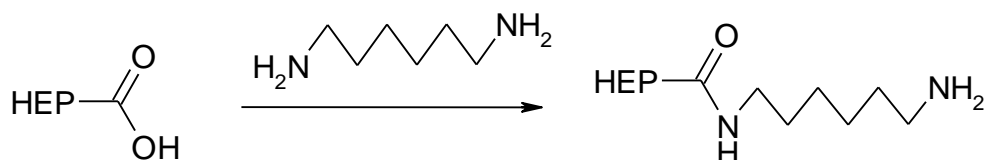


[0085] A uma solução de HEP (60 mg) e do produto obtido na etapa b) (200 mg), em água destilada (4 mL), cloreto de EDC⁴⁾ (80 mg, 100 equ.) é adicionado. A solução reacional é agitada à temperatura ambiente de um dia para o outro e depois despejada

em acetona (5 mL). O sólido precipitado é filtrado e seco. Para purificação adicional, o produto bruto é dissolvido em água destilada e dialisado por 24 horas. Após remoção da água por evaporação, o produto de ligação de HES e heparina, como mostrado no esquema de reação, é obtido como um sólido incolor (0,11 g).

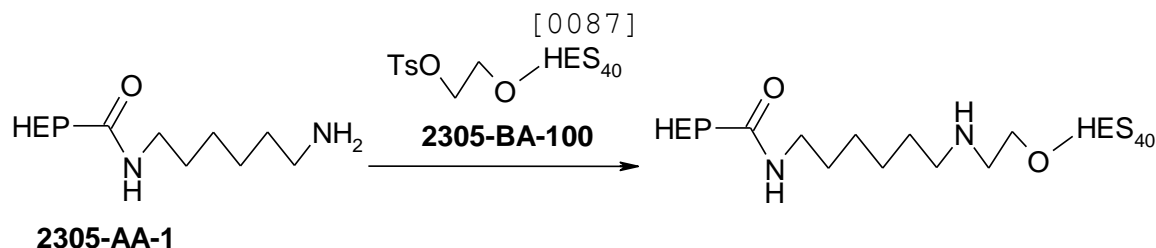
Exemplo 6 (ligação de amido de hidroxietila com heparina por meio de hexano-1,6-diamina)

a) Acoplamento de EDC⁴⁾ de heparina (HEP) com agente de ligação de amino



[0086] A uma solução de HEP (1,0 g) e hexano-1,6-diamina (0,8 g, 100 equ.), em água destilada (10 mL), cloreto de EDC⁴⁾ (14 g, 100 equ.) é adicionado. A solução reacional é agitada a 20°C de um dia para o outro e depois despejada em acetona (20 mL). O sólido precipitado é filtrado e seco. Por meio de LC-MS, determina-se que hexanodiamina não reagida esteja contida no produto de reação. Para purificação adicional, o produto bruto é dissolvido em água destilada e dialisado por 24 horas. Após remoção da água por evaporação, o produto de acoplamento, mostrado no esquema de reação, é obtido como um sólido incolor (0,8 g). Comparado com aquele da heparina, o espectro ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) mostra adicionalmente picos CH aromáticos, com uma variação química de 1 - 2 ppm.

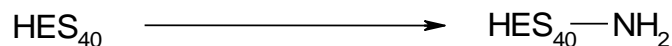
b) Substituição nucleofílica do produto de acoplamento, obtido na etapa a), com o HES tosilado do Exemplo 5, etapa a)



[0088] A uma suspensão de 2305-AA-1 (30 mg) e 2305-BA100 (100 mg, PM: cerca de 50 kDa) em DMSO (4 mL), Et₃N (0,003 mL, 100 equ.) é injetado, seguido por aquecimento a 80°C sob agitação. A mistura reacional é agitada por 6 horas e depois despejada em acetona (6 mL). O sólido precipitado é filtrado e seco. O composto-título é obtido como um sólido ligeiramente bege (0,1 g). Comparado com aquele da heparina, o espectro ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) mostra adicionalmente picos CH aromáticos, com uma variação química de 1 - 2 ppm.

Exemplo 7 (ligação de um amido de hidroxietila aminado com heparina por aminação redutora)

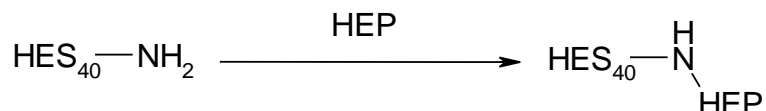
a) Aaminação do amido de hidroxietila (HES)



[0089] HES₄₀ (5,1 g, PM: 40 kDa) é dissolvido em uma solução aquosa de hidróxido de amônio (100 mL, 22%). O catalisador, consistindo de níquel (5,6 g, 325 malhas), cromo (0,15 g, 100 malhas) e cobre (1,8 g, 1 μm), é adicionado à solução. A mistura é agitada sob uma atmosfera de hidrogênio a 120°C em uma autoclave, por 48 horas. Após resfriamento a 20°C, o catalisador é filtrado, e o filtrado é despejado em etanol (20

mL). O sólido precipitado é filtrado, lavado com pouco etanol / água e seco. O HES aminado é seco como um sólido ligeiramente azulado (1,2 g).

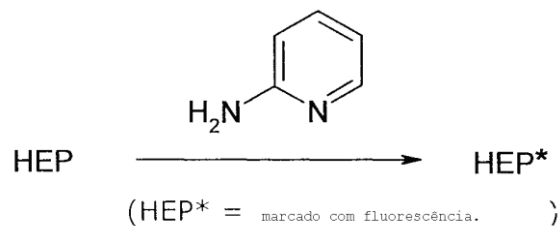
b) Aminoação redutora do HES aminado, obtido na etapa a), com heparina



[0090] HEP (200 mg) é dissolvido em uma solução aquosa de tampão de fosfato (5 mL, pH = 7,5), e uma solução do marcador fluorescente aminado, da etapa a) (200 mg), em água destilada (10 mL), é adicionada gota a gota. A intervalos de 2 horas, NaCNBH₃ é adicionado seis vezes (0,025 mg cada, de uma mistura-padrão aquosa) à solução reacional. A mistura reacional é de novo agitada a 20°C por 2 horas. Para purificação adicional, o produto bruto é dialisado por 24 horas. Após remoção da água por evaporação, o produto de ligação de heparina e amido de hidroxietila aminado, como mostrado no esquema de reação, é obtido como um sólido incolor (250 mg).

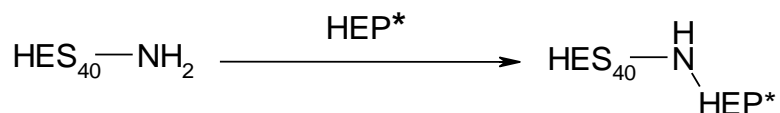
Exemplo 8 (ligação de uma heparina marcada com fluorescência com um amido de hidroxietila (HES) aminado por aminoação redutora)

a) Acoplamento de heparina (HEP) com o marcador de fluorescência 2-aminopiridina



[0091] A uma solução de 2-aminopiridina (31,7 g, 0,33 mol, 1.000 equ.) e NaCNBH₃ (2,1 g, 0,033 mol, 100 equ.) em formamida (50 mL), heparina (5,0 g) é adicionada. A suspensão obtida é agitada a 37°C de um dia para o outro, e uma solução clara é formada lentamente. A solução reacional é despejada em EtOH (50 mL). O sólido precipitado é filtrado e seco. O produto de acoplamento (HET*), mostrado no esquema reacional, é obtido como um sólido ligeiramente bege (1,3 g). Tanto em solução aquosa quanto em sólido, o produto de acoplamento mostra uma intensa fluorescência azul-púrpura, quando irradiada com luz UV a 366 nm. Comparado com aquele da heparina, o espectro ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) mostra adicionalmente picos CH aromáticos, com uma variação química de 6,6 - 7,8 ppm, o que indica substituintes de piridina típicos.

b) Ligação da heparina marcada com fluorescência (HEP*), preparada na etapa a), com o amido de hidroxietila aminado, preparado no Exemplo 7, etapa a), por aminação redutora



[0092] HEP* da etapa a) (200 mg, peso molecular médio: 15 kDa) é dissolvida em uma solução aquosa de tampão de fosfato (5 mL, pH = 7,5), e uma solução do HES aminado, do Exemplo 7, etapa a), (200 mg), em água destilada (10 mL), é adicionada

gota a gota. A intervalos de 2 horas, NaCNBH₃ é adicionado três vezes (0,025 mg cada, de uma mistura-padrão aquosa) para a solução reacional. A mistura reacional é de novo agitada a 20°C por 2 horas. Para purificação adicional, o produto bruto é dialisado por 24 horas. Após remoção da água por evaporação, o produto de ligação de HES aminado e heparina marcada com fluorescência é obtido como um sólido incolor (200 mg).

[0093] Tanto em solução aquosa quanto em sólido, o produto de acoplamento mostra uma intensa fluorescência azul-púrpura, quando irradiada com luz UV a 366 nm. Comparado com aquele da heparina, o espectro ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) mostra adicionalmente picos CH aromáticos, com uma variação química de 7,0 - 7,8 ppm, o que indica substituintes de piridina típicos.

Exemplo 9 (ligação do produto obtido no Exemplo 5, etapa b) com a heparina marcada com fluorescência do Exemplo 8, etapa a) por acoplamento usando EDC⁴⁾)



[0094] A uma solução de HEP* (Exemplo 8, etapa a)) (60 mg) e do produto reacional do Exemplo 5, etapa b) (160 mg), em água destilada (4 mL), cloreto de EDC (80 mg, 100 equ.) é adicionado. A solução reacional é agitada a 20°C de um dia para o outro e seca. Para purificação adicional, o produto bruto é dissolvido em água destilada e dialisado por 24 horas. Após remoção da água por evaporação, o produto de ligação desejado, de acordo com o esquema de fórmulas apresentado acima, é obtido como um sólido incolor (0,1 g).

[0095] Tanto em solução aquosa quanto em sólido, o produto de acoplamento mostra uma intensa fluorescência azul-púrpura, quando irradiada com luz UV a 366 nm. Comparado com aquele da heparina, o espectro $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) mostra adicionalmente picos CH aromáticos, com uma variação química de 7,0 - 7,8 ppm, o que indica substituintes de piridina típicos.

¹⁾ Heparina (também abreviada como HEP): o sal sódico foi empregado (de origem suína), pH = 7, M_w médio = 12 - 15 kDa, fabricante: Changzhou Qianhong Bio-Pharma Co., Ltd., Jiangsu, China.

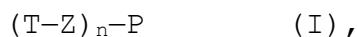
²⁾ A.N. De Belder e Kirsti Granath; Carbohydrate Research, 30 (1973), 375-378.

³⁾ HES₄₀: Amido de hidroxietila tendo um peso molecular médio M_w = 40 kDa, grau de substituição DS = 0,3; fabricante: BBraun, Crissier, Suíça.

⁴⁾ EDC: cloreto de N-dimetilaminopropil-N-etilcarbodiimida

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula geral (I)



caracterizado pelo fato de que:

- T é um mediador de transporte de glicosaminoglicana;
- P é um composto coloide ativo selecionado a partir de amido de hidroxialquila e amido de carboxialquila;
- Z é um primeiro agente de ligação, por meio do qual T e P são ligados covalentemente conjuntamente; e
- n é um número inteiro de pelo menos 1;

e em que o mediador de transporte T e/ou o coloide P porta m grupos $-(L-A)$, em que:

- A é uma substância medicinalmente ativa ou um marcador fluorescente;
- L é um segundo agente de ligação, pelo qual P é ligado covalentemente a A, ou pelo qual T é ligado covalentemente a A; e
- m é um número inteiro de pelo menos 1;

em que o dito composto medicinalmente ativo A é selecionado a partir do grupo consistindo de antibióticos, agentes quimioterapêuticos, agentes citostáticos e substâncias citotóxicas.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o dito mediador de transporte T é uma glicosaminoglicana selecionada a partir do grupo consistindo de heparina e sulfato de heparina.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que a dita glicosaminoglicana é heparina ou sulfato de heparina com menos de 6 unidades sacarídeas.

4. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o dito composto coloide ativo é selecionado do grupo consistindo de amidos de hidroxialquila, amidos de carboxialquila, amido de hidroxialquila e carboxialquila, amido de hidroxialquila aminado, amido de hidroxialquila e carboxialquila aminado e amido de carboxialquila aminado.

5. Composto, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o dito composto coloide ativo é selecionado de amido de hidroxietila ou amido de hidroxietila aminado.

6. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 4 ou 5, **caracterizado** pelo fato de que o composto coloide ativo P tem um peso molecular médio de 20.000 a 800.000 daltons, de preferência, de 25.000 a 500.000 daltons, especialmente de 30.000 a 200.000 daltons.

7. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 4 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o grau

de substituição, DS, do amido de hidroxietila é de 0,2 a 0,8, de preferência, de 0,3 a 0,6.

8. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que o dito marcador fluorescente é selecionado do grupo consistindo de isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina, rodâmina e 2-aminopiridina.

9. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que é obtível por uma reação de aminação redutora de um coloide P, tendo grupos amino livre (-NH₂) selecionados a partir de um grupo consistindo de amido aminado, amido de hidroxialquila aminado, amido de hidroxialquila e carboxialquila aminado e amido de carboxialquila aminado com o dito mediador de transporte T de glicosaminoglicana, tendo pelo menos um grupo aldeído ou ceto, e em que o coloide P e/ou o mediador de transporte T é(são) ligado(s) com m unidades -(L-A).

10. Composto, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o dito mediador de transporte é heparina ou derivado de heparina.

11. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o dito mediador de transporte T é heparina, e o dito coloide P é um amido de hidroxietila, e o primeiro agente de ligação Z é um grupo -NH.

12. Formulação farmacêutica **caracterizada** pelo fato de que compreende o composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 11.

13. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** pelo fato de que a dita formulação é aquosa e injetável.

14. Processo para preparar um composto de fórmula geral (I), conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que é por ligação de um mediador de transporte T de glicosaminoglicana com um composto colóide ativo P selecionado a partir de amido de hidroxialquila e amido de carboxialquila, para formar um agente de ligação Z, pelo qual T e P são ligados covalentemente entre si, e em que o colóide P e/ou o mediador de transporte T é(são) ligados com m unidades -(L-A).

15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que, em uma primeira etapa, o colóide P, que é selecionado do grupo consistindo de amido aminado, amido de hidroxialquila aminado, amido de hidroxialquila e carboxialquila aminado e amido de carboxialquila aminado, é reagido com um mediador de transporte T, selecionado do grupo de heparinas ou derivados de heparina, na presença de um agente redutor selecionado do grupo consistindo de LiAlH_4 , LiBH_4 , NaBH_4 e NaBH_3CN .

FIGURA 1

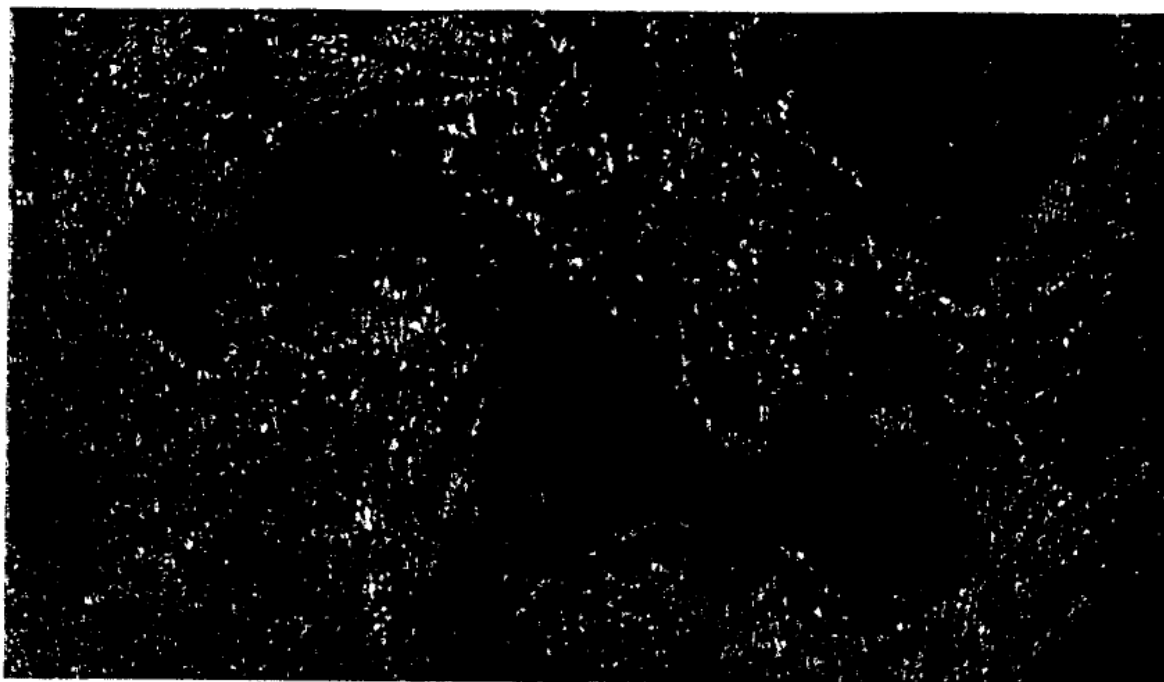
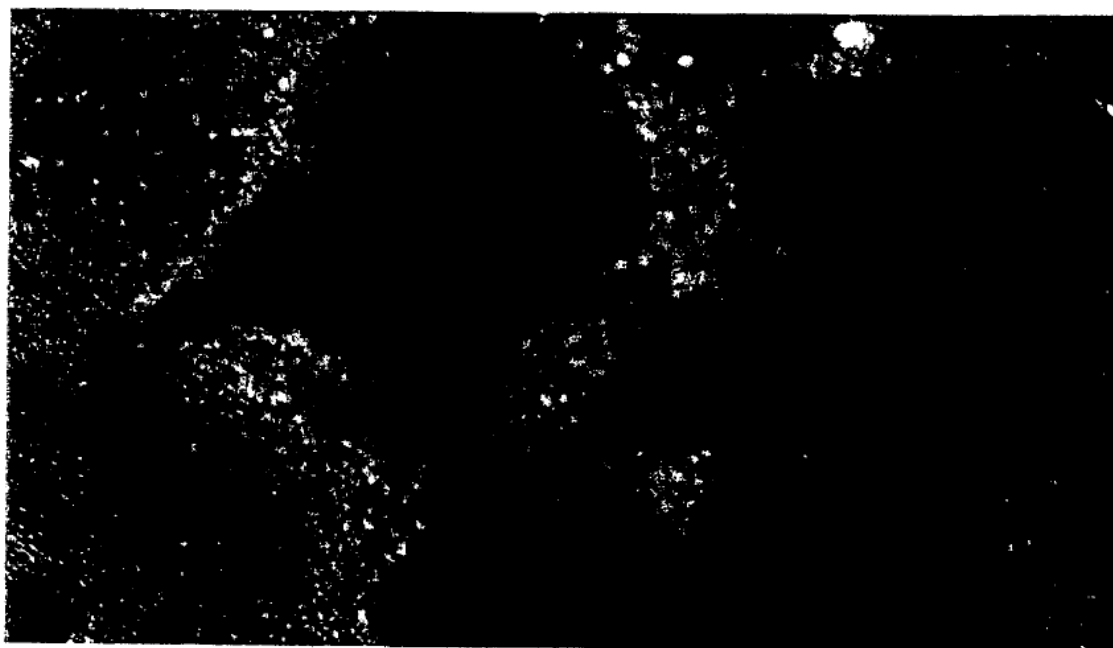


FIGURA 2



RESUMO

COMPOSTO DE FÓRMULA GERAL (I) $(T-Z)_n-P$ (I), FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E PROCESSO PARA PREPARAR UM COMPOSTO DE FÓRMULA GERAL (I)

A invenção se refere a coloides ligados a mediadores de transporte, compreendendo substâncias farmacêuticas ou marcadores fluorescentes, a um processo para a produção deles, e a uma preparação farmacêutica compreendendo os ditos compostos.